

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT
ET DE L'ENVIRONNEMENT

-U. F. R. de CHIMIE-

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline : Biophysique et Biologie Structurale

par

Juan Lopez

ETUDE DE L'AGREGATION DES PROTEINES INTRINSEQUEMENT
DÉSORDONNEES IMPLIQUÉES DANS LES MALADIES D'ALZHEIMER
ET DE PARKINSON

Soutenue publiquement le 27 janvier 2015

Directeur de Thèse : Dr Guy Lippens et Pr Philippe Cotelle

Membres du Jury

Bernhard Brutscher	DR CEA (IBS - Grenoble)	President / Rapporteur
Fabien Ferrage	CR CNRS (ENS - Paris)	Rapporteur
Veerle Baekelandt	PR (KU - Leuven)	Examineur
Arnaud Leroy	MC (Paris - Sud)	Co-Encadrant
Philippe Cotelle	PR (ENSCL - Lille)	Directeur de Thèse
Guy Lippens	DR CNRS (UGSF - Lille)	Directeur de Thèse

Remerciements

Tout d'abord, je suis infiniment reconnaissant envers tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer mon travail de thèse.

Que Madame le Professeur V. Baekelandt et Messieurs les Docteurs B. Brutscher, F. Ferrage, A. Leroy soient remerciés du temps qu'ils consacreront à lire ce manuscrit.

Je voudrais également remercier l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer pendant toutes ces années passées au laboratoire. Nos échanges m'ont permis de beaucoup réfléchir sur mon engagement à faire de la science.

Premièrement, le Dr Caroline Smet-Nocca dont j'ai eu l'opportunité de suivre les cours de RMN et qui a ouvert ma curiosité pour l'étude des protéines.

Le Dr Isabelle Landrieu qui m'a encadré et formé pendant mon stage de master.

Le Dr Bernd Fritzing qui m'a initialement formé sur le spectromètre RMN.

Le Dr Xavier Hanouille qui m'a aidé à résoudre plusieurs problèmes techniques, avec qui j'ai eu de nombreuses discussions qui m'ont beaucoup aidé, à la fois sur le plan théorique, mais également sur le plan technique.

Un spécial grand merci au Dr Arnaud Leroy qui m'a tout appris de la spectroscopie optique. Je le remercie pour son soutien et surtout d'avoir pris énormément de son temps pour m'expliquer les différents aspects techniques et théoriques de cette science. Son enthousiasme restera gravé à jamais dans ma mémoire et je l'entends encore me dire : « tant que l'on n'a pas essayé, on ne peut pas savoir ». Ses précieux conseils scientifiques et autres me seront, à coup sûr, toujours utiles et je garderai indéfectiblement en mémoire sa bonne humeur.

Au Pr Philippe Cotelle pour son soutien et sa disponibilité, tout au long de ces années de thèse.

Je remercie énormément le Dr Guy Lippens pour sa transparence et son soutien tout le long de ma thèse, pour m'avoir non seulement tout appris de la RMN et de la biologie structurale, mais aussi toutes les facettes du métier de scientifique. D'avoir pris le temps de m'expliquer la théorie et de répondre à mes innombrables questions. Un grand merci à lui de m'avoir laissé énormément de liberté pour explorer différents sujets qui très très souvent

s'éloignaient de mon sujet principal. Même si, dans plusieurs cas, cela n'a pas abouti, les connaissances techniques et théoriques que j'ai pu en tirer me sont aussi précieuses que tout ce qui a abouti. Je le remercie surtout pour sa passion scientifique et son incommensurable enthousiasme, qui n'ont fait qu'augmenter le mien.

Une spéciale dédicace pour mes compagnons de bureau, Amina Kamah, Pauline Bellanger, le Dr Isabelle Huvent et les nouveaux arrivants, Luiza Mamigonian-Bessa et Clément Desprès ainsi que mes anciens compagnons les Dr Puneet Ahuja et Dr Guy Lippens. Grâce à leur humour, on ne s'est jamais ennuyé.

Je ne peux oublier également les nouveaux arrivants qui ne partagent pas notre bureau. Le Dr Robert Schneider et le Dr Idir Malki, avec qui j'espère pouvoir partager une fois ma thèse terminée.

Merci à Amina pour plusieurs de nos discussions et pour son esprit critique qui m'ont beaucoup rassuré scientifiquement.

Grand merci au Dr Isabelle Huvent qui a généré le mutant Tau F4-C291S-C322 ainsi que les dimères de TAU présentés dans cette thèse. Je la remercie pour sa sympathie, ses conseils, ses cours de bon français, de m'avoir toujours donné un coup de main dans le laboratoire et surtout transmis toutes ses petites astuces en biochimie. Cette dernière, Amina et auparavant Puneet, avec leur humour et anecdotes ont toujours mis l'ambiance dans le bureau.

Je remercie le Dr François-Xavier Cantrelle qui court dans tous les sens, mais qui, toujours, trouve du temps pour donner un coup de main. Il m'a aidé à résoudre tous les problèmes qu'il est possible d'imaginer sur le spectromètre, allant de la régulation de la température, de la saturation du signal de lock, des problèmes avec les gradients, les amplificateurs, bref tout ce qui peut arriver sur cette formidable machine. Je le remercie également de m'avoir beaucoup aidé à implémenter plusieurs séquences d'impulsion.

Merci aussi à Emmanuelle Boll et François-Xavier, leur humour m'a fait passer d'excellents moments dans la froideur de l'institut Pasteur.

Je remercie Marie Dujardin, le Dr Hélène Launay, le Dr Puneet Ahuja pour les différentes discussions techniques et souvent théoriques qui m'ont beaucoup servi à comprendre certains phénomènes. Grand merci à Puneet qui m'a non seulement appris la théorie mais aussi la pratique des *Long Lived States* en RMN.

Comment ne pas citer également Haoling Qi, le Dr Riccardo Peruzzini, le Dr Morkos Henen avec qui j'ai eu d'excellents échanges, malheureusement l'éloignement de nos bâtiments respectifs a fait que nous ne nous sommes pas vus aussi souvent que je l'aurais souhaité.

Je voudrais également remercier le Dr Mélanie Gérard de l'université de Leuven à Kortrijk (Belgique) avec qui j'ai collaboré sur le projet de l'alpha-synucléine.

Je suis également reconnaissant envers tous mes copains pour leur soutien. Et surtout un grand merci à ceux qui ont lu ma thèse et corrigé mes nombreuses fautes d'orthographe.

Enfin, je ne peux oublier mes proches, ma mère, mon père, mes frères et toute ma famille, pour leur soutien inconditionnel.

Je dédie donc cette thèse à toutes et tous avec qui j'ai pu partager des moments de ma vie.

A ma mère, à mon père, à ma famille et à mes amis.

« L'évolution scientifique, comme l'évolution tout court (biologique) se fait par essais, par erreurs. Eliminer l'erreur, réfuter nos hypothèses, la nature s'en charge: nos hypothèses fausses échouent »

Bertrand SAINT-SERNIN

« L'homme est en même temps un être solitaire et un être social. Comme être solitaire il s'efforce de protéger sa propre existence et celle des êtres qui lui sont le plus proches, de satisfaire ses désirs personnels et de développer ses facultés innées. Comme être social il cherche à gagner l'approbation et l'affection de ses semblables, de partager leurs plaisirs, de les consoler dans leurs tristesses et d'améliorer leurs conditions de vie. C'est seulement l'existence de ces tendances variées, souvent contradictoires, qui explique le caractère particulier d'un homme, et leur combinaison spécifique détermine dans quelle mesure un individu peut établir son équilibre intérieur et contribuer au bien-être de la société. Il est fort possible que la force relative de ces deux tendances soit, dans son fond, fixée par l'hérédité. Mais la personnalité qui finalement apparaît est largement formée par le milieu où elle se trouve par hasard pendant son développement, par la structure de la société dans laquelle elle grandit, par la tradition de cette société et son appréciation de certains genres de comportement. Le concept abstrait de "société" signifie pour l'individu humain la somme totale de ses relations, directes et indirectes, avec ses contemporains et les générations passées. Il est capable de penser, de sentir, de lutter et de travailler par lui-même, mais il dépend tellement de la société " dans son existence physique, intellectuelle et émotionnelle " qu'il est impossible de penser à lui ou de le comprendre en dehors du cadre de la société. (...) Je suis maintenant arrivé au point où je peux indiquer brièvement ce qui constitue pour moi l'essence de la crise de notre temps. Il s'agit du rapport entre l'individu et la société. L'individu est devenu plus conscient que jamais de sa dépendance de la société. Mais il n'éprouve pas cette dépendance comme un bien positif, comme une attache organique, comme une force protectrice, mais plutôt comme une menace pour ses droits naturels, ou même pour son existence économique. En outre, sa position sociale est telle que les tendances égoïstes de son être sont constamment mises en avant, tandis que ses tendances sociales qui, par nature, sont plus faibles, se dégradent progressivement. Tous les êtres humains, quelle que soit leur position sociale, souffrent de ce processus de dégradation. Prisonniers sans le savoir de leur propre égoïsme, ils se sentent en état d'insécurité, isolés et privés de la naïve, simple et pure joie de vivre. L'homme ne peut trouver de sens à la vie, qui est brève et périlleuse, qu'en se dévouant à la société.» « C'est le devoir de chaque homme de rendre au monde au moins autant qu'il en a reçu »

Albert EINSTEIN

Abréviation :

AS : Alpha synucléine

Ca : Carbone alpha

Cb : Carbone beta

CD : *Circular dichroism*

DLS : *Dynamic light scattering*

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DTT : Dithiothréitol

FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

GST : *Glutathione S transferase*

Hn-N NOE : *Proton-nitrogen heteronuclear NOE*

HSQC : *Heteronuclear single quantum coherence*

IDP : Protéine intrinsèquement désordonnée

IDR : Domaine intrinsèquement désordonné

IR : inter-répétition

Kapp : Constante de vitesse apparente

LBs : Lewy Bodies

MA : Maladie d'Alzheimer

MAP : *Microtubule Associated Protein*

MP : Maladie de Parkinson

MPT : Modifications post-traductionnelles

MT : Microtubule

MTBR : *Microtubule binding repeats*

NAC : *Non Aβ amyloïde component* (⁷¹VTGVTAVAQKTV⁸¹)

NOE : *Nuclear Overhauser effect*

NOESY : *Nuclear Overhauser effect spectroscopy*

NOTO : NOESY-TOCSY

PHF : *Paired helical filaments*

PHF6 : ³⁰⁶VQIVYK³¹¹

PHF6* : ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰

PKA : Protéine kinase A

PPM : Partie par million

R : répétitions

Relax-EXSY : *Relaxation exchange spectroscopy*

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SAXS : *Small-angle X-ray scattering*

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

TAU : *Tubuline-Associated Unit*

TAU 411 : Isoforme longue de TAU (411 acides aminés)

TAU F4 : Fragment F4 de TAU (S208-S324)

THS : Thioflavine S

THT : Thioflavine T

TMSP : Trimethylsilyl propanoic acid

TOCSY : *Total correlated spectroscopy*

TONO : TOCSY-NOESY

Résumé

Face au vieillissement accru de la population, les maladies neurodégénératives sont désormais un problème de santé publique majeur. Dans plusieurs cas, les dépôts amyloïdes sont constitués de fibres d'IDP (« *intrinsically disordered protein* »), comme par exemple le peptide A β dans les plaques séniles et TAU dans les PHF retrouvés dans la maladie d'Alzheimer, ou encore l'Alpha synucléine dans les corps de Lewy retrouvés dans la maladie de Parkinson. Dans ces maladies, l'accumulation de fibres amyloïdes est au cœur des mécanismes de neurodégénérescence. Ainsi, comprendre les mécanismes biologiques qui mènent à la formation de ces fibres peut permettre d'envisager le développement de marqueurs capables d'identifier à un stade précoce ces pathologies, de molécules capables de ralentir ou d'arrêter leur progression.

Ces travaux de thèse vont, dans une première partie, développer les nouvelles méthodologies appliquées à l'étude des IDPs par RMN. Dans une deuxième partie, ils s'attacheront à mieux comprendre les mécanismes d'agrégation de deux IDPs très impliquées dans des maladies neurodégénératives. Le premier cas étudié sera celui de la protéine TAU, impliquée dans la maladie d'Alzheimer, et le deuxième cas sera celui d'Alpha synucléine, impliquée dans la maladie de Parkinson.

Abstract

Due to population aging, neurodegenerative diseases have become a major public health problem. In many cases, the amyloid deposits are composed of IDP (Intrinsically disordered protein) fibers, as A β peptide in senile plaques and TAU in the PHF found in Alzheimer's disease, or Alpha synuclein in Lewy bodies found in Parkinson's disease. The accumulation of amyloid fibers is at the heart of the mechanisms of neurodegeneration. The understanding of the biological mechanisms that lead to the formation of the fibers may allow novel treatments and / or molecules that slow or stop the progression of these diseases.

Firstly, in this thesis, we will develop new methodologies to study IDPs by NMR. In the second part, we will seek to better understand the mechanisms of aggregation of two IDPs involved in neurodegenerative diseases. The first case will be the aggregation of TAU protein in Alzheimer's disease and the second case will be the aggregation of Alpha synuclein in Parkinson's disease.

1) Introduction générale	11
1.1) Introduction sur les protéines intrinsèquement désordonnées (IDP)	11
1.1.1) Définition des IDPs et IDRs	13
1.1.3) Nuage conformationnel	15
1.1.3) Mode d'interaction des IDPs et IDRs	16
1.1.3.1) Interaction par sélection de conformation	17
1.1.3.2) Interaction par induction de la conformation	18
1.1.3.3) Interaction dynamique	18
1.1.3.4) Complexe structuré et complexe dynamique	20
1.1.4) Rôle biologique des IDPs et IDRs	22
1.1.4.1) <i>Linker</i> ou chaîne entropique	23
1.1.4.2) Site de modification post-traductionnelle	23
1.1.4.3) Fonction effectrice	24
1.1.4.4) « <i>Scavenger</i> » (piégeur)	25
1.1.4.5) Assemblage de complexe	26
1.1.4.6) Chaperonne	26
1.2) Introduction sur les fibres amyloïdes	27
1.2.1) Structure des fibres amyloïdes	27
1.3) Implication des IDPs dans des maladies neurodégénératives	31
2) Développement de méthodologie RMN pour l'étude des IDPs	32
2.1) Attribution des spectres RMN	32
2.1.1) « <i>A new strategy for sequential assignment of intrinsically unstructured proteins based on ¹⁵N single isotope labelling</i> »	34
2.1.2) Attribution complète de TAU	41
2.2) Caractérisation d'épitope d'anticorps par RMN	42
2.3) Nouvelles méthodologies pour mesurer des échanges proton deutérium rapides	44
2.3.1) « <i>H/D exchange of a ¹⁵N labelled Tau fragment as measured by a simple Relax-EXSY experiment</i> »	44
3) Développement de modèles d'agrégation de TAU pour tester des inhibiteurs	58
3.1) Introduction sur la maladie d'Alzheimer	58
3.2) Introduction sur la protéine TAU	59
3.2.1) Description des domaines de TAU	62
3.2.1.1) Le domaine MTBR	62
3.2.1.2) Le domaine riche en proline	62
3.2.1.3) Les extrémités N-terminale et C-terminale	62
3.2.2) Modifications post-traductionnelles	63
3.3) Les modèles d'agrégation <i>in vitro</i>	64
3.3.2) Les tests d'inhibition par fluorescence	66
3.3.3) " <i>Primuline fluorescence detects early aggregates of the Tau-P301L protein devoid of cystein residues</i> "	68
3.4) Mise en place d'un nouveau test pour sonder l'inhibition de la phase de nucléation	89
3.4.1) Résultats	91
3.4.1.1) Caractérisation du dimère de TAU F4-C291S-C322	91
3.4.1.2) Caractérisation de l'interaction PHF6-PHF6 dans le dimère TAU F4-C291S-C322	95
3.4.2) Conclusions et perspectives	100
4) Etude de l'agrégation d'AS induit par FKBP12	101

4.1) Introduction sur la maladie de Parkinson	101
4.2) Introduction sur la protéine Alpha Synucléine	102
4.2.1) Structure	102
4.2.2) Le rôle physiologique de l'Alpha Synucléine.....	104
4.2.3) Interaction avec la membrane plasmique.....	104
4.2.5) Interaction d'AS avec la dopamine et ses dérivés	106
4.3) Agrégation d'AS.....	106
4.4) Interaction d'Alpha Synuclein avec les FKBP12.....	108
4.4.1) Introduction.....	108
4.4.2) Interaction entre AS et FKBP12 <i>in vitro</i>	110
4.4.2.1) Activité proline <i>Cis-Trans</i> isomérase.....	112
4.4.2.2) Cartographie de l'interaction	114
4.4.2.3) Conclusion	119
4.4.3) Etude de l'agrégation d'AS par différentes techniques biophysiques	119
4.4.3.1) Modèle en secouant	120
4.4.3.2) Modèle d'agrégation induit par FKBP12 sans secouer	123
4.4.3.3) Cinétique d'agrégation par RMN :	127
4.5) Conclusion	140
4.5.1) Hypothèse sur l'agrégation d'AS induit par FKBP12.....	140
4.5.2) Perspective	141
5) Conclusion générale	142
ANNEXE 1 : Utilisation du logiciel du Dr Verdegem pour l'attribution d'IDPs	144
ANNEXE 2 : Table des déplacements chimiques des résonances de TAU 441 (spectre ¹ H- ¹⁵ N HSQC).....	155
ANNEXE 3 : « <i>Tau Monoclonal Antibody Generation based on Humanized Yeast Models: Impact on Tau Oligomerization and Diagnostics</i> »	160
ANNEXE 4 : Stratégie d'attribution du spectre ¹ H- ¹⁵ N Ha(Ca)N.....	195
ANNEXE 5 : Expression et purification des protéines	197
Expression des protéines.....	197
Purification des protéines	197
Reference :	200

1) Introduction générale

1.1) Introduction sur les protéines intrinsèquement désordonnées (IDP)

Depuis plusieurs décennies la science cherche à comprendre les phénomènes biologiques au niveau moléculaire. Très vite les biologistes comprennent que plusieurs des fonctions biologiques sont portées par des protéines. En 1953, la biologie moléculaire fait un grand saut grâce aux travaux de Max Perutz et John Kendrew qui déterminent la première structure protéique. Ils déterminent la structure de l'hémoglobine par diffraction des rayons X. L'étude structurale de l'hémoglobine permettra d'élucider sa fonction dans le transport de l'oxygène. C'est ainsi que naît la biologie structurale, dont le but est de déterminer la structure d'une biomolécule, afin de comprendre son mécanisme d'action.

Ce paradigme Séquence primaire – Structure – Fonction va pendant très longtemps gouverner la biologie structurale avec comme principale arme la diffraction des rayons X. Cette vision de la biologie permettra de comprendre certains des plus importants mécanismes biologiques comme la réponse immunitaire, les mécanismes cataboliques et métaboliques. Dans cette même ligne de pensée, Emil Fisher développe le modèle de la clé et la serrure (figure 1) pour expliquer la stéréospécificité de l'activité enzymatique[1].

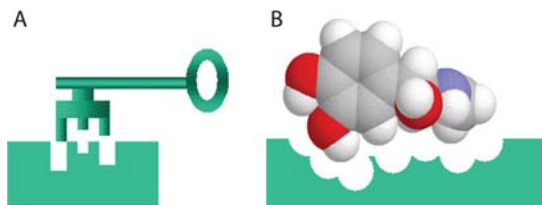


Figure 1: (A) Modèle de la clé et la serrure pour expliquer la stéréospécificité de l'activité enzymatique. (B) Le modèle suppose que le substrat s'ajuste au site de liaison de l'enzyme comme une clé dans une serrure. Figure extraite de Habchi *et al.* [2].

Selon ce paradigme, nous pouvons définir une protéine comme une chaîne d'acides aminés qui se replie dans l'espace pour adopter une structure tridimensionnelle unique qui lui confère ses propriétés biologiques. La perte de sa structure tridimensionnelle conduirait à la perte de sa fonction biologique. Durant le repliement, les chaînes latérales des acides aminés non polaires ont tendance à s'enfouir à l'intérieur de la structure de façon à constituer le "cœur" hydrophobe de la protéine. Les chaînes latérales des acides aminés polaires ou chargés (hydrophiles) ont tendance à être à la surface de la protéine et accessibles au solvant. Cette structure compacte serait liée à un minimum

énergétique et les protéines oscilleraient autour de cette position grâce à leur énergie thermique [3] [4] [5].

Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDP) s'opposent frontalement à ce paradigme puisqu'elles présentent une absence de structure tridimensionnelle. Cette absence de structure tridimensionnelle ne constitue en aucun cas une perte de fonction biologique. Au contraire, les protéines désordonnées sont justement celles qui interagissent avec le plus grand nombre de partenaires [2] [6].

Dès les débuts de la biologie structurale, il y a eu un certain nombre d'indices sur l'existence des IDPs et IDRs (domaines intrinsèquement désordonnés). Notamment, certaines structures déterminées par cristallographie présentent des zones de densité électronique manquantes. On pensait alors que ces zones correspondaient à des défauts dans les cristaux. En réalité, la plupart de ces régions sont mal définies à cause de la mobilité du domaine protéique. Dû aux différents positionnements du domaine, le signal de diffraction sera alors différent pour chaque maille du cristal résultant d'une perte de cohérence.

Certaines publications visionnaires avaient déjà intégré la notion de protéine non structurée et de complexe dynamique. Ainsi Kirschner propose en 1977 puis en 1991 que la protéine TAU (*Tubulin-Associated Unit*) est fonctionnelle sans structure tridimensionnelle définie [7] [8]. La capacité de TAU à polymériser et stabiliser la tubuline serait liée à une interaction coopérative étendue, qui implique une très large région de la protéine. Il émet l'hypothèse que TAU lie les microtubules (MTs) par des petites unités de répétition et que l'énergie de liaison aux microtubules dérive d'une série d'interactions faibles de ces petites unités d'acides aminés. Cette caractéristique inhabituelle suggère que la protéine TAU peut adopter plusieurs conformations, et même se déplacer le long des microtubules ce qui a été vérifié en 2013 par Konzack *et al.* [9]. Kirschner conclut également en extrapolant sur les années à venir, et émet l'hypothèse que d'autres protéines comme TAU seront découvertes.

En 1999, Wright et Dyson popularisent la notion d'IDP dans une revue qui rassemble les différentes données de l'époque [10], notamment les études de Romero *et al.* qui prédisent que plus de 15 000 protéines référencées dans la base de données SwissProt contiennent des régions intrinsèquement désordonnées (IDR) d'au moins 40 acides aminés consécutifs [11]. Des études génomiques conclurent postérieurement qu'un grand nombre de gènes coderaient pour des IDPs [12] [13].

Dans le cas des IDPs, la séquence primaire détermine directement l'absence de structure 3D plutôt que leur repliement [14]. Des études statistiques

de séquence ont confirmé qu'en condition physiologique, il existe une corrélation directe entre le nombre de charges, le nombre de résidus hydrophobes et la nature désordonnée de la protéine [15] [16]. Depuis la découverte des IDPs et IDRs, il y a eu un développement massif de logiciels prédicteurs de désordre comme SEG [17], Globplot [18], Dis-EMBL [19], NORSp [20], FoldIndex [21], HCA (Hydrophobic Cluster Analysis) [22], PreLink [23], IUPred [24] [25], RONN [26], DISpro [27], Spritz [28], PrDOS [29], etc.

1.1.1) Définition des IDPs et IDRs

Pour parler des IDPs, il faut définir une notion importante qu'est la notion d'ensemble conformationnelle « *random coil* ». Nous pouvons définir l'ensemble conformationnelle « *random coil* » comme un ensemble de conformations en échange dynamique au sein desquelles les positions et les angles (Ramachandran) relatifs des acides aminés fluctuent de façon perpétuelle et explorent toutes les conformations stériquement permises. Chaque conformation stériquement permise aura alors le même minimum énergétique. C'est-à-dire que l'exploration conformationnelle de chaque acide aminé ne dépendra que de sa nature et de la nature des acides aminés situés en position $i+1$ et $i-1$.

Les IDPs et IDRs n'ont pas de structure bien définie et présentent une absence de structure d'équilibre. Leur structure est un ensemble hétérogène de conformères et leurs propriétés conformationnelles ne peuvent pas être définies par un ensemble unique de coordonnées ou d'angles dièdres (Ramachandran). Contrairement à l'ensemble conformationnelle « *random coil* », les IDPs et IDRs n'explorent pas toutes les conformations stériquement permises, ou du moins pas avec la même probabilité. On peut considérer l'ensemble conformationnelle « *random coil* », comme le cas le plus extrême des IDPs. Par opposition aux protéines structurées, la structure tridimensionnelle des IDPs ne fluctue pas autour d'une conformation d'équilibre mais fluctue entre plusieurs conformations différentes. Néanmoins, toutes les conformations explorées n'ont pas le même minimum énergétique, ce qui veut dire qu'il y aura certaines conformations préférentielles. La barrière énergétique entre ces différentes conformations est souvent inférieure à l'énergie due à l'agitation thermique. C'est pour cette raison que la protéine peut passer très rapidement d'une conformation à une autre. En effet, ces protéines sont hautement dynamiques mais peuvent également présenter des structurations secondaires ou tertiaires transitoires plus ou moins stables.

En réalité, il n'y a pas dans la nature de séparation nette entre les IDPs et les protéines globulaires. On y trouve un continuum de structures qui vont de l'ensemble conformationnelle « *random coil* » à des structures très rigides et compactes (figure 2). Tous ces états structuraux sont interconnectés et une protéine peut passer d'un état à un autre [15] [16].



Figure 2 : Le schéma représente les différents niveaux de désordre structural. De gauche à droite: protéine globulaire très rigide; protéine globulaire avec les extrémités N- et C-terminales désordonnées; protéine globulaire avec une boucle désordonnée; protéine globulaire avec un *linker* désordonné, protéine globulaire partiellement désordonnée; protéine non structurée avec des domaines résiduels structurés; protéine non structurée non étendue; protéine complètement désordonnée. Les régions structurées sont représentées en gris tandis que les régions non structurées sont représentées en rouge. Figure extraite de Habchi *et al.* [2].

Certains IDPs peuvent comporter un nombre considérable de conformères présentant des structurations secondaires et/ou tertiaires [2] [15] [16] [30] [31] [32] [33]. Tous ces conformères sont en échange avec des dynamiques plus ou moins lentes. Nous pouvons évoquer le cas du mutant A39G du domaine FF de HYPA/FBP11 qui présente une conformation structurée en échange lent avec la forme IDP [34]. Les différents facteurs physico-chimiques vont alors définir les états structuraux et la dynamique de la protéine. La modification de l'environnement physico-chimique (température, pH, salinité, pression...) ainsi que la présence de partenaires d'interaction (partenaire protéique, ligand, substrat, inhibiteur, membrane plasmique...) ou les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation, acétylation ...) vont modifier l'état structural d'une protéine et la faire basculer d'une conformation à une autre. Par exemple, une variation importante du pH fait basculer la protéine α -lactalbumine d'une conformation structurée classique à une conformation plus ou moins IDP [35].

1.1.3) Nuage conformationnel

Avec la découverte des IDPs naît une nouvelle vision de l'activité protéique et un nouveau défi pour la biologie structurale. Comme pour se rattacher à l'ancien paradigme Structure-Fonction, les biologistes structuralistes se lancèrent dans l'étude de l'ensemble de conformations en échange dynamique, également appelé nuage conformationnel [36]. Cette vision rejoint l'ancien paradigme Structure-Fonction mais rajoute une nouvelle composante : la fluctuation temporelle de la structure ; on désigne quelque fois les IDPs comme protéines à structure 4D (3 dimensions spatiales plus une dimension temporelle [36]). L'hypothèse est la suivante : si on détermine le nuage conformationnel, ainsi que la dynamique, nous pourrions comprendre et prédire l'activité des IDPs. Cette hypothèse est sûrement vraie d'un point de vue strictement théorique (selon la loi du déterminisme, si on connaît exhaustivement un système nous pouvons prédire son évolution) mais aucune étude n'est capable d'atteindre une telle précision du système. Dans l'état actuel des connaissances, on ne sait pas si cette vision des IDPs va se révéler pertinente.

Plusieurs techniques permettent de faire une description grossière du nuage conformationnel (CD, DLS, SAXS, FRET, RMN...). Grâce à ces techniques, nous pouvons établir la présence de structures secondaires résiduelles, des contacts longue distance, connaître le rayon hydrodynamique moyen et avoir une idée sur la dynamique locale. Mais il est très difficile de connaître complètement la dynamique et l'échange conformationnel exact ainsi que la durée de vie des structures secondaires, des contacts longue distance (structure tridimensionnelle) et du caractère concomitant et/ou séquentiel des structures.

La principale stratégie pour caractériser l'ensemble conformationnel consiste à extraire les conformations les plus représentatives du nuage conformationnel et considérer que celui-ci peut être défini à partir de ces conformations préférentielles [37]. Cette hypothèse est très controversée et sûrement trop réductrice car la dynamique qui gouverne l'interconversion entre les différents conformères peut également être déterminante [38]. Néanmoins, dans certains cas, l'étude des conformations préférentielles peut s'avérer suffisante pour comprendre l'activité biologique de certaines IDPs [30].

La détermination des conformations privilégiées peut être estimée par dynamique moléculaire sous contrainte expérimentale [39]. La sélection des conformères décrivant les données expérimentales peut être réalisée par des algorithmes de sélection tels que ENSEMBLE et ASTEROIDS [40] [41]. Les

processus de calcul commencent le plus souvent par générer un ensemble de conformères aléatoires, échantillonnant l'espace de conformations. L'algorithme FLEXIBLE-MECCANO est très utilisé pour générer un ensemble de structures en accord avec les données expérimentales [42]. Les algorithmes sélectionnent ensuite un ensemble de conformations qui sont en accord avec les contraintes expérimentales et qui seraient celles qui représentent le mieux le nuage conformationnel. Cette approche souffre énormément de la difficulté à obtenir des contraintes expérimentales suffisantes ainsi que du nombre élevé de combinaisons de structures transitoires qui peuvent satisfaire les données expérimentales. Un autre problème important est qu'il faut considérer plusieurs modèles théoriques pour pouvoir modéliser correctement les données expérimentales.

1.1.3) Mode d'interaction des IDPs et IDRs

Le manque de structures stables confère aux IDPs une grande adaptabilité de liaison et une grande diversité de liaison avec des partenaires multiples [2] [43] (figure 3).

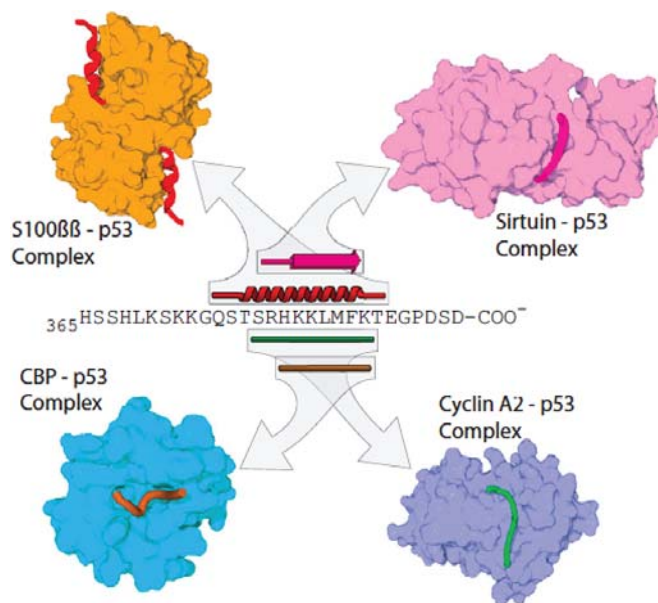


Figure 3 : Structure des complexes d'interaction du domaine C-terminal de p53. En haut à gauche : le complexe C-ter p53 avec S100ββ (le domaine C-ter de p53 se structure en hélice alpha) ; en haut à droite : le complexe C-ter p53 avec Sirtuine (le domaine C-ter p53 présente une structuration en feuillet beta) ; en bas à gauche : le complexe avec CBP ; en bas à droite : le complexe avec Cycline A2. Dans les deux derniers complexes (avec CBP et Cycline) le domaine C-ter p53 interagit sans former de structure secondaire régulière mais

les deux interactions restent très différentes. Figure extraite et modifiée de Oldfield *et al.* [43].

Un exemple clair de l'adaptabilité de liaison des IDPs est l'exemple du domaine C-terminal de p53 qui est impliqué dans l'interaction avec divers partenaires. Cependant, il va présenter une structure de liaison très différente dans chaque complexe [43] (figure 3). La protéine p53 induit ou inhibe plus de 150 gènes et sa perte de fonction est souvent liée à des processus cancéreux [43]. p53 est un acteur clé dans un grand réseau de signalisation cellulaire, impliquant l'expression d'une multitude de gènes importants pour la régulation du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, la réparation de l'ADN, la réponse au stress cellulaire, etc [43]. La figure 3 montre quatre complexes impliquant le domaine C-ter de p53. Dans chaque complexe le domaine C-ter de p53 va adopter une structuration complètement différente. Cette grande adaptabilité de liaison explique en partie la grande diversité d'activités biologiques de p53. On surnomme souvent ce genre d'IDRs « domaines caméléons », car ils peuvent acquérir des structures très diverses lors de leurs interactions [6] [44].

Un défi important pour comprendre les mécanismes de liaison des IDPs est de clarifier davantage le rôle des sous-états conformationnels et la façon dont ces sous-états régulent la fonction biologique. Leur description en terme de nuage de conformation peut aussi être insuffisante car il pourrait exister trois modes d'interaction : l'interaction par sélection de conformation, l'interaction par induction de conformation et l'interaction dynamique. Bien entendu, l'interaction peut également être un mélange de ces différents modes. Selon que les IDP adoptent ou non une structure en interaction, on peut les classer grossièrement dans deux types de complexe : les complexes structurés et les complexe non-structurés.

1.1.3.1) Interaction par sélection de conformation

Dans beaucoup de cas, les IDPs restent non structurés dans les complexes [2] [6] [45], mais dans de nombreux cas on les retrouve sous forme de structure stable [2] [6] [46]. Des structures résiduelles ont été fréquemment observées dans les IDPs, et curieusement, on retrouve ces mêmes structures résiduelles dans plusieurs complexes [2] [6] [47]. Par exemple, des études structurales ont démontré que le nuage conformationnel d'Alpha Synucléine (AS) a une forte tendance à former des hélices alpha amphipathiques. Cette même structure est retrouvée dans le complexe d'AS avec la membrane plasmique [48]. Ces observations ont conduit à une hypothèse très attractive où le mécanisme de liaison passerait par une sélection de la conformation. Cette hypothèse veut que

seul le sous-état avec la bonne conformation puisse lier son partenaire. Par conséquent, les structures résiduelles sont au cœur de l'interaction car c'est grâce à elles que se fait la reconnaissance moléculaire [49]. D'un point de vue cinétique, ce mode de liaison est très inefficace car l'étape limitante est le repliement de la protéine.

1.1.3.2) Interaction par induction de la conformation

Au cours des dernières années, beaucoup d'études ont démontré que certaines IDPs forment des liaisons non spécifiques de nature désordonnée [2] [6]. Ces liaisons peuvent être de haute affinité et jouent un rôle central dans la reconnaissance moléculaire [43] [50]. Mais les mécanismes d'interaction sont beaucoup moins clairs. Un des mécanismes proposés est appelé le « *fly-casting* ». Comme la liaison non spécifique désordonnée est sans doute plus étendue, elle pourrait augmenter le rayon de capture pour améliorer la cinétique de liaison [51] [52]. C'est après la reconnaissance non spécifique que la protéine se replie pour former un complexe stable [53]. Ce mode de liaison est cinétiquement optimal car il est seulement limité par la diffusion moléculaire [54].

1.1.3.3) Interaction dynamique

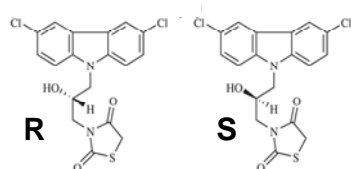
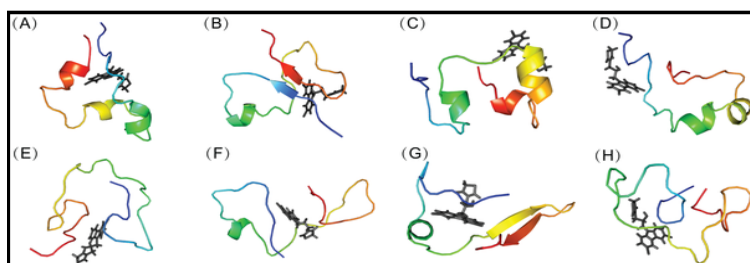
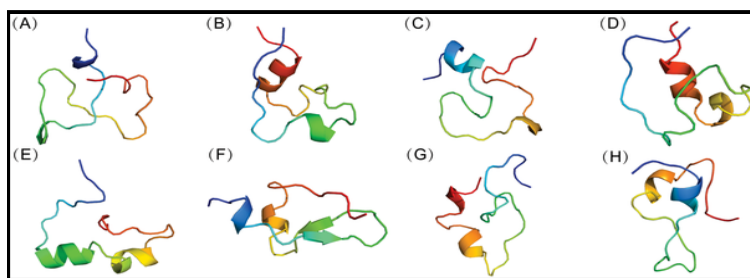


Figure 4 : En haut, le nuage conformationnel d'apo c-Myc370–409 représenté par ces conformations préférentielles (les populations des différentes conformations sont estimées : A 10.5%, B 8.6%, C 7.8%, D 6.4%, E 6.1%, F 4.5%, H 3%) [55] ; Au milieu : le nuage interactionnel d'apo c-Myc370–409 avec le ligand 10074-A4 représenté par ses conformations préférentielles (les populations des différentes conformations sont estimées : A 14.3%, B 13.9%, C 13.7%, D 10.4%, E 7.5%, F 6.9%, H 5.2%) [55] ; En bas : représentation des énantiomères R et S du ligand 10074-A4 [55]. Figure extraite et modifiée de Jin *et al.* [55].

Beaucoup d'IDPs ne forment pas de « complexe structuré » (au sens classique du terme) et leurs liaisons peuvent être très dynamiques et multi-sites. A l'instar de la notion de nuage conformationnel, nous parlerons alors de nuage interactionnel [55]. Nous pouvons décrire la liaison dynamique comme un nuage conformationnel en interaction avec le ligand. La figure 4 illustre l'interaction entre le peptide apo c-Myc370–409 et un ligand (10074-A4). Apo c-Myc370-409 se lie fortement au ligand avec une multitude de sites d'interaction [55] (figure 4). Même si cette liaison est non localisée, elle peut être très spécifique : par exemple apo c-Myc370-409 a plus d'affinité pour l'énantiomère S du ligand que pour l'énantiomère R [55] (figure 4).

Un point souvent négligé pour comprendre les interactions des IDPs avec leurs partenaires sont les interactions électrostatiques. La majorité des IDPs présente des pH isoélectriques extrêmes (exemple TAU pI 8.24, ou Alpha-Synucléine pI 4.67). L'interaction entre les sous-unités structurées inter ou intramoléculaires ainsi que les interactions hydrophobes sont des interactions tridimensionnellement bien définies [56]. Leurs minima énergétiques de liaison correspondent à une structure tridimensionnelle bien précise. Contrairement à ce mode d'interaction, l'interaction électrostatique ne dépend que de la distance entre les charges. Pour deux charges, l'énergie d'interaction est la même dans une sphère de rayon constant. Dans le cas de plusieurs charges nous devons prendre en compte la distance relative entre chaque charge.

La contribution électrostatique peut-être attractive ou répulsive et ceci aussi bien pour les domaines d'une même protéine ou pour des partenaires dans un complexe. Ces phénomènes électrostatiques peuvent être responsables de structures résiduelles et/ou d'une diminution du rayon hydrodynamique [57]. Dans le cas d'interaction avec des partenaires, elles peuvent grandement contribuer à l'énergie de liaison [58] comme dans le cas de l'interaction de TAU avec l'héparine [59]. Un exemple clair de l'importance de l'interaction électrostatique est l'interaction entre NCBD (*Nuclear Co-activator Binding Domain*) de CBP et le domaine ACTR (*Activation Domain of the Nuclear*

Hormone Receptor Coactivator) [57] [60]. Ces deux IDRs présentent de nombreuses charges qui vont interagir électrostatiquement pour stabiliser le rapprochement moléculaire et par la suite, permettre le repliement synergique des deux domaines pour former un complexe structuré [57].

Dans le cas des interactions protéiques, les biologistes structuralistes cherchent à comprendre le mode d'interaction afin de pouvoir intervenir dans le mécanisme, en inhibant ou en stabilisant cette interaction. Concernant la sélection de conformation, l'étude du nuage conformationnel peut nous renseigner sur la présence de la structure biologiquement active ainsi que sur la dynamique d'interconversion entre les différentes structures. Ces données peuvent nous permettre de modifier l'efficacité de la liaison ainsi que la cinétique par l'ajout de ligand ou par des modifications post-traductionnelles qui vont stabiliser ou déstabiliser la structure biologiquement active.

Concernant l'induction de structure et l'interaction dynamique, on peut se poser la question de l'intérêt d'une étude sur le nuage conformationnel. Dans le cas de l'induction de conformation, la conformation biologiquement active peut être un conformère très minoritaire, voire inexistant et dans le cas de l'interaction dynamique il n'existe pas de conformation biologiquement active mais un ensemble de conformations biologiquement actives. Dans le but d'inhiber ou stabiliser le complexe, l'étude de la protéine en dehors de son complexe pourrait donc s'avérer très inefficace.

1.1.3.4) Complexe structuré et complexe dynamique

Nous allons comparer les complexes structurés et les complexes dynamiques à travers deux exemples impliquant un même partenaire du cytosquelette, la tubuline. La protéine TAU ainsi que la Stathmine sont deux IDPs qui se lient fortement au microtubule (affinité de l'ordre du nanomolaire) mais présentent des modes de liaison et des fonctions diamétralement opposés.

La Stathmine est une petite IDP qui, au contact de la tubuline, va se structurer en un « *beta hairpin* » et en une longue hélice qui va complexer deux hétérodimères de la tubuline [61] [62] [63]. Ce complexe présente une courbure incompatible avec l'incorporation de la tubuline dans les microtubules [63], inhibant ainsi la polymérisation des microtubules par séquestration de la tubuline. De plus, la séquestration des tubulines situées à l'extrémité du microtubule va induire la dépolymérisation. De façon très imagée, la Stathmine va peler le microtubule comme on pèle une banane (figure 5). En solution, la Stathmine est non structurée mais des analyses par CD et RMN ont démontré

que la conformation qui lie la tubuline est présente de façon résiduelle (résultats démontrés dans le laboratoire mais non publiés). Dans le cas des IDP, il est très difficile de savoir si la structuration a lieu avant l'interaction (seule la forme structurée interagit) ou si c'est l'interaction qui induit la structuration de l'hélice.

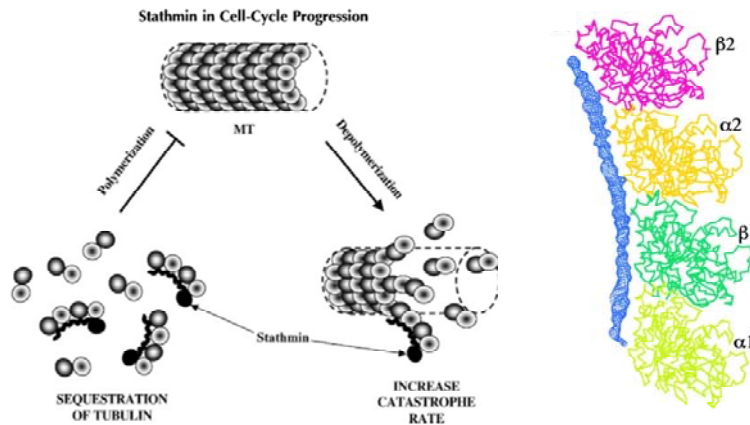


Figure 5 : A gauche, un schéma représentant le rôle de la Stathmine dans la régulation et la dynamique des microtubules. La Stathmine est représentée en noir et l'hétérodimère de tubuline est représenté par une sphère gris clair (beta tubuline) et une sphère gris foncé (alpha tubuline). Figure extraite de Rubin *et al.* [61]. A droite, la structure cristalline du domaine RB3-SLD de la Stathmine (en bleu) en complexe avec deux tubulines. Figure extraite et modifiée de Gigant *et al.* [63].

TAU est une longue IDP qui polymérise la tubuline en microtubules et qui les stabilise [64] [65] ; son interaction avec les microtubules est extrêmement différente de l'idée classique d'interaction. TAU se lie fortement au microtubule [66] avec ses régions N- et C-terminales en saillie extérieure, mais elle ne présente aucune structuration stable lors du complexe. De plus, elle diffuse extrêmement vite tout le long de la surface du microtubule [9] [67] [68] (figure 6). L'interaction avec des résidus chargés négativement de la tubuline (queue polyglutamate) contribue grandement à l'affinité et à la mobilité de la protéine [69] [70].

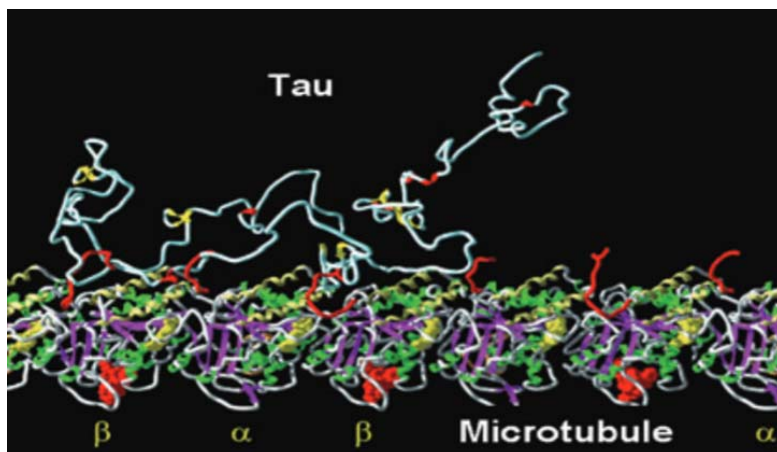


Figure 6 : Interaction de TAU avec les microtubules. Figure extraite et modifiée de Mandelkow *et al.* [71].

On peut, de façon très imagée, se représenter cette interaction comme une chenille qui se déplace le long d'une branche (figure 6). Plusieurs équipes ont étudié le nuage conformationnel de TAU [31] [33] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] mais aucun résultat ne permet de prédire ou d'expliquer son mode de liaison au microtubule. Mukrasch *et al.* assurent que de faibles structurations en feuillet beta présentes dans TAU seraient indispensables à la liaison au microtubule [79], mais ces structures n'ont pas été détectées dans le complexe TAU : tubuline [80].

Ces différents modes d'interaction des IDPs démontrent clairement les limites du paradigme Structure-Fonction pour expliquer l'activité biologique.

1.1.4) Rôle biologique des IDPs et IDRs

Comme cela a été vu précédemment, dans la nature, il existe de nombreuses protéines et domaines intrinsèquement désordonnés. Des études sur les génomes des bactéries, des archées et des eucaryotes ont démontré que leur pourcentage augmente avec la complexité de l'organisme [2] [12] [13] (avec 30% d'IDRs de plus de 40 acides aminés chez les eucaryotes, 4% chez les bactéries et 2% chez les archées [13]). Les IDPs et IDRs sont impliquées dans plusieurs mécanismes biologiques. Elles sont très représentées dans des catégories fonctionnelles comme: la différenciation, la transcription, les régulations de la transcription, la spermatogenèse, la condensation de l'ADN, la régulation des cycles cellulaires, l'épissage de l'ARN, la mitose, l'apoptose, le transport des protéines, et la méiose [2]. Dans d'autres catégories fonctionnelles,

on trouve très peu IDPs et IDRs comme dans la biosynthèse des acides aminés, le transport d'électrons, la biosynthèse de lipides, le catabolisme d'hydrocarbures aromatiques, la glycolyse, la biosynthèse de purines et pyrimidines, le métabolisme des glucides, et la biosynthèse de lipopolysaccharides [2]. En règle générale, les IDPs et IDRs sont fortement impliquées dans les voies de signalisation et régulation des fonctions biologiques, mais elles sont très peu représentées dans les fonctions enzymatiques [2]. Nous pouvons classer les IDPs ou IDRs par leur fonction biologique en 5 catégories :

1.1.4.1) *Linker* ou chaîne entropique

Le premier rôle fonctionnel est un rôle structural. Les IDRs peuvent servir de *linker* flexible entre deux domaines fonctionnels. Cette distance entre les deux domaines fonctionnels peut réguler l'activité de la protéine. Ces *linkers* présentent souvent des transitions entre des formes structurées et « *random coil* » qui vont moduler l'activité protéique ainsi que l'allostérie [81]. La dynamique et/ou la structuration de ces *linkers* peuvent aussi être modulées par l'interaction avec des ligands ou des modifications post-traductionnelles [2].

Certaines IDPs vont avoir des rôles constitutifs dans des complexes moléculaires. Elles peuvent servir à maintenir l'espacement entre des complexes, comme par exemple la protéine MAP2 qui va réguler stériquement la distance entre deux microtubules adjacents [82].

D'autres IDPs peuvent jouer le rôle de *cross linker*, comme par exemple la protéine MAP65-1, qui va *cross linker* les filaments de tubuline par dimérisation [83].

Une autre fonction constitutive peut être l'aide à la solubilisation [44]. Par exemple, NEIL1, un homologue humain de la ADN glycosylase endonucléase VIII, de *E. coli* présente un domaine C-terminal désordonné (106 derniers acides aminés). Ce domaine définit la solubilité de la protéine, étant donné que, sans ce domaine, la protéine est complètement insoluble [84].

1.1.4.2) Site de modification post-traductionnelle

Les MPT (modifications post-traductionnelles) de protéines sont des modifications chimiques réversibles ou irréversibles d'une chaîne polypeptidique qui se produisent après la traduction. La gamme de MPT s'étend de l'addition

covalente de groupes chimiques comme des lipides, des glucides, des acides aminés ou même des protéines entières, ou clivage de certains domaines peptidiques ou même l'isomérisation de certaine fonction chimique (exemple de MPT : phosphorylation, acétylation, acylation, adénylation, ADP ribosylation, l'amidation, carboxylation, formylation, glycosylation, méthylation, sulfatation, ubiquitination, Proly *Cis-Trans* isomérisation, etc...). Chez les eucaryotes, les modifications post-traductionnelles sont un des principaux mécanismes de régulation de la fonction biologique des protéines et jouent des rôles fondamentaux dans la régulation du repliement des protéines, leur clivage, leur translocation, leur interaction, ainsi que leur état de fonctionnement, tels que l'activité catalytique [85] [86]. Plusieurs de ces modifications sont réversibles et subissent une forte régulation par de nombreuses enzymes comme la phosphorylation, qui est régulée par un grand nombre de kinases et phosphatases (CDK, ERK, GSK, PP1, PP2A...). Certaines protéines nécessitent plusieurs types de modifications post-traductionnelles pour être fonctionnelles [87] et certaines MPTs peuvent être concurrentielles pour le même site, comme par exemple la phosphorylation et la O-glycosylation [88]. Ceci rajoute un niveau supplémentaire de complexité à la régulation de l'activité biologique.

De par leur grande flexibilité et leur facilité d'accès, les sites de MPTs sont en immense majorité des IDRs. Un exemple spectaculaire de régulation par MPT est fourni par les queues IDRs des histones. L'activité des histones est régulée par un « *pattern* » complexe de MPTs (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, ADP-ribosylation, et SUMOylation) à différents stades de leur action biologique, régulant ainsi la stabilité du nucléosome, les interactions histone-ADN et histone-histone [89]. On peut parler à juste titre d'un « code histone ».

1.1.4.3) Fonction effectrice

Les fonctions effectrices des IDPs sont probablement les plus faciles à interpréter en terme de paradigme Structure-Fonction, car elles résultent de la liaison et de la modification de l'activité du partenaire, soit par inhibition, soit par activation de sa fonction biologique [6]. Il existe de nombreux exemples de cette fonction des IDPs. Par exemple, l'interaction d'Alpha ou Beta Synucléine avec la phospholypase PLD2 inhibe son activité catalytique [90]. Un autre exemple est l'inhibition de l'activité de YPrA (*Yeast proteinase A*) par interaction avec IA3 (*Inhibitor of yeast proteinase A*) [91] [92].

Les IDPs peuvent être impliquées dans un grand nombre de complexes et avoir des rôles antagonistes (activateur de certains complexes et inhibiteur

d'autres complexes). Par exemple la TB4 (*Thymosin Beta 4*) inhibe la polymérisation de l'actine G [93], mais peut également activer la kinase ILK (*integrin-linked kinase*) [94].

1.1.4.4) « *Scavenger* » (piégeur)

Les IDPs peuvent également piéger certaines molécules et aider à leur transport, leur solubilisation ou leur précipitation. Par exemple, les glycoprotéines salivaires riches en proline (PRGs) constituent environ les deux tiers des protéines totales dans la salive [95]. La fonction clé des PRGs est de piéger et neutraliser les composés polyphénoliques végétaux, comme par exemple les tannins [96] [97]. Les tannins possèdent plusieurs propriétés bénéfiques pour le corps (activité antioxydante, vasoconstrictrice, anti-inflammatoire...) mais également des activités néfastes comme l'inhibition de certains enzymes de l'appareil digestif. Les PRGs complexent les tannins et permettent leur transport dans le tube digestif tout en empêchant leur activité inhibitrice délétère [6].

Un autre exemple très important est la complexation du calcium par les caséines du lait. Dans le lait, le phosphate de calcium peut atteindre des concentrations élevées (20 à 30 mM). A ces concentrations, le phosphate de calcium n'est pas soluble dans l'eau, et sa précipitation aurait des effets délétères sur la glande mammaire. Les caséines vont donc complexer le calcium pour éviter sa précipitation [6].

On accorde dernièrement de plus en plus d'intérêt à la coordination des métaux par les IDPs. Il a été démontré que les IDPs peuvent non seulement servir à piéger des métaux, mais aussi devenir des espèces réactives [98] et, dans certains cas, aider à la régulation de la concentration des métaux dans les compartiments cellulaires [99]. Dans le cas des métalloprotéines structurées, on observe souvent un seul site de liaison de haute affinité. Pour la plupart des IDPs, l'affinité pour les métaux est plus faible et l'interaction est dynamique et multi-sites. Par exemple, le peptide A β , a une affinité faible avec plusieurs sites de coordination pour le Cu (I / II) et le Zn (II). La coordination de Cu (I / II) par le peptide A β est très dynamique et les échanges sont très rapides entre des coordinations intrapeptidiques et interpeptidiques [98]. Cette interaction suscite de plus en plus d'intérêt, en raison de son rôle potentiel dans la maladie d'Alzheimer, où il a été démontré que les plaques amyloïdes A β sont fortement enrichies en métal Cu et Zn [98]. Cette interaction A β /métal a un fort impact sur la réactivité des métaux. Chaque conformation a des propriétés redox différentes,

et seules quelques conformations sont capables de réagir avec l'oxygène et peuvent jouer un rôle dans le stress oxydatif [98].

AS est une autre IDP qui peut coordonner des ions métalliques. Mais, sous certaines conditions, elle pourrait également jouer un rôle de canal ionique membranaire en se multimérisant et ainsi permettre le transport du Ca^{2+} [99]. Il est bien connu qu'AS se structure en double hélice amphipathique au contact de la membrane plasmique [48].

1.1.4.5) Assemblage de complexe

Beaucoup d'IDPs ont des fonctions stabilisatrices de complexe comme la protéine TAU et MAP2B qui stabilisent les microtubules [7] [64]. Une autre fonction quasi catalytique est la capacité des IDP à polymériser des macrocomplexes : par exemple, TAU et MAP2B polymérisent la tubuline [7] [64] et Ciboulot polymérise les filaments d'actine [100]. Cette activité quasi catalytique est très peu comprise. Récemment, il a été démontré qu'une IDP pouvait induire la polymérisation d'un grand nombre d'IDPs. C'est le cas de SERF1a qui peut induire la polymérisation des fibres amyloïdes d'A β , Alpha Synucléine et PrP (*Prion protein*) [101].

1.1.4.6) Chaperonne

Les chaperonnes sont des machines protéiques hautement sophistiquées qui aident au repliement des protéines pour atteindre leurs conformations biologiquement actives. Elles empêchent le mauvais repliement menant vers des conformations inactives ainsi que l'agrégation. Elles peuvent également aider à solubiliser des agrégats protéiques, aider à la translocation des protéines membranaires et à l'élimination de protéines irrémédiablement endommagées [44] [102]. Les IDPs et IDRs sont extrêmement représentés chez les chaperonnes. Ils jouent différents rôles fonctionnels allant de la reconnaissance moléculaire à un rôle d'agent de solubilisation. Ils permettent la déstabilisation de certaines structures de telle sorte que la protéine explore les différentes conformations pour atteindre son minimum énergétique fonctionnel [2] [6]. Souvent, elles permettent de débobiner localement certaines structures de façon à permettre la correction de mauvais repliements [103]. Certaines extrémités C- ou N-terminales peuvent jouer le rôle de chaperonne intramoléculaire [104]. Ces domaines, indispensables au repliement fonctionnel de la protéine, sont cependant très souvent retirés après le repliement, soit par auto-protéolyse, soit

par des protéases exogènes. Ces IDRs chaperonnes sont connus dans plusieurs cas comme le repliement de la Subtilisine [105] et de la protéase alpha-lytic [106].

1.2) Introduction sur les fibres amyloïdes

En 1854, Rudolph Virchow a introduit et popularisé le terme « amyloïde » pour désigner une anomalie tissulaire qui présente une réaction positive à la coloration à l'iode. Rudolf Virchow croyait que cette anomalie tissulaire était constituée de glucides, et la nomma amyloïde par analogie avec l'amidon [107]. Pendant une période, la communauté scientifique débattit pour savoir si les dépôts amyloïdes étaient des dépôts gras ou des dépôts glucidiques; en 1859, Friedreich et Kehule démontrèrent qu'il s'agissait de dépôts protéiques [107].

Les dépôts amyloïdes sont associés à plus d'une vingtaine de pathologies humaines comme le diabète, certaines maladies neurodégénératives et certaines maladies cardiovasculaires. L'accumulation anormale de fibrilles amyloïdes dans des organes peut conduire à une amylose totale de l'organe et à sa destruction. Les protéines qui forment des fibres amyloïdes sont des protéines fonctionnelles (structurées ou non) liées à différentes activités métaboliques (exemple : superoxyde dismutases, beta-microglobuline, AS, TAU...), beaucoup de ces protéines sont des IDPs dans leur état physiologique.

La formation des fibres amyloïdes est fortement liée à une transition entre la structure fonctionnelle (pour les protéines structurées) ou le nuage conformation (pour les IDPs) et une structure pro-amyloïde. De façon très énigmatique, la plupart de ces protéines ont d'énormes différences structurales, que ce soit dans leur séquence primaire ou leurs structures tridimensionnelles. Néanmoins, toutes forment des structures fibrillaires très semblables. Le mécanisme qui permet la transition entre la structure fonctionnelle de la protéine et la formation des fibres amyloïdes est très peu connu, et il se trouve au centre des recherches cliniques sur la compréhension des mécanismes pathologiques.

1.2.1) Structure des fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes sont souvent des assemblages macromoléculaires très compacts et stables, résistants à l'hydrolyse et aux agents dénaturants. On peut définir les fibres amyloïdes par leurs caractéristiques biophysiques. Ces

propriétés comprennent une morphologie allongée non ramifiée [108], une cinétique de formation coopérative avec une phase de nucléation [109], et la présence d'un « *pattern* » par rayons X de feuillets β perpendiculaires à l'axe de la fibre [110]. Classiquement, les fibres amyloïdes sont caractérisées par biréfringence après coloration au Rouge de Congo [111].

Le cœur des filaments de fibre (protofilament) est constitué de certains domaines protéiques qui se structurent en feuillets beta intermoléculaires perpendiculaires à l'axe de la fibre (figure 7). Les liaisons hydrogène des feuillets sont disposées dans l'axe de la fibre. Le reste de la protéine va se situer de façon perpendiculaire à l'axe de la fibre et peut adopter des structurations très diverses. Les filaments de fibre peuvent s'associer pour former une macrostructure fibrillaire, qui a souvent la forme d'un ruban torsadé. Ces macrostructures fibrillaires vont s'associer pour former les agrégats histologiques retrouvés dans les tissus.

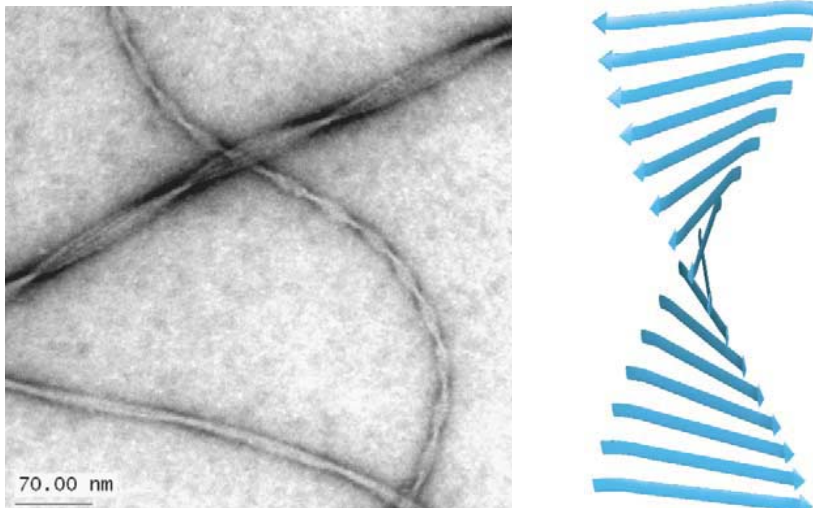


Figure 7. A gauche : une image de microscopie électronique de fibre du peptide A β ; à droite : la représentation des feuillets beta constituant le cœur de la fibre. Figure extraite de Tycko [112].

Il existe un grand nombre de polymorphismes de fibres amyloïdes [113]. Par exemple, *in vitro*, on dénombre plus de 12 polymorphismes différents des fibres du peptide A β (figure 8) [114], sans savoir exactement laquelle (lesquelles) est (sont) présente(s) dans le cerveau. Des expériences récentes ont polymérisé des peptides A β à partir de fibres extraites de cerveau, en espérant d'imprimer le polymorphisme relevant sur la forme finale [115].

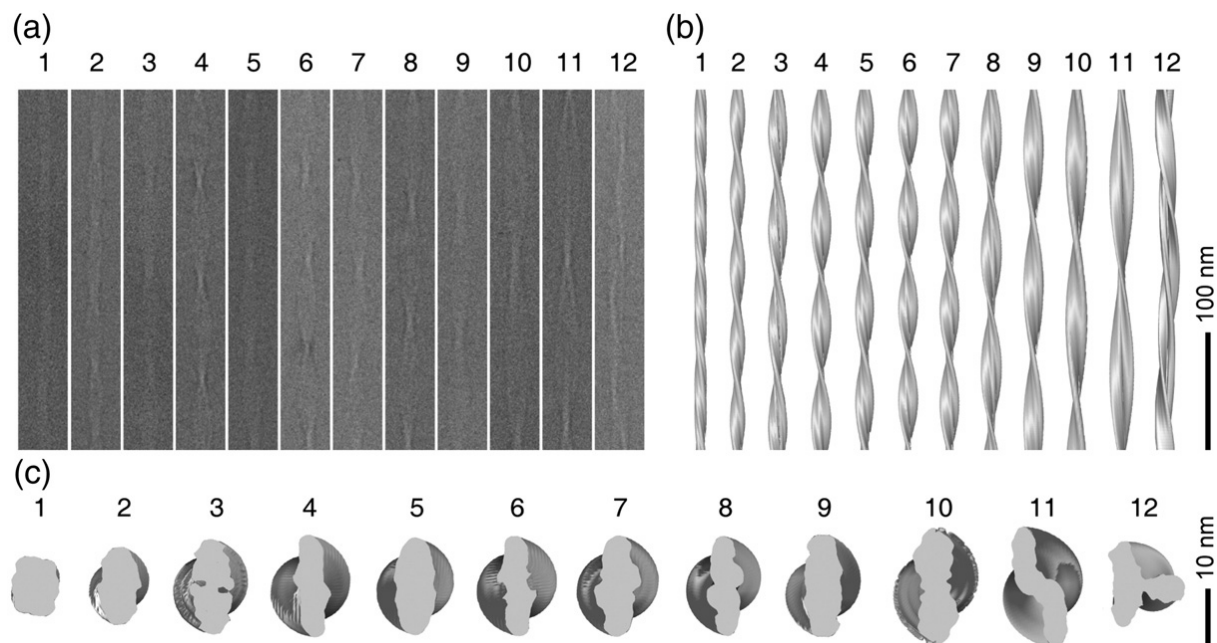
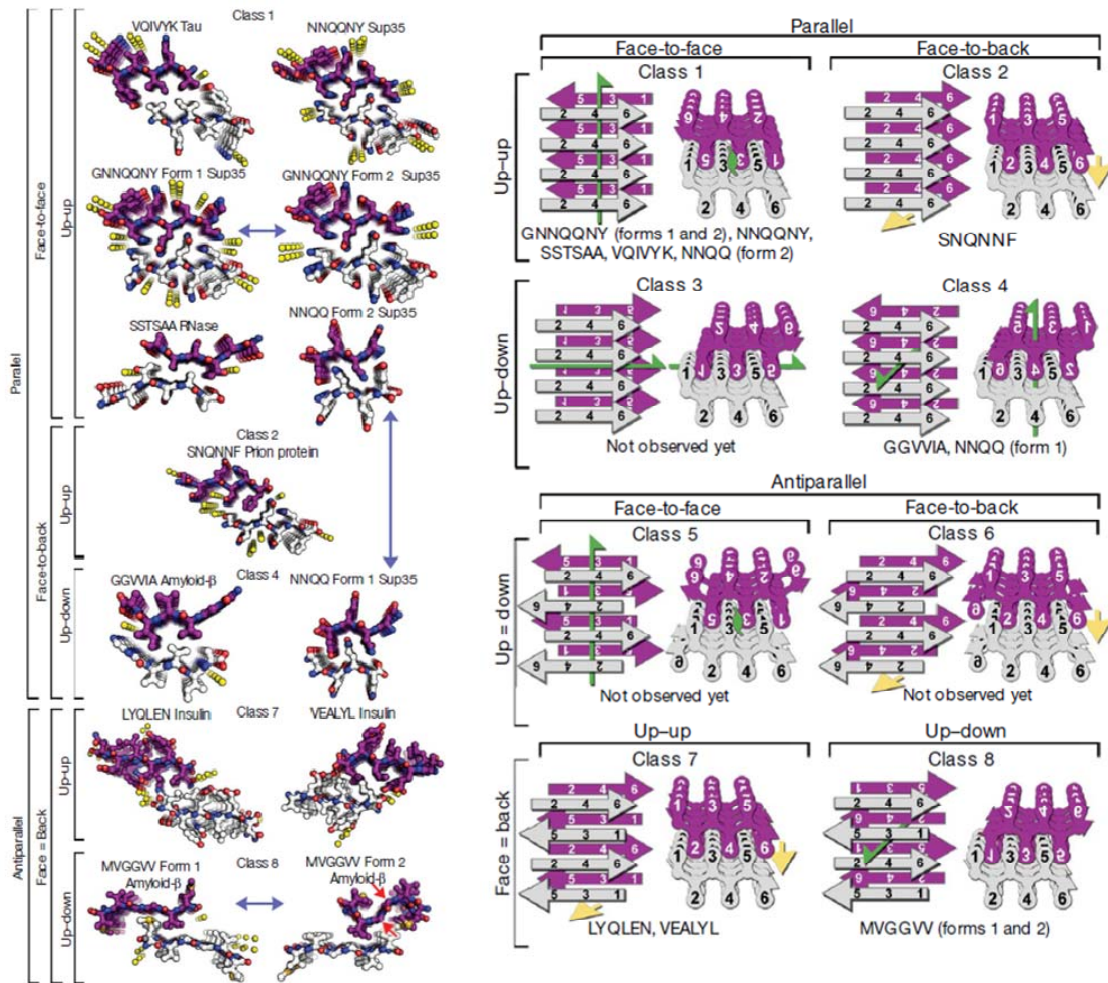


Figure 8 : Reconstructions de 12 fibres du peptide A β (1-40) par cryo-électromicroscopie. (a) images de 12 fibres du peptide A β (1-40) par cryo-électromicroscopie présentant des polymorphismes différents. (b et c) micrographies des 12 polymorphismes de fibres observés en (a). en (b), vue de côté ; en (c), vue du haut [114]. Figure extraite de Meinhardt *et al.* [114].

Un des premiers défis structuraux pour caractériser les fibres amyloïdes a été de déterminer les zones des protéines constituant le cœur des fibres et les domaines constituant les feuillettes beta. Le cœur des fibres a été caractérisé par différentes techniques biochimiques et biophysiques [112] : protéolyse, échange proton deutérium, RMN, RPE ... Avec beaucoup d'efforts, certaines structures et/ou structures partielles ont pu être déterminées à l'échelle atomique par RMN solide [116] et RPE [117]. Eisenberg et ses collaborateurs ont étudié les fragments protéiques indispensables à la formation de fibrilles [118] [119] [120] : ces fragments ont souvent des longueurs de 4 à 8 acides aminés. Ces peptides ont été cristallisés et étudiés par diffraction des rayons X. Ils présentent tous des structurations en feuillettes beta intermoléculaires perpendiculaires à l'axe principal. Les liaisons hydrogène sont disposées le long de l'axe principal. Les chaînes latérales intermoléculaires hydrophobes vont interagir de façon à former une interface hydrophobe [118] [119] [120], formant ainsi elle-même un *zipper* stérique qui maintient la structure.



La figure 9 : à droite montre 13 structures de segments peptidiques de protéines formant des fibrilles. Chaque structure est représentée en projection vers le bas de l'axe du cristal. Ces structures mettent en évidence une interaction stérique par l'entrecroisement des chaînes latérales entre les feuillettes (*zipper* stérique). Les atomes de carbone sont représentés en pourpre ou blanc, les atomes d'azote en bleu, et les atomes d'oxygène en rouge. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères jaunes. A gauche : les huit classes de *zipper* stériques (représentées pour un hexapeptide). Deux brins identiques peuvent être soit en face-à-face (*face to face*), soit en tête-à-queue (*face to back*). Chaque brin peut présenter des feuillettes beta parallèles ou antiparallèles, et l'empilement des feuillettes peut se faire de façon alternée avec un feuillet vers le haut et un vers le bas (*up-down*), ou avec tous les feuillettes orientés vers le haut (*up-up*). Figure extraite et modifiée de Sawaya *et al.* [119]

1.3) Implication des IDPs dans des maladies neurodégénératives

Dans plusieurs cas de maladies neurodégénératives, les dépôts amyloïdes sont constitués de fibres d'IDP, comme par exemple le peptide A β dans les plaques séniles et TAU dans les PHF (*Paired Helical Filaments*) retrouvés dans la maladie d'Alzheimer, ou encore l'Alpha synucléine dans les corps de Lewy retrouvés dans la maladie de Parkinson. Dans les maladies neurodégénératives, l'accumulation de fibres amyloïdes est au cœur des mécanismes de neurodégénérescence. Ainsi, comprendre les mécanismes biologiques qui mènent à la formation des fibres peut permettre de créer de nouveaux traitements et/ou des molécules capables de ralentir ou arrêter ces pathologies. Face au vieillissement accru de la population, les maladies neurodégénératives sont désormais un problème de santé publique majeur.

Ces travaux de thèse vont, dans une première partie, développer les nouvelles méthodologies d'étude des IDPs et des fibres amyloïdes. Dans une deuxième partie, ils s'attacheront à contribuer à mieux comprendre les mécanismes d'agrégation de deux IDPs très impliquées dans des maladies neurodégénératives. Le premier cas étudié sera celui de la protéine TAU, impliquée dans la maladie d'Alzheimer, et le deuxième cas sera celui d'AS, impliquée dans la maladie de Parkinson.

2) Développement de méthodologie RMN pour l'étude des IDPs

2.1) Attribution des spectres RMN.

La première étape indispensable pour obtenir des informations structurales par RMN consiste à attribuer chaque résonance du spectre. Classiquement, le spectre ^1H - ^{15}N -HSQC est utilisé comme empreinte digitale de la protéine. Chaque acide aminé à l'exception des prolines peut être identifié par sa fréquence proton et azote amide. Pour attribuer le spectre ^1H - ^{15}N -HSQC des protéines structurées, on utilise typiquement un ensemble de séquences de triple résonance où on corrèle de manière séquentielle les résonances du proton, de l'azote, des carbonyles et des carbones de la chaîne latérale (figure 10) [121].

Triple-Resonance Experiments Used for Sequential Resonance Assignment ^a			
Experiment	Correlations observed	Magnetization transfer	J couplings ^b
HNCA	$^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{C}_i^{\alpha}$ $^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{C}_{i-1}^{\alpha}$		$^1J_{\text{NH}}$ $^1J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^2J_{\text{NC}^{\alpha}}$
HN(CO)CA	$^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{C}_{i-1}^{\alpha}$		$^1J_{\text{NH}}$ $^1J_{\text{NCO}}$ $^1J_{\text{C}^{\alpha}\text{CO}}$
H(CA)NH	$^1\text{H}_i^{\alpha} - ^{15}\text{N}_i - ^1\text{H}_i^{\text{N}}$ $^1\text{H}_i^{\alpha} - ^{15}\text{N}_{i+1} - ^1\text{H}_{i+1}^{\text{N}}$		$^1J_{\text{C}^{\alpha}\text{H}^{\alpha}}$ $^1J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^2J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^1J_{\text{NH}}$
HNCO	$^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{CO}_{i-1}$		$^1J_{\text{NH}}$ $^1J_{\text{NCO}}$
HN(CA)CO	$^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{CO}_i$ $^1\text{H}_i^{\text{N}} - ^{15}\text{N}_i - ^{13}\text{CO}_{i-1}$		$^1J_{\text{NH}}$ $^1J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^2J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^1J_{\text{C}^{\alpha}\text{CO}}$
CBCA(CO)NH	$^{13}\text{C}_i^{\beta}/^{13}\text{C}_i^{\alpha} - ^{15}\text{N}_{i+1} - ^1\text{H}_{i+1}^{\text{N}}$		$^1J_{\text{CH}}$ $^1J_{\text{C}^{\alpha}\text{C}^{\beta}}$ $^1J_{\text{C}^{\alpha}\text{CO}}$ $^1J_{\text{NCO}}$ $^1J_{\text{NH}}$
CBCANH	$^{13}\text{C}_i^{\beta}/^{13}\text{C}_i^{\alpha} - ^{15}\text{N}_i - ^1\text{H}_i^{\text{N}}$ $^{13}\text{C}_i^{\beta}/^{13}\text{C}_i^{\alpha} - ^{15}\text{N}_{i+1} - ^1\text{H}_{i+1}^{\text{N}}$		$^1J_{\text{CH}}$ $^1J_{\text{C}^{\alpha}\text{C}^{\beta}}$ $^1J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^2J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^1J_{\text{NH}}$
HNCACB	$^{13}\text{C}_i^{\beta}/^{13}\text{C}_i^{\alpha} - ^{15}\text{N}_i - ^1\text{H}_i^{\text{N}}$ $^{13}\text{C}_{i-1}^{\beta}/^{13}\text{C}_{i-1}^{\alpha} - ^{15}\text{N}_i - ^1\text{H}_i^{\text{N}}$		$^1J_{\text{C}^{\alpha}\text{C}^{\beta}}$ $^1J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^2J_{\text{NC}^{\alpha}}$ $^1J_{\text{NH}}$

Figure 10 : Expérience classique de triple résonance utilisée pour une attribution séquentielle des résonances. Figure extraite et modifiée de Cavanagh *et al.* [121].

Pour une protéine globulaire, due à la structure tridimensionnelle, chaque acide aminé se retrouve dans un environnement différent, ce qui se traduit par une grande dispersion des déplacements chimiques. Par conséquent, l'attribution des spectres est assez simple à condition que l'on soit capable d'observer les résonances. La relaxation transversale (T₂) du signal est intrinsèquement liée au temps d'autocorrélation de l'interaction dipolaire entre les différents spins qui, pour les protéines structurées, est directement lié à la fréquence de rotation de la protéine. Plus la protéine est volumineuse, plus le temps d'autocorrélation est élevé et plus la relaxation transversale de l'aimantation associée avec ses noyaux est importante. Par conséquent, plus la protéine est volumineuse, plus son signal décroît rapidement. Pour les très grosses protéines, la relaxation du signal est tellement rapide qu'avant même d'avoir transféré l'aimantation d'un noyau vers l'autre, le signal a déjà complètement relaxé.

Pour les IDPs, se pose toute une autre problématique. L'absence de structure stable confère une grande mobilité de la chaîne peptidique. Le temps d'autocorrélation entre les différents spins est extrêmement court et indépendant du volume de la protéine, par conséquent le signal a une durée de vie beaucoup plus longue. Contrairement aux protéines structurées, nous pouvons utiliser des séquences avec de multiples étapes de transferts d'aimantation (HN(Ca)NH [122], NOTO [123] ...).

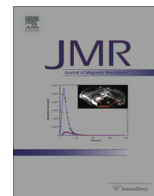
Toutefois, l'absence de structure tridimensionnelle stable confère aux résonances des différents noyaux des valeurs très proches, ce qui se traduit par énormément de recouvrement spectral [124]. Par exemple, les protons amides vont avoir des environnements chimiques très semblables et la dispersion des signaux va être inférieure à 1 PPM. Les noyaux comme l'azote et surtout le carbone sont très influencés par la nature de l'acide aminé ainsi que par la présence de structures secondaires. Du fait de l'absence de structure secondaire, chaque acide aminé d'un type donné aura à peu près le même déplacement chimique. Ce déplacement chimique est dit « *random coil* », il correspond au déplacement chimique de l'acide aminé qui explore les différentes conformations stériquement permises (voir définition chapitre 1.1.1).

Ce fort recouvrement spectral rend l'attribution des spectres fastidieuse et difficile par les méthodes classiques d'attribution des protéines [124]. Plusieurs équipes ont développé de nouvelles stratégies pour attribuer les spectres des IDPs, une d'elle est d'augmenter les dimensions des spectres [125] de façon à pouvoir séparer les différentes résonances en 4 jusqu'à 7 dimensions. Ce genre de technique nécessiterait des temps d'enregistrement extrêmement longs,

plusieurs semaines pour une 4D et plusieurs mois, voire plusieurs années pour des dimensions supérieures. Pour réduire les temps d'analyse, il a été développé des techniques de « *non uniform sampling* » [126] [127] [128]. Cette méthode est basée sur un enregistrement partiel des dimensions indirectes [128] suivi d'une reconstitution algorithmique de l'ensemble de la matrice de données [128]. L'acquisition de spectre 5D et 7D règle suffisamment le problème de recouvrement spectral pour permettre l'attribution automatique des résonances de TAU [129]. Une autre méthode pour augmenter la résolution des spectres est d'utiliser la détection directe carbone [130]. Les carbonyles sont très sensibles à la nature de l'acide aminé mais également à la nature de l'acide aminé en position $i+1$ ce qui confère une meilleure dispersion spectrale que le proton amide. Classiquement, dans les spectres 2D, on corrèle le carbonyle avec l'azote en position $i+1$, ce qui améliore la dispersion des signaux dans les deux dimensions. Un autre point positif de la détection directe carbone est qu'elle ne souffre pas de l'échange avec l'eau. Par conséquent cette approche peut être utilisée à pH basique et à haute température [131]. Mais, même si la détection carbone devient de plus en plus populaire, le spectre $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC reste de loin le spectre le plus utilisé pour étudier les IDPs.

Dans ce chapitre nous allons présenter une nouvelle méthodologie d'attribution des IDPs basée sur un temps de mélange composite TOCSY-NOESY.

2.1.1) « *A new strategy for sequential assignment of intrinsically unstructured proteins based on ^{15}N single isotope labelling* »



A new strategy for sequential assignment of intrinsically unstructured proteins based on ^{15}N single isotope labelling



Juan Lopez^a, Puneet Ahuja^a, Melanie Gerard^b, Jean-Michel Wieruszkeski^a, Guy Lippens^{a,*}

^a CNRS UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^b Laboratory of Biochemistry, K. U. Leuven-Kortrijk, Etienne Sabbelaan 53, B-8500 Kortrijk, Flanders, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2013

Revised 8 July 2013

Available online 23 July 2013

Keywords:

Assignment

Intrinsically unstructured protein

NOESY

TOCSY

ABSTRACT

We describe a new efficient strategy for the sequential assignment of amide resonances of a conventional ^{15}N - ^1H HSQC spectrum of intrinsically unfolded proteins, based on composite NOESY-TOCSY and TOCSY-NOESY mixing times. These composite mixing times lead to a $\text{H}\alpha$ -proton mediated unidirectional transfer of amide to amide proton. We have implemented the composite mixing times in an HSQC-NOESY-HSQC manner to obtain directional connectivity between amides of neighbouring residues. We experimentally determine the optimal mixing times for both transfer schemes, and demonstrate its use in the assignment for both a fragment of the neuronal tau protein and for α -synuclein.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

NMR is a most powerful experimental approach to study intrinsically unfolded proteins (IUPs) [1] yielding time-averaged parameters that can be interpreted in terms of conformational sampling of the individual amino acids [2–8], mapping the interactions with (bio)molecular partners [9–12] and even analyzing post-translational modification patterns in terms of identification and quantification of the PTM pattern and its structural consequences [13–18]. An absolute prerequisite for all these studies is the assignment of the ^1H - ^{15}N HSQC spectrum. The reduced amide proton chemical shift range and reduced deviation of the carbon chemical shifts from their random coil values make this assignment more difficult than for a folded protein. Exploiting the NOE effect between adjacent amide protons, but encoding them by their associated ^{15}N amide frequency, thereby has early on been proposed as strategy to assign unfolded proteins [19]. More recently, the HNCaNNH experiment [20,21] was developed, that bases the transfer of magnetization between adjacent amide functions not on the NOE effect of its protons, but on the scalar coupling between nitrogen and carbon atoms. This experiment equally allows to connect a given amide signal to the nitrogen frequency of its two neighbouring amino acids. The good ^{15}N spread for the amide nitrogen and the limited magnetization losses due to the reduced line width of the resonances in an IUP make this experiment particularly useful, and it therefore is invariable part of the assignment strategy of IUPs. Other developments including techniques of higher dimensionality

[22] and non-uniform sampling of the carbon dimensions [23], have allowed a certain level of automatization of the assignment process [24,25]. As a result, the assignment, both of larger and more repetitive IUPs, such as the 441 amino acids long microtubule associated protein Tau [25] has been accomplished, even though these approaches are not yet routine procedures in most laboratories.

One drawback of the HNCaNNH experiment is that it lacks directionality. Because of the non-vanishing coupling constant between the ^{15}N of residue i and the $\text{C}\alpha$ of residue $i-1$, one indeed observes 3 resonances in the third dimension. Another limitation is that it only gives information on the nitrogen frequency of the neighbouring amide functions. If we could equally access the proton frequency, one could imagine to walk through the spectrum in a straightforward manner.

The ROESY-TOCSY mixing scheme was implemented to cross the glycosidic linkage in complex glycan molecules [26,27], and was later implemented as a NOESY-TOCSY mixing to assist in the assignment of small folded proteins [28]. A proton NOESY mixing time combined with a carbon TOCSY transfer was equally proposed to transfer magnetization from one to the next amino acid [19]. We propose here the use of a proton-only composite mixing time to connect in a directional manner sequential amide nitrogen or hydrogen frequencies in an IUP. The experiment exploits a mixing period composed of two periods, whereby magnetization transfer is based alternatively on NOE dipolar relaxation (as in a regular NOESY spectrum) and on scalar coupling (as in a regular TOCSY experiment). We explore the optimal mixing times to be used for efficient transfer from amide to amide function, and apply the sequence to two IUPs, a functional TauF4 fragment that we previously have defined [29] and α -Synuclein [9,30], another IUP

* Corresponding author. Fax: +33 03 20 43 65 55.

E-mail address: guy.lippens@univ-lille1.fr (G. Lippens).

that has been extensively studied. We implement the sequence as 4 separate 3D sequences, with particular attention to water suppression and the minimizing of antidiagonal artefacts. Finally, we show that a nearly complete assignment of these IUPs can be obtained on the sole basis of the hereby presented pulse sequences.

2. Results and discussion

The magnetization transfer during the composite mixing times can be easily seen on a hypothetical tripeptide (Fig. 1). Amide proton magnetization of $(i + 1)$ th residue will be transferred to the H^α proton of the upstream residue (i) during the NOE period. The resulting $H^\alpha(i)$ magnetization will then be transferred to its own amide proton $H^N(i)$ via the TOCSY transfer, resulting in a net transfer from the $H^N(i + 1)$ proton to the $H^N(i)$. In the 2D spectrum with this composite mixing time, cross peaks will hence show between a given amide proton in the direct dimension and its downstream neighbour. If we invert the order of NOESY and TOCSY mixing times, the transfer would be from $H^N(i - 1) \rightarrow H^\alpha(i - 1) \rightarrow H^N(i)$, resulting in a cross peak between a given amide proton in the direct detection proton dimension and its upstream neighbour.

Fig. 2 shows the pulse sequence designed based on the 4D HSQC–NOESY–HSQC pulse sequence [31], where we have implemented the composite mixing times. We have performed these two 4D sequences as four 3D experiments (3D–NNH_N–NOESY–TOCSY, 3D–H_NNH_N–NOESY–TOCSY, 3D–NNH_N–TOCSY–NOESY, 3D–H_NNH_N–TOCSY–NOESY) on a sample of α -Synuclein, to obtain unidirectional correlations between proton and nitrogen frequencies of backbone amides of neighbouring residues. Whereas in the original NOESY–TOCSY experiment [28], a 4 step phase cycle was used, we extended it to 8 in order to increase signal to noise.

Because amide protons in IUPs are in fast exchange with water due to their easy accessibility, the first block of the pulse sequence is implemented as a water flip-back HSQC [32,33]. When encoding nitrogen in the first dimension (t_1) for the 3D–NNH_N–NOESY–TOCSY or 3D–NNH_N–TOCSY–NOESY schemes, and denoting the amide proton or nitrogen magnetization terms by I and S, respectively, and the water magnetization by H, the magnetization after this first HSQC block (time point a in Fig. 2) is $-Iy \cos(\omega_N t_1) + Hz$ or $-Iy \sin(\omega_N t_1) + Hz$, according to the phase selection by the nitrogen pulse ϕ_1 . The 90° hard pulse along the $-x$ -axis preceding the composite mixing period transforms these terms into $Iz \cos(\omega_N t_1) + Hy$ or $Iz \sin(\omega_N t_1) + Hy$. The water term is then brought back to the z axis in an active manner by a flip back pulse with the opposite phase of the 90° hard pulse (time point b in Fig. 2), before the gradient pulse G5 defocuses all residual magnetization terms in the xy plane.

Before considering the evolution of these terms in the composite mixing time, we describe how the same scheme can be used for encoding the amide proton frequency in t_2 (3D–H_NNH_N–NOESY–TOCSY and 3D–H_NNH_N–TOCSY–NOESY experiments). The drawback

of encoding protons in an indirect dimension is the requirement of many complex points to obtain a satisfying resolution. Because in the present case, we focus on IUPs, the reduced amide proton window can be sampled with a small number of points, especially as the first HSQC block efficiently acts as a band pass filter for only those protons that are directly bound to a ¹⁵N nucleus. Therefore, at time point a (Fig. 2), we switch the proton frequency to the middle of the amide proton region ensuring that the proton evolution during the t_2 period will be centered at this offset. One nevertheless should take into account the NH₂ side chain protons, that will be folded in this dimension when too small a window is chosen. We therefore typically used a 2.4 ppm window centered at 7.7 ppm. The proton evolution in t_2 is followed by a proton pulse with phase ϕ_2 that is still centered at the same offset in the middle of the amide proton region. After the t_2 encoding, the resulting magnetization can be written as $-Iy \cos(\omega_H t_2) + Ix \sin(\omega_H t_2) + Hz$. Phase selection in the t_2 dimension is performed by the phase ϕ_2 of the 90° pulse preceding the mixing time, that will select the cosine or sine term, resulting in $Iz \cos(\omega_H t_2) + Ix \sin(\omega_H t_2) + Hy$ or $-Iy \cos(\omega_H t_2) + Iz \sin(\omega_H t_2) + Hx$. After this pulse, at time point b, we switch back the proton carrier to the water frequency, and apply the water flip back pulse with the opposite phase as the ϕ_2 pulse. The G5 gradient will destroy all in-plane magnetization, leaving as only terms at the beginning of the mixing time $Iz \cos(\omega_H t_2) + Hz$ or $Iz \sin(\omega_H t_2) + Hz$. This ensures a pure Z component before the composite mixing period, and avoids any amplitude differences in the cosine and sine terms that might cause anti-diagonals peaks [34]. A gradient G4 at the end of the composite mixing period assures that only magnetization terms along the Z axis enter the second half of the pulse sequence that we implement as a sensitivity enhanced HSQC sequence [35].

The composite mixing time is aimed to transfer with optimal efficacy the magnetization from one amide proton to its next neighbour (upstream or downstream, depending on the order of NOESY and TOCSY blocks) via the H^α proton. We therefore first sought to optimize the durations of both mixing times, by considering the transfer from $H^\alpha(i - 1)$ to H^N in a simple NOESY experiment or from $H^\alpha(i)$ to $H^N(i)$ in a TOCSY experiment. In order to optimize these delays experimentally for our systems, we ran the 2D H–H planes of a TOCSY–HSQC and NOESY–HSQC pulse sequence with varying mixing times on the TauF4 sample, and considered the projection of the H^α protons. Fig. 3a shows the sum of the columns (F_1 dimension) of the proton–proton plane of the NOESY–HSQC corresponding to amide proton chemical shifts between 8.7 and 7.7 ppm, extracted from 2D experiments at different mixing times. The maximum intensity in the H^α region is obtained for a mixing time of 200 ms (Fig. 3b). Because pH and temperature might alter these values for different samples, we ran the same experiments on a α -synuclein sample at 10 °C and pH 7.4 (see below). We again found the same flat maximum with optimal NOE mixing time between 200 and 300 ms. Using only a NOE based transfer period to directly connect consecutive amide protons

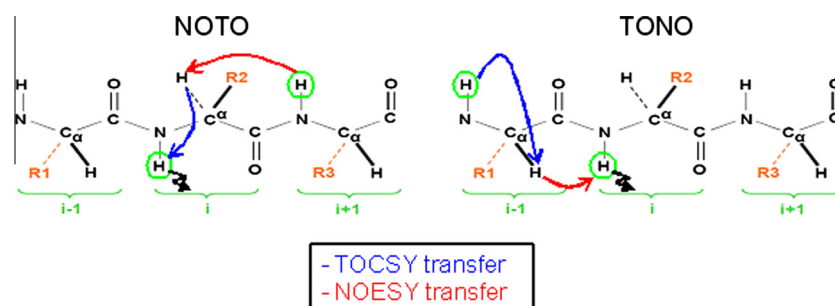


Fig. 1. Magnetization transfer pathways during NOESY–TOCSY and TOCSY–NOESY composite mixing times: The NOESY–TOCSY mixing time leads to correlations between i th and $(i + 1)$ th residues while the TOCSY–NOESY scheme gives opposite directionality, and the correlations between i th and $(i - 1)$ th can be obtained.

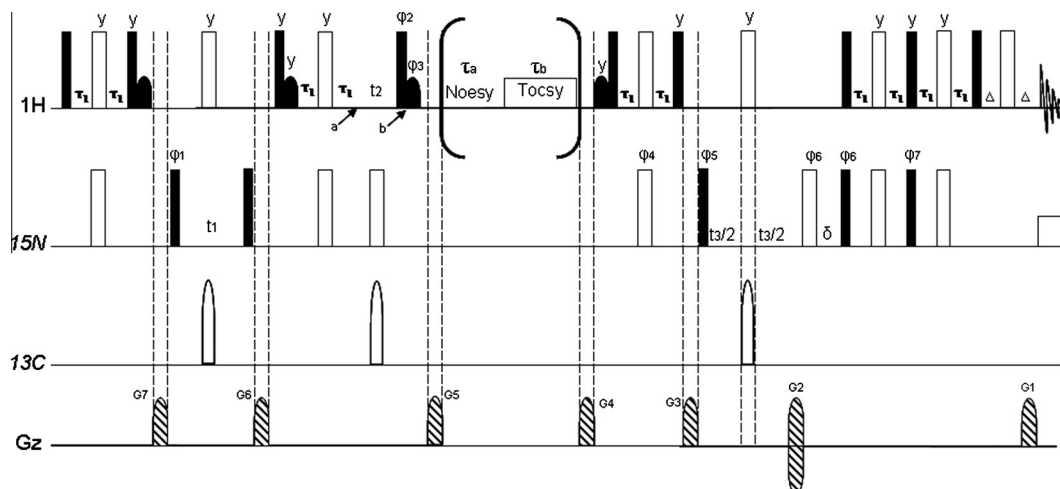


Fig. 2. The 4D-HSQC-NOESY-TOCSY-HSQC pulse sequence differs from 4D-HSQC-NOESY-TOCSY-HSQC by the block represented inside the brackets. Filled and empty rectangles indicate 90° and 180° pulses, respectively, applied along x, unless indicated otherwise. Pulse sequence delays: $\tau_1 = \frac{1}{4} J_{\text{NH}}$, δ = refocus delays (1.3 ms), Δ = duration of gradient + field recovery (1.2 ms), τ_a = Noesy mixing time (0.2s) and τ_b = TOCSY mixing time (41.4 ms). Pulsed field gradients, G1, G2, G3, G4, G5, G6 and G7 are applied along the z-axis (PFGz). The G2 and G1 relative strength ratio is given by $G5/G6 = \gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}$. Carbon decoupling is optional, and can be omitted when working with only ^{15}N -labeled samples. Phase cycling: $\phi_1 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_2 = -x$; $\phi_3 = x$; $\phi_4 = x$; $\phi_5 = x, -x$; $\phi_6 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_7 = 4(-y), 4(y)$; $\phi_{\text{rec}} = x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$. Quadrature detection in F1 is obtained by incrementing ϕ_1 using the States-TPPI method. The frequency labelling in the F2 is obtained by increasing the t_2 delay and using the States-TPPI method applied to ϕ_2 and ϕ_3 . If one does not encode the F2 dimension, the carrier position can be kept at the water frequency during the complete experiment. When encoding the F2 dimension (in the 3D- $\text{H}_\text{N}\text{NH}_\text{N}$ -NOESY-TOCSY and 3D- $\text{H}_\text{N}\text{NH}_\text{N}$ -TOCSY-NOESY spectra), the carrier is switched to the middle of the amide region at time point a, and the t_2 increment is chosen in function of a proton window covering only the amide region. At time point b, we restore the carrier position to the water frequency. After the composite mixing time, the final HSQC block is implemented as a sensitivity enhanced HSQC sequence [35] with again water flip-back pulses. Frequency labelling in F3 has been performed by increasing the delay t_3 and using the echo/anti-echo method applied to ϕ_4, ϕ_5, ϕ_7 and G2 for quadrature detection in F3.

[19] would require a longer mixing time. For the TOCSY transfer, a theoretical study neglecting damping effects because of relaxation had shown optimal mixing times ranging from 30 to 80 ms when varying the $^3J_{\text{HNNH}\alpha}$ coupling constant from 10 to 4 Hz, and when considering the distinct proton networks in different amino acids [36]. We experimentally verified these findings by a similar series of 2D experiments as above, whereby again we are not as much interested in the transfer of magnetization over the full side chain, but rather by a maximal transfer to the H^α protons. For different signals corresponding to H^α chemical shifts, we found an optimal TOCSY mixing time of 41.4 ms, whereas this mixing time indeed increased when considering the transfer to aliphatic side chain protons (Fig. 3c).

Whereas all triple resonance experiments that encode a carbon frequency in the indirect dimension do have a directionality built in, because of the non-vanishing 2J coupling constant between the nitrogen of residue i and the $\text{C}\alpha$ of residue $(i-1)$, the double transfer in the $(\text{H})\text{N}(\text{Ca})\text{NNH}$ experiment leads to cross peaks in the indirect ^{15}N dimension for both the $(i-1)$ and $(i+1)$ residues [20,21]. As a result, the $^{15}\text{N}, ^{15}\text{N}$ projection plane can be compared to a $^{15}\text{N}, ^{15}\text{N}$ COSY spectrum, displaying the ^{15}N neighbours of a given amino acid (Fig. 4). When we perform the same projections for our 3D- NNH_N -NOESY-TOCSY or TOCSY-NOESY sequences, together they reproduce this COSY type spectrum, but both individual spectra only show one single cross peak in the indirect dimension. As an example, looking at the isolated resonance of A227 in TauF4 at 128.86 ppm, we find that it connects in the indirect dimension to its upstream neighbour V226 in the TOCSY-NOESY experiment, whereas its downstream neighbour V228 can be identified by its ^{15}N frequency of 121.21 ppm in the NOESY-TOCSY experiment. The symmetrical peaks originate from the diagonal peaks of V226 and V228, respectively, and hence connect to the A227 resonance in the NOESY-TOCSY and TOCSY-NOESY experiments, respectively.

In order to demonstrate how the combined use of the ^{15}N and ^1H encoded unidirectional experiments can be used to obtain in a straightforward manner the sequence specific assignment of an

IUP, we give an example of α -synuclein. In Fig. 5, we start from the resonance of A76, at 8.46 ppm (proton chemical shift) and 127.7 ppm (nitrogen chemical shift). When extracting the strips at the A76 position in the third dimension from the NNH_N and $\text{H}_\text{N}\text{NH}_\text{N}$ -TOCSY-NOESY experiments, we obtain next to the diagonal peak, the cross peak to its Thr75 neighbour. As we have both the amide nitrogen and proton frequency from the combined experiments, we can immediately identify its position on the ^1H - ^{15}N HSQC experiment. The forward direction is equally possible by combining the ^1H and ^{15}N indirect dimensions of the NOESY-TOCSY experiments, as shown in Fig. 5b. The strips extracted from the position of V37 connect to the amide proton and nitrogen of L38, and hence allow an unambiguous assignment of its downstream neighbour. Connecting from glycine to glycine residue, and completing the side chain identification with the information from a TOCSY-HSQC experiment, we were able to obtain nearly 90% of the assignments of α -synuclein. Complete spectral overlap of E_{13} and E_{35} as well as severe signal broadening for the $\text{K}_{11}\text{AK}_{13}$ triplet and an additional couple of isolated resonances thereby were the main limits to get to a complete assignment.

The possibility to obtain the sequential assignment of a ^{15}N only labeled protein might be useful when no prokaryotic overexpression system is available for it, and can be combined with a TOCSY-HSQC sequence for amino acid identification. However, the proposed procedure also is most powerful on doubly labeled samples when combined with the identification of the amino acid type through its carbon $\text{C}\alpha/\text{C}\beta$ values. The NOESY-TOCSY and TOCSY-NOESY experiments hence provide an additional tool to tackle the assignment of larger and more repetitive IUPs.

3. Materials and methods

3.1. Protein production

The α -SYN clone in pT7-7 plasmid was a kind gift of Dr. J. Christodoulou, London. It was transformed in BL21 codon plus (DE3) RIPL *Escherichia coli* cells (Stratagene, La Jolla, CA, USA). In the

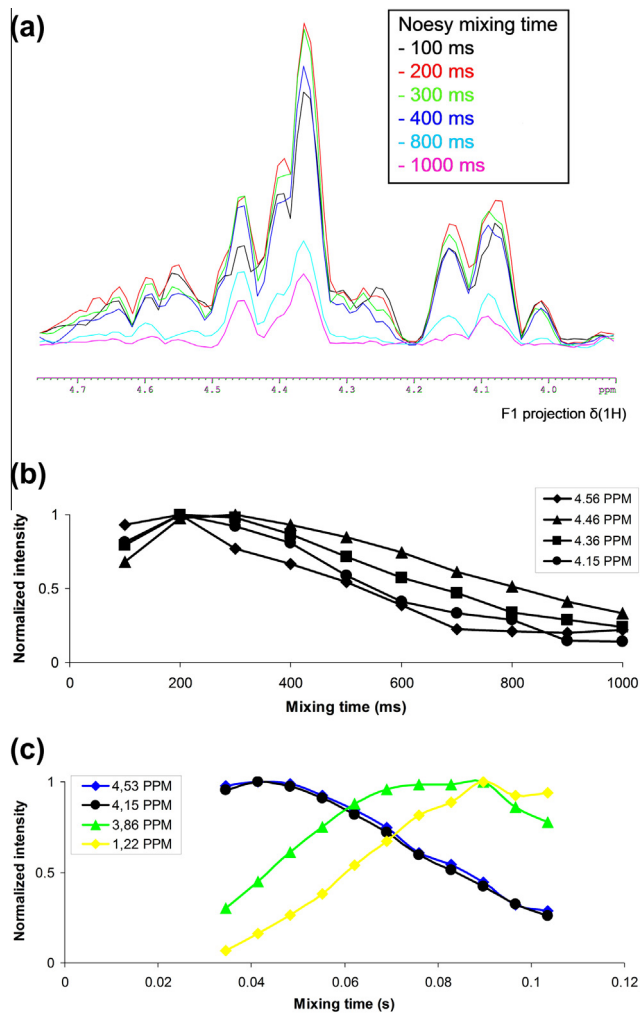


Fig. 3. HH- planes of NOESY-HSQC and TOCSY-HSQC experiments were run on the TauF4 sample to optimize the mixing times. The top panel shows the comparison of NOESY-HSQC projections in the F₁ dimension at different mixing times, resulting in the plot of the normalized intensities of some peaks as a function of the NOE mixing time (middle panel). The bottom panel shows the plot of the normalized intensities of some peaks as a function of the TOCSY mixing time. The black and blue curves are from peaks in the H α alpha proton region, while green, red and yellow curves are for selected aliphatic protons. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

presence of 50 μ g/ml carbenicillin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), transfected cells were grown to an 1 l culture at 37 °C (M9 salts (33.7 mM Na₂HPO₄, 22.0 mM KH₂PO₄, 8.55 mM NaCl) supplemented with 1 g ¹⁵NH₄Cl, 4% glucose, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂ and 10 ml 100 \times MEM Vitamin solution (Sigma–Aldrich). At an OD of 0.6–0.8 cultures were induced with 1 mM isopropyl thiogalactoside (IPTG) and left to shake overnight at 22 °C.

After harvesting (20 min, 7000 rpm with SLA 3000 rotor in a Sorvall® RC-24 Refrigerated Superspeed Centrifuge), pellets were solubilized in 60 ml sonication buffer (100 mM TRIS HCl (Sigma–Aldrich), 10 mM EDTA (Chimica, Geel, Belgium), pH 8) and frozen overnight.

Then, the cell pellet was thawed in a 37 °C water bath and the cells were lysed by two freeze–thaw cycles (freeze in liquid nitrogen followed by defrosting in a 37 °C waterbath). Next, the cells were sonicated with a tip sonicator (Branson): 6 cycles, 30 s on/30 s off. The cellular debris was removed by centrifugation (18,000 rpm for 30 min, 4 °C). The lysate was boiled for 20 min and centrifuged again at 13,500 rpm, 4 °C for 20 min. To the supernatant, streptomycin sulfate was added at 10 mg per ml and stirred

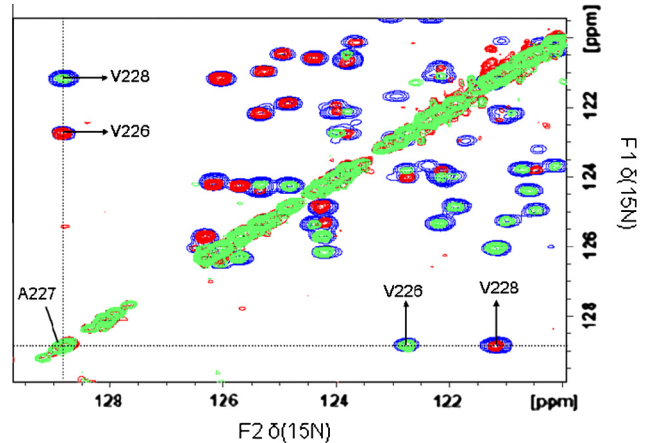


Fig. 4. N–N plane of the spectra obtained from HNCaNNH (in blue), 3D-NNH_N-NOESY-TOCSY (in green) and 3D-NNH_N-TOCSY-NOESY (in red) the cross peaks with both (*i* + 1)th and (*i* – 1)th residues are observed in HNCaNNH while the cross peaks only with (*i* + 1)th are observed in 3D-NNH_N-NOESY-TOCSY and the cross peaks only with (*i* – 1)th residues are observed in 3D-NNH_N-TOCSY-NOESY. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

at 4 °C for 20 min after which the sample was centrifuged (13,500 rpm, 20 min, 4 °C). Again, ammonium sulfate was added to the supernatant to 400 mg per ml, which was stirred for 30 min at 4 °C and centrifuged similarly. The pellet was then resuspended in a minimal volume of Buffer A (25 mM Tris HCl, pH 7.7) and dialysed overnight at 4 °C against 4 L of water. The dialysed protein was filtered through a 0.22 μ m filter and loaded onto a Hi-Trap Q Sepharose column which was equilibrated in Buffer A. After loading the sample, the column was washed to baseline using Buffer A. Over a 60 ml gradient, a linear 0–300 mM NaCl gradient was made (using Buffer B: 25 mM Tris–HCl, 1 M NaCl, pH 7.7), collecting 2 ml fractions. The fractions containing protein were pooled and buffer exchanged into buffer A. The protein was aliquoted and stored at –80 °C.

The TauF4 fragment was produced as described previously [29].

3.2. NMR spectroscopy

All the experiments were performed on Bruker Avance I 600 spectrometer equipped with a triple resonance probe with cryogenic cooling of the proton detection circuitry.

All Tau F4 spectra were recorded at 20 °C on a 250 μ M sample of ¹⁵N–¹³C Tau F4 in 25 mM phosphate buffer (pH 6.8), 25 mM sodium chloride, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT and 5% D₂O.

We ran 10 NOESY–HSQC and 11 TOCSY–HSQC proton–proton planes with different mixing times (NOESY mixing time: 100 ms, 200 ms, 300 ms, 400 ms, 500 ms, 600 ms, 700 ms, 800 ms, 900 ms and 1000 ms; TOCSY mixing time: 34.5 ms, 41.4 ms, 48.3 ms, 55.3 ms, 62.2 ms, 69.1 ms, 76.0 ms, 82.9 ms, 89.8 ms and 103.6 ms). The NOESY–HSQC and TOCSY–HSQC planes were acquired with 16 scans and 512 and 2 K complex data points in *t*₁ and *t*₃. The 3D-NNH_N-TOCSY-NOESY (HSQC–TOCSY–NOESY–HSQC) and 3D-NNH_N-NOESY-TOCSY (HSQC–NOESY–TOCSY–HSQC) planes were each recorded with 8 scans per increment. Total of 128, 1, 128, and 2 K complex data points were acquired in *t*₁, *t*₂, *t*₃, and *t*₄, respectively. The HNCaNNH experiment was recorded with 8 scans and 96, 86, and 2 K complex data points in *t*₁, *t*₂, and *t*₃.

All α -synuclein spectra were recorded at 10 °C on a 700 μ M sample of ¹⁵N, α -synuclein in 20 mM Hepes buffer (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, and 5% D₂O. All TOCSY–NOESY and NOESY–TOCSY versions were recorded with 200 ms NOESY mixing

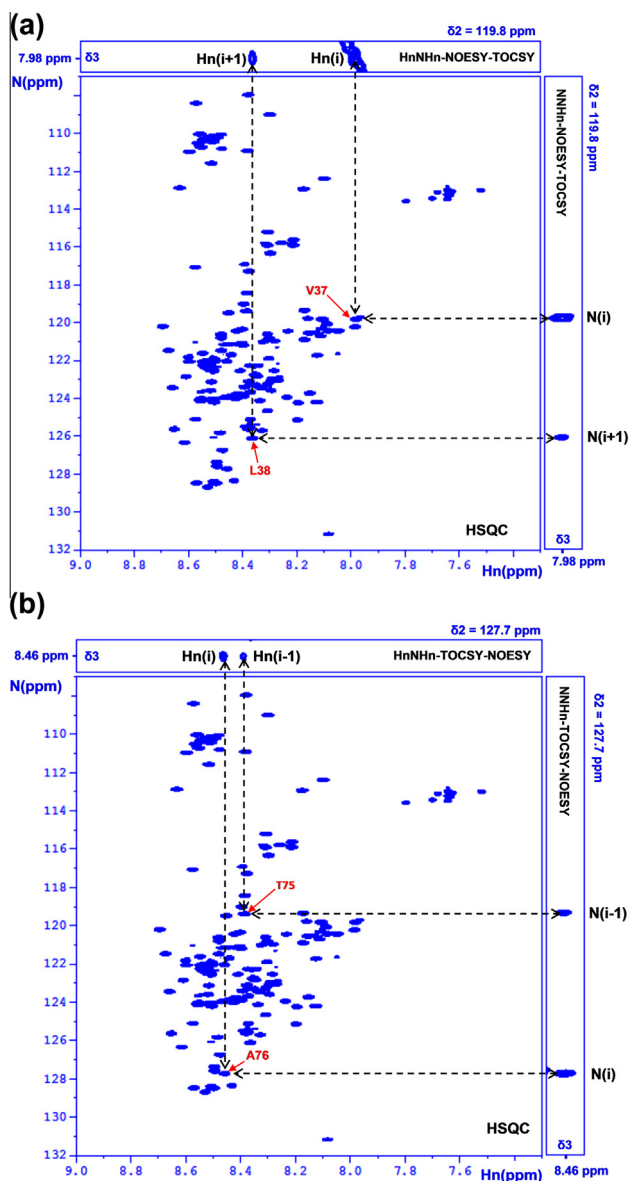


Fig. 5. (top) Assignment strategy of the HSQC spectrum of α -synuclein using 3D- NNH_n -TOCSY-NOESY and 3D- H_nNH_n -TOCSY-NOESY spectra. The connectivity path linking residues A76 to T75 is marked in black lines. A 2D strip of the 3D- NNH_n -TOCSY-NOESY and of the 3D- H_nNH_n -TOCSY-NOESY spectrum is shown on the right and top of the HSQC spectrum, respectively. (bottom) Assignment strategy of HSQC using 3D- NNH_n -NOESY-TOCSY and 3D- H_nNH_n -NOESY-TOCSY spectra. The connectivity path linking residues V37 to L38 is marked in black lines. A 2D strip of the 3D- NNH_n -NOESY-TOCSY and of the 3D- H_nNH_n -NOESY-TOCSY spectrum is shown on the right and top of the HSQC spectrum, respectively.

time and 41.4 ms TOCSY mixing time. The 3D- NNH_n -TOCSY-NOESY (HSQC-TOCSY-NOESY-HSQC) and 3D- NNH_n -NOESY-TOCSY (HSQC-NOESY-TOCSY-HSQC) spectra were each recorded with 8 scans per increment and a relaxation delay of 1 s. Totals of 128, 1, 128, and 2 K complex data points were acquired in t_1 , t_2 , t_3 and t_4 , respectively.

The 3D- H_nNH_n -TOCSY-NOESY spectrum was recorded with 8 scans per increment and a relaxation delay of 1 s. A total of 168, 1, 128, and 2 K complex data points was acquired in t_1 , t_2 , t_3 and t_4 , respectively. The 3D- H_nNH_n -NOESY-TOCSY spectrum was recorded with 8 scans per increment and a relaxation delay of 1 s. A total of 160, 1, 128, and 2 K complex data points was acquired in t_1 , t_2 , and t_3 , respectively.

The 3D TOCSY-HSQC was recorded with 8 scans per increment, 80 ms of TOCSY mixing time. A total of 256, 128, and 2 K complex data points were acquired in t_1 , t_2 , and t_3 .

All spectra's were processing with TOPSPIN. Alpha-Synuclein assignment was performed with the in house developed NMRPY software [37].

Acknowledgments

We thank Dr J. Christodoulou (UCL, London) for a kind gift of the α -synuclein clone. The NMR facilities are funded by the the European community, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France), the Région Nord-Pas de Calais (France), the University of Lille 1 and the Institut Pasteur de Lille. This work has been partly developed and supported by the LABEX (laboratory of excellence program investment for the future) DISTALZ Grant (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). We dedicate the paper to the memory of Dr J.M. Wieruszski, who untimely passed away in 2012.

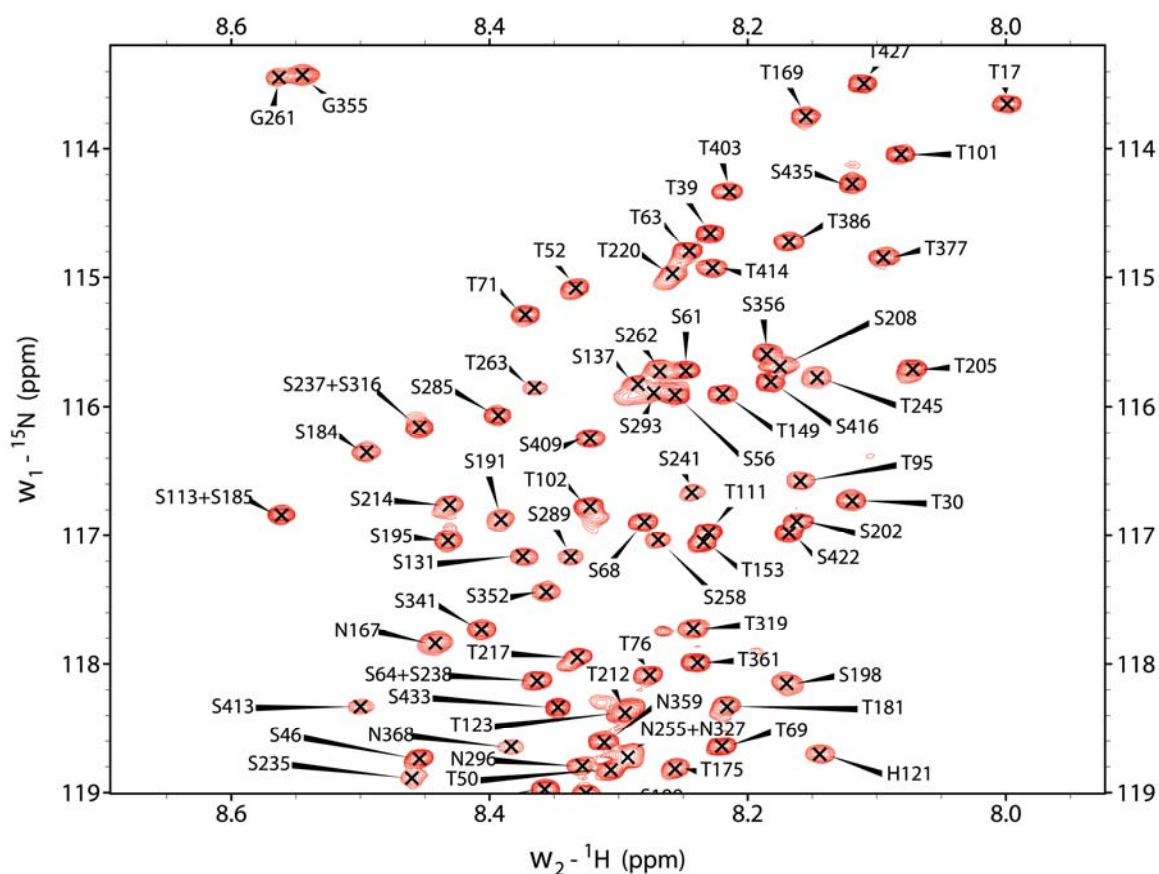
References

- [1] H.J. Dyson, P.E. Wright, Unfolded proteins and protein folding studied by NMR, *Chem. Rev.* 104 (2004) 3607–3622.
- [2] C.W. Bertoncini, R.M. Rasia, G.R. Lamberto, A. Binolfi, M. Zweckstetter, C. Griesinger, C.O. Fernandez, Structural characterization of the intrinsically unfolded protein beta-synuclein, a natural negative regulator of alpha-synuclein aggregation, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 708–722.
- [3] D. Eliezer, Characterizing residual structure in disordered protein States using nuclear magnetic resonance, *Methods Mol. Biol.* 350 (2007) 49–67.
- [4] D. Eliezer, Biophysical characterization of intrinsically disordered proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19 (2009) 23–30.
- [5] M.R. Jensen, P.R.L. Markwick, S. Meier, C. Griesinger, M. Zweckstetter, S. Grzesiek, P. Bernadó, M. Blackledge, Quantitative determination of the conformational properties of partially folded and intrinsically disordered proteins using NMR dipolar couplings, *Structure* 17 (2009) 1169–1185.
- [6] M.R. Jensen, L. Salmon, G. Nodet, M. Blackledge, Defining conformational ensembles of intrinsically disordered and partially folded proteins directly from chemical shifts, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 1270–1272.
- [7] S. Meier, M. Blackledge, S. Grzesiek, Conformational distributions of unfolded polypeptides from novel NMR techniques, *J. Chem. Phys.* 128 (2008) 052204.
- [8] T. Mittag, J.D. Forman-Kay, Atomic-level characterization of disordered protein ensembles, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2007) 3–14.
- [9] D. Eliezer, E. Kutluay, R. Bussell Jr, G. Browne, Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 1061–1073.
- [10] X. Hanouille, A. Badillo, J.-M. Wieruszski, D. Verdegem, I. Landrieu, R. Bartschlagler, F. Penin, G. Lippens, Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13589–13601.
- [11] P. Lebrun, D. Raze, B. Fritzinger, J.-M. Wieruszski, F. Biet, A. Dose, M. Carpentier, D. Schwarzer, F. Allain, G. Lippens, C. Loch, Differential contribution of the repeats to heparin binding of HBHA, a major adhesin of *Mycobacterium tuberculosis*, *Plos One* 7 (2012) e32421.
- [12] D. Verdegem, A. Badillo, J.-M. Wieruszski, I. Landrieu, A. Leroy, R. Bartschlagler, F. Penin, G. Lippens, X. Hanouille, Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 20441–20454.
- [13] A. Dose, S. Liokatis, F.-X. Theillet, P. Selenko, D. Schwarzer, NMR profiling of histone deacetylase and acetyl-transferase activities in real time, *ACS Chem. Biol.* 6 (2011) 419–424.
- [14] I. Landrieu, L. Lacosse, A. Leroy, J.-M. Wieruszski, X. Trivelli, A. Sillen, N. Sibille, H. Schwalbe, K. Saxena, T. Langer, G. Lippens, NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3575–3583.
- [15] S. Liokatis, A. Dose, D. Schwarzer, P. Selenko, Simultaneous detection of protein phosphorylation and acetylation by high-resolution NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 14704–14705.
- [16] P. Selenko, D.P. Frueh, S.J. Elsaesser, W. Haas, S.P. Gygi, G. Wagner, In situ observation of protein phosphorylation by high-resolution NMR spectroscopy, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (2008) 321–329.
- [17] N. Sibille, I. Huvent, C. Fauquant, D. Verdegem, L. Amniai, A. Leroy, J.-M. Wieruszski, G. Lippens, I. Landrieu, Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein, *Proteins* (2011).
- [18] F.-X. Theillet, S. Liokatis, J.O. Jost, B. Bekei, H.M. Rose, A. Binolfi, D. Schwarzer, P. Selenko, Site-specific mapping and time-resolved monitoring of lysine methylation by high-resolution NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 7616–7619.

- [19] O. Zhang, J.D. Forman-Kay, D. Shortle, L.E. Kay, Triple-resonance NOESY-based experiments with improved spectral resolution: applications to structural characterization of unfolded, partially folded and folded proteins, *J. Biomol. NMR* 9 (1997) 181–200.
- [20] S.C. Panchal, N.S. Bhavesh, R.V. Hosur, Improved 3D triple resonance experiments, HNN and HN(C)N, for HN and 15N sequential correlations in (13C, 15N) labeled proteins: application to unfolded proteins, *J. Biomol. NMR* 20 (2001) 135–147.
- [21] R. Weisemann, H. Rüterjans, W. Bermel, 3D triple-resonance NMR techniques for the sequential assignment of NH and 15N resonances in 15N- and 13C-labelled proteins, *J. Biomol. NMR* 3 (1993) 113–120.
- [22] V. Motáčkova, J. Nováček, A. Zawadzka-Kazimierczuk, K. Kazimierczuk, L. Zidek, H. Sanderová, L. Krásný, W. Koźmiński, V. Sklenář, Strategy for complete NMR assignment of disordered proteins with highly repetitive sequences based on resolution-enhanced 5D experiments, *J. Biomol. NMR* 48 (2010) 169–177.
- [23] J. Nováček, N.Y. Haba, J.H. Chill, L. Zidek, V. Sklenář, 4D non-uniformly sampled HCBCACON and $^1\text{J}(\text{NC}\alpha)$ -selective HCBCANCO experiments for the sequential assignment and chemical shift analysis of intrinsically disordered proteins, *J. Biomol. NMR* 53 (2012) 139–148.
- [24] S. Hiller, C. Wasmer, G. Wider, K. Wüthrich, Sequence-specific resonance assignment of soluble nonglobular proteins by 7D APSY-NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 10823–10828.
- [25] R.L. Narayanan, U.H.N. Dürr, S. Bibow, J. Biernat, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, Automatic assignment of the intrinsically disordered protein Tau with 441-residues, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 11906–11907.
- [26] B. Plainchont, A. Martinez, S. Tisse, J.-P. Bouillon, F. Pilard, J.-M. Wieruszski, G. Lippens, D. Jeannerat, J.-M. Nuzillard, New and old NMR experiments for the resonance assignment of complex oligosaccharides—application to a cyclodextrin derivative, *Magn. Reson. Chem.* 49 (2011) 781–787.
- [27] L. Poppe, J. Dabrowski, Sequence determination in oligosaccharides by relayed NOE experiments in the rotating frame, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 (1989) 618–623.
- [28] L. Mueller, S. Campbell-Burk, P. Domaille, 15N-correlated three-dimensional relayed NOESY experiments in uniformly 15N-labeled proteins, *J. Magn. Reson.* 1969 (96) (1992) 408–415.
- [29] C. Fauquant, V. Redeker, I. Landrieu, J.-M. Wieruszski, D. Verdegem, O. Laprèvote, G. Lippens, B. Gigant, M. Knossow, 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 (2011) 33358–33368.
- [30] M.G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature* 388 (1997) 839–840.
- [31] T. Diercks, M. Coles, H. Kessler, An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments, *J. Biomol. NMR* 15 (1999) 177–180.
- [32] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenář, Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, *J. Biomol. NMR* 2 (1992) 661–665.
- [33] V. Sklenář, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek, Gradient-tailored water suppression for 1H–15N HSQC experiments optimized to retain full sensitivity, *J. Magn. Reson.* 102 (1993) 241–245.
- [34] Dhalluin, Wieruszski, Lippens, An improved homonuclear TOCSY experiment with minimal water saturation, *J. Magn. Reson. B* 111 (1996) 168–170.
- [35] A. Palmer III, J. Cavanagh, P. Wright, M.M. Rance, Sensitivity improvement in proton-detected 2-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 93 (1991) 151–170.
- [36] J. Cavanagh, W.J. Chazin, M. Rance, The time dependence of coherence transfer in homonuclear isotropic mixing experiments, *J. Magn. Reson.* 1969 (87) (1990) 110–131.
- [37] D. Verdegem, K. Dijkstra, X. Hanouille, G. Lippens, Graphical interpretation of Boolean operators for protein NMR assignments, *J. Biomol. NMR* 42 (2008) 11–21.

2.1.2) Attribution complète de TAU.

Il existe deux publications qui annoncent l'attribution complète de l'isoforme la plus longue de TAU [129] [132]. Malheureusement ces deux publications ne montrent ni un spectre de TAU 441 annoté, ni une table des déplacements chimiques. Nous avons donc décidé de réaliser l'attribution complète de TAU 441 dans nos conditions expérimentales. Pour cela, nous avons utilisé un logiciel développé dans le laboratoire par le Docteur Dries Verdegem [133]. Ce logiciel peut être défini comme « un outil d'attribution graphique et semi-automatique, qui utilise le concept des produits et sommes des plans spectraux pour faire les connectivités séquentielles et générer des spectres résidu-spécifique ». La méthodologie est détaillée dans l'annexe 1. Grâce à cette méthodologie, nous avons réussi à attribuer 93.2% du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de TAU 411 (table de déplacement chimique en annexe 2). La figure 11 montre quelques parties annotées du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de TAU 411.



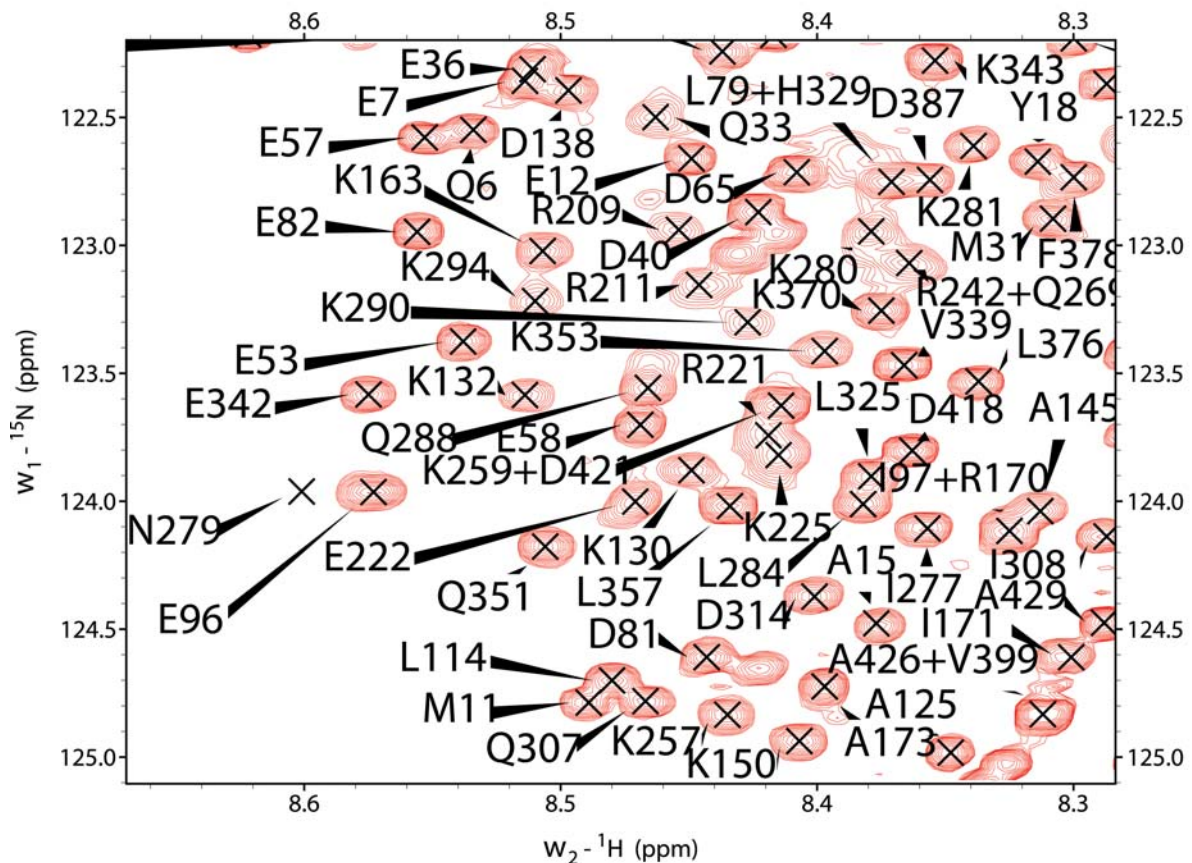


Figure 11 : Quelques zooms annotés du spectre ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N - ^{13}C TAU 411 (300 μM). Le spectre a été enregistré à 900 MHz, 20°C et pH 6.5.

2.2) Caractérisation d'épitope d'anticorps par RMN

Un des grands avantages de la RMN par rapport à d'autres méthodes spectroscopiques est qu'elle ne permet pas seulement de mettre en évidence une interaction moléculaire, mais aussi de la localiser. En effet, les changements spectraux entre le spectre HSQC d'une protéine seule ou en mélange avec un partenaire indiquent qu'il y a interaction, mais aussi où les partenaires se contactent.

Plusieurs équipes cherchent à développer de nouveaux anticorps anti-TAU mais la caractérisation de l'épitope d'interaction d'un anticorps est souvent une tâche très laborieuse par les techniques classiques d'identification : ELISA, *phage display*...

Dans le cadre d'une collaboration qui a pour but de développer des anticorps anti-TAU (publication en soumission en annexe 3), notre attribution

complète de TAU nous a permis de caractériser l'épitope d'interaction de deux anticorps ADx201 et ADx215 par RMN.

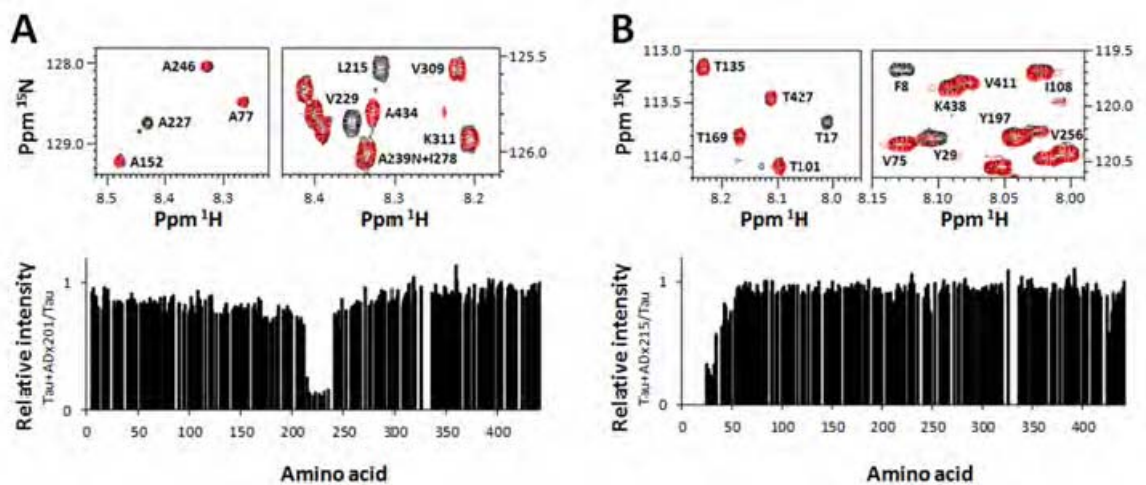


Figure 12 : Caractérisation de l'interaction de TAU avec les anticorps ADx201 (A) et ADx215 (B) par RMN. En haut, certaines régions des spectres concernées dans l'interaction TAU-anticorps, superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -TAU en absence d'anticorps (noir) et ^{15}N -TAU en présence de l'anticorps : ratio TAU/anticorps = 1 (rouge). Les graphiques inférieurs représentent les intensités relatives des acides aminés en présence d'anticorps par rapport à la forme en absence d'anticorps. Une valeur proche de zéro indique que cet acide aminé est potentiellement dans l'épitope d'interaction.

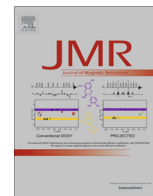
Comme les anticorps sont des macromolécules de haut poids moléculaire, leur interaction avec TAU se traduit par un élargissement des signaux RMN des acides aminés qui participent à l'interaction. En comparant les spectres ^1H - ^{15}N HSQC de TAU en présence ou en absence d'anticorps (figure 12) nous avons pu déterminer facilement les épitopes d'interaction. Dans l'interprétation des résultats il faut également tenir compte du fait que les acides aminés proches du site d'interaction vont également élargir. Typiquement, on estime que cet effet concerne une distance de 6 ou 7 acides aminés. Pour ADx201, l'épitope déterminé est 218-PPTREPK-224 et pour ADx215 l'épitope est 16-GTYGLGDRK-24. Ces résultats confortent ceux de nos collaborateurs obtenus par la méthode ELISA.

2.3) Nouvelles méthodologies pour mesurer des échanges proton deutérium rapides

La vitesse d'échange du proton amide avec le solvant est un paramètre très puissant pour obtenir des informations sur la structure et la dynamique des protéines et des acides nucléiques [134]. Ce paramètre s'est avéré un outil précieux pour étudier les protéines, y compris les voies de repliement [135], les changements conformationnels [136], la dynamique [137], la détermination structurale [138] [139] [140] et les interactions protéine-protéine [141] [142]. Comparée à d'autres méthodes, la RMN est une technique privilégiée pour mesurer l'échange amide, car elle permet une résolution au niveau de l'acide aminé et une interférence minimale avec l'échantillon.

L'échange H/D est de plus en plus utilisé pour l'étude des IDPs et IDRs [143]. La comparaison des valeurs d'échange mesurées à des valeurs « *random coil* » permet très facilement de distinguer les domaines structurés des IDRs [144] et de délimiter les surface d'interaction [145]. Il a surtout été très utilisé pour étudier les phénomènes de structuration par interaction [143]. Quelques exemples sont l'étude de la structuration du domaine I(kappa)B(alpha) ankyrin [146], des changements conformationnels induits par des mutations ou des modifications post-traductionnelles [147] et la détermination des acides aminés impliqués dans le cœur des fibres amyloïdes [138] [148]. Nous avons développé une méthode simple et robuste pour mesurer ce paramètre d'échange H/D à la résolution du résidu individuel et l'avons appliqué à un fragment fonctionnel de TAU avant et après phosphorylation par la kinase PKA.

2.3.1) « *H/D exchange of a 15N labelled Tau fragment as measured by a simple Relax-EXSY experiment* »



H/D exchange of a ^{15}N labelled Tau fragment as measured by a simple Relax-EXSY experiment



Juan Lopez^a, Puneet Ahuja^a, Isabelle Landrieu^{a,b}, François-Xavier Cantrelle^a, Isabelle Huvent^a, Guy Lippens^{a,*}

^a CNRS UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^b CNRS USR 3078, Institut de Recherche Interdisciplinaire, Centre National de la Recherche Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2014

Revised 3 October 2014

Available online 19 October 2014

Keywords:

H/D exchange

Amide protons

Intrinsically unfolded protein

Phosphorylation

ABSTRACT

We present an equilibrium H/D exchange experiment to measure the exchange rates of labile amide protons in intrinsically unfolded proteins. By measuring the contribution of the H/D exchange to the apparent T_1 relaxation rates in solvents of different D_2O content, we can easily derive the rates of exchange for rapidly exchanging amide protons. The method does not require double isotope labelling, is sensitive, and requires limited fitting of the data. We demonstrate it on a functional fragment of Tau, and provide evidence for the hydrogen bond formation of the phosphate moiety of Ser214 with its own amide proton in the same fragment phosphorylated by the PKA kinase.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Amide hydrogen exchange is a powerful tool to obtain information about structure and structural dynamics of proteins and nucleic acids [1]. First introduced by Linderstrøm-Lang [2–5], it has proven a valuable tool for protein studies including folding and refolding pathways [6], conformational changes [7], dynamics [8], structure determination [9–11] and protein–protein interactions [12,13]. Several methods are capable of measuring accurately the protein solvent exchange: mass spectroscopy [12,14,15], neutron crystallography [16,17], and NMR [18–20]. Although NMR is limited by the size of the protein and by the requirement of isotope labelling, it remains a privileged technique to measure exchange rates as it allows a resolution at the level of an individual amino acid with minimal interference with the sample, and data measurement is straightforward. Rapid dissolving of a protonated protein sample into a deuterated buffer and subsequent monitoring of decreasing amide proton intensities thereby is the simplest experiment, but it is limited to the cases of slow H/D exchange [18]. Manipulating the water magnetization and observing how this affects the amide proton intensity is an alternative approach in the case of rapid H/D exchange [21–26]. However, this approach suffers from a number of experimental drawbacks, with radiation damping being a non negligible problem on the high magnetic fields presently available. Moreover, as the water line coincides

with a number of $\text{H}\alpha$ protons, magnetization transfer by a dipolar NOE transfer from the $\text{H}\alpha$ to the amide protons can be misinterpreted as chemical exchange with the water magnetization. The CLEANEX-PM [26] method was developed to eliminate this unwanted NOE transfer in the limit of high τ_c values, by compensating the possible NOE transfer by a rotating frame ROE transfer of opposite sign [27].

Recently, the H/D-SOLEXSY [28] was proposed to measure fast proton deuterium exchange at equilibrium in a mixed $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ buffer as solvent. The mixed solvent thereby assures the presence of two distinct populations of amide nitrogens, bound to either a proton or a deuteron, that can be distinguished through the differential isotope effect of the ^1H or ^2D nucleus on the ^{15}N chemical shift value. Detection of the two nitrogen frequencies starting from the $\text{H}\alpha$ proton of the previous residue (based on the HA(CACO)NH pulse sequence) allows the direct measurement of the exchange between both cross peaks. Although capable of measuring fast water exchange rates in folded and unfolded proteins, this approach requires $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ labelling, is limited in sensitivity because of multiple magnetization transfer steps involving comparatively faster relaxation rates of $\text{H}\alpha$ and $\text{C}\alpha$, and requires complex data analysis by fitting several unknown parameters.

The influence of the H/D exchange on the apparent longitudinal relaxation rate has been described [29,30], and was found to be a potential source of error when exchange is rapid. Here, we propose to exploit it in a constructive manner to extract the exchange rates, and make it more robust by multiplying the T_1 measurements of a given sample in aqueous buffers with variable percentages of H_2O

* Corresponding author.

E-mail address: Guy.Lippens@univ-lille1.fr (G. Lippens).

and D₂O. The Relax-EXSY (Relaxation based EXchange Spectroscopy) experiment is thereby a simpler version of H/D-SOLEXSY, and the contribution of the chemical H/D exchange to the apparent T_1 rate can readily be extracted for each residue. The Relax-EXSY experiment does not require ¹³C labelling, and avoids any lengthy ¹⁵N to ¹³C coherence transfer, thereby gaining considerable sensitivity over the H/D-SOLEXSY experiment. Because of this increased sensitivity, the measurement can easily be performed with several H₂O/D₂O ratios to increase its accuracy. The experiment does not rely upon the manipulation of the water magnetization, and the data can be fitted with only two unknown parameters.

H/D exchange has recently been applied to the study of intrinsically unfolded proteins [31], and we first illustrate the Relax-EXSY method by measuring the amide exchange rates for the different amino acids of the TauF4 fragment. This fragment, that spans residues [208–334] from the neuronal Tau protein, is fully functional in terms of microtubule assembly [32] but also forms the Alzheimer's disease characteristic fibres when incubated with heparin [33]. We validate the method by measuring the exchange rates of the same sample with the H/D-SOLEXSY method, and equally use theoretical values parameterized on the basis of exchange rates measured on model peptides [34] to see whether the resulting exchange rates reveal any residual structure in this Tau fragment. We finally apply the Relax-EXSY method to explore the amide proton protection due to phosphorylation of a Serine in the same TauF4 fragment.

2. Results and discussion

As in the ¹⁵N T_1 relaxation experiment, amide proton magnetization is transferred during the first refocused INEPT transfer period (Fig. 1, time points a to b) to its nitrogen, resulting in a $-N_{\text{H}}^z$ magnetization term for the protonated amide groups. Deuterated amide nitrogen atoms will not lead to detectable magnetization, as the corresponding term will be destroyed by the G2 pulse field gradient. During the mixing time (points b to c, Fig. 1), the $-N_{\text{H}}^z$ term will return to its equilibrium value through longitudinal relaxation (with a rate $R_{1,\text{NH}}$) or through exchange of the amide proton into a deuteron. Because back-exchange of the N–D function into N–H is a possibility, especially when the H/D exchange

is rapid on the time scale of the mixing time, the longitudinal relaxation of the resulting N_{D}^z term with a $R_{1,\text{ND}}$ relaxation rate also has to be considered. After the mixing time, only the resulting protonated nitrogen term (N_{H}^z) will evolve into detectable magnetization when we neglect the exchange during the back transfer between time points c and the detection.

The Relax-EXSY method hence requires two independent experiments. Firstly, we measure the $R_{1,\text{NH}}$ relaxation rate for the different amide functions when the protein sample is dissolved in a fully protonated solvent. Secondly, we lyophilize the sample, redissolve it in a mixture of H₂O/D₂O, and measure the apparent T_1 values as before. Alternative sample preparation procedures can be considered, if lyophilisation is a problem. The mole fractions of H₂O/D₂O can be directly transferred to P_{H} and P_{D} , but not directly to the fractions of N(H) and N(D) because of the small difference between K_{HD} and K_{DH} ($K_{\text{HD}} = 1.1 * K_{\text{DH}}$) [35]. Comparing the decay rates of the nitrogen magnetization from both experiment allows us to extract the two unknown parameters, K_{DH} and $R_{1,\text{ND}}$, knowing that we have the $R_{1,\text{NH}}$ rate, $I(t)$ and $I(0)$ as experimental inputs (see Supplemental Information for the fitting procedure). Fig. 2 illustrates the resulting curves for two different residues (L243 and D252) of the TauF4 fragment at pH 6.4 and 25 °C. Qualitatively, we observe that the apparent longitudinal relaxation of the amide nitrogen magnetization for all cross peaks indeed is faster when the D₂O fraction of the solvent used to dissolve the sample is increased. Using the experimentally determined $R_{1,\text{NH}}$ rate from the black curve, we can fit the remaining two parameters, and find values of 6.4 s⁻¹ and 3.5 s⁻¹ for the H/D exchange rate of these two residues.

For certain peaks (V248 and V313), the effective decay curves vary little when increasing the D₂O content of the solvent from 5% to 55% (Fig. 2). As expected, the resulting exchange rate for these residues is significantly slower, and the fitting the data yields an exchange rate of 0.6 s⁻¹ for both residues. Similar to the SOLEXSY experiment, the true T_1 relaxation of the ¹⁵N magnetization sets a lower limit to the exchange rates than can be measured by the Relax-EXSY method. When exchange is slow on this time scale, the chemical exchange of an N–H into N–D will not contribute significantly enough to the apparent relaxation rate for being observed experimentally. Excluding the prolines and those peaks

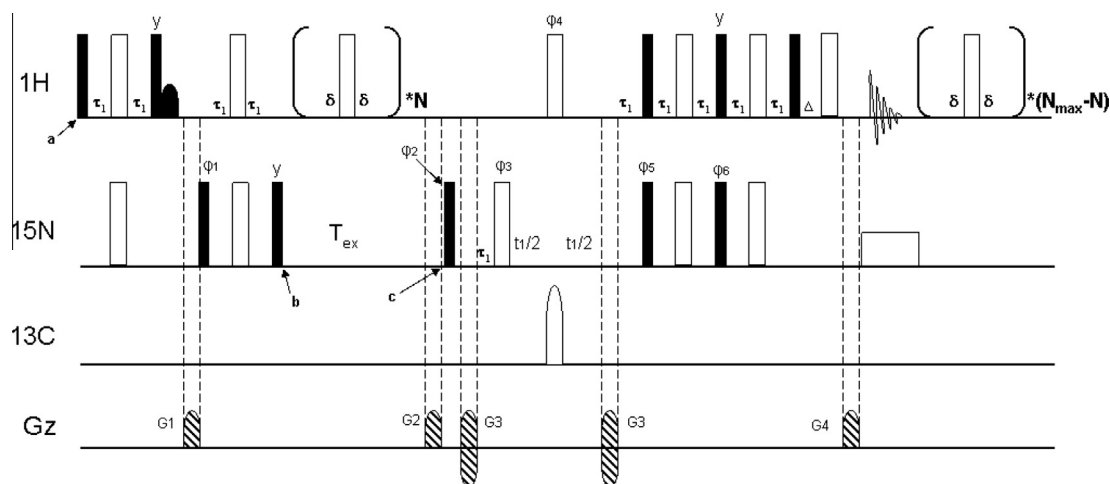


Fig. 1. Pulse sequence used for the Relax-EXSY experiment. Filled and empty rectangles indicate 90° and 180° pulses, respectively, applied along x, unless indicated specifically. Pulse sequences Delays: $\tau_1 = 1/4 J_{\text{NH}}$, Δ = duration of gradient + field recovery, T = mixing time (1.5 ms to 1.2 s). Pulsed field gradients, G1, G2, G3, and G4 are applied along the z-axis. The relative strength of pulsed field gradients G3 and G4 is given by $(2 * G3)/G4 = \gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}$. Phase cycling: $\phi_1 = 4(x), 4(-x)$; $\phi_2 = y, -y$; $\phi_3 = x, 2(-x)$; $\phi_4 = 2(x), 2(-x)$; $\phi_5 = 2(x), 2(-y)$; $\phi_6 = 2(-y), 2(y)$; $\phi_{\text{rec}} = x, 2(-x), x, -x, 2(-x), x$. Frequency labelling in F1 was obtained by increasing the t_1 delay, using the echo/anti-echo method (with G2 and ϕ_6) for selection of the orthogonal N^z components and TPPI selection (with ϕ_2 and ϕ_3) for incremental t_1 delays. Temperature compensation was introduced by complementing the decoupling scheme during the mixing time with its missing duration after the proton acquisition, such as to assure a constant period of decoupling (corresponding to T_{max} , the maximal exchange delay). Omitting the decoupling scheme, however, was found to have no significant influence on the resulting exchange rates.

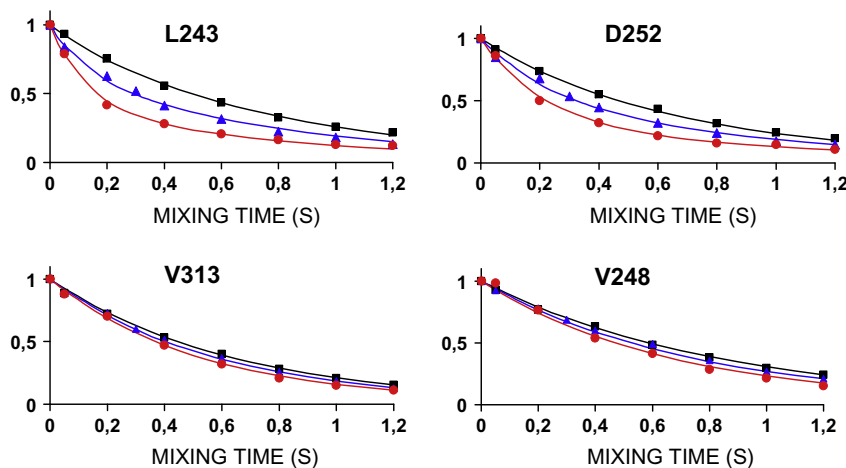


Fig. 2. Relax-EXSY decay curves at 600 MHz for residues L243, D252 (top) showing rapid exchange rates, or V313, V248 (bottom) showing slow exchange rates. Black rectangles, blue triangles and red circles correspond to the measured intensities for 5%, 30% and 55% D₂O in the solvent mixture, respectively. Black, blue and red lines correspond to the fitting of the data with $P_D = 0.05, 0.3$ and 0.55 . Sample conditions: TauF4 300 μ M, pH 6.4, $T_e = 298$ K. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that show overlap in the ¹H, ¹⁵N HSQC spectrum, we could extract meaningful exchange rates for 50% of the cross peaks for the TauF4 sample measured on a 600 MHz spectrometer.

To validate the method, we measured the water exchange rates with the CLEANEX-PM method [26]. Although we first attempted the experiment on our reference sample (300 μ M in 95% aqueous buffer with 5% D₂O) of the Relax-EXSY experiment, the limited sensitivity of the CLEANEX-PM experiment did not allow for a sufficient S/N, and we hence turned to a 1.05 mM sample of the same fragment dialyzed against the same buffer. The $R_{1\rho}$ water relaxation rate was estimated to be 0.6 s⁻¹ on the basis of 1D-CLEANEX-PM experiment without water suppression. The relaxation of the amide proton magnetization limits the mixing time in this method to 20–40 ms, and hence only those residues that show a sufficiently rapid exchange behaviour yield a curve that could be fitted with confidence. Build-up of the amide magnetization coming from the exchange with water could only be fitted satisfactorily for 15% of the non-overlapping cross peaks (Fig. S1). For those residues characterized by rapid H/D exchange, the extracted values fitted well with those from the Relax-EXSY experiment, although the values derived from the CLEANEX-PM method tend to be slightly inferior than those from the Relax-EXSY experiment (Fig. S1). A plausible cause is that the NOESY/ROESY compensation during the spin-lock period is not perfect, as amide nitrogen-proton vectors in IDPs are probably not in the regime of $\omega\tau_c \gg 1$. For the more slowly exchanging residues such as Val248 and Val313, magnetization transfer with water was too weak to be detectable, precluding the measurement of the exchange rates.

To further validate the method, we prepared a novel ¹⁵N/¹³C labelled sample, allowing us to compare directly with the SOLEXY experiment. Because in the previous series, the limitation on the obtained number of exchange rates (50%) was mainly due to the overlap of peaks, we prepared this doubly labelled TauF4 sample at pH 6.75, but at 20 °C. Overlap was less (Fig. S2), and we could extract exchange values for 75% of the expected cross peaks. Comparison with the values extracted on three independent samples showed the reproducibility of the method (Fig. 3). When predicting the exchange values with the SPHERE server while allowing the pH to vary by 0.1 units, we obtained similar error bars, indicating that sample per sample pH variations are a possible source of error. Interestingly, the $R_{1N(D)}$ rates extracted for the deuterated amide nitrogens characterized by an exchange rate superior to 7 s⁻¹ were relatively uniform, with an average value of 0.3 ± 0.1 s⁻¹ compared

to and average $R_{1N(H)}$ equal to 1.4 ± 0.1 s⁻¹ for the same residues in 95% H₂O. Direct ¹⁵N observation yielded a $R_{1N(D)}/R_{1N(H)}$ ratio of 0.35 for the amide nitrogens of residues in the flexible loops of ubiquitin [36], in reasonable agreement with our data.

A potential source of systematic error that might particularly affect those residues characterized by slow exchange rates (such as V313, Fig. 2) is the increase in viscosity when increasing the D₂O content. Although the possibility to observe IDPs with standard liquid NMR parameters in in-cell experiments [37,38] hints towards a limited influence of the overall tumbling rate, we evaluated experimentally this potentially confounding factor by measuring the relaxation rates for the same TauF4 fragment at pH 4 and 293 K, where exchange is expected to be slow. Relaxation rates in 95% H₂O/5% D₂O and 50% H₂O/50% D₂O were found to be very close for all residues (Figs. 4 and S3), and can certainly not explain the differential rates observed for amide protons such as V313 upon increase of the D₂O content (Fig. 4). The small increase in apparent relaxation rate for all amide protons at pH 4.0 is in agreement with the estimated persistence length of 6–7 residues in IDPs [39,40]. For peptides of this size, an increase in viscosity is still expected to decrease the T_1 value [41]. We equally tested the possibility to decrease the recovery delay in the Relax-EXSY experiment. Although a value of 3–5 T_1 is generally recommended to obtain accurate absolute values for the T_1 values [42], extraction of the exchange rates requires only that the apparent T_1 relaxation rate is constant between the different samples. When measuring on two independent samples, we found an excellent correlation between Relax-EXSY experiments with 1 or 5 s recovery delay (Fig. S4), which can lead to a significant gain of time.

The presence of an exchange peak on a single sample in the H/D-SOLEXY experiment allows to visualise directly the exchange process, and thereby eliminates potential systematic errors from subtle changes between the different samples. We applied the method to our ¹⁵N/¹³C labelled TauF4 sample, and fitted the build-up curves as described [28]. As expected, build-up curves are robust for those residues where the Relax-EXSY method gives a strong dependence of the apparent relaxation rate on the D₂O content, whereas the cross peaks remain of low intensity for slowly exchanging amid protons such as in V313 (Fig. 4). Nevertheless, the correlation between the values extracted from both experiments was excellent (Fig. 4).

Comparison of our experimental values to the random coil values obtained from the SPHERE server [34,43–45] allows to evaluate

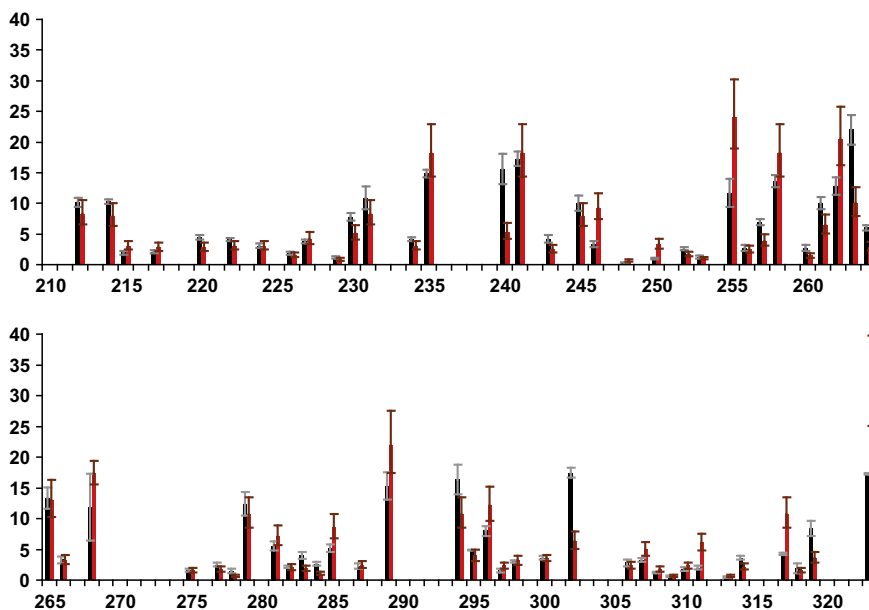


Fig. 3. Exchange rates along the primary sequence of TauF4. Experimental values are in black, theoretical values obtained with the SPHERE server in red. Error bars come from 3 independent samples for the experimental values, and by varying the pH by 0.1 units in the SPHERE prediction. Sample conditions : TauF4 300 μ M, pH 6.75, T_e = 293 K. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

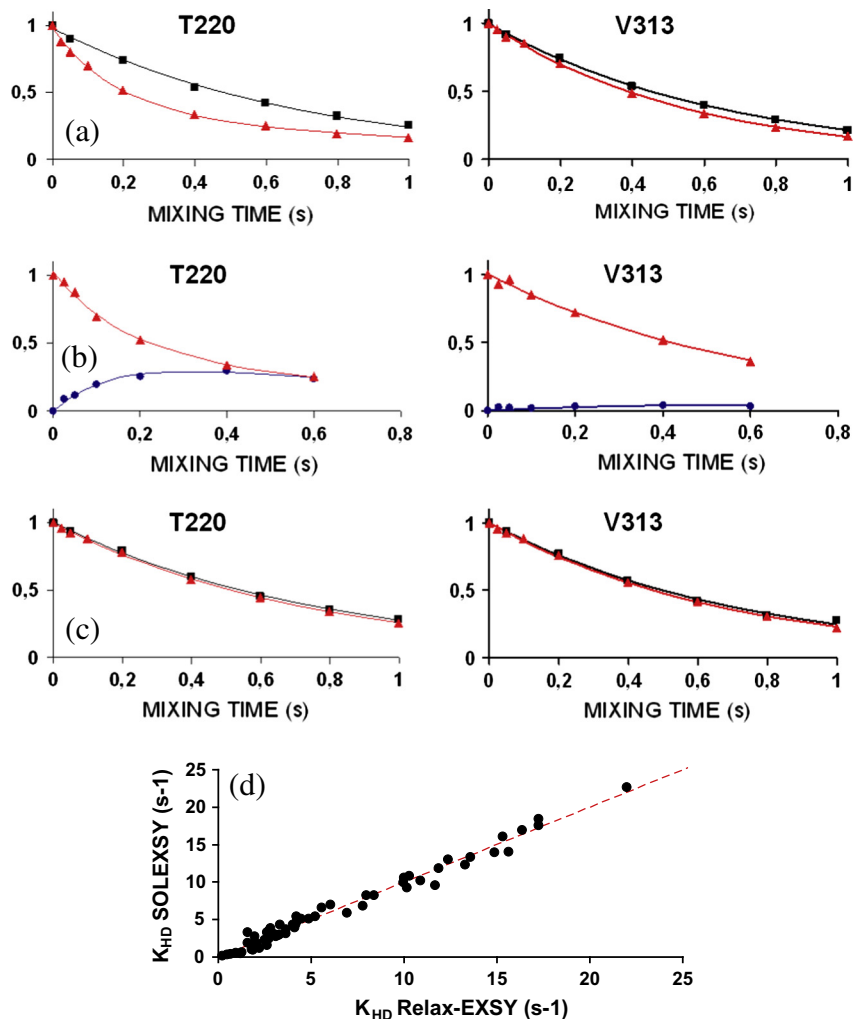


Fig. 4. (a) Experimental Relax-EXSY curves on a $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ labelled sample, pH 6.75, T_e = 293 K. (b) Corresponding build-up curves from the H/D-SOLEXSY experiment. (c) Experimental Relax-EXSY curves on a $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ labelled sample, pH 4, T_e = 293 K. (d) Correlation between the exchange rates derived from the Relax-EXSY and SOLEXSY experiments, both acquired on the same $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ labelled sample, pH 6.75, T_e = 293 K.

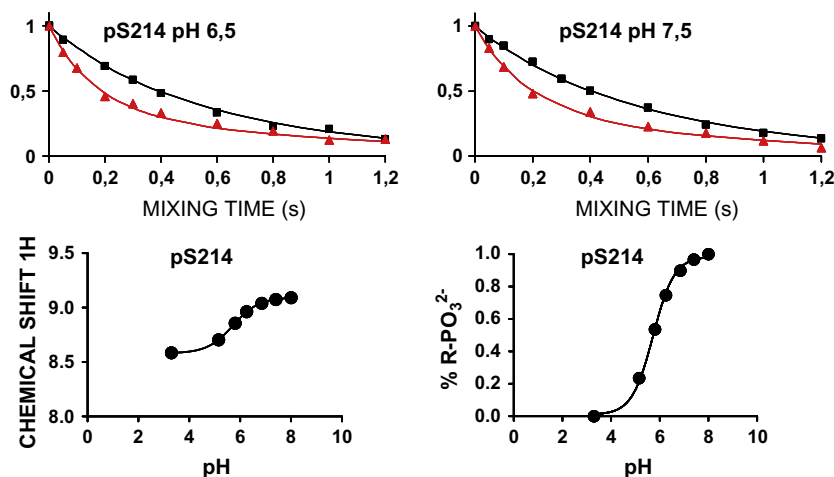


Fig. 5. (top) Relax-EXSY decay curves for phospho-Ser214 at two different pH values (left, 6.45 and right, 7.5). Black rectangles and red triangles correspond to measured intensities for 5% and 50% D₂O solvents, respectively. (bottom, left) Chemical shift variation of the pSer214 amide proton when varying the pH from 3 to 8. (bottom, right) Transition of the mono- to di-anionic character of the pSer214 side chain. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

any residual structure within the TauF4 fragment. The theoretical prediction accounts for the nature of the downstream and upstream neighbours when calculating the exchange rates. The slow exchange rates measured for Val248 and Val313, for example, are predicted on the basis of the shielding effect of the Val side chain and of the neighbouring proline residue [34], and therefore do not reflect any specific protection due to residual secondary structure. We conclude from the good agreement between theoretical and experimental values (Fig. 2) that the TauF4 fragment does not contain any stable secondary structure elements.

In IDP's or unfolded domains, the phosphorylation of serines and threonines results in a large downfield shift of their amide proton resonances [46]. These chemical shift changes have been attributed to the formation of a hydrogen bond between the phosphate moiety and its own amide proton [47]. The hydrogen bond stability is modulated by the transition from a mono-anionic to di-anionic character of the phosphate group when the pH is increased [47,48]. Typical pK_a values of 6.04 or 6.32 characterize the transition for phosphorylated Serine or Threonine residues, respectively [49]. Here, we explore the existence of this hydrogen bond by measuring the effect of phosphorylation on the amide proton water exchange using the same TauF4 fragment phosphorylated by the PKA kinase on its Ser214 residue [50]. Comparing the exchange rates (K_{DH}) for the same Ser214 in both samples (TauF4 and phospho-TauF4), we find that at pH 6.45, the amide proton of the phosphorylated serine ($K_{DH} = 4.9 \text{ s}^{-1}$) exchanges at slower rate than the same proton in the non-phosphorylated serine ($K_{DH} = 6.2 \text{ s}^{-1}$) (Fig. 5). At pH 7.5, however the exchange rate of the phospho-serine amide proton drops even further to $K_{DH} = 4.1 \text{ s}^{-1}$. In contrast, the same amide proton in TauF4 at pH 7.5 exchanges so fast (the SPHERE server predicts a value of 71 s^{-1} under these conditions) that its NMR signal in the HSQC spectrum, despite the use of water flip back pulses [51], becomes unobservable. In order to explain this differential behaviour at the two pH values, we experimentally determined the pK_a values by monitoring the amide proton resonance of pSer214 at different pH values. The resulting pK_a was found to be 5.7, implying that at pH 6.45, the phosphate group remains for nearly 15% in its mono-anionic form (Fig. 5). If this exchange between mono- and di-anionic forms is fast, we can expect the exchange of the amide proton with water protons to be dominated by the fraction of time it spends in the mono-anionic form. At pH 7.5, the phosphate group is almost exclusively in its di-anionic form, characterized by a strong hydrogen bond that efficiently protects the amide proton from exchange.

The counter-intuitive decrease of K_{DH} values for pSer214 when increasing the pH hence can be explained on the basis of the transition to the di-anionic form of the phosphate moiety (see Fig. 5).

3. Conclusion

We have presented here a simple and highly sensitive experiment to measure the H/D exchange rates for amide protons in an intrinsically unfolded protein. Its high sensitivity, easy implementation and straightforward fitting of the desired parameters should make it into a method of choice for measuring the amide exchange rates of rapidly exchanging amide protons by NMR. We have used the method to probe amide exchange in a functional fragment of Tau, and to show that the strong hydrogen bond between the phosphate moiety of a phosphorylated Serine and its own amide proton reduces the exchange rate even at higher pH values.

4. Experimental

The TauF4 fragment was produced and purified as previously described [32]. Phosphorylation of TauF4 was accomplished by *in vitro* phosphorylation of the recombinant sample by the PKA kinase as described previously [50]. Limiting the incubation time of the sample with the recombinant kinase to 10 min ensures the single but complete phosphorylation of the Ser214 residue in TauF4.

All the experiments were performed at 25 °C on Bruker Avance I spectrometer operating at 600 MHz proton frequency, and equipped with a cryogenic triple resonance probe head. Further details are given in the [Supplemental Information](#).

The data fitting was performed with GraphPad PRISM 5 software. Further details are given in the [Supplemental Information](#).

Acknowledgments

We thank Prof. Skrynnikov for providing the SOLEXY NMR sequence. The research leading to these results was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-Blanc-6320-01, and program MALZ-TAF), the LABEX (laboratory of excellence program investment for the future) DISTALZ grant (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease), and the CNRS Large Scale Facility NMR THC Fr3050. The NMR facility is

funded by the European Community, the CNRS, the Région Nord-Pas de Calais (France), the University of Lille 1, and the Institut Pasteur de Lille.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2014.10.008>.

References

- [1] S.W. Englander, N.R. Kallenbach, Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids, *Q. Rev. Biophys.* 16 (1983) 521–655.
- [2] A. Hvidt, G. Johansen, K. Linderstrøm-Lang, F. Vaslow, Exchange of deuterium and ^{18}O between water and other substances. I. Methods, *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. Chim.* 29 (1954) 129–157.
- [3] A. Hvidt, K. Linderstrøm-Lang, Exchange of deuterium and ^{18}O between water and other substances. III. Deuterium exchange of short peptides, Sanger's a-chain and insulin, *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. Chim.* 29 (1955) 385–402.
- [4] A. Hvidt, K. Linderstrøm-Lang, Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions, *Biochim. Biophys. Acta* 14 (1954) 574–575.
- [5] A. Berger, K. Linderstrøm-Lang, Deuterium exchange of poly-DL-alanine in aqueous solution, *Arch. Biochem. Biophys.* 69 (1957) 106–118.
- [6] T. Uzawa, C. Nishimura, S. Akiyama, K. Ishimori, S. Takahashi, H.J. Dyson, et al., Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 13859–13864.
- [7] L. Tang, S. Sundaram, J. Zhang, P. Carlson, A. Matathia, B. Parekh, et al., Conformational characterization of the charge variants of a human IgG1 monoclonal antibody using H/D exchange mass spectrometry, *mAbs* 5 (2013) 114–125.
- [8] A. Sijoka, D. Wilson, Probing protein ensemble rigidity and hydrogen–deuterium exchange, *Phys. Biol.* 10 (2013) 056013.
- [9] C. Del Mar, E.A. Greenbaum, L. Mayne, S.W. Englander, V.L. Woods Jr., Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 15477–15482.
- [10] S. Sharma, H. Zheng, Y.J. Huang, A. Ertekin, Y. Hamuro, P. Rossi, et al., Construct optimization for protein NMR structure analysis using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, *Proteins* 76 (2009) 882–894.
- [11] Y.-H. Lee, Y. Goto, Kinetic intermediates of amyloid fibrillation studied by hydrogen exchange methods with nuclear magnetic resonance, *Biochim. Biophys. Acta* 2012 (2012) 1307–1323.
- [12] J.G. Mandell, A. Baerga-Ortiz, A.M. Falick, E.A. Komives, Measurement of solvent accessibility at protein–protein interfaces, in: G.U. Nienhaus (Ed.), *Protein–Ligand Interact.* Humana Press, 2005, pp. 65–79.
- [13] A. Baerga-Ortiz, C.A. Hughes, J.G. Mandell, E.A. Komives, Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein, *Protein Sci.* 11 (2002) 1300–1308.
- [14] Z. Zhang, D.L. Smith, Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: a new tool for protein structure elucidation, *Protein Sci.* 2 (1993) 522–531.
- [15] T.E. Wales, J.R. Engen, Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 158–170, <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20064>.
- [16] N. Niimura, T. Chatake, K. Kurihara, M. Maeda, Hydrogen and hydration in proteins, *Cell Biochem. Biophys.* 40 (2004) 351–369.
- [17] N. Niimura, S. Arai, K. Kurihara, T. Chatake, I. Tanaka, R. Bau, Recent results on hydrogen and hydration in biology studied by neutron macromolecular crystallography, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63 (2006) 285–300.
- [18] G. Wagner, K. Wüthrich, Amide protein exchange and surface conformation of the basic pancreatic trypsin inhibitor in solution. Studies with two-dimensional nuclear magnetic resonance, *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 343–361.
- [19] M.M.G. Krishna, L. Hoang, Y. Lin, S.W. Englander, Hydrogen exchange methods to study protein folding, *Methods* 34 (2004) 51–64.
- [20] S.W. Englander, L. Mayne, Protein folding studied using hydrogen-exchange labeling and two-dimensional NMR, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21 (1992) 243–265.
- [21] G.D. Henry, B.D. Sykes, Saturation transfer of exchangeable protons in ^1H -decoupled ^{15}N INEPT spectra in water. Application to the measurement of hydrogen exchange rates in amides and proteins, *J. Magn. Reson. B* 102 (1993) 193–200.
- [22] C. Dalvit, U. Hommel, New pulsed field gradient NMR experiments for the detection of bound water in proteins, *J. Biomol. NMR* 5 (1995) 306–310.
- [23] G. Gemmecker, W. Jahnke, H. Kessler, Measurement of fast proton exchange rates in isotopically labeled compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 11620–11621.
- [24] K. Zangger, I.M. Armitage, Sensitivity-enhanced detection of fast exchanging protons by an exchange-edited gradient HEHAHA-HSQC experiment, *J. Magn. Reson.* 135 (1998) 70–75.
- [25] S. Mori, C. Abeygunawardana, M.O. Johnson, P.C.M. Vanzijl, Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short Interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation, *J. Magn. Reson. B* 108 (1995) 94–98.
- [26] T.L. Hwang, P.C. van Zijl, S. Mori, Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection scheme, *J. Biomol. NMR* 11 (1998) 221–226.
- [27] C. Griesinger, R.R. Ernst, Frequency offset effects and their elimination in NMR rotating-frame cross-relaxation spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 75 (1987) 261–271.
- [28] V. Chevelkov, Y. Xue, D.K. Rao, J.D. Forman-Kay, N.R. Skrynnikov, $^{15}\text{N}/\text{D}$ -SOLESY experiment for accurate measurement of amide solvent exchange rates: application to denatured drkN SH3, *J. Biomol. NMR* 46 (2010) 227–244.
- [29] S. Jurt, O. Zerbe, A study on the influence of fast amide exchange on the accuracy of (^{15}N) relaxation rate constants, *J. Biomol. NMR* 54 (2012) 389–400.
- [30] P.R. Rosevear, D.C. Fry, A.S. Mildvan, Temperature dependence of the longitudinal relaxation rates and exchange rates of the amide protons in peptide substrates of protein kinase, *J. Magn. Res.* 61 (1985) 102–115.
- [31] D. Balasubramanian, E.A. Komives, Hydrogen-exchange mass spectrometry for the study of intrinsic disorder in proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 2013 (2013) 1202–1209, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.009>.
- [32] C. Fauquant, V. Redeker, I. Landrieu, J.-M. Wieruszkeski, D. Verdegem, O. Laprévote, et al., 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 (2011) 33358–33368.
- [33] I. Huvent, A. Kamah, F.-X. Cantrelle, N. Barois, C. Slomianny, C. Smet-Nocca, et al., A functional fragment of Tau forms fibers without the need for an intermolecular cysteine bridge, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445 (2014) 299–303.
- [34] Y. Bai, J.S. Milne, L. Mayne, S.W. Englander, Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange, *Proteins* 17 (1993) 75–86.
- [35] A.C. LiWang, A. Bax, Equilibrium protium/deuterium fractionation of backbone amides in U- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labeled human ubiquitin by triple resonance NMR, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 12864–12865, <http://dx.doi.org/10.1021/ja9630553>.
- [36] P.R. Vasos, J.B. Hall, R. Kümmerle, D. Fushman, Measurement of ^{15}N relaxation in deuterated amide groups in proteins using direct nitrogen detection, *J. Biomol. NMR* 36 (2006) 27–36.
- [37] J.-F. Bodart, J.-M. Wieruszkeski, L. Amniai, A. Leroy, I. Landrieu, A. Rousseau-Lescuyer, et al., NMR observation of Tau in *Xenopus* oocytes, *J. Magn. Reson.* 1997 (1997) 252–257.
- [38] A. Binolfi, F.-X. Theillet, P. Selenko, Bacterial in-cell NMR of human α -synuclein: a disordered monomer by nature?, *Biochem Soc. Trans.* 40 (2012) 950–954, <http://dx.doi.org/10.1042/BST20120096>.
- [39] H. Schwalbe, K.M. Fiebig, M. Buck, J.A. Jones, S.B. Grimshaw, A. Spencer, et al., Structural and dynamical properties of a denatured protein. Heteronuclear 3D NMR experiments and theoretical simulations of lysozyme in 8 M urea, *Biochemistry* 36 (1997) 8977–8991, <http://dx.doi.org/10.1021/bi970049q>.
- [40] J. Klein-Seetharaman, M. Oikawa, S.B. Grimshaw, J. Wirmer, E. Duchardt, T. Ueda, et al., Long-range interactions within a nonnative protein, *Science* 295 (2002) 1719–1722, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067680>.
- [41] G. Lippens, K. Hallenga, D. Van Belle, S.J. Wodak, N.R. Nirmala, P. Hill, et al., Transfer nuclear Overhauser effect study of the conformation of oxytocin bound to bovine neurophysin I, *Biochemistry* 32 (1993) 9423–9434.
- [42] J.W. Peng, G. Wagner, Mapping of the spectral densities of N–H bond motions in eglin c using heteronuclear relaxation experiments, *Biochemistry* 31 (1992) 8571–8586.
- [43] G.P. Connelly, Y. Bai, M.F. Jeng, S.W. Englander, Isotope effects in peptide group hydrogen exchange, *Proteins* 17 (1993) 87–92.
- [44] A.D. Robertson, R.L. Baldwin, Hydrogen exchange in thermally denatured ribonuclease A, *Biochemistry* 30 (1991) 9907–9914.
- [45] J.J. Englander, J.R. Rogero, S.W. Englander, Protein hydrogen exchange studied by the fragment separation method, *Anal. Biochem.* 147 (1985) 234–244.
- [46] F.-X. Theillet, C. Smet-Nocca, S. Liokatis, R. Thongwichian, J. Kosten, M.-K. Yoon, et al., Cell signaling, post-translational protein modifications and NMR spectroscopy, *J. Biomol. NMR* 54 (2012) 217–236.
- [47] K.-K. Lee, E. Kim, C. Joo, J. Song, H. Han, M. Cho, Site-selective intramolecular hydrogen-bonding interactions in phosphorylated serine and threonine dipeptides, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 16782–16787.
- [48] J.-T. Du, Y.-M. Li, Wei, G.-S. Wu, Y.-F. Zhao, K. Kanazawa, et al., Low-barrier hydrogen bond between phosphate and the amide group in phosphopeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 16350–16351.
- [49] E.A. Bienkiewicz, K.J. Lumb, Random-coil chemical shifts of phosphorylated amino acids, *J. Biomol. NMR* 15 (1999) 203–206.
- [50] I. Landrieu, L. Lacosse, A. Leroy, J.-M. Wieruszkeski, X. Trivelli, A. Sillen, et al., NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3575–3583.
- [51] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenář, Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, *J. Biomol. NMR* 2 (1992) 661–665.

Supplemental Information

H/D exchange of a ^{15}N labelled Tau fragment as measured by a simple Relax-EXSY experiment

Juan Lopez¹, Puneet Ahuja¹, Isabelle Landrieu^{1,2}, François-Xavier Cantrelle¹, Isabelle Huvent¹, Guy Lippens^{1*}

NMR measurements

TauF4 CLEANEX-PM measurements were recorded on a 1.05 mM ^{15}N -TauF4 sample in an aqueous buffer at pH 6.45 containing 25mM of phosphate, 25 mM sodium chloride, 2.5 mM EDTA, 2 mM DTT, and 5% of D_2O . Spectra were recorded with 128 increments in the t_1 dimension and 128 scans per increment, with a relaxation delay of 2s between the transients. Exchange mixing times were 5ms, 10ms, 15ms and 20ms.

Relax-EXSY measurements were initially recorded on a 300 μM TauF4 sample pH 6.4 at 298K, with three different D_2O ratios (55%, 30% and 5%). Spectra were recorded with 16 scans per increment, with an interscan delay of 5s. Spectra with nine different mixing times (1.5 ms, 50 ms, 200 ms, 300 ms, 400 ms, 600 ms, 800 ms, 1s and 1.2s) were recorded. A total of 128 and 2048 complex data points were acquired in the t_1 , t_2 dimensions, respectively. The pulse sequence used corresponds to the one used to measure the ^{15}N T_1 relaxation times, including sensitivity enhancement (Figure 1). Spectra were recorded in an interleaved fashion. All spectra were processed with the TOPSPIN 2.1 software. Peak intensity was extracted with SPARKY 3.114 software.

In a second series of experiments, Relax-EXSY measurements were recorded on a 600 μM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelled TauF4 sample pH 6.75 at 293K, with two different D_2O ratios (50% and 5%). Spectra were recorded with 8 scans per increment, with an interscan delay of 1 or 5s. Spectra with nine different mixing times (1.5ms, 25ms, 50ms, 100ms, 200ms, 400ms, 600ms, 800ms and 1s) were recorded. A total of 128 and 2048 complex data points were acquired in the t_1 , t_2 dimensions, respectively.

The SOLEXY experiment was set up on the same experiment, using the pulse sequence provided by Dr. Skrynnikov. Spectra were recorded with 7 different exchange mixing times (10us, 25ms, 50ms, 100ms, 200ms, 400ms and 600ms). Each spectrum was recorded with two initial conditions +Nx(H), +Nx(D) and -Nx(H), +Nx(D) in an interleaved fashion. Each initial condition was recorded with 128 increments in the F1 dimension and 32 scans per increment, with a relaxation delay of 5s.

pS214-TauF4 SEXSY measurements were recorded at two different pH values (6.45 and 7.5) on a 100µM 15N-pS214-TauF4 sample with 5% and 50% of solvent deuteration. The phosphorylation causes a significant shift of the amide resonance of the phosphorylated Ser214 [46], therefore, spectra could be recorded as 1D T₁-HSQC spectra. They were recorded with 1024 scans, with an interscan delay of 5s and mixing times of 1.5 ms, 50 ms, 200 ms, 300 ms, 400 ms, 600 ms, 800 ms, 1s and 1.2s. To avoid any change in the pH, the same samples were lyophilized and dissolved in various mixtures of D₂O/H₂O with their different ratios. pK_a determination of pS214 was obtained from changes in the amide chemical shift over the pH range of 3 to 8.

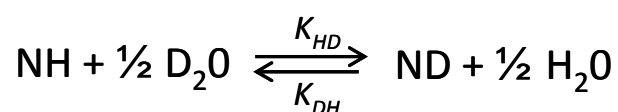
Theoretical predictions

Theoretical H/D exchange values were obtained by SPHERE server (Server Program for Hydrogen Exchange Rate Estimation:

http://www.fccc.edu/research/labs/roder/sphere/sphere_help.html).

Data fitting

The data fitting was performed with GraphPad PRISM 5 software. The fitting equation was based on the Bloch-McConnell equation (Eq. 1) for the following amide H/D exchange



The strength of the hydrogen-nitrogen bond also depends on the type of hydrogen isotope. For backbone amides, the ratio of exchange rates for proton and deuterium was determined to be

1.1 ($K_{HD} = 1.1 * K_{DH}$) [35]. If we write the exchange equation as a pseudo first order exchange process, and take into account the relative amounts of H₂O and D₂O, here expressed as the fractional values P_H and P_D , the equation becomes :

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} N_H^z(t) \\ N_D^z(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -R_{1,N_H} - P_D K_{HD} & P_H K_{DH} \\ P_D K_{HD} & -R_{1,N_D} - P_H K_{DH} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} N_H^z(t) \\ N_D^z(t) \end{bmatrix} \quad (1)$$

Focusing only on the intensity decay during the mixing time T_m , but including explicitly the differential longitudinal relaxation rates for the amide nitrogen magnetization when bound to a proton or a deuterium nucleus, the magnetization decay from the resulting Bloch-McConnell equation can be written as:

$$\frac{I(t)}{I(0)} = \frac{(a_{HH} - \lambda_-) e^{-\lambda_+ t} + (\lambda_+ - a_{HH}) e^{-\lambda_- t}}{\lambda_+ - \lambda_-} \quad (2)$$

a_{ij} and λ are defined as :

$$a_{HH} = R_{1,N_H} + P_D K_{HD} = R_{1,N_H} + 1.1 * P_D K_{DH}$$

$$a_{DD} = R_{1,N_D} + P_H K_{DH}$$

$$a_{HD} = -P_D K_{HD} = -1.1 * P_D K_{DH}$$

$$a_{DH} = -P_H K_{DH}$$

$$\lambda_{\pm} = \frac{a_{HH} + a_{DD} \pm \sqrt{(a_{HH} - a_{DD})^2 + 4a_{HD}a_{DH}}}{2}$$

P_H : Proton solvent ratio

P_D : Deuterium solvent ratio

N_H^z : Nitrogen protonated magnetization

N_D^z : Nitrogen deuterated magnetization

R_{1,N_H} : Nitrogen protonated relaxation rate

R_{1,N_D} : Nitrogen deuterated relaxation rate

We fit the experimental decay of the ¹⁵N magnetization to Equation 2, with two parameters (K_{DH} and R_{1,N_D}) as the two unknown parameters.

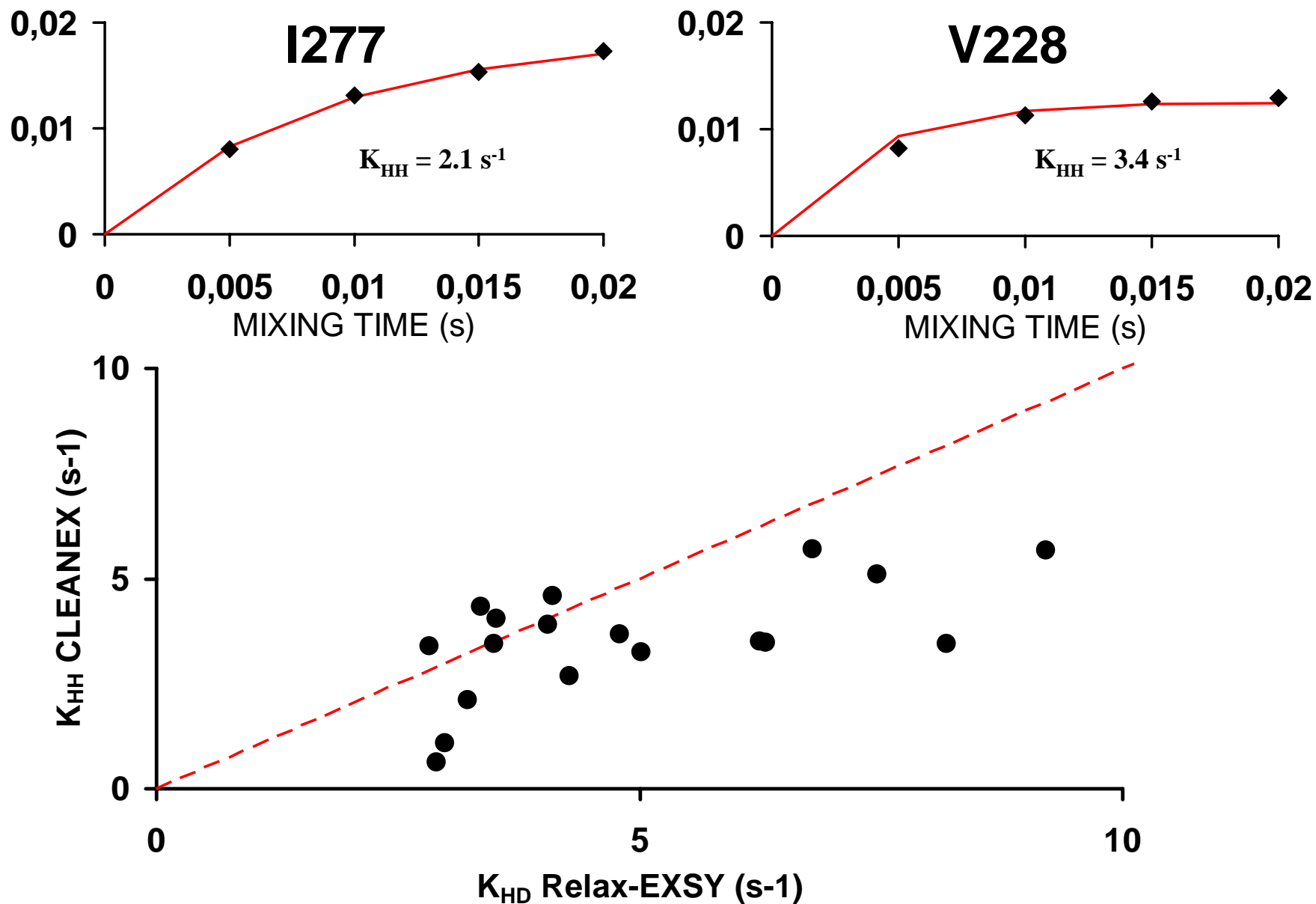


Figure S1 (top) Representative CLEANEX-PM build-up curves and (bottom) correlation between the exchange rates obtained with the Relax-EXSY sequence and the CLEANEX-PM pulse sequence [26]. Experimental conditions : TauF4 300 μ M, pH 6.45, Te=298K

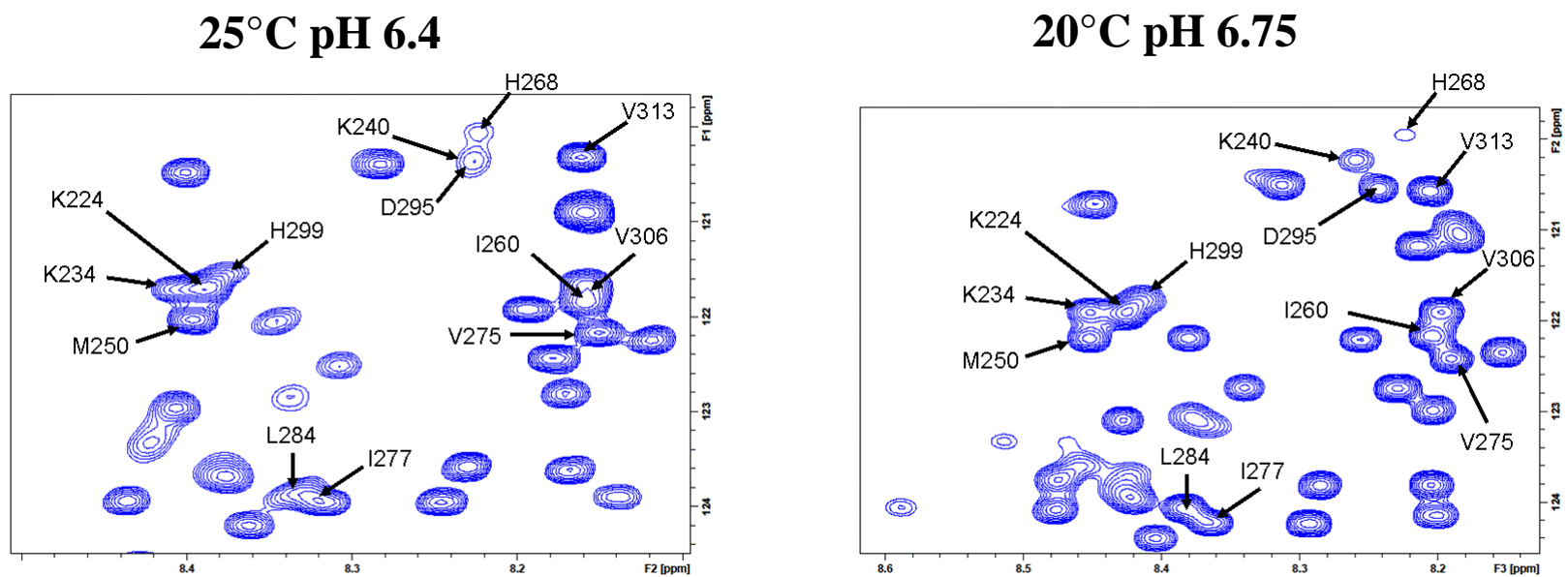


Figure S2 Comparison of the spectral overlap for the TauF4 fragment at pH 6.4 Te=298K (left) and at pH 6.75 Te=293K (right). In the latter conditions, over lpa is less, and rates for residues such as L284 and I277 become Accessible.

pH 4 Te = 293K

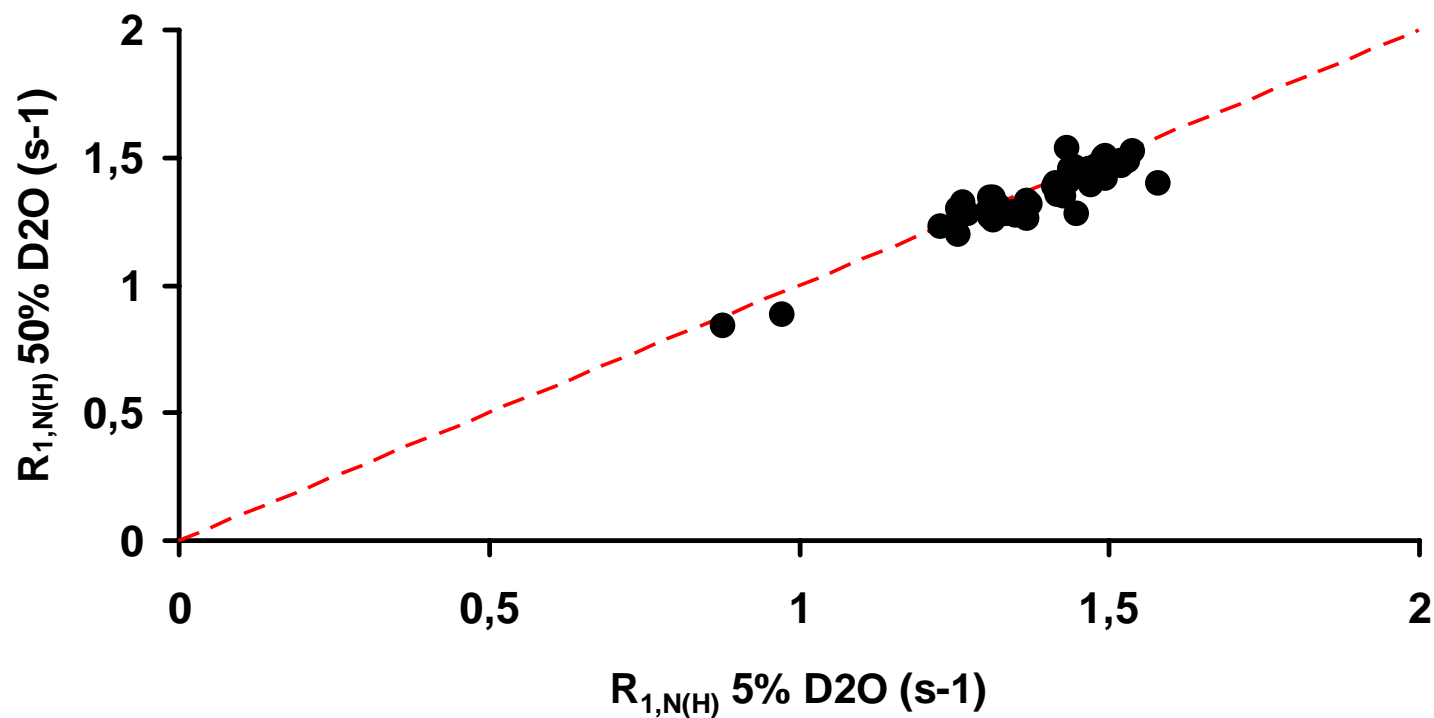


Figure S3 Correlation between the effective R_1 rates obtained with the Relax-EXSY sequence in different solvents (5% D2O or 50% D2O) at pH 4 and $T_e=293K$, where chemical exchange should be minimal. Experimental conditions : TauF4 300 μ M, pH 4.0, $T_e=293K$

pH 6.75 $T_e = 293\text{K}$

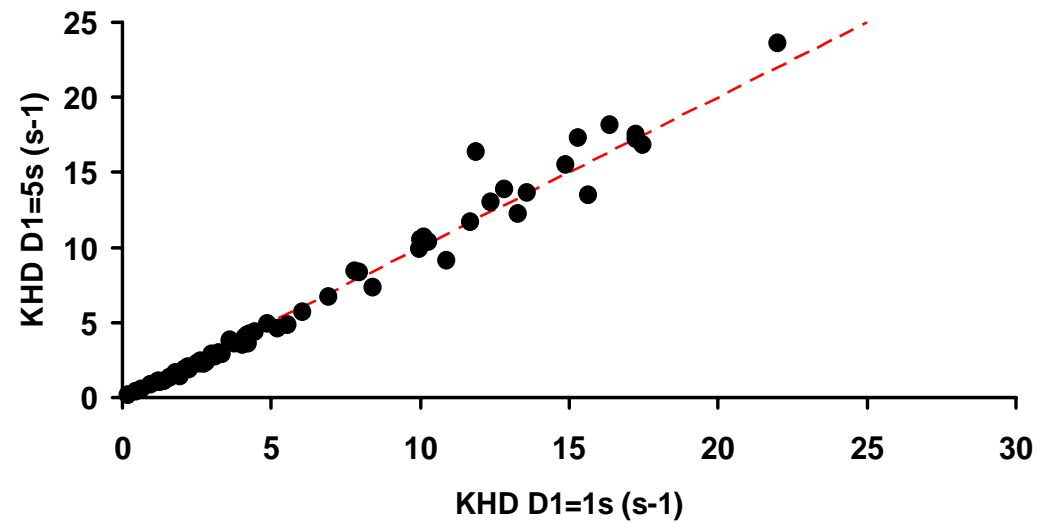


Figure S4 Influence of the recovery delay. Exchange rates for two experiments on the same sample, But with a recovery delay of 1s or 5s. Experimental conditions : TauF4 600 μM , pH 6.75, $T_e=293\text{K}$

3) Développement de modèles d'agrégation de TAU pour tester des inhibiteurs.

3.1) Introduction sur la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est sans doute la maladie neurodégénérative la plus répandue chez l'humain. En 2006, on dénombre plus de 20 millions de cas à travers le monde et ce nombre ne cesse d'augmenter [149]. Les principaux symptômes sont une perte progressive de la mémoire à long et court terme, une aphasie, une apraxie et une agnosie. La maladie fût initialement décrite par le psychiatre Alois Alzheimer chez un patient de 51 ans, à l'hôpital de Francfort [149]. L'examen post-mortem du cerveau du patient démontra la présence d'agrégats extracellulaires (plaque séniles) et d'inclusions neuronales. Ces deux constatations histologiques définissent les caractéristiques neuropathologiques de la maladie [149]. Bien qu'il existe un lien étroit entre l'apparition des plaques séniles, les inclusions neuronales et la progression des caractéristiques psychosociales de la maladie, les mécanismes pathologiques restent mystérieux.

En 1963, Kidd observe par microscopie électronique que les inclusions neuronales sont constituées de fibres amyloïdes hélicoïdales entrelacées par paires (PHF : *Paired Helical Filaments*) [150]. Au milieu des années 1980, la recherche sur la MA s'accélère avec plusieurs découvertes majeures. En 1984, Glen *et al.* déterminent que les plaques amyloïdes sont principalement constituées de fibres d'un peptide protéique (le peptide A β). Un an plus tard (1985), Brion *et al.* postulent que les PHF sont constituées principalement de la protéine TAU, la « *Tubulin Associated Unit* » décrite par l'équipe du docteur Kirschner comme facteur d'assemblage de la tubuline en microtubules [151]. Ces résultats seront confirmés en 1986 par les études de Wood *et al.* [152]. Cette même année, Grundke-Iqbal *et al.* publient que les PHF seraient constituées de la protéine TAU anormalement hyperphosphorylée. Puis, en 1988, Wischik *et al.* déterminent les domaines de TAU impliqués dans la structure fibrillaire, et déterminent que ce sont les quatre répétitions définies par Kirschner comme liant les microtubules (MTBR : *MicroTubule binding repeats*).

En 1992, Wille *et al.* mènent des études pour former des fibres avec de la protéine TAU recombinante. Ils réussissent seulement à former des fibres avec des mutants de délétion (délétion du domaine N-terminal, le domaine riche en proline et le domaine C-terminal) contenant uniquement le domaine MTBR (délétion du domaine N-terminal, le domaine riche en proline et le domaine C-

terminal) [153]. Un peu plus tard, en 1995, Schweers *et al.* proposent que la cystéine 322 est indispensable à l'agrégation de TAU *in vitro* [154]. La cystéine 322 formerait un pont disulfure intermoléculaire qui va stabiliser les premiers oligomères présents lors de la phase de nucléation. En 1996, Goedert démontre que la protéine TAU recombinante entière peut être fibrillée, si elle est incubée avec des polyanions comme l'héparine [155]. Par la suite, le modèle d'agrégation TAU-héparine deviendra le modèle d'agrégation le plus utilisé.

En 1998 Spillantini *et al.* découvrent que certaines mutations de la protéine TAU comme la mutation P301L, sont pathogènes et peuvent causer une tauopathie apparente à la maladie d'Alzheimer (la maladie de Pick) [156] [157]. Nacharaju *et al.* démontrent *in vitro* que le mutant de TAU P301L agrège plus vite que la forme sauvage [158].

En 2001, Von Bergen *et al.* identifient deux hexapeptides dans la séquence primaire de TAU (PHF6 : ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ et PHF6* : ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰) qui participent à la formation de la structure en feuillets beta des fibres. Quelques années plus tard (en 2007), Eisenberg et ses collaborateurs cristallisent et étudient par diffraction des rayons X le peptide PHF6 [119]. Ils proposent le premier modèle atomique des fibres de TAU. Les fibres de TAU seraient formées par des feuillets beta parallèles constitués d'empilements d'hexapeptides PHF6 et PHF6* qui vont former l'axe de la fibre. Ces peptides présentent une interaction intermoléculaire entre les chaînes latérales formant ainsi une interface hydrophobe. Cette interface hydrophobe va agir comme un *zipper* stérique qui va maintenir la structure. Les extrémités N- et C-terminales restent flexibles et disposées perpendiculairement à l'axe de la fibre [119] [120]. En 2008 et 2012, deux études par RMN du solide proposent que, dans les fibres, la structuration des feuillets beta ne concerne pas uniquement les hexapeptides PHF6 et PHF6* mais une large zone du domaine MTBR [159] [160].

3.2) Introduction sur la protéine TAU

TAU est une longue IDP faisant partie de la famille des MAP (*Microtubule Associated Protein*). Elle est caractérisée par une très faible tendance à former des structures secondaires. Elle a un pH isoélectrique de 8.24, 56 charges négatives (Asp + Glu) et 58 charges positives (Arg + Lys). Les charges ne sont pas distribuées de façon homogène : le N-terminus (domaine de projection) contient une forte majorité des charges négatives, tandis que le MTBR est caractérisé par un excès de charges positives.

La protéine TAU est identifiée pour la première fois en 1975 par Weingarten *et al.* [151]. Elle est identifiée comme un facteur de stabilisation et polymérisation des microtubules [151]. TAU est exprimée dans le système nerveux central et périphérique mais aussi, en moindre mesure, dans les reins, les poumons et les testicules [161]. Elle est plus abondante dans les axones neuronaux [162] [163] mais peut également être trouvée dans les compartiments stomato-dendritiques [164]. TAU peut être subdivisée en quatre régions: une région de projection en N-terminal, un domaine riche en proline, un domaine de liaison aux microtubules (MTBR) et une région C-terminale [165]. L'épissage alternatif autour de la région N-terminale et le MTBR génère six principales isoformes présentes dans le cerveau d'un individu adulte [166] (figure 14).

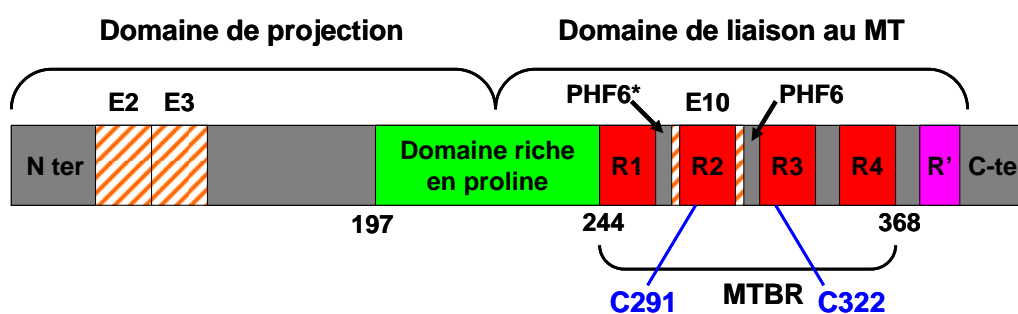


Figure 13 : Schéma des domaines de TAU.

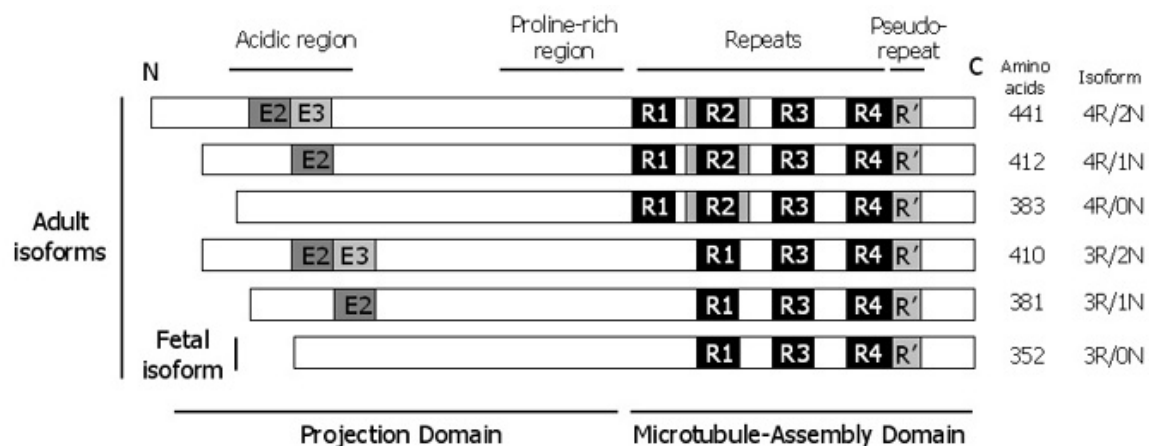


Figure 14 : Principales isoformes de TAU présentes dans le cerveau. Figure extraite de Chun et Johnson [167].

Le docteur Kirschner et ses collaborateurs mènent les premières études sur TAU et, très rapidement, ils postulent que la protéine TAU est fonctionnelle mais n'aurait pas de structure tridimensionnelle stable [7] [8] : ce qui sera vérifié par la suite [72]. La capacité de TAU à polymériser et stabiliser la tubuline est liée à de faibles interactions coopératives impliquant des petites unités de répétition dans une très large région de la protéine [7] [8]. L'énergie de liaison

aux microtubules dérive d'une série d'interactions faibles de ces petites unités d'acides aminés. Le complexe TAU-MT est un complexe dynamique. TAU se lie fortement aux microtubules [66] avec ses régions N-et C-terminales en saillie extérieure. Il est postulé qu'elle ne présente aucune structuration stable lors du complexe [80]. De plus, elle diffuse tout le long de la surface du microtubule [9] [67] [68] (figure 6). L'interaction avec des résidus chargés négativement de la tubuline (queue polyglutamate) contribue grandement à l'affinité et à la mobilité de la protéine [69] [70].

Bien que l'activité de TAU sur la tubuline soit connue depuis plusieurs décennies, le mécanisme de polymérisation reste mystérieux. Des études récentes, menées dans le laboratoire, sur l'interaction d'un fragment fonctionnel de TAU (fragment F4 : S208-S324) avec des formes solubles de la tubuline, ont permis une première entrevue du mécanisme de polymérisation de la tubuline par TAU [80].

Bien que dans la cellule la majorité de la protéine TAU soit ancrée aux microtubules [65], son rôle ne se limite pas à son interaction avec la tubuline. Récemment, il a été démontré que TAU est multifonctionnelle et interagit avec une multitude de partenaires, notamment avec de nombreuses molécules de signalisation, des éléments du cytosquelette et des lipides [65] [168] [169], TAU interagit également avec la membrane plasmique [170] [171] et certaines protéines régulatrices des phospholipides comme l'Annexin A2 [172]. TAU serait également impliquée dans la stabilité de l'ADN [173].

TAU est également très impliquée dans la régulation de l'activité de la tyrosine kinase Fyn qui, elle-même, est impliquée dans la régulation de la voie pathologique d'A β [65]. L'interaction des microtubules avec les filaments d'actine serait médiée par une interaction conjointe avec les protéines MAPs qui pourraient relier les filaments d'actine aux microtubules [174] [175] [176].

Des études récentes ont démontré que les protéines de la famille des FKBP seraient impliquées dans les tauopathies [177] [178] [179]. FKBP52 serait capable d'agréger TAU *in vitro* et *in vivo* par un mécanisme qui est actuellement inconnu [177] [178] [179].

3.2.1) Description des domaines de TAU

3.2.1.1) Le domaine MTBR

Le domaine MTBR est très basique et il a été identifié comme la zone la plus importante pour l'interaction TAU-MT. Le domaine seul est capable de lier et polymériser des microtubules [8] [180]. Ce domaine est caractérisé par des répétitions de séquences et comporte 4 répétitions (R) ainsi que des zones appelées inter-répétition (IR) situées entre chaque répétition. Les zones d'inter-répétition situées entre R1 et R2 (IR1/2) et entre R2 et R3 (IR2/3) jouent un rôle important dans la liaison au microtubule [8] [181] mais elles jouent également un rôle central dans l'agrégation [181] ; notamment les deux hexapeptides PHF6 (306-VQIVYK-311) et PHF6* (275-VQIINK-280) situés dans IR2/3 et IR1/2. Ces deux hexapeptides seraient les constituants principaux des feuillets beta retrouvés dans l'architecture des fibres amyloïdes [182] [119][120].

3.2.1.2) Le domaine riche en proline

Ce domaine est caractérisé par une présence accrue de résidus proline. Il a été démontré que ce domaine est très important dans la régulation de l'affinité pour les microtubules [183]. Le domaine seul a une faible affinité pour les microtubules [184] mais sa délétion dans la protéine entière entraîne une très forte diminution de l'affinité pour les microtubules [183] [184] [185]. L'interaction avec le MT pourrait se faire d'une façon coopérative avec le domaine MTBR et le domaine riche en proline [183] [186]. Le domaine riche en proline est également impliqué dans nombreuses interactions protéine-protéine, notamment avec l'actine [174] [175], PIN1 [187][188], PP2A [188][189] et le domaine SH3 de Fyn [168] [169].

3.2.1.3) Les extrémités N-terminale et C-terminale

L'extrémité N-terminale (figure 13) ainsi que C-terminale se trouvent en dehors du site d'interaction avec la tubuline et s'orientent vers l'extérieur des microtubules [66]. Le domaine de projection (N-terminal) serait plutôt impliqué dans des interactions avec la membrane plasmique [170] [171] ainsi que certains éléments du cytosquelette où il participerait à contrôler l'espacement entre deux microtubules adjacents [190]. Le domaine C-terminal est très impliqué dans la

protection de l'agrégation. Yin et Kuret démontrent que si on délète le domaine C-terminal, on favorise l'agrégation [191].

Bien que TAU soit une IDP, elle présente quelques faibles structurations résiduelles ; notamment des structurations en feuillets beta au niveau du domaine MTBR [72] [79] [182]. Le domaine riche en proline est fortement soupçonné d'avoir une structuration résiduelle en hélice Poly-Proline [192]. Jeganathan *et al.* ont montré également la présence d'une structure tertiaire résiduelle appelée le « *paper clip* », caractérisée par l'interaction entre le domaine N-terminal et C-terminal [31]. Certaines phosphorylations pourraient stabiliser la conformation « *paper clip* » et seraient ainsi responsables du décrochement de TAU des MT et de l'agrégation [193].

3.2.2) Modifications post-traductionnelles

TAU est soumis à un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles : phosphorylation [194] [168] [195] [196], acétylation [197] [198], transglutamination [199], glycation [200], nitration [201], sumoylation [202], ubiquitination [203]... La diversité de ces modifications suggère que la protéine TAU est très fortement régulée et ses modifications sont liées à la fois à son activité physiologique ainsi qu'à différentes pathologies [65].

La recherche sur l'impact des modifications post-traductionnelles de TAU se divise en deux axes majeurs. Le premier axe est focalisé sur l'impact des MPTs dans la régulation de l'interaction TAU : tubuline ainsi que sa capacité à la polymériser. Le deuxième axe est plutôt centré sur l'impact des MPTs dans l'agrégation de TAU.

Depuis la découverte de Grundke-Iqbal *et al.* que les PHF seraient constitués de la protéine TAU anormalement hyperphosphorylée [204], la phosphorylation et la régulation de la phosphorylation est devenue sans aucun doute la modification post-traductionnelle la plus étudiée.

TAU possède 80 sites potentiels de phosphorylation (45 serine, 35 thréonine et 5 tyrosine). Physiologiquement, la protéine TAU possède en moyenne entre 2 et 3 sites phosphorylés. Chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer, on constate en moyenne entre 9 et 10 sites phosphorylés [205] [206]. Chaque phosphorylation ou combinaison de phosphorylations va jouer un rôle bien spécifique sur l'activité biologique et pathologique de TAU, comme s'il y avait un « code » pour chaque *pattern* de phosphorylation. Ces différents *patterns* vont réguler les différentes activités de TAU, comme l'interaction avec

ses différents partenaires, sa capacité à lier et polymériser la tubuline ainsi que sa capacité à former des fibres amyloïdes. Les différents niveaux de phosphorylation de TAU sont régulés par plusieurs kinases et phosphatases [207] [208] [209], la dérégulation de cet équilibre est une des voies qui pourraient conduire vers la pathologie.

Les nombreux sites de phosphorylation de la protéine TAU [210] peuvent être grossièrement divisés en trois catégories : les motifs S(P) / T(P) qui sont surtout les cibles des kinases *proline-directed* telles que la GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) [211] [212] [213], CDK5 (*Cycline-Dependent Kinases 5*) [214], ou MAPK (*Mitogen activated protein Kinase*) [215]. Les motifs KXGS sont les cibles des kinases *non proline-directed*, comme MARK [216], SADK [217] et PKA [218] [66]. Les résidus tyrosine sont cibles des Src kinases telles que Fyn et c-Abl [219] [220]. Il a été démontré que la phosphorylation des motifs S(P) / T(P) n'a qu'une faible influence sur les interactions TAU-MT, mais ils sont fortement hyperphosphorylés dans toutes les tauopathies [71]. Cette caractéristique peut être reconnue par différents anticorps de diagnostic [194]. La phosphorylation par certaines kinases *non proline-directed* comme MARK, SADK ou PKA conduit à une forte diminution de l'affinité de TAU pour les microtubules [216] [221] [222], mais inhibe également la formation des PHFs [223].

3.3) Les modèles d'agrégation *in vitro*

En raison du nombre élevé de combinaisons de phosphorylation et de la difficulté expérimentale à obtenir des protéines TAU uniformément phosphorylées, les modèles d'agrégation *in vitro* n'utilisent pas de protéine TAU phosphorylée ; bien que cet état de fait commence à changer [224] [225].

Plusieurs équipes démontrent qu'il est possible d'induire l'agrégation de TAU par des cofacteurs polyanioniques (héparine, polyglutamate, ARN...) [155] [226] [227]. L'héparine est un agent agrégeant très puissant et pourrait même induire l'agrégation de protéines non amyloïdes [228]. Morphologiquement, les agrégats de TAU induits par l'héparine ressemblent aux PHFs extraits de cerveaux de patients atteints par la MA [155]. Ce mécanisme d'agrégation serait amorcé par une neutralisation des charges de TAU et se rapproche des conditions trouvées à la surface des microtubules (présence accrue de charges négatives portées par les queues polyglutamates des tubulines). De fait, la surface des MTs peut également induire la formation de PHFs [229].

Le modèle TAU-héparine est sans doute le modèle *in vitro* le plus utilisé malgré l'absence d'héparine à l'intérieur des neurones. Ce modèle *in vitro* a très fortement été utilisé pour déterminer la structure des fibres [59] [230] [159] [160] ainsi que pour étudier des inhibiteurs potentiels de l'agrégation [231] [232] [233] [234] [235]. L'utilisation de ce modèle est extrêmement simple mais sa faible relevance physiologique rend très difficile la corrélation des études *in vitro* avec les études *in vivo*.

Un autre point fortement débattu dans le mécanisme d'agrégation de TAU est l'importance des cystéines. L'état oxydatif des cystéines de TAU dans les neurones reste par ailleurs inconnu. Plusieurs études suggèrent que l'agrégation de TAU serait liée à un stress oxydatif [236]. Le docteur Mandelkow et ses collaborateurs défendent fervemment que le mécanisme d'agrégation passerait par une stabilisation du pont disulfure intramoléculaire [154]. Ceci stabiliserait l'interaction des hexapeptides PHF6 et PHF6* qui serait capitale pour la formation des fibres. Cette hypothèse est bouleversée par des études récentes qui démontrent que le fragment TAU F4 (S208-S324) dépourvu de cystéine est capable de former des fibres (*in vitro*) [237]. L'équipe du docteur Mandelkow, montre d'ailleurs une cinétique d'agrégation ainsi que des fibres par microscopie électronique d'un mutant de TAU dépourvu de cystéine (TAU C291A-C322A) [238]. Néanmoins, les mutants de TAU dépourvus de cystéine agrègent avec un temps de latence beaucoup plus long ; ce qui confirme que les ponts disulfures peuvent servir à amorcer la phase de nucléation.

Un point très discuté sur le modèle d'agrégation TAU-héparine est qu'il est soumis à plusieurs faux positifs. En particulier, plusieurs MPTs ou molécules qu'on croit anti-agrégantes peuvent en réalité inhiber l'interaction TAU-héparine et par conséquent être des faux positifs.

Il est extrêmement difficile de corréler les conclusions tirées d'étude *in vitro* avec les données *in vivo*. Le problème principal est que tous les modèles actuels d'agrégation *in vitro* sont extrêmement simplistes et sûrement très éloignés des mécanismes pathologiques. Ceci est dû à l'utilisation du modèle héparine ainsi qu'à la minoration du poids des modifications post-traductionnelles.

Actuellement, plusieurs équipes académiques ainsi que plusieurs laboratoires pharmaceutiques sont à la recherche de molécules capables d'inhiber l'agrégation de TAU. Actuellement, il existe un médicament en phase trois clinique (Bleu de méthylène) trouvé par Wischik en 1996 [239]. Cette molécule serait capable d'inhiber l'agrégation de TAU mais son mécanisme d'action est très controversé [239] [238]. *In vitro*, il a été démontré que plusieurs inhibiteurs de l'agrégation de TAU agissent sur le potentiel REDOX des

cystéines. Ces inhibiteurs n'ont aucun avenir thérapeutique car leur mode d'action est complètement non spécifique.

Pour pouvoir tester des inhibiteurs potentiels de l'agrégation de TAU, il est devenu capital d'avoir un modèle d'agrégation robuste pour pouvoir éviter les faux positifs (inhibition de l'interaction TAU-heparine) ainsi que les molécules qui agissent sur le potentiel REDOX des cystéines.

3.3.2) Les tests d'inhibition par fluorescence

Un des objectifs du laboratoire est de développer un modèle robuste d'agrégation de TAU pour pouvoir tester des inhibiteurs de l'agrégation. Mais un bon modèle d'agrégation n'est rien sans une bonne technique de détection.

Historiquement, les fibres amyloïdes ont été largement étudiées par interaction avec des fluorophores. L'immense majorité de ces fluorophores provient de l'industrie textile ou ils sont utilisés pour teinter les fibres de coton. La première molécule utilisée pour colorer les tissus amyloïdes fut le Rouge de Congo qui présente un phénomène de biréfringence quand il est lié aux fibres [111]. Par la suite, l'équipe du docteur Mandelkow introduit la thioflavine S (THS) un autre colorant textile [226]. Il l'utilise non seulement pour colorer les dépôts fibrillaires mais également pour suivre la cinétique d'agrégation *in vitro* par simple augmentation de la fluorescence. Un des désavantages majeurs du THS est qu'il est un mélange hétérogène de molécules, par conséquent il fut remplacé par une molécule unique, la thioflavine T (THT), qui a la propriété de ne pas être fluorescente en solution aqueuse mais dont la fluorescence augmente en présence de fibres.

Ces techniques de fluorescence sont si anciennes et répandues qu'il est couramment pensé que le Rouge de Congo, le THS et le THT sont spécifiques des fibres amyloïdes [240]. En réalité, toutes ces molécules interagissent avec des interfaces hydrophobes avec une légère préférence pour les feuilletts beta. En raison de l'absence de poche hydrophobe, ces fluorophores n'interagissent pas avec les IDP. C'est pour cette raison qu'on peut suivre facilement leur fibrillation par l'apparition d'une interface hydrophobe. Il est très important de ne pas sur-interpréter les résultats car la modification des propriétés de fluorescence (intensité de fluorescence, polarisation ou *shift* du maximum d'émission) ne révèle que l'apparition d'une surface hydrophobe et en aucun cas une indication directe de fibre amyloïde (un précipité amorphe peut également faire augmenter la fluorescence du THT). Nous verrons, dans le chapitre 3,

qu'une réponse positive en THT n'est pas forcément corrélée avec l'observation de fibres amyloïdes par microscopie électronique.

La cinétique par fluorescence peut être corrélée avec la cinétique d'agrégation uniquement si nous sommes en conditions saturantes de fluorophore. Ceci implique que l'affinité du fluorophore pour les fibres est un paramètre capital.

Dans le cadre d'une recherche à haut débit d'inhibiteurs de l'agrégation, le test par fluorescence peut présenter un nombre considérable d'interférences :

- Interaction de la sonde avec l'inhibiteur
- Compétition de l'inhibiteur pour le même site de liaison [241] [242]
- Désactivation du fluorophore par collisions [241] [242]
- Écrantage de la sonde et/ou réabsorption de la fluorescence [243]

Il existe également un problème spécifique aux fibres. Pendant la cinétique d'agrégation, la diffusion de la lumière (*Light Scattering*) augmente énormément et peut empiéter sur le signal du fluorophore : ce qui se traduit par une fausse augmentation de la fluorescence. Dans le cas des fibres amyloïdes, il est très avantageux d'utiliser des fluorophores possédant un « *stoke shift* » important.

La grande majorité des études concernant la recherche d'inhibiteurs de l'agrégation de TAU à haut débit a été menée avec des techniques de fluorescence dans un modèle TAU-héparine [232] [244]. Beaucoup de molécules ont été retenues suite à ces efforts de criblage avec une IC50 de l'ordre de 1 μM . Cette large quantité d'inhibiteurs potentiels est sûrement la conséquence d'effets parasites qui produisent un large nombre de faux positifs. Par exemple, une étude menée par fluorescence du THT, par Johnson *et al.*, sur une librairie de plus de 250 000 molécules, trouve que 18% ont une réponse positive au THT. Ce nombre élevé d'inhibiteurs potentiels ne peut être expliqué que par la présence d'une quantité accrue de faux positifs [232].

Dans la recherche d'une technique robuste de détection d'inhibiteurs potentiels, nous avons découvert un nouveau fluorophore (la Primuline) qui est beaucoup plus performant que le THT. Nous avons comparé les propriétés de fluorescence des sondes Thioflavine avec la Primuline dans un modèle d'agrégation TAU-C291S-P301L-C322S, car dans le modèle sans cystéine nous avons un temps de latence plus important que dans le modèle avec cystéine. L'utilisation de ce modèle nous a permis de mettre en évidence une propriété très intéressante de la Primuline qui est de détecter des agrégats précoces.

3.3.3) "*Primuline fluorescence detects early aggregates of the Tau-P301L protein devoid of cystein residues*"

Juan Lopez^{1, 2§}, Alain Sillen^{1§}, Huvent Isabelle¹, Cedric Lion^{1, 2}, Amina Kamah¹, Melanie Gerard³, François-Xavier Cantrelle¹, Anthony Daccache¹, Philippe Cotelle², Frank Wien⁴, Michel Leroy⁵, Billiald Philippe⁶, Guy Lippens^{1*}, and Arnaud Leroy^{1, 4, 6*}

¹CNRS UMR 8576 - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle - Université des Sciences et Technologies de Lille 1 - 59655, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

²EA 4478, Chimie Moléculaire et Formulation, Université des Sciences et Technologies de Lille 1 - 59655, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

³Laboratory for Biochemistry, KU Leuven campus Kulak Kortrijk, Etienne Sabbelaan, B-8500 Kortrijk, Belgium

⁴DISCO Synchrotron Soleil, l'Orme des Merisiers, Saint Aubin BP 48, 91192 Gif sur Yvette, France

⁵Instrulabo-InstruL2, 92340 Bourg-la-Reine, France

⁶EA 4529, UFR de Pharmacie - Université Paris - Sud, 92296 Châtenay-Malabry, France

*To whom Correspondence must be sent.

§ contributed equally to this work

Running title: Binding of Primuline to amyloid fibers

Keywords: red-edge effect, Tau protein, Thioflavine S, Thioflavine T

ABSTRACT

We investigate the fluorescence properties of Primuline as an alternative probe for the detection of amyloid fibers of Tau. When compared to the commonly used ThS and ThT fluorophores, Primuline displays a pronounced red-edge effect with a Stokes shift that exceeds 60nm when exciting at 400nm, thereby limiting potential problems with light scattering from the fibrils. The affinity of Primuline for Tau fibrils and its resulting quantum yield are significantly higher than that of ThT, and hence can advantageously replace ThT or ThS for the monitoring of the aggregation process. We demonstrate this by the detection of earlier intermediates in the aggregation process of a cystein-less TauP301L protein. Furthermore, we confirm that Primuline can be advantageously used for the detection of other amyloid proteins such as alpha-Synuclein. Primuline remains however a non-covalent fluorescent probe, and can despite its high affinity be displaced, which should be considered when interpreting the results of a screen of potential aggregation breakers.

Thioflavine S (ThS) and Thioflavine T (ThT) are closely related azo group-free thiazole compounds originally used as cotton dyes (Figure 1). The fluorescence intensity of both dyes increases upon binding to amyloid-like deposits [1,2], and they are extensively used in the study of amyloid formation of proteins. It is commonly believed that they specifically interact with the cross- β -sheet structure common to amyloid structures [3–6]. Primuline, the mother compound of ThS and ThT, has been used to determine cell viability [7] and to stain the large bodies of micro-organisms [8] or the cell wall structure [9]. However, to our knowledge, it was never used and described as amyloid stain in the academic literature, but its use has been disclosed in the patent literature [10].

Here, we examine the use of Primuline as a potential marker of amyloid structures, and present a comparative study of the three dyes with respect to their amyloid-staining mechanism, to their specificity and affinity. We use as a model amyloid system the Alzheimer disease like filaments obtained from the microtubule-associated protein Tau and the fibers characteristic for Parkinson's disease obtained from alpha-Synuclein.

For both Primuline and ThS, but not for ThT, we observe an emission spectrum shift to higher wavelengths upon excitation at the red-edge of its absorption spectrum upon binding to the fibers. This red edge effect [11] is believed to reflect a rigid binding of the fluorophore. When defining the affinity of the dyes for the Tau fibrils, we find rather unexpectedly that Primuline is a significantly stronger amyloid binder than ThT. Together with its superior fluorescence yield, this feature allows the detection of significantly smaller amounts of fibers. As a demonstration of this, we follow the aggregation process of the pathogenic TauP301L mutant, and evaluate the requirement for an intermolecular disulfide bridge in this model. We find that TauP301L devoid of cysteines does form fibrils when incubated with heparin, and that Primuline detects at an earlier stage amyloid structures than ThT. A drawback of the higher affinity of Primuline for the fibers, though, is that it stimulates the aggregation process of Tau in a similar but even more efficient manner as other dyes such as Thiazine Red or ThT [12,13].

MATERIALS AND METHODS

Materials

Primuline, Thioflavine S (ThS), Thioflavine T (ThT) and Heparin (Sodium salt, from porcine intestinal mucosa, MW 3000) were all obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Dye solutions

Dye stock solutions were prepared by dissolving approximately 1mg powder in 1 mL water and filtered through 0.22 μ m syringe filters (Millipore Corp. Bedford, MA USA). The stock solutions were stored at 4°C in the dark. The concentration of Primuline was determined by diluting the stock solution in a 25mM phosphate buffer (NaCl 25 mM, pH 6.5) using a molar absorption coefficient of 29200 M⁻¹cm⁻¹ at 345 nm (Sigma). The concentration of ThS cannot be determined since it is a mixture of several molecules. The concentration is therefore expressed as absorption at 371nm. To estimate the concentration, a minimal molecular weight of 510 (Sigma) was assumed. In that case the molar absorption coefficient of ThS is 8840 M⁻¹cm⁻¹ (Sigma). ThS was diluted to approximately $A_{371} = 0.2$ and then stored in the dark at 4°C for at least a week in order to achieve complete dissolution of the compound. The concentration of ThT was determined by diluting the stock solution in ethanol and using a molar absorption coefficient of 26620 M⁻¹cm⁻¹ at 416 nm [14].

Expression and purification of the recombinant protein

The longest isoform of Tau441 and the Tau441-P301L-2CS mutant were purified as follow. A bacterial culture of E. coli BL21 (DE3) (Invitrogen) was grown at 37°C. It carried the longest human Tau isoform (441 AA) or the Tau441-P301L-2CS mutant cloned in a pET15b plasmid under the control of a T7 promoter. When the OD at 600 nm reached a value around 0.6, the Tau production was induced by adding 0.4 mM IPTG for 2 hours. The culture was centrifuged and the precipitate re-suspended in the extraction buffer (1mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.25 % triton and 20 mM Sodium phosphate pH = 6.2) and a protease inhibitor cocktail was added (Complete, EDTA-free, Roche). The cell lysis was performed by sonication after addition of lysozyme and a heating step (75°C, 15 min). The soluble extracts

that contain the thermostable Tau proteins were isolated by centrifugation and loaded on a 5 ml HitrapTM SP FF (GE Healthcare) equilibrated with 2.5 mM EDTA, and 50 mM Sodium phosphate pH = 6.2. Proteins were eluted by a NaCl gradient. The fractions containing the recombinant proteins were pooled and buffer exchanged to 50 mM ammonium bicarbonate prior to lyophilization. The final protein concentration was measured by absorption at 280nm (the molar absorption coefficient of Tau is 7400 as calculated according to Mach et al [15]). Alpha-Synuclein was purified as previously described [16].

Filament Assembly of Tau and characterization

For the filament assembly, Tau was incubated at 37°C for 20 hours in 25mM sodium phosphate buffer, 25 mM NaCl, 2.5 mM EDTA and 300µM DTT (pH 6.5) in the presence of heparin (MW 3000) at a molar ratio of 1:1 (heparin:Tau). We define a 80µM filament solution as a sample of initial Tau concentration equal to 80µM that was treated as above. In order to verify the filament assembly, this sample was diluted to a 1µM solution and a 20µL droplet was adsorbed onto a formvar carbon-coated nickel grid for 1 minute. The excess was removed, and then the grid was negatively stained with 2% uranyl acetate for 1 minute, air-dried and examined under transmission electron microscopy (Hitachi 7500, Japan) at high resolution lens mode and 80 kvolts.

Filament assembly of alpha-Synuclein and characterization

For the filament assembly, 350 µM alpha-Synuclein and 10 µM Primuline in 150 mM NaCl and 20 mM Hepes (pH 7.4) were incubated at 37°C and continuously shaken at 9000 rpm during 192 hours in a eppendorf controlled temperature shaker (Thermomixer Confort eppendorf AG, Germany) as essentially previously described by [17,18]. The filament formation was controlled by electron microscopy as above. In order to record the fluorescence spectra of the sample at different wavelengths of excitation and at the beginning and at the end of the reaction different wavelengths of excitation, an aliquot was taken at the beginning before the increase of the temperature to 37°C and diluted 10 times in the previous buffer and another aliquot was taken at the end of the incubation and diluted identically in order to have a final concentration of 35 µM alpha-Synuclein and 1 µM Primuline.

Ultraviolet absorption and Fluorescence Spectroscopy

Ultraviolet absorption was measured on a UVIKON kontron 933 spectrophotometer (Kontron Instruments, Milano, Italy). Steady state fluorescence was measured on a PTI fluorescence spectrometer (PTI Monmouth Junction, N J, USA). The excitation and emission slit widths were set to 2 and 4 nm respectively. Data were systematically acquired at 20°C and at 37°C for the aggregation of Tau in the presence of heparin.

In order to detect the red-edge effect of ThS and Primuline bound to filaments, emission scans (400-600nm) of the dyes with different excitation wavelengths (ThS and ThT: 370-450nm, Primuline: 340-410nm) were taken using a 10 nm increment step for the excitation wavelengths.

Quantum yield determination

Quantum yields were determined relative to NATA (N-Acetylated Tryptophan Amide) in water according to the method of Parker and Rees [19], the quantum yield for NATA in water is taken as 0.14 [20]. The emission was integrated over the wavelength region corresponding to the emission band of the respective dyes.

Determination of the dissociation constant (K_D) of Thioflavine T and Primuline dyes for the Tau filaments

ThT is not fluorescent in the presence of free Tau in solution as well as Primuline does not display a red-edge effect in the presence of free Tau. They both require the presence (formation) of Tau fibers (or of another amyloid fiber) to promote their respective fluorescent property. For the determination of the dissociation constant (K_D) of Primuline, ThS and ThT for the for the Tau filaments, aliquots of dye were sequentially added to a known concentration of filaments. The fluorescence signal was monitored. The following equation was used to fit the data:

$$\frac{F}{F_{\max}} = \frac{b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

Here F is the fluorescence emission caused by the dye bound at any dye concentration, F_{\max} is the fluorescence at saturating dye, $b = a + c + K_D$ or $b = [\text{dye binding sites}] + [\text{dye}] + K_D$, a is the concentration of dye binding sites, c is the concentration of dye and K_D is the dissociation constant. The number of binding sites N can be calculated by dividing 'a' by the filament concentration (expressed in monomer concentration). Data fitting was performed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA).

Potential aggregation inhibitors and Thioflavine fluorescence probes on preformed Tau-PHF.

We first preformed Tau fibers by incubating 10 μM of Tau with 10 μM of heparin during 20 hours. At the end of the incubation, we mixed 10 μM of Tau PHF and 50 μM of each Thioflavine dye. Three different aggregation inhibitors (for their structures and chemical synthesis, see Fig. S1 in online supplementary material): Hydroxytyrosol (Htyr), tetrahydroxyphenylnaphtalene (6-(3,4-dihydroxyphenyl)naphtalene-2,3-diol, THyPN), and Methylene Blue (MB) were titrated into this solution to evaluate the potential displacement and/or quenching of the fluorescent probes. The fluorescence intensity (Excitation wavelength set at 410nm and emission at 480nm for Primuline and 485nm for THT).

Kinetic monitoring of Tau filament formation

TauP301L-2CS filament formation was performed by incubating at 37°C several 300 μl samples of 10 μM Tau/10 μM of heparin. At different time points, individual samples were diluted with 300 μl of 50 μM of Primuline or 300 μl of a 100 μM ThT solution. The fluorescence intensity of the resulting 600 μl samples were measured immediately after mixing.

As other fluorescent dyes have been reported to induce aggregation of Tau [12,13] we equally measured the aggregation process by adding 25 μM of Primuline to the initial sample of 10 μM Tau: 10 μM heparin, and monitored the reaction progress directly in the fluorimeter at 37°C.

All experiments were performed with an excitation wavelength at 410nm and an emission wavelength at 480nm.

Results

Fluorescence and binding properties of Primuline and Thioflavine S and T. When varying the wavelength of excitation for a Primuline solution from 340nm to 410nm, the emission fluorescence spectrum decreases in intensity, but the wavelength of maximal emission remains at 420nm (Figure 2, top left). In the presence of 50 μ M of Tau fibrils, however, this is not the case. Indeed, when varying $\lambda_{\text{excitation}}$ from 370nm to 390nm, the wavelength of maximal emission increases by 35nm, from 427nm to 462nm (Figure 2, top right). At an excitation of 400nm, the Stokes shift hence exceeds 60nm, avoiding problems with light scattering in the presence of fibrils. Similar results were obtained with Primuline on alpha-Synuclein fibers, suggesting that the effect is general for amyloid containing structures (Figure 3).

A similar experiment with the other dyes highlights some interesting differences. For ThS free in solution, we observe a minor shift upon varying the wavelength of the exciting light from 370nm to 450nm (Figure 2, middle left), possibly due to the dye forming some micelles at this concentration [21]. When bound to Tau filaments, the same variation in excitation wavelength leads to a significant shift of the emission curves, with a variation from 445 nm upon excitation at 370nm to 471nm upon excitation at 420nm (Figure 2, middle right). ThS hence equally shows a red-edge behavior, but less pronounced than Primuline. ThT on the other hand is not fluorescent at all when free in solution (Figure 2, bottom left). This can be seen as a clear advantage, because fluorescence occurs only in the presence of the fibrils and makes it an easy indicator of the presence of the latter. Upon varying the wavelength of excitation, however, we do not observe any shift of the wavelength of maximum emission for ThT when bound to Tau filaments (Figure 2, bottom right), pointing to a fundamental difference between ThT and Primuline.

To compare the brightness of the dyes, we measured their quantum yields when bound to fibers and free in solution at 20°C. The quantum yield of Primuline free in solution with excitation at 340nm is 0.98 +/- 0.09, and this value drops to 0.014 +/- 0.003 after excitation at 410nm. Fiber binding of Primuline does not change significantly its quantum yield upon excitation at 340nm (quantum yield of 0.9 +/- 0.1 at 340nm), but its quantum yield when bound to fibers dramatically increases when exciting at 410nm (0.54 +/- 0.01 at 410nm). A similar observation can be made for ThS, with values of 0.31 +/- 0.04 and 0.3 +/- 0.1 when exciting the free or bound dye at 371nm, and 0.003 +/- 0.001 and 0.2 +/- 0.1 when exciting

the free or bound dye at 440nm. As a result, the fluorescence intensity when exciting at these higher wavelengths drops significantly for fibril associated ThS, whereas it remains strong for Primuline, even when exciting beyond 400nm (Figure 2, top right). The quantum yield of ThT free in solution is not measurable (ThT is not fluorescent in water). In the presence of Tau fibers, we measure with excitation at 410 nm and 440 nm a quantum yield of 0.096 +/- 0.02 and 0.12 +/- 0.02 respectively at 20°C, in agreement with values reported in the literature [22]. For both dyes (ThT and Primuline) we observed in the presence of alpha-Synuclein fibers similar quantum yields with a relative ratio of five for Primuline over ThT.

In conclusion, both Primuline and ThS hence show a red-edge effect when bound to Tau fibers, but with a more pronounced shift and higher fluorescence intensity for Primuline. ThT behaves differently, acquiring only fluorescence upon complex formation with fibrils, but devoid of any red-edge effect.

Dissociation constants of the Thioflavine dyes for the Tau filaments. A parameter of direct importance for the quantitative evaluation of the fibril concentration in a sample is the thermodynamic dissociation constant (K_D) and stoichiometry of the dye for the fibrils. We determined these parameters by titrating increasing amounts of the dyes against a fixed concentration of preformed fibrils. The latter is expressed as a concentration of Tau monomer in the heparin-induced aggregation reaction, and assumes that all Tau is indeed integrated into fiber structures [23]. Because ThS is a mixture of compounds (Figure 1) [24], we only determined these parameters for Primuline and ThT.

The higher fluorescence yield of Primuline allowed for an experiment with 0.1 μ M of Tau fibrils. The resulting titration curve (Figure 4) leads to a K_D value of 66 ± 30 nM and a stoichiometry of 0.97 ± 0.2 Primuline per Tau monomer, pointing to a tight stoichiometric binding of Primuline to Tau fibrils. The fluorescence yield of ThT is not high enough to measure the fluorescence at comparable low concentrations of fibrils, hence we performed a similar experiment with ThT in the presence of 5 μ M, or a 50 fold higher concentration of Tau fibrils. We obtained a similar stoichiometry (1:1) from the titration curve (Figure 4), but a 30 fold higher value for the dissociation constant, with a K_D value of $1.8 \pm 0.6\mu$ M.

In conclusion, Primuline and ThT bind with a comparable stoichiometry to the heparin-induced Tau fibrils, with one dye molecule per monomer of Tau in the fibrils. The affinity of Primuline is however significantly higher than that of ThT.

Effect of potential aggregation inhibitors on Thioflavine fluorescent probes. When testing the capacity of small molecular entities to inhibit the aggregation process, the fluorescence properties of the small molecules themselves are one possible source of false positive results. In the case of the non-covalent fluorescence probes as described here, other potential sources of error are the possible displacement of the fluorescent probe from the fibril surface, or its fluorescence quenching by the small molecule. The resulting decrease in fluorescence intensity could be erroneously interpreted as an inhibition of the fibrilization process. To explore the possible effect of displacement of the probe, we titrated three small molecules against a constant concentration of preformed tau fibrils, in the presence of an excess of Primuline or ThT. The first two molecules come from an earlier screen of different polyphenols in our laboratory, hydroxytyrosol (Hytyr) and 6-(3,4-dihydroxyphenyl)naphtalene-2,3-diol (THyPN) for tetrahydroxyphenylnaphtalene [25]. The IC50 values previously determined for inhibition of the heparin induced aggregation of Tau were 2.0 μ M and 0.8 μ M, respectively. The third molecule is methylene blue, previously reported as an aggregation inhibitor with an IC50 value around 1 μ M [26].

The first molecule, hydroxytyrosol, even when added in a large excess, does not lead to a decrease in fluorescence signal for both fluorophores ThT and Primuline. The IC50 determination with one or the other fluorophore hence should not be influenced by the potential displacement of the probe. The results for the second molecule, THyPN, are more ambiguous. Indeed, an equimolar amount of THyPN as compared to ThT already leads to a 60% decrease in ThT fluorescence. With an equivalent amount of Primuline, however, the fluorescence signal hardly decreases. We interpret this result in terms of an overlapping binding site for all three molecules, with an intermediate affinity of THyPN when compared to those of ThT ($K_D=1.8 \mu$ M) and Primuline ($K_D=66 \text{ nM}$). Further evidence for this view is given by the observation that higher amounts of THyPN are capable of chasing 20% of the Primuline. Methylene blue was one of the first phenothiazines identified to inhibit the Tau: Tau association that precedes PHF formation [27] and has recently shown promising results in a first clinical study. Methylene blue leads to an efficient displacement of ThT as well as primuline, pointing to an even tighter binding than Primuline, and again an overlapping binding site [28]. Although other methods such as a filter assay or quantitative electron microscopy have demonstrated a clear effect of MB on the resulting amounts of fibers [26,29], the present result indicates that an estimate of the final fiber concentration on the basis of the fluorescence of a given amount of ThT or Primuline will be underestimated especially for higher concentrations of MB.

Monitoring the kinetics of Tau filament formation. ThS and ThT have previously been used to monitor kinetically the aggregation of Tau [21] but both molecules were equally shown to accelerate the aggregation process when present in the Tau:heparin solution [12,13]. Adding the dyes at the end of the reaction, just before the read-out, therefore seems a reasonable approach. Primuline fluorescence, when excited at 410nm, only shows emission intensity at 462nm in the presence of fibrils (Figure 2), and therefore should be equally suitable to monitor in a kinetic fashion the aggregation process. We recently determined that TauF4, a functional Tau fragment that spans partially the proline rich region and the first three MTBRs [30] can form fibers without the requirement of an intermolecular disulfide bridge [31], as was postulated for full-length Tau [32,33]. We wondered whether the pathogenic P301L mutation might equally overcome this requirement. We thus produced a TauP301L C291S C322S triple mutant, and incubated this protein with heparin. Aliquots of the reaction were diluted in a ThT or Primuline solution, and the fluorescence was recorded. For both dyes, fluorescence does increase over time (Figure 6), confirming that this P301L mutation makes the aggregation process independent of the intermolecular cysteine bridge. Electron microscopy of the final samples (Figure 6, right panel) showed the overall structure of the resulting fibrils, which resemble the PHFs observed in the brains of Alzheimer's disease patients [34]. Importantly, the lag time as defined by Primuline fluorescence was shorter than that determined by ThT (Figure 6, left panel), indicating that objects that form earlier in the aggregation process can be detected by Primuline before ThT does.

To ascertain whether the higher affinity might equally lead to an observable effect on the aggregation kinetics when the dye is present during the process, we added 25 μ M of Primuline directly to the TauP301L C291S C322S mutant/heparin mixture, and monitored the reaction directly in the fluorescence cuvette. Not unexpectedly, the lag time is now almost unexisting (Figure 7). As was the case for Thiazine Red [12] Primuline can thus also accelerate the aggregation process.

Discussion

We propose here that Primuline, as a small and chemically well characterized non covalent fluorescence probe, can be used advantageously over ThS and/or ThT to monitor kinetically the quantitative and the qualitative formation of amyloid fibers in solution. Main advantages are its high affinity for the fibers and its superior fluorescence intensity. ThT only displays high fluorescence signal when it is bound to amyloid structures. On the other hand, Primuline displays already fluorescence when free in solution, but is characterized by a pronounced red edge effect when it is bound to fibrillar structures. Exciting at 400nm or even longer wavelengths allows to monitor the signal without being hampered by the light scattering of the fibrillar structures under study.

The non covalent interaction of the dyes with the amyloid structures could potentially lead to an erroneous assignment as aggregation inhibitors of small molecules that displace the probe rather than truly inhibit the aggregation process. We examined this with three molecules. Hydroxytyrosol does not dissociate ThT or Primuline of existing fibers, suggesting that it acts at a distinct binding pocket. The absence of a planar aromatic structure in this compound indeed suggests little resemblance with the dyes, thereby limiting the probability that it would bind to the same pocket. THyPN displaces ThT and Primuline, albeit to a lesser extent for the latter. This does suggest an overlapping binding site for this compound with the dye, but with an intermediate affinity when compared to the values for ThT ($K_D = 1.8\mu\text{M}$) and Primuline ($K_D=66\text{nM}$). Methylene blue, on the other hand, displaces both compounds very efficiently, suggesting a very tight binding to the same binding pocket as both dyes. The inner filter effect, that describes the absorption of emitted light by Methylene blue [35], can equally contribute in a linear fashion to the observed intensity decrease. Whether the quenching of the fluorescence of the Thioflavine dyes results from displacement or collisional processes by the potential inhibitors under study, both cases will result in the loss of the fluorescence signal. Nevertheless, Methylene blue was early on identified as an aggregation inhibitor by several quantitative assays that did not rely on fluorescence increase [27]. Our displacement experiment does not challenge this previous finding [27], but rather emphasizes that the estimation of the concentration of fibers, especially for the larger amounts of MB used in a typical titration experiment, might be underestimated. Whereas MB inhibits the Tau aggregation, Primuline was found to stimulate it, and this despite them having overlapping binding sites. This suggests that binding of planar aromatic molecules to the same site can have opposite effects, underscoring the subtle structural features at play.

The necessity for an intermolecular disulfide bridge to nucleate the fiber formation was initially postulated on the basis of experiments without poly-anionic inducers such as heparin [32], but was later verified for heparin induced aggregation of wild type Tau441.[33] However, we recently showed that removal of the N- and C-termini of Tau such as in the functional TauF4 [208-324] fragment [30] allows for efficient aggregation of the fragment even when both natural cysteines (Cys291 and Cys322) are mutated into Serine [31]. Based on the evidence that the pathogenic P301L mutation equally stimulates the *in vitro* aggregation of Tau [36,37], we wondered whether this mutation would also be able to overcome the requirement for a disulfide bridge. Such is the case, and the ThT or Primuline fluorescences monitor indeed *bona fide* fibril formation as witnessed by electron microscopy of the end product (Figure 6). When probing the kinetics of fiber formation, we find a significantly shorter lag period when using Primuline rather than ThT as the fluorescent probe. We assign this to the capacity of Primuline to bind to lesser quantities of fibers because of its higher affinity, and to its higher fluorescence as we already noticed in the titration experiments (Figure 4). Nevertheless, adding Primuline directly to the Tau:heparin sample does significantly accelerate the aggregation (Figure 7), and should hence be avoided in a screening process. We therefore show that both Primuline and THT can be used to characterize amyloid fibers such as those made of Tau or alpha-Synuclein (Figure 3).

In conclusion, we propose to use Primuline as a non-covalent probe for the characterization of amyloid fiber formation, with several main advantages over the commonly used ThT and ThS probes. Most importantly, its larger affinity for fibers and the brighter fluorescence upon binding enable it to detect fiber formation more rapidly than ThT.

Acknowledgments

A.S. was funded by a European Training and Mobility Grant (HPRN-CT-2002-00241). This work was supported by the LABEX (laboratory of excellence program investment for the future) DISTALZ grant (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities, and thank the team for for scientific advices and assistance in using the DISCO beam line (proposal number: 20110375, accorded to AL).

References

- [1] P.S. Vassar, C.F. Culling, Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues, *Arch. Pathol.* 68 (1959) 487–498.
- [2] G. Kelényi, On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 15 (1967) 172–180.
- [3] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Anal. Biochem.* 177 (1989) 244–249.
- [4] H. Naiki, K. Higuchi, K. Matsushima, A. Shimada, W.H. Chen, M. Hosokawa, et al., Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 62 (1990) 768–773.
- [5] H. Naiki, K. Higuchi, K. Nakakuki, T. Takeda, Kinetic analysis of amyloid fibril polymerization in vitro, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 65 (1991) 104–110.
- [6] H. Levine, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2 (1993) 404–410.
- [7] R.K. Graham, P. Caiger, Fluorescence Staining for the Determination of Cell Viability, *Appl. Microbiol.* 17 (1969) 489.
- [8] K.S. Kang, L.E. Casida, Jr, Large Bodies of Mycoplasma and L-Form Organisms, *J. Bacteriol.* 93 (1967) 1137.
- [9] O. Necas, Cell wall synthesis in yeast protoplasts, *Bacteriol. Rev.* 35 (1971) 149.
- [10] C.M. Wischik, C.R. Harrington, J.E. Rickard, D. Horsley, Introducing into the subject a ligand capable of labelling aggregated paired helical filament (PHF) tau protein, determining the presence and/or amount of ligand bound to extracellular aggregated PHF tau in the medial temporal lobe of the brain, correlating the result of the determination, patent US/2010/7713962 (2010).
- [11] A.P. Demchenko, The red-edge effects: 30 years of exploration, *Luminescence.* 17 (2002) 19–42.
- [12] C.N. Chirita, E.E. Congdon, H. Yin, J. Kuret, Triggers of full-length tau aggregation: a role for partially folded intermediates, *Biochemistry (Mosc.)*. 44 (2005) 5862–5872.
- [13] K.I. Lira-De León, P. García-Gutiérrez, I.N. Serratos, M. Palomera-Cárdenas, M.D.P. Figueroa-Corona, V. Campos-Peña, et al., Molecular mechanism of tau aggregation induced by anionic and cationic dyes, *J. Alzheimers Dis. JAD.* 35 (2013) 319–334.
- [14] J. Wall, C.L. Murphy, A. Solomon, In vitro immunoglobulin light chain fibrillogenesis, in: Ronald Wetzel (Ed.), *Methods Enzymol.* 309 (1999) 204–217.
- [15] H. Mach, C.R. Middaugh, R.V. Lewis, Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins, *Anal. Biochem.* 200 (1992) 74–80.
- [16] A. Deleersnijder, A.-S.V. Rompuy, L. Desender, H. Pottel, L. Buée, Z. Debyser, et al., Comparative Analysis of Different Peptidyl-Prolyl Isomerases Reveals FK506-binding Protein 12 as the Most Potent Enhancer of α -Synuclein Aggregation, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 26687–26701.
- [17] C.F. Lee, S. Bird, M. Shaw, L. Jean, D.J. Vaux, Combined Effects of Agitation, Macromolecular Crowding, and Interfaces on Amyloidogenesis, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 38006–38019.
- [18] J. Pronchik, X. He, J.T. Giurleo, D.S. Talaga, In Vitro Formation of Amyloid from α -Synuclein Is Dominated by Reactions at Hydrophobic Interfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9797–9803.

- [19] C.A. Parker, W.T. Rees, Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency, *Analyst*. (1960) 587–600.
- [20] E.P. Kirby, R.F. Steiner, Influence of solvent and temperature upon the fluorescence of indole derivatives, *J. Phys. Chem.* 74 (1970) 4480–4490..
- [21] P. Friedhoff, A. Schneider, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution, *Biochemistry (Mosc.)*. 37 (1998) 10223–10230.
- [22] A.I. Sulatskaya, A.A. Maskevich, I.M. Kuznetsova, V.N. Uversky, K.K. Turoverov, Fluorescence Quantum Yield of Thioflavin T in Rigid Isotropic Solution and Incorporated into the Amyloid Fibrils, *PLoS ONE*. 5 (2010) e15385.
- [23] A. Sillen, J.-M. Wieruszeski, A. Leroy, A.B. Younes, I. Landrieu, G. Lippens, High-resolution magic angle spinning NMR of the neuronal tau protein integrated in Alzheimer's-like paired helical fragments, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 10138–10139.
- [24] A. Sharp, S.J. Crabb, P.W.M. Johnson, A. Hague, R. Cutress, P.A. Townsend, et al., Thioflavin S (NSC71948) interferes with Bcl-2-associated athanogene (BAG-1)-mediated protein-protein interactions, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331 (2009) 680–689.
- [25] A. Daccache, C. Lion, N. Sibille, M. Gerard, C. Slomianny, G. Lippens, et al., Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors, *Neurochem. Int.* 58 (2011) 700–707.
- [26] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, et al., Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 7614–7623.
- [27] C.M. Wischik, P.C. Edwards, R.Y. Lai, M. Roth, C.R. Harrington, Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 11213–11218.
- [28] J.R. Jensen, K. Cisek, N.S. Honson, J. Kuret, Ligand polarizability contributes to tau fibril binding affinity, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 5147–5154.
- [29] E. Akoury, M. Pickhardt, M. Gajda, J. Biernat, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, Mechanistic Basis of Phenothiazine-Driven Inhibition of Tau Aggregation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 3511–3515.
- [30] C. Fauquant, V. Redeker, I. Landrieu, J.-M. Wieruszeski, D. Verdegem, O. Lapr evote, et al., 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 (2011) 33358–33368.
- [31] I. Huvent, A. Kamah, F.-X. Cantrelle, N. Barois, C. Slomianny, C. Smet-Nocca, et al., A functional fragment of Tau forms fibers without the need for an intermolecular cysteine bridge, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445 (2014) 299–303.
- [32] O. Schweers, E.M. Mandelkow, J. Biernat, E. Mandelkow, 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 (1995) 8463–8467.
- [33] K. Bhattacharya, K.B. Rank, D.B. Evans, S.K. Sharma, Role of cysteine-291 and cysteine-322 in the polymerization of human tau into Alzheimer-like filaments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 20–26.
- [34] M. Kidd, Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease, *Nature*. 197 (1963) 192–193.
- [35] S.A. Hudson, H. Ecroyd, T.W. Kee, J.A. Carver, The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds, *FEBS J.* 276 (2009) 5960–5972.

- [36] E. Chang, S. Kim, H. Yin, H.N. Nagaraja, J. Kuret, Pathogenic missense MAPT mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1113–1123.
- [37] B. Combs, T.C. Gamblin, FTDP-17 tau mutations induce distinct effects on aggregation and microtubule interactions, *Biochemistry (Mosc.)*. 51 (2012) 8597–8607.

Figures:

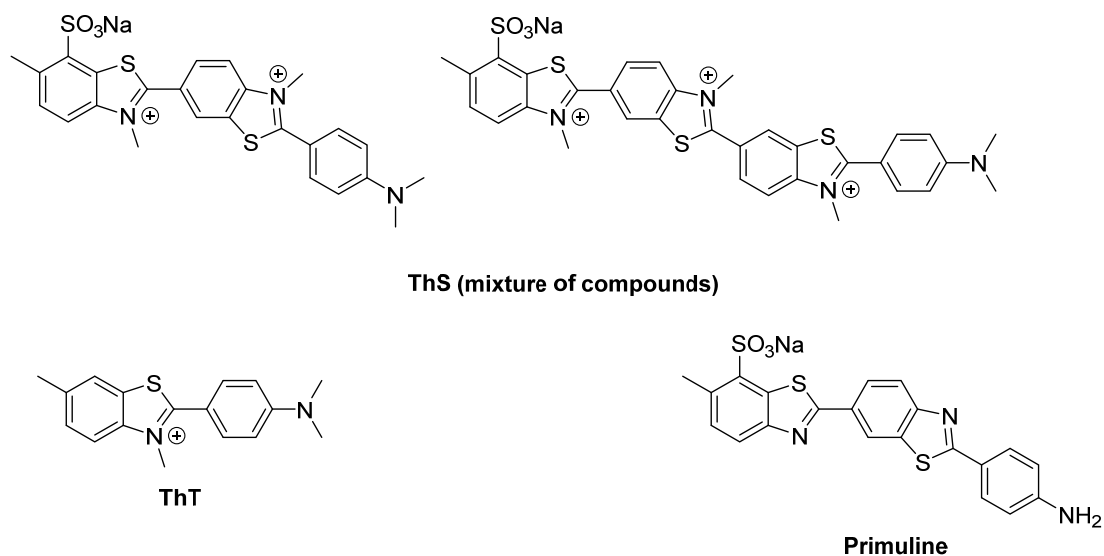


Figure 1. Chemical structures of the Thioflavine dyes studied in this work. ThS is a mixture of different components all derived from the methylation and sulfonation of dehydrothio-para-toluidine. Its two main components are shown. Primuline and ThT are pure compounds.

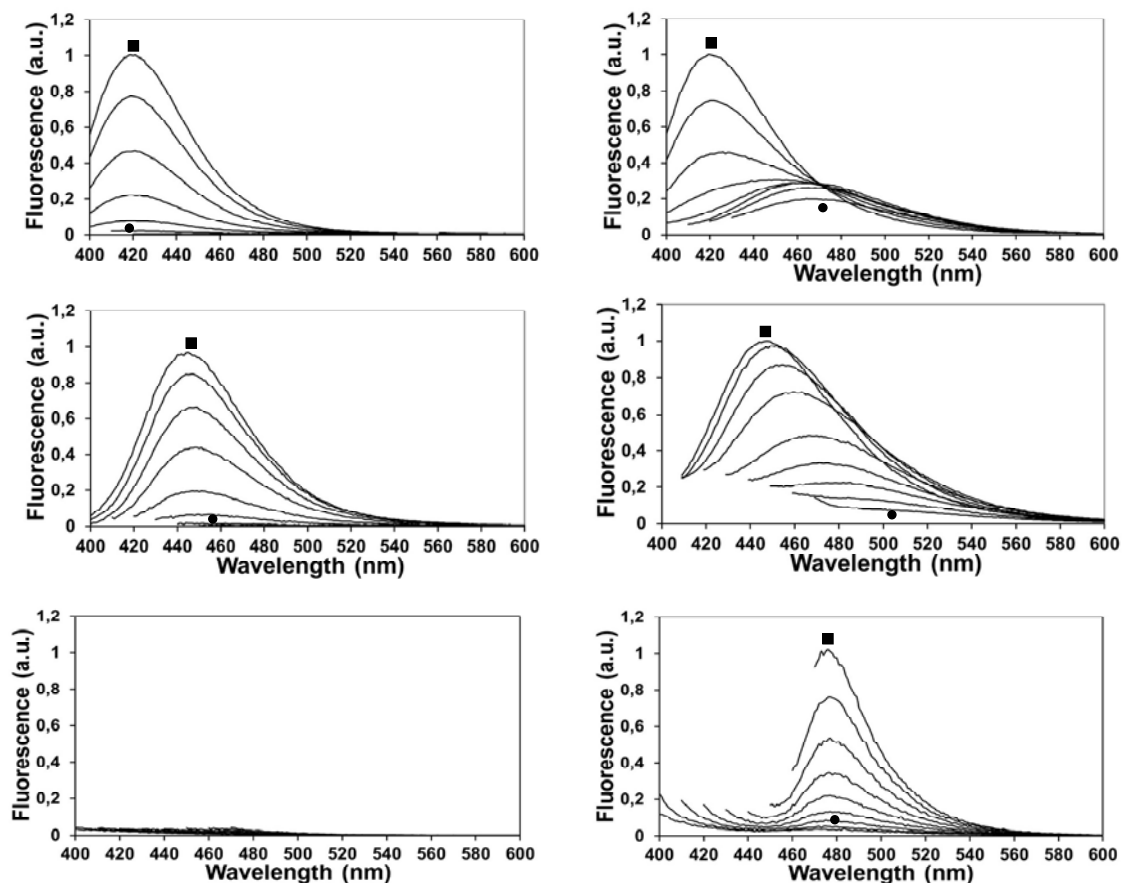


Figure 2. Emission spectra of 5 μM Primuline (top), 5 μM ThS (middle) or 5 μM ThT (bottom) free in solution (left) or in the presence of 50 μM Tau aggregated in filaments (right), when exciting from 340nm (■) to 410nm (●) for Primuline, or from 370nm (■) to 450nm (●) for ThS and ThT (using an increment of 10 nm).

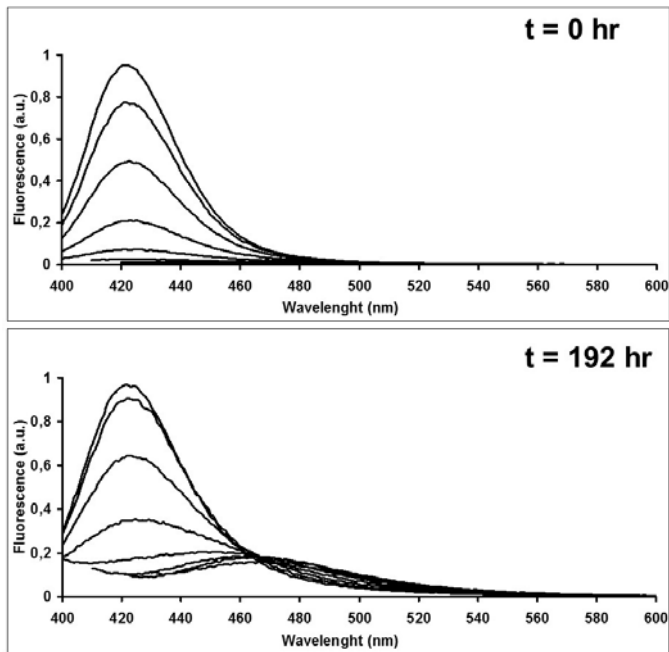


Figure 3. Fluorescence spectra of 1 μM Primuline in the presence of 35 μM alpha-Synuclein obtained at $t = 0\text{h}$ (top) and after 192h (bottom) in aggregation conditions (shaking at 37°C), using different excitation wavelength from 340nm to 410nm.

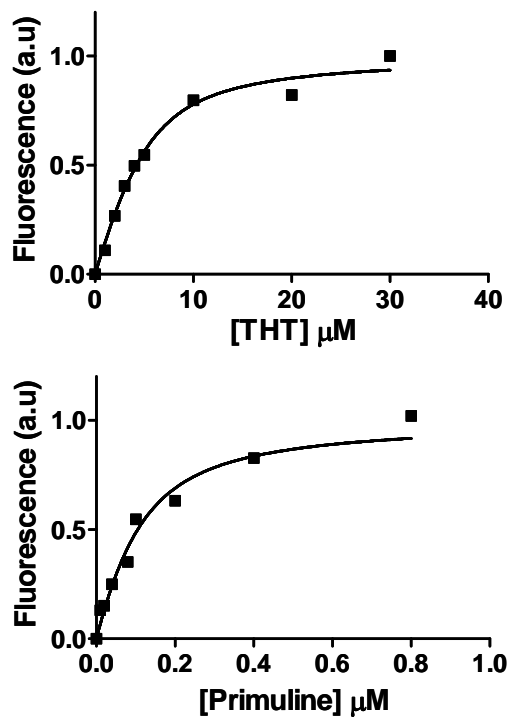


Figure 4. Titration curves of 5 μM of fibrillized Tau by ThT (top) or of 0.1 μM of Tau PHF by Primuline (bottom).

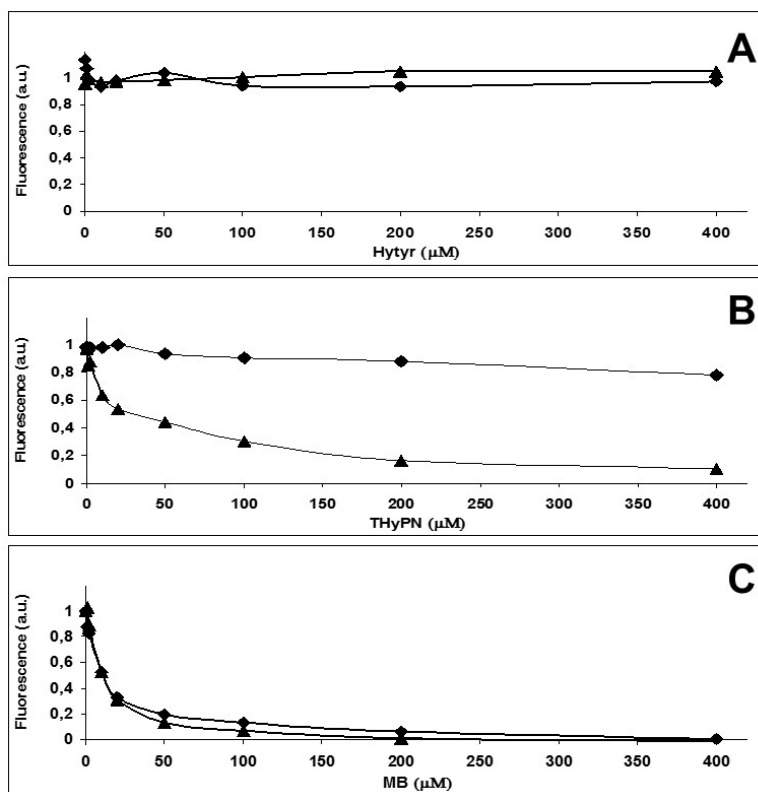


Figure 5. Displacement of 50 μM THT (triangle) or 50 μM Primuline (diamond) from preformed Tau-heparin fibers (10 μM) by different concentrations of potential aggregation inhibitors. (A) Hytyr (hydroxytyrosol), (B) THyPN (tetrahydroxyphenylnaphtalene), (C) MB (Methylene Blue).

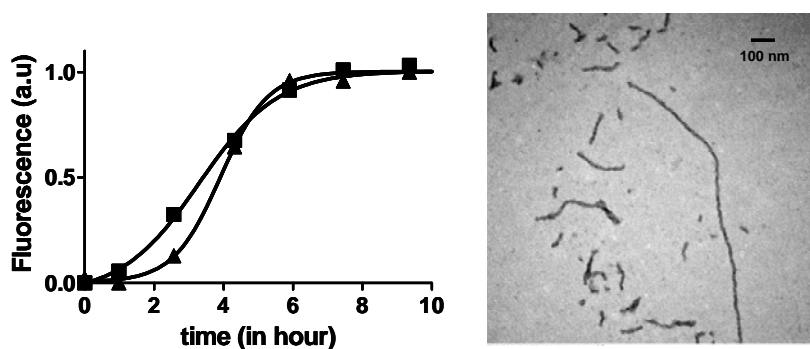


Figure 6. Kinetic trace of the heparin induced TauP301L-2CS filament formation followed by fluorescence emission (480 nm) of 25μM of Primuline (square) and 50μM of ThT (triangle). Both Primuline and ThT dyes were excited at 410 nm. Right panel: Electron microscopy image of TauP301L-2CS fibers at the end of the aggregation process.

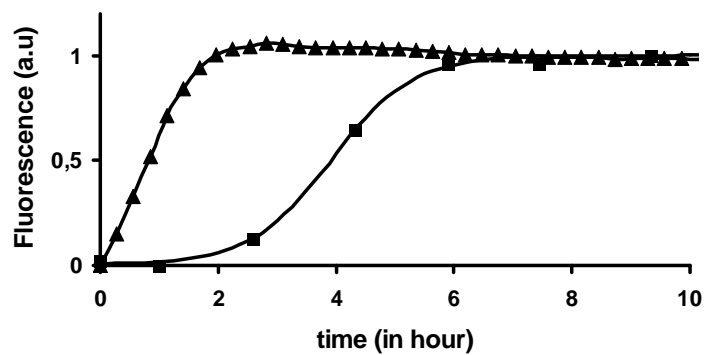


Figure 7. Kinetic traces of heparin induced TauP301L-2CS filament formation followed by Primuline fluorescence emission (excitation at 410 nm and emission at 480 nm). Triangles correspond to 25 μ M Primuline added at the beginning of the aggregation experiment, whereas squares correspond to 25 μ M of Primuline added at the end of each incubation time.

Supplementary Information

Chemical synthesis

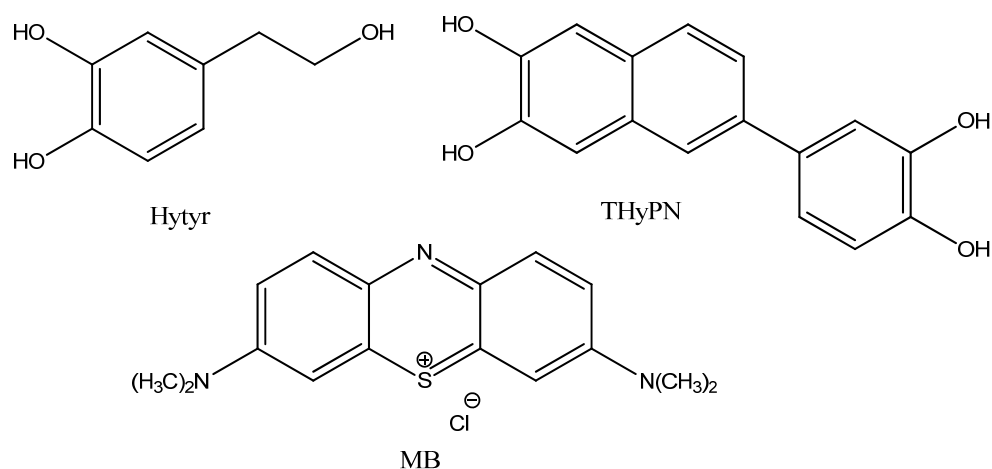


Figure S1. Structure of Hydroxytyrosol (Hytyr), tetrahydroxyphenylnaphthalene (6-(3,4-dihydroxyphenyl)naphthalene-2,3-diol, THyPN) and methylene blue (MB)

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)naphthalene-2,3-diol has been obtained by treatment of the methoxylated precursors (Maurin, C., Bailly, F., Cotelle, P., 2005. Facile access to methoxylated 2-phenylnaphthalenes and epoxydibenzocyclooctenes *Tetrahedron*, 61, 7054-7058.) by boron tribromide.

2-(3,4-Dihydroxyphenyl)naphthalene-2,3-diol

To a solution of 6-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,3-dimethoxynaphthalene (366.4 mg, 1.13 mmol) dissolved in dichloromethane (12 mL) was added a 1M solution of boron tribromide in dichloromethane (8 mL, 8 mmol) under argon. The mixture is stirred for 3 hours and water (15 mL) was added. After stirring for additional 30 min. the solution was filtered. The solid was washed with water and dried to give 224 mg (74% yield) of 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)naphthalene-2,3-diol as a white powder; melting point 190°C; ¹H nmr (300 MHz, DMSO-d₆): 6.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.39 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 8.99 (s, 2H), 9.52 (s, 2H). ¹³C nmr (75 MHz, acetone-d₆): 110.3 (CH), 110.7 (CH), 114.9 (CH), 116.6 (CH), 119.4 (CH), 123.5 (CH), 123.7 (CH), 127.3 (CH), 129.3 (C), 130.8 (C), 134.5 (C), 136.9 (C), 145.5 (C), 146.3 (C), 147.1 (C), 147.5 (C).

Hydroxytyrosol was prepared synthetically by sodium borohydride reduction of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid diethyl ester as described in the literature (Bianco, A., Passacantilli, G., Righi, G., 1988. Improved procedure for the reduction of esters to alcohols by sodium borohydride. *Synth. Commun.* 18, 1765–1771).

3.3.4) Conclusion

Dans le cadre du développement d'un test robuste capable de détecter des inhibiteurs de l'agrégation, nous avons abandonné la piste d'un test fluorescent basé sur une sonde non covalente. Même si la Primuline présente des propriétés très supérieures au THT, il existe beaucoup trop d'effets parasites qui mènent vers des faux positifs et des faux négatifs. Par conséquent, nous ne pouvons pas prétendre développer un test d'inhibition basé sur l'interaction avec des sondes non covalentes.

3.4) Mise en place d'un nouveau test pour sonder l'inhibition de la phase de nucléation.

D'après le modèle d'interaction PHF6-PHF6 développé par Eisenberg, les fibres de TAU présentent un empilement de PHF6, cet empilement est formé de feuillets beta parallèles (dans la classification d'Eisenberg c'est une interaction de type 1, voir figure 9). Chaque empilement de feuillets beta va interagir par paire, face à face, orienté de façon parallèle par rapport à l'axe de la fibre et de façon antiparallèle par rapport à l'axe perpendiculaire à la fibre. Cette structure va permettre la formation d'une interface hydrophobe entre chaque empilement.

Dans ce chapitre, nous chercherons à développer un modèle pour pouvoir tester des inhibiteurs potentiels de la phase de nucléation de l'agrégation de TAU. Les différents modèles structuraux des fibres de TAU démontrent que l'interaction entre les hexapeptides PHF6 et PHF6* est au cœur de la structure des fibres et du mécanisme d'agrégation. Le modèle que nous développons est un modèle qui consiste à former des dimères de TAU par un seul pont disulfure, de façon à forcer l'interaction PHF6-PHF6.

Le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de la protéine TAU entière présente un fort encombrement spectral, notamment aux niveaux des séquences de répétition dans le MTBR. Nous avons donc décidé de développer le modèle sur un fragment de TAU (fragment TAU F4 :S208-S324) s'étant avéré fonctionnel en terme de polymérisation de la tubuline [183] et d'agrégation (modèle TAU : héparine) [237]. Ce fragment est constitué d'une partie du domaine riche en proline ainsi que du R1, R2 et une partie du R3 (figure 15).

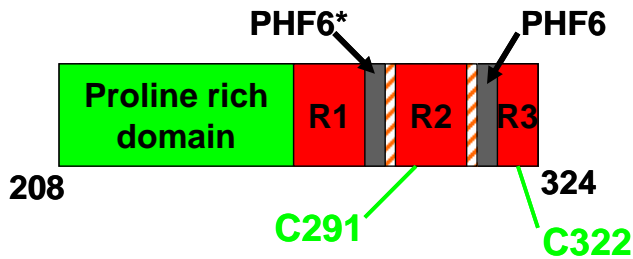


Figure 15 Schéma du fragment F4 de TAU.

Pour développer ce modèle, Isabelle Huvent, dans notre groupe, a produit le mutant TAU F4-C291S-C322 avec une cystéine unique. Cela nous permet d'obtenir un dimère par formation du pont disulfure qui ne peut être qu'intermoléculaire.

Les dimères sont obtenus en incubant le mutant de TAU-C291S-C322 dans un tampon 25 mM phosphate de sodium, 25 mM NaCl, 2.5mM EDTA, pH 6.6 avec 5% de DMSO pendant deux heures. Ceci permet la formation du pont disulfure par oxydation des fonctions thiol des résidus cystéine. Après incubation nous échangeons le tampon contre un tampon bicarbonate d'ammonium. Les différents mutants sont alors aliquotés et lyophilisés. La formation du dimère est contrôlée par gel SDS-PAGE. La figure 16 montre un gel SDS-PAGE du dimère TAU-C291S-C322 formé par incubation avec différents pourcentages de DMSO. La formation du dimère est réversible, par l'ajout du DTT, qui réduit le pont disulfure et donc mène à l'obtention à nouveau du monomère.

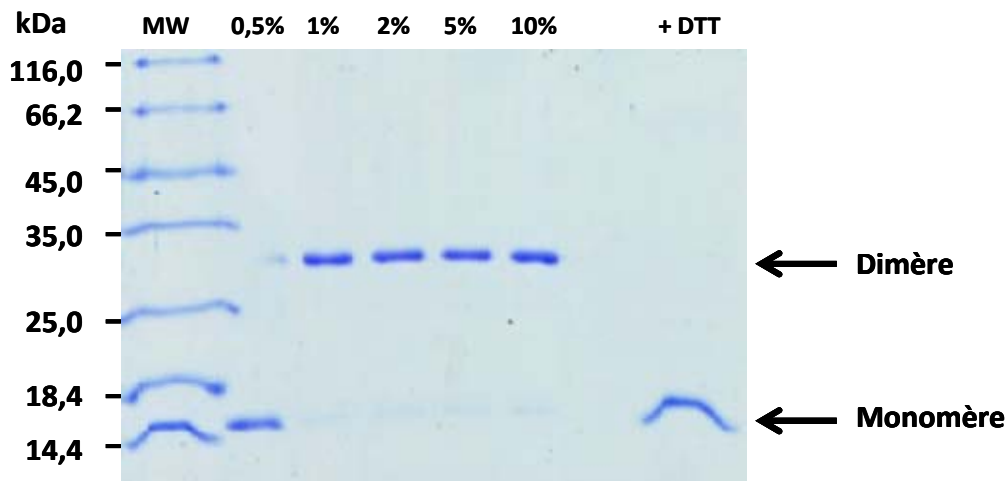


Figure 16 : Gel SDS-PAGE de TAU F4-C291S-C322 (100 uM) incubé avec différents pourcentages de DMSO. A droite, on peut observer la bande correspondant à la protéine réduite par 2.5mM de DTT.

3.4.1) Résultats

3.4.1.1) Caractérisation du dimère de TAU F4-C291S-C322

Nous avons tout d'abord étudié le dimère de TAU F4 C291S-C322 contenant uniquement la cystéine 322. Cette cystéine 322 est décrite par l'équipe du professeur Mandelkow comme indispensable au processus d'agrégation [154]. Si on compare les spectres ^1H - ^{15}N HSQC du dimère de TAU F4-C291S-C322 avec sa forme monomérique respective (réduit par du DDT), nous observons des perturbations autour de la zone de dimérisation. Dans la figure 18, nous observons clairement la résonance de la cystéine 322 oxydée et des variations importantes de déplacement chimique concernant les acides aminés proches du pont disulfure. Ces perturbations sont dues à la présence du pont disulfure. Nous observons également des perturbations plus lointaines, concernant les acides aminés dans le PHF6 (figure 17 et 18). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la formation du pont disulfure en C322 a permis une stabilisation de l'interaction entre les PHF6.

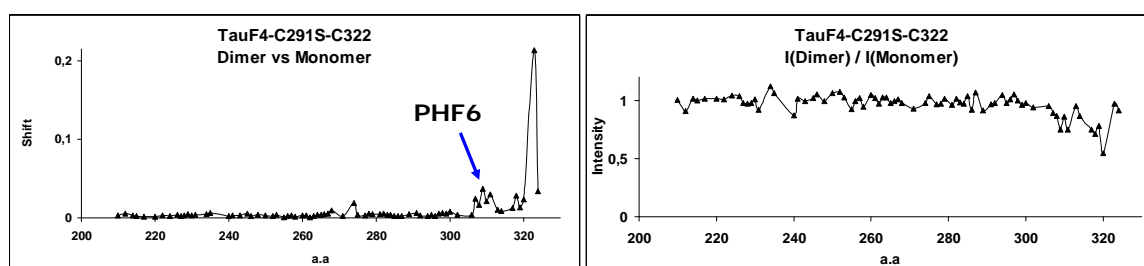
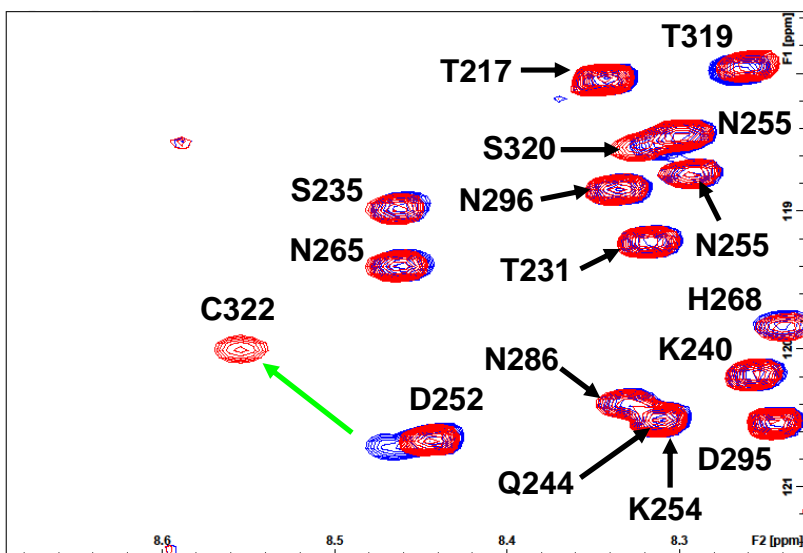
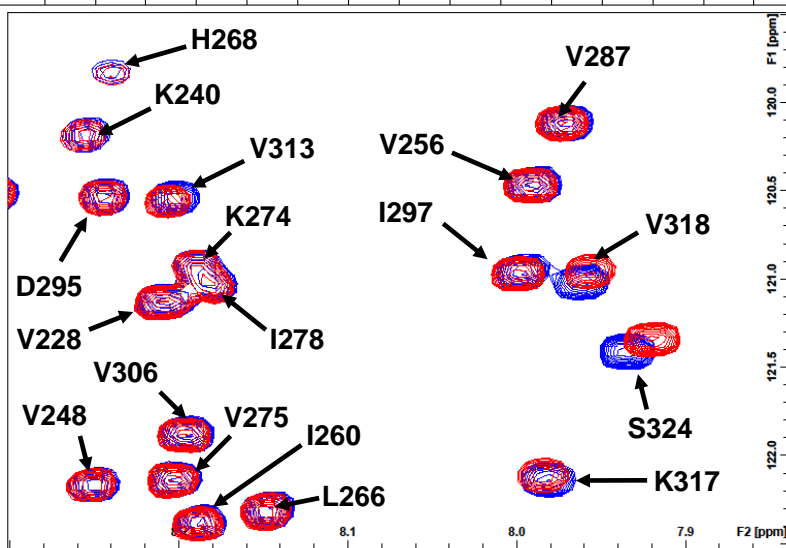
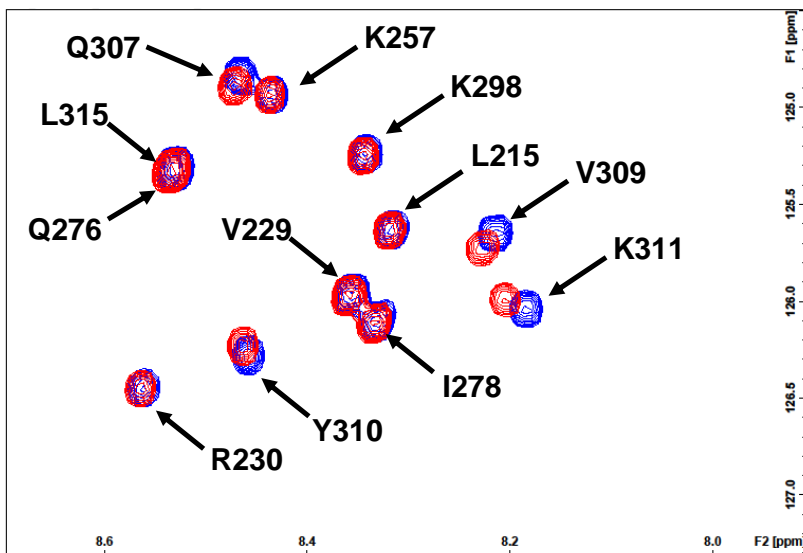


Figure 17 : A gauche, la variation de déplacement chimique et à droite l'intensité relative entre la forme monomérique et la forme dimérique de ^{15}N -TAU F4-C291S-C322. La variation de déplacement chimique (*Shift*) a été calculée à partir de la formule $Shift = \sqrt{\Delta\delta(H)^2 + 0.2 * \Delta\delta(N)^2}$. Les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et à 20°C sur un échantillon de ^{15}N -TAU F4-C291S-C322 dimérique (50 μM) et un échantillon de ^{15}N -TAU F4-C291S-C322 monomérique (50 μM).



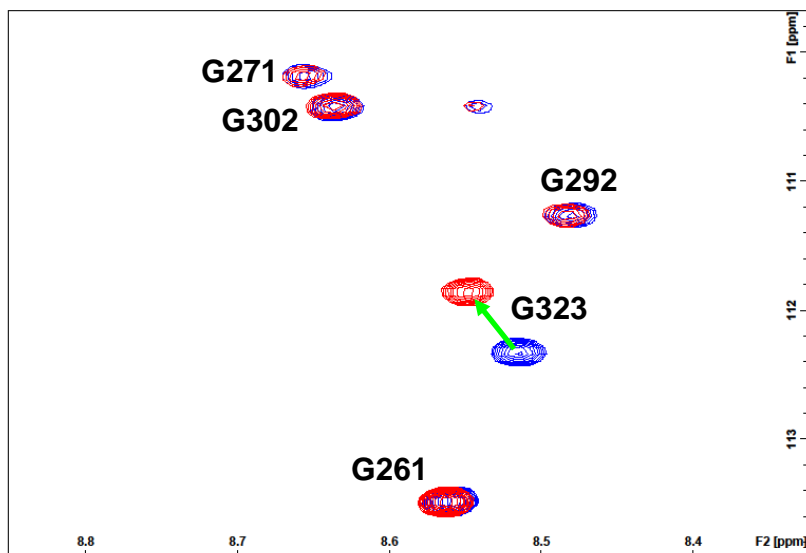
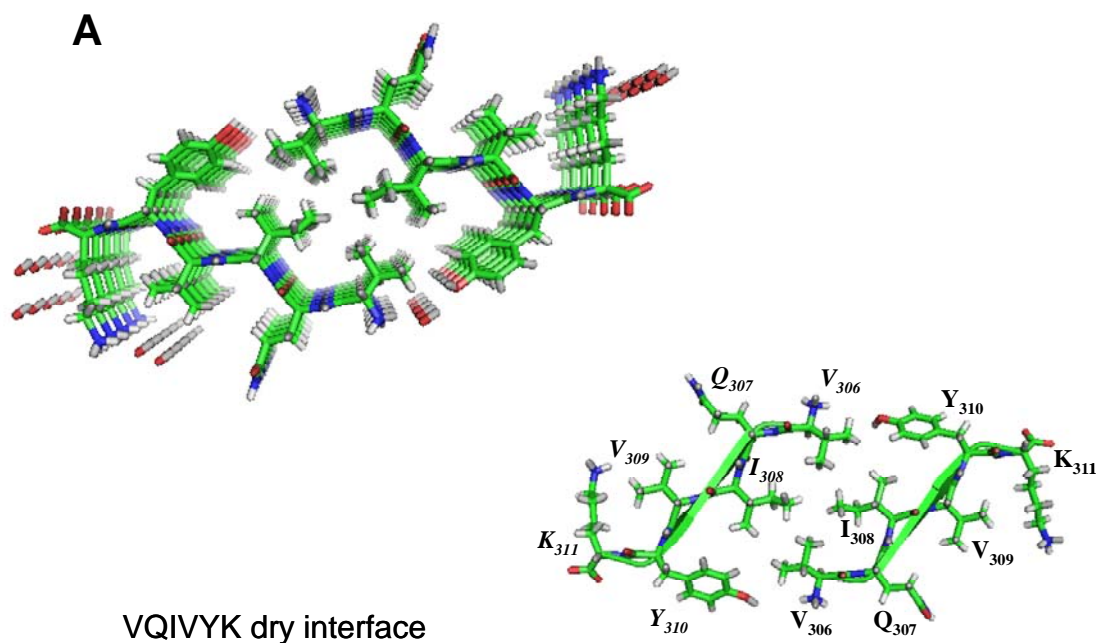


Figure 18 : Quelques zooms des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -TAU F4-C291S-C322 monomère (50 μM , bleu) et dimère (50 μM , rouge) à 600 MHz et à 20°C.

D'après le modèle d'interaction PHF6-PHF6 proposé par Eisenberg [119], deux interactions entre les PHF6 peuvent être envisagées. Soit une interaction par formation d'un feuillet beta parallèle avec la formation de pont hydrogène entre chaque brin, soit une interaction antiparallèle purement hydrophobe entre les chaînes latérales des PHF6 (figure 19).



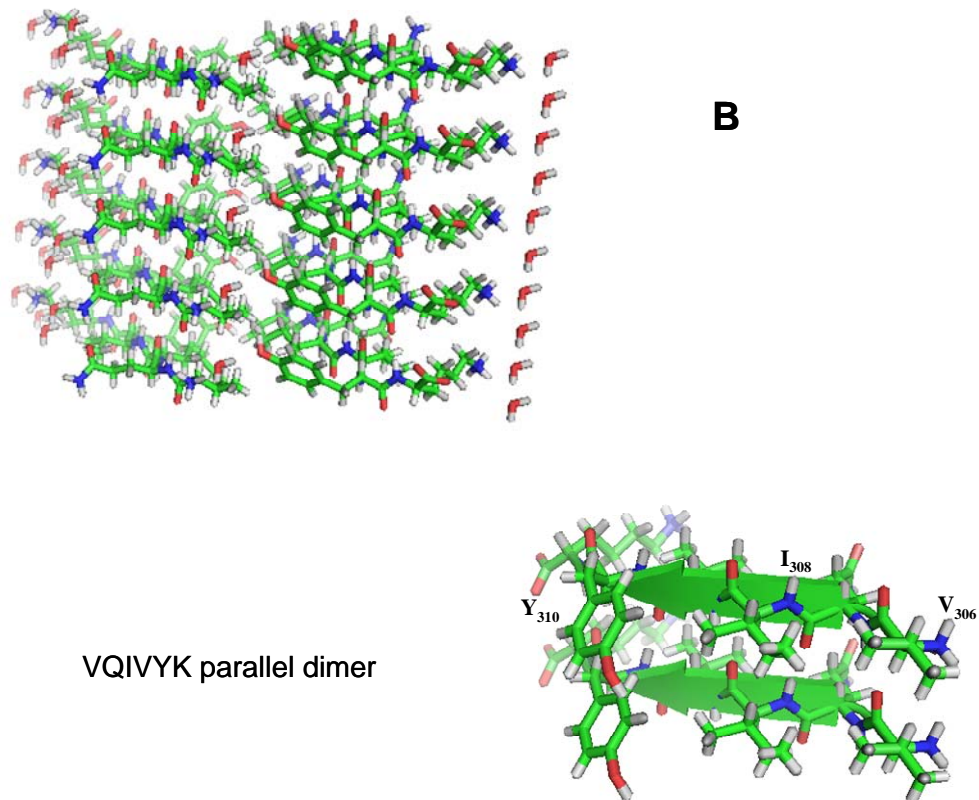


Figure 19 : Modèle d'interaction des hexapeptides PHF6. En haut (A), vue de dessus de l'axe principal de la fibre. En bas (B), vue perpendiculaire à l'axe de la fibre.

Si on observe le spectre de TAU F4-C291S-C322 à plus haut champ (800 MHz), on remarque que le signal des acides aminés K311 et V309 présente un deuxième pic minoritaire situé au même déplacement chimique que ces résidus dans le monomère de TAU F4-C291S-C322. Ceci nous laisse penser que nous sommes en échange lent entre deux populations, une forme majoritaire avec les PHF6 en interaction et une forme minoritaire avec les PHF6 « libres ». Ces pics minoritaires ne proviennent pas d'une quantité résiduelle de monomères dans l'échantillon, car nous n'observons pas de pic minoritaire sur les résonances de S324 et G323.

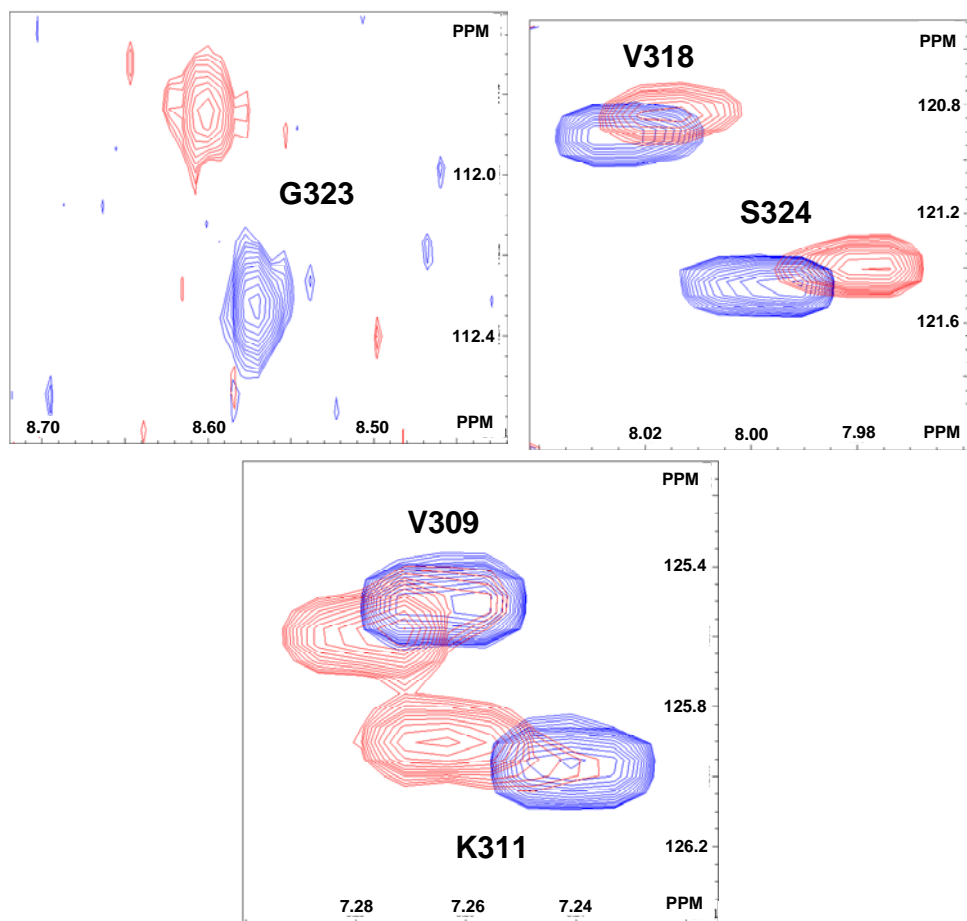


Figure 20 : Zooms des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -TAU F4 C291S-C322. En rouge, le spectre correspondant au dimère (160 μM) et en bleu le spectre correspondant au monomère (160 μM) de ^{15}N -TAU F4-C291S-C322. Les spectres ont été enregistrés à 800 MHz et à 20°C.

3.4.1.2) Caractérisation de l'interaction PHF6-PHF6 dans le dimère TAU F4-C291S-C322

Comme première étape de caractérisation structurale, nous avons essayé de mesurer le transfert par effet NOE entre les deux PHF6 en comparant les spectres NOESY-HSQC édités ^{15}N du dimère et du monomère de TAU F4-C291S-C322.

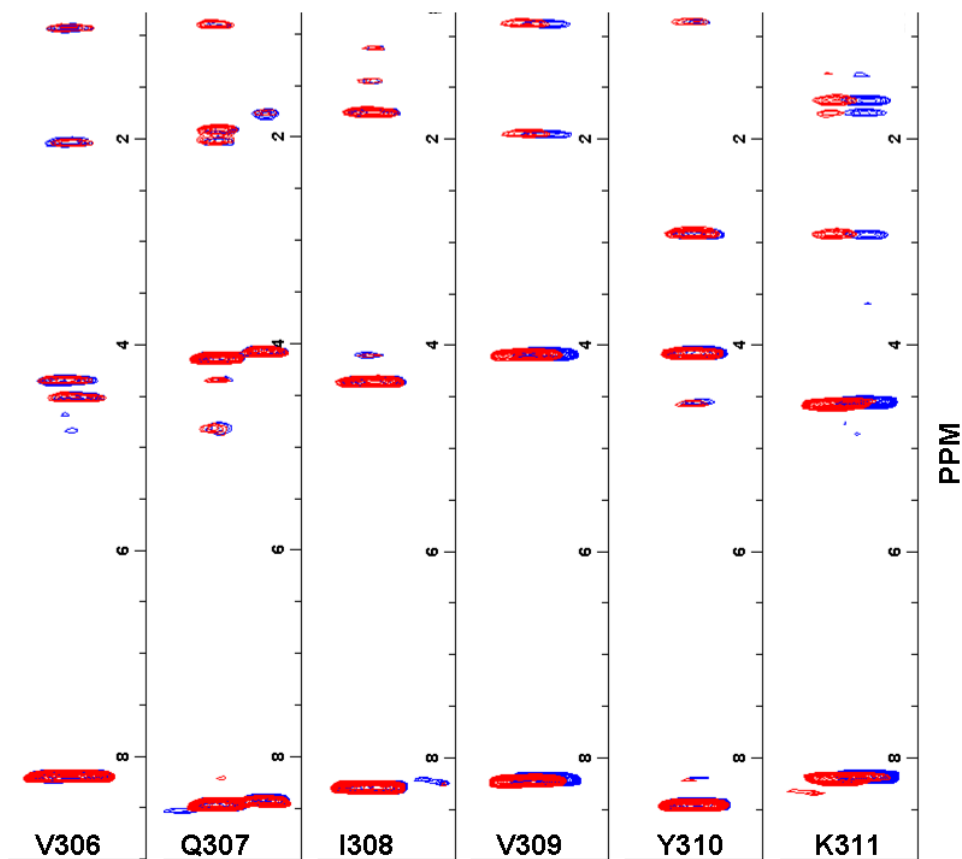


Figure 21 : Plans ^1H - ^1H du spectre NOESY édité ^{15}N . La figure montre les six plans ^1H - ^1H correspondant à chaque résidu du PHF6 à la fréquence ^{15}N du résidu. En rouge, le spectre correspondant au dimère (200 μM) et en bleu, le spectre correspondant au monomère (200 μM) de ^{15}N -TAU F4-C291S-C322. Les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et à 20°C.

Les contacts forts $\text{H}\alpha(i)$ - $\text{H}\alpha(i+1)$ indiquent que le monomère a déjà une tendance à former des brins beta aux niveaux du PHF6. De façon très étonnante, nous n'observons aucun pic NOE supplémentaire au niveau des PHF6 du dimère de TAU F4-C291S-C322 (figure 21). Ces résultats vont à l'encontre d'une structuration qui stabiliserait une structure en feuillets beta parallèles.

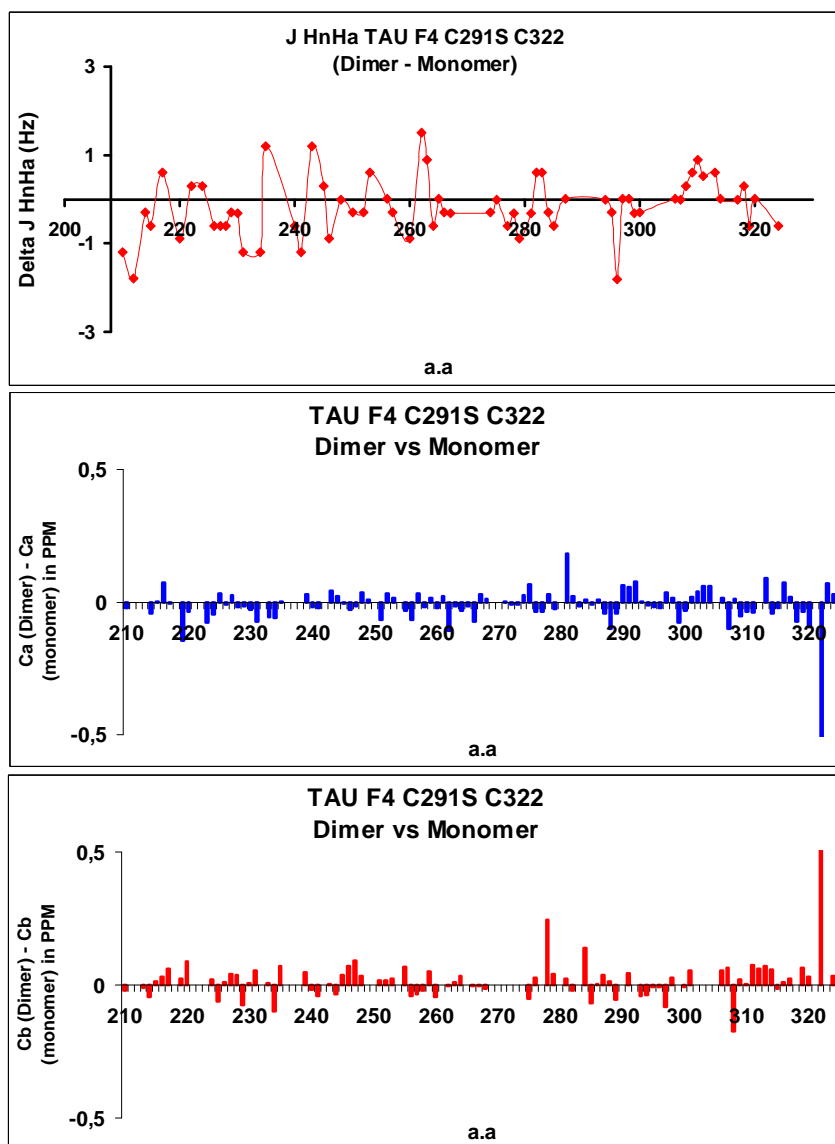


Figure 22 : Comparaison des déplacements chimiques (carbone alpha et beta) et les couplages 3J HnH α entre le dimère et le monomère de TAU-C291S-C322. En haut, le couplage 3J HnH α du dimère moins celui du monomère. Au milieu et en bas, la différence de déplacement chimique du Ca et Cb du dimère par rapport au monomère. Les spectres HnCaCb ont été enregistrés dans un échantillon de 200 μ M de ^{15}N - ^{13}C TAU-C291S-C322 dimère et 200 μ M de ^{15}N - ^{13}C TAU-C291S-C322 monomère. Les constantes de couplage 3J HnH α ont été mesurées directement sur des spectres ^1H - ^{15}N TROSY enregistrés avec 16K points en dimension directe, un temps d'acquisition de 756 ms et une résolution de 1.3 Hz (échantillons : 200 μ M de dimère de ^{15}N TAU-C291S-C322 et 200 μ M de ^{15}N TAU-C291S-C322 monomère). Tous les spectres ont été enregistrés à 900 MHz et 20°C.

Si on compare le dimère TAU F4-C291S-C322 avec sa forme monomérique (réduit par du DTT), nous n'observons aucune variation

significative des couplages $^3\text{J HnH}\alpha$ ni des déplacements chimiques des carbones alpha et beta (figure 22). Ceci démontre que le dimère ne stabilise pas de conformation secondaire détectable par RMN.

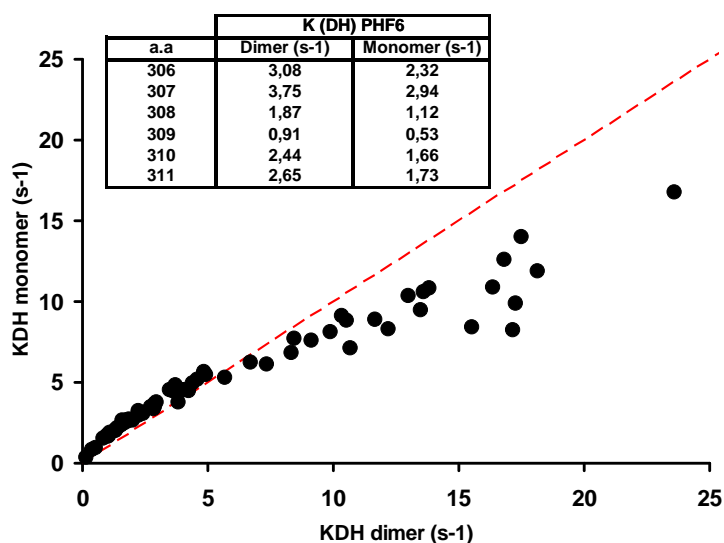


Figure 23 : Corrélation entre la constante de vitesse d'échange deutérium/proton des fonctions amide du monomère (200 μM) et du dimère (200 μM) de ^{15}N - TAU F4 C291S-C322. Nous avons utilisé la méthode développée dans le chapitre 1. Les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et à 20°C. L'échantillon du dimère présente un pH légèrement supérieur à celui du monomère. En haut, un tableau montrant les valeurs des constantes de vitesse d'échange deutérium/proton pour les résidus du PHF6.

Nous avons appliqué la méthodologie Relax-EXSY [245] développée dans le chapitre 1 pour essayer d'observer s'il y a une formation de pont hydrogène dans le dimère. Malheureusement, les données ont été enregistrées sur deux échantillons différents et nous pensons qu'il existe une faible variation de pH entre les deux échantillons (le dimère aurait un pH un peu plus élevé que le monomère), par conséquent les valeurs d'échange de la forme dimérique sont un peu plus élevées que celle du monomère. Néanmoins, s'il y avait une stabilisation d'un pont hydrogène on devrait observer une forte diminution de l'échange H/D dans la forme dimérique or, ce n'est pas le cas (figure 23).

Ces résultats peuvent être interprétés de deux façons, soit le dimère ne stabilise pas de pont hydrogène entre les PHF6 ou l'échange entre la conformation qui présente les ponts hydrogène et la conformation « libre » est plus rapide que la vitesse d'échange intrinsèque de la fonction amide. L'ordre de grandeur de cet échange doit être plus ou moins supérieur à 3 s^{-1} car les valeurs d'échange H/D des résidus dans le PHF6 sont comprises entre 2.94 s^{-1} (I307) et 0.53 s^{-1} (V309).

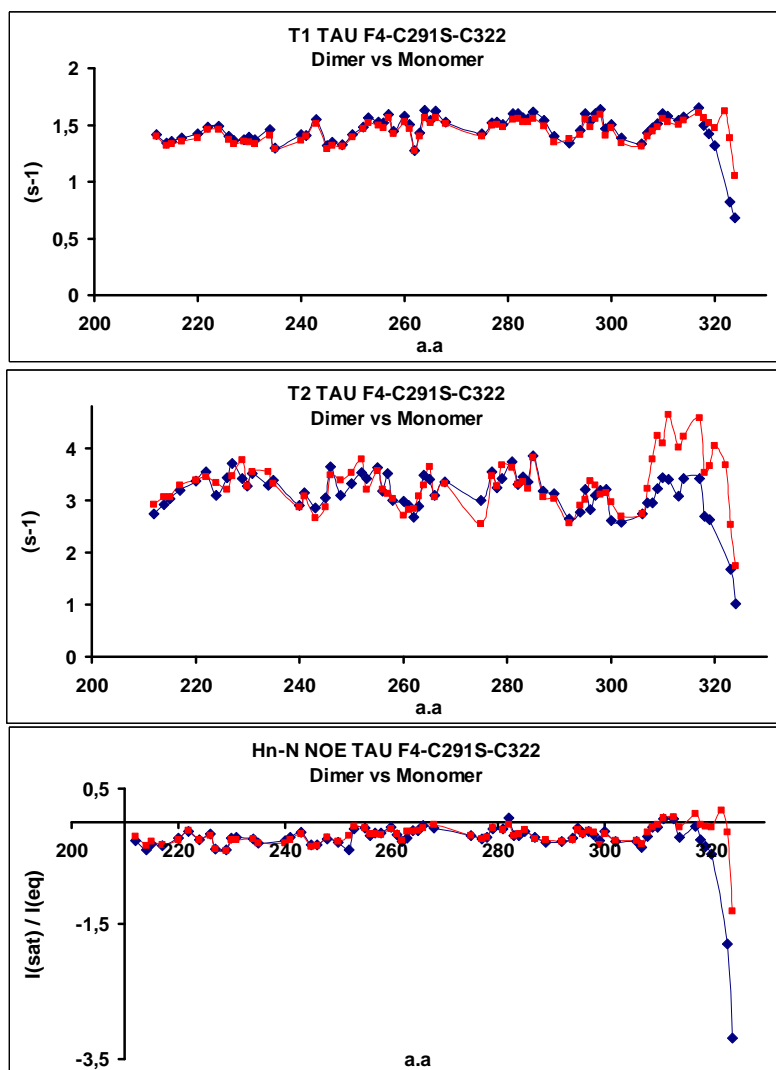


Figure 24 : Paramètres de relaxation ^{15}N du dimère (en rouge, 200 μM) et du monomère (en bleu, 200 μM) de ^{15}N -TAU F4 C291S C322 en fonction de la séquence en acides aminés [246] [247]. Les valeurs de relaxation R1 (en haut), R2 (au milieu) et l'effet Hn-N NOE (en bas) ont été mesurés à 600 MHz et à 20°C.

Si on compare les propriétés de relaxation entre le dimère et le monomère, on observe qu'il y a une très faible variation de la relaxation R1 ainsi que de l'effet Hn-N NOE sauf pour les résidus autour du pont disulfure (figure 24).

Concernant la relaxation R2 du dimère, on observe que la relaxation du côté C-terminal est beaucoup plus importante que dans le reste de la protéine. Ceci est sûrement dû à une contribution importante du déphasage du signal à la relaxation transversale [246] (figure 24). L'augmentation de la relaxation transversale dans le C-terminus (où se retrouve le PHF6), nous laisse penser que cette contribution supplémentaire à la relaxation viendrait d'un échange conformationnel rapide aux niveaux de l'interaction des PHF6.

L'ensemble des résultats de la caractérisation structurale pointe vers une interaction faible et transitoire entre les PHF6. Cette interaction serait en échange rapide, ce qui expliquerait l'absence de stabilisation de structure secondaire, l'absence de ponts hydrogène stables ainsi que l'absence de pics NOE supplémentaires dans le spectre NOESY édité ^{15}N . Seul un résultat contredit cette hypothèse, dans le spectre ^1H - ^{15}N HSQC du dimère nous observons deux pics minoritaires correspondant aux résonances de K311 et V309 « libres ». La présence de ces pics minoritaires ne peut pas être expliquée par un échange rapide, au contraire il témoigne d'un échange lent entre deux environnements chimiques du PHF6.

3.4.2) Conclusions et perspectives

Nos résultats démontrent que le pont disulfure intermoléculaire formé par la cystéine naturelle de TAU (C322) contribue à la stabilisation de l'interaction PHF6-PHF6. Huvent *et al.* [237] démontrent que le mutant dépourvu de cystéine TAU F4-C291S-C322S agrège mais avec un temps de latence supérieur au temps de latence de TAU F4. Ces résultats peuvent être expliqués par la stabilisation de l'interaction intermoléculaire PHF6-PHF6 qui mènerait vers une stabilisation des noyaux d'agrégation et expliquerait la diminution du temps de latence. Néanmoins, une caractérisation plus approfondie de la structure des dimères est nécessaire. Pour l'instant, nous ne pouvons pas proposer de modèle sur la structure et la dynamique de l'interaction PHF6-PHF6.

Le dimère TAU F4-C291S-C322 pourrait être utilisé comme un modèle pour tester des molécules capables d'inhiber l'interaction intermoléculaire PHF6-PHF6 et par conséquent la phase de nucléation.

Pour continuer la caractérisation de l'interaction PHF6-PHF6, nous envisageons des expériences NOESY-éditées ^{15}N avec des marquages sélectifs (formation de dimères à partir d'un mélange de protéine TAU F4-C291S-C322 marquée ^{15}N - ^2H et TAU F4-C291S-C322 non marquée). De cette façon, nous pourrions observer les transferts NOE intramoléculaires.

4) Etude de l'agrégation d'AS induit par FKBP12

4.1) Introduction sur la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) a initialement été décrite par James Parkinson en 1817. La MP est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente, elle affecte près de 2% de la population âgée de plus de 65 ans [248]. Elle se caractérise par trois symptômes : une rigidité musculaire, une bradykinésie et des tremblements. Les principales caractéristiques neuropathologiques furent décrites en 1912 par Friederich Lewy. Elles se traduisent par la formation de deux inclusions cytoplasmiques neuronales appelées Lewy Bodies (LBs) et Lewy Neurites [248]. Ces LBs apparaissent sous la forme de masses sphériques composées d'un centre dense entouré d'un halo de fibrilles (figure 30). Ces inclusions sont particulièrement nombreuses dans la *Substantia Nigra* mais se propagent dans plusieurs zones du cerveau [248] [249]. La dégénérescence des cellules nerveuses de la *Substantia Nigra* va perturber tout le système dopaminergique [248]. Il existe une forte corrélation entre la dégénérescence de la *Substantia Nigra* et la rigidité musculaire ainsi que les tremblements [248]. En 1997, Spillantini *et al.* démontrent que les LBs sont principalement constitués de fibres d'AS [250]. Il est très probable qu'au sein même des LBs nous avons un grand polymorphisme entre les fibres d'AS [113]. Pour l'instant, personne n'a été capable de déterminer ces polymorphismes ni les mécanismes d'agrégation relevant pour la maladie de Parkinson. Il n'existe actuellement aucun traitement permettant de soigner la maladie. Cependant, l'administration de L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), un dérivé de la dopamine, reste le traitement le plus efficace pour retarder les symptômes de la maladie.

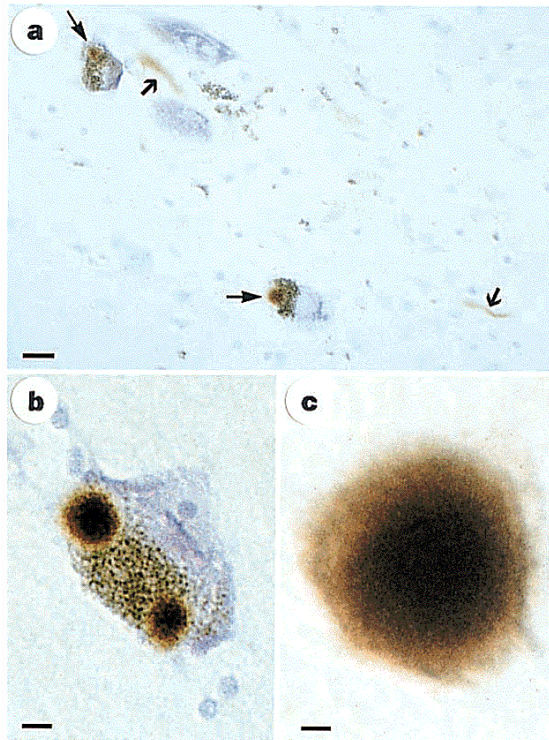


Figure 25 : Immunodétection des fibres d'AS dans la *Substantia Nigra*. A) Deux cellules nerveuses de la *Substantia Nigra*, contenant chacune un Lewy Bodies (indiqué par des flèches noires fines). Les Lewy Neurites sont indiquées par des flèches noires épaisses. La barre d'échelle correspond à 20 micromètres. B) Une cellule nerveuse avec deux Lewy bodies. La barre d'échelle correspond à 8 micromètres. C) Lewy body extracellulaire. La barre d'échelle correspond à 4 micromètres. Figure extraite de Spillantini *et al.* [250].

4.2) Introduction sur la protéine Alpha Synucléine

4.2.1) Structure

Alpha Synucléine (AS) est une petite IDP de 140 acides aminés. Elle est composée de 7 répétitions imparfaites de séquence (XKTKEGVXXXX figure 26 [251]) qui ressemblent beaucoup aux motifs retrouvés dans les hélices amphipathiques des apolipoprotéines. AS possède 2 domaines principaux (figure 26) :

- Résidus 1-95: le domaine N-terminal avec une forte tendance à former des hélices alpha amphipathiques. Dans ce domaine se retrouve la zone centrale d'AS qui comporte les résidus les plus hydrophobes de la protéine. Dans la zone centrale nous trouvons une région appelée la NAC région (*non Aβ amyloïde*

component). La NAC région (71-VTGVTAVAQKTV-81) est décrite pour être indispensable à l'agrégation d'AS [252].

- Résidus 96-140: le domaine C-terminal est fortement acide. Ce domaine est la zone la plus « IDP » de la protéine. Il joue surtout le rôle de régulateur de l'agrégation et des interactions.

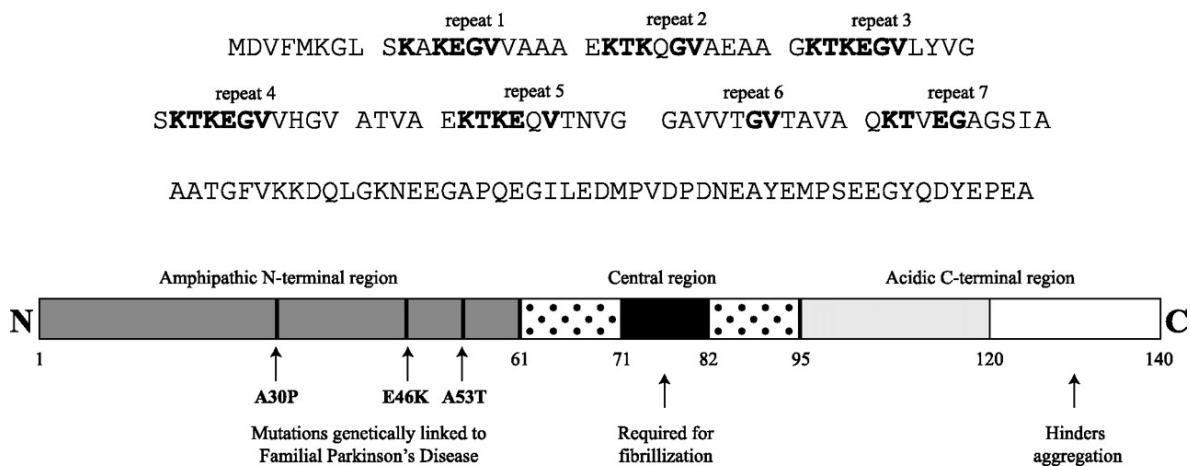


Figure 26 : Structure primaire d'AS. Les répétitions imparfaites sont mises en évidence avec les résidus conservés en gras. En bas, un schéma représentant les régions de la protéine. La région N-terminale contient les répétitions et les trois mutations ponctuelles liées à l'apparition précoce de la maladie de Parkinson, la partie C-terminale, qui est la partie la plus acide de la protéine. La zone centrale est également indiquée. Figure extraite de Bisaglia *et al.* [251].

Bien qu'AS soit une IDP, des données récentes suggèrent qu'*in vivo*, une partie d'AS se trouverait sous forme de tétramère structuré [253]. Ce tétramère présente la même structuration qu'AS en interaction avec la membrane (structure en hélice amphipatique [254]). D'après les auteurs [253][254], la forme tétramérique d'AS protégerait contre l'agrégation. Les mutations pathologiques A30P, A53P et E46K induiraient des changements structuraux du tétramère et AS retrouve sa capacité à agréger sous agitation à 37°C [254]. Il existe une grande controverse au sujet de ce tétramère. Dans une publication parue en 2012 [255], plusieurs laboratoires s'unissent pour démontrer que le tétramère d'AS n'a aucune relevance physiologique. Ils démontrent également que la forme IDP monomérique est la forme prédominante dans le système nerveux central [255].

4.2.2) Le rôle physiologique de l'Alpha Synucléine

Le rôle physiologique d'AS est peu connu. George *et al.* [256] démontrent dans un modèle de poisson Zèbre qu'AS joue un rôle important dans la plasticité neuronale. AS jouerait également un rôle important dans la transmission synaptique et notamment dans le recrutement de la dopamine au niveau des synapses et des pré-synapses [251] [257]. Il a été démontré qu'AS peut également réguler le transport de la sérotonine et de la norépinéphrine [251]. AS est très impliquée dans la régulation de certaines kinases et phospholipases comme PKC et PLD2. Certaines études suggèrent qu'AS a un rôle de chaperonne, notamment pour le complexe SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) [258].

Des études sur des souris déficientes en AS ont été réalisées par le docteur Abeliovich et ses collaborateurs [259]. Les souris déficientes en AS sont tout à fait viables et fertiles. Elles présentent une architecture neuronale correcte ainsi qu'un cycle dopaminergique tout à fait normal. Le docteur Goedert [248] suggère que la Beta et Gamma Synucléine pourraient compenser l'absence d'AS et qu'il faudrait étudier un système triple *knockout* pour comprendre les effets des Synucléines.

4.2.3) Interaction avec la membrane plasmique

Au contact de la membrane plasmique, AS se structure en deux hélices amphipatiques [48] (figure 27). La boucle entre les deux hélices (résidus 38-44) et le domaine C-terminal reste toujours flexibles. L'interaction d'AS avec les lipides est modulée par plusieurs facteurs : la taille et la courbure des vésicules [260], la salinité du milieu [261], les modifications post-traductionnelles [262] [263], certaines mutations cliniques ... Le rôle exact d'AS dans la membrane plasmique est très peu connu.

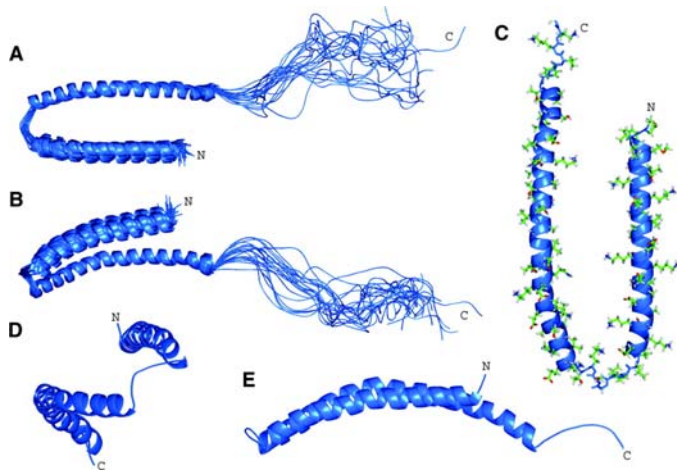


Figure 27 : Structure d'AS liée aux micelles. A et B, ensemble de vingt structures superposées sur l'hélice C-terminale. L'hélice N-terminale (V3-V37) et C-terminale (K45-K97) sont reliées par une courte boucle (le domaine C-terminal est non structuré (D98-A140)). C à E, vues de la structure moyenne des hélices en différentes orientations. La queue non structurée n'a pas été représentée en C et D). Figure extraite d'Ulmer *et al.* [48].

4.2.4) Phosphorylation d'AS

Une kinase décrite comme très active sur AS est la caséine kinase CK1 [264]. Elle phosphoryle AS en deux positions : S129 et S87. Ces phosphorylations sont intrinsèquement liées à la régulation des fonctions biologiques d'AS [262] [263] [265] [264]. L'extrémité C-terminale, et notamment le motif 125-YEMPS-129 d'AS, est fortement impliquée dans les interactions protéine-protéine, les interactions avec des ions et dans la régulation de l'agrégation. La phosphorylation de la sérine 129 jouerait un rôle de modulateur de l'affinité. Bien que S129 ne soit pas intégrée dans les fibres ni dans la membrane, sa seule phosphorylation est suffisante pour inhiber l'agrégation d'AS [263] et diminuer l'affinité d'AS pour la membrane plasmique [263] [264].

S87 se trouve en plein dans la NAC région (résidus : 71 à 81). Cette région est impliquée dans l'agrégation et dans une des hélices qui interagit avec la membrane. *In vivo* la phosphorylation de S87 est très liée aux synucléopathies [262]. Il a été démontré, qu'*in vivo*, le taux de phosphorylation de S87 augmente dans toutes les synucléopathies [262]. La phosphorylation de S87 évite l'agrégation [262] mais diminue aussi l'affinité d'AS pour la membrane plasmique [262], conduisant à une incrémentation d'AS soluble dans le neurone. Paleologou *et al.* suggèrent que les phosphorylations S87 et S129 seraient pour le corps une façon de se défendre contre l'agrégation. Mais une observation

reste inexplicée : à un stade précoce de la maladie, AS n'est pas phosphorylée dans les LBs tandis que, dans les LBs matures, il y a une présence accrue des phosphorylations S87 et S129 [262].

4.2.5) Interaction d'AS avec la dopamine et ses dérivés

La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence des neurones du système dopaminergique accompagnée d'une accumulation de fibres (Lewy bodies). L'interaction d'AS avec la dopamine et ses effets sur l'agrégation sont très controversés (différentes zones d'interaction, interaction covalente ou non covalente, etc). Néanmoins, toutes les publications démontrent que la dopamine a un pouvoir inhibiteur de l'agrégation ainsi qu'un pouvoir oxydant. La dopamine stabiliserait également des oligomères non amyloïdes dont la toxicité et la structure restent controversées.

Plusieurs inhibiteurs de l'agrégation sont des dérivés de la dopamine [266], [267]. Ces molécules, non seulement inhibent l'agrégation, mais peuvent aussi désagréger les fibres [267]. Plusieurs mécanismes d'action sont proposés pour la dopamine. La dopamine jouerait le rôle d'une modification post-traductionnelle par interaction covalente avec les tyrosines et les lysines [268]. La dopamine serait oxydée en dérivé quinone qui formerait des liaisons covalentes avec plusieurs AS, formant ainsi des oligomères non amyloïdes [269]. L'interaction avec la tyrosine 125 serait capitale pour la formation de ces oligomères non amyloïdes [270]. Une autre hypothèse considère le DOPAL (3,4-DihydroxyPhénylAcétylaldéhyde), métabolite toxique de la dopamine comme promoteur de la formation d'oligomère toxique [271].

4.3) Agrégation d'AS

Pour comprendre les mécanismes d'agrégation, plusieurs laboratoires ont développé des modèles *in vitro*. Le modèle d'agrégation *in vitro* le plus utilisé, fait incuber un échantillon d'AS à 37°C tout en le secouant. Sous ces conditions on obtient des fibres sur une échelle de temps de jours. Cette agrégation se fait en deux étapes : une phase de nucléation et une phase d'élongation. Dans ce modèle, l'agrégation d'AS se fait à l'interface eau-air générée par l'action de secouer [272] [273] [274]. Ce mécanisme peut être remplacé par l'ajout de billes hydrophobes [272]. Pour des raisons évidentes, ce modèle n'est pas très pertinent d'un point de vue physiologique. Plusieurs équipes, utilisant des techniques très différentes (SM [275], RMN solide [276][277], cryo-microscopie électronique [276], EPR [278] ...) ont néanmoins déterminé la structure et les

différents polymorphismes fibrillaires formés par ce modèle. Les figures 28 et 29 résument les différentes structures et polymorphismes. Les différentes publications s'accordent : seuls les acides aminés compris entre 30-110 constituent le cœur de la fibre, et les domaines N-terminal (1-30) et C-terminal (110-140) restent flexibles.

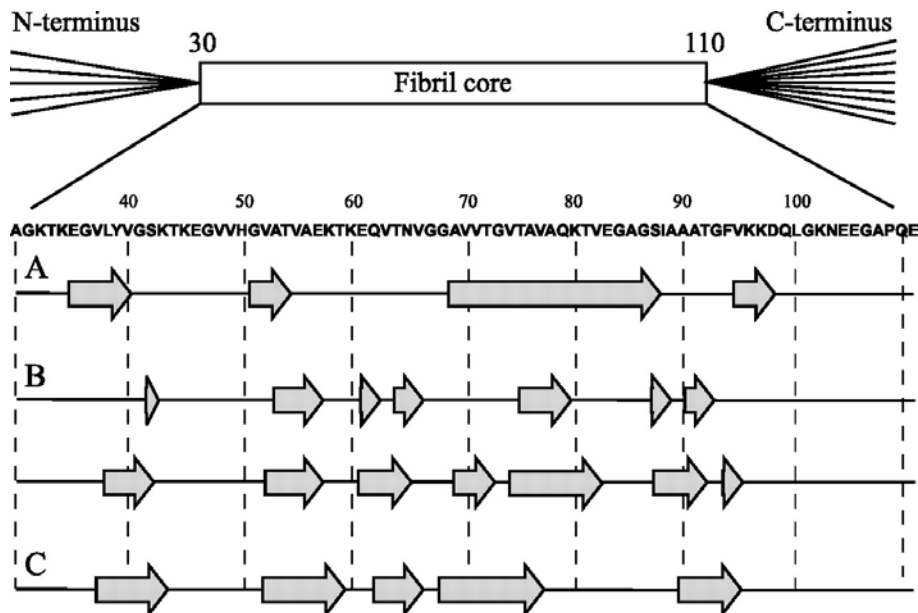


Figure 28 : Structure de la fibre d'AS formée en secouant, avec localisation de brins beta. A) structure obtenue par RPE [278] B) et C) sont différents polymorphismes obtenus par deux études menées par RMN du solide [277] [276]. Figure extraite de Bisaglia *et al.* [251].

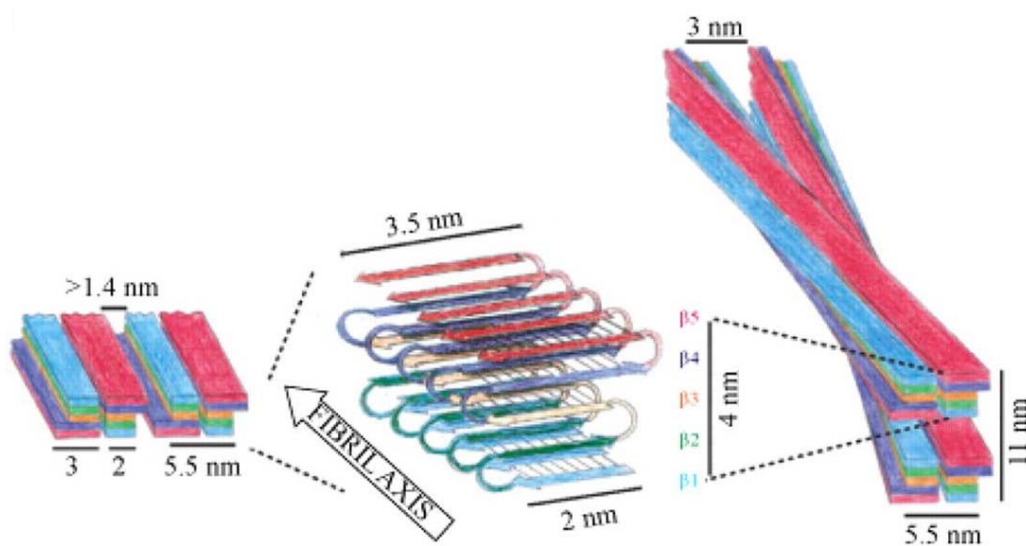


Figure 29 : Schéma représentant une proposition de structure fibrillaire d'AS. Au centre, la structuration du protofilament ; à gauche, l'agencement des

protofilaments dans une fibre droite. Et à droite, l'agencement dans une fibre torsadée. Figure extraite de Vilar *et al.* [276].

Gurry *et al.* montrent par simulation qu'en solution, AS peut avoir un faible pourcentage d'oligomères [279]. Quelques uns inhiberaient l'agrégation et d'autres, au contraire, serviraient de noyau pour initier la nucléation. Ces résultats iraient dans le même sens que les résultats d' Ariesandi *et al.* [280], qui démontrent que, si on chauffe à plus de 80°C, on dénature le faible pourcentage d'oligomères d'AS et on inhibe l'agrégation tandis que l'on n'observe aucune différence par spectroscopies CD et RMN avant et après chauffage [280]. La dynamique entre toutes les conformations monomériques et oligomériques joue un rôle capital dans l'agrégation *in vitro*.

Le domaine acide C-terminal est extrêmement important dans les interactions protéine-protéine, les interactions avec des ions et dans la régulation de l'agrégation [281][282]. Chez les patients atteints de Parkinson, on observe des formes tronquées d'AS dans les LBs. Ces formes tronquées peuvent représenter un pourcentage non négligeable des protéines constituant les LBs [283]. *In vivo* (dans un modèle de rat), des expériences de co-expression de la forme tronquée avec la forme sauvage donnent lieu à une forte accumulation de fibres et à une perte des cellules du système dopaminergique [282]. Hoyer et ses collaborateurs démontrent que les formes tronquées (1-108 et 1-124) agrègent plus vite *in vitro* et, surtout, avec un temps de latence beaucoup plus court que la forme entière [281]. Ceci démontre l'importance du domaine C-terminal dans la prévention de la nucléation [32].

4.4) Interaction d'Alpha Synuclein avec les FKBP

4.4.1) Introduction

Les FKBP sont des immunophilines qui se lient à des médicaments immunosuppresseurs tels que FK506 et ont une activité enzymatique peptidyl-prolyl *Cis-Trans* isomérase (PPIase) [284] [285]. Elles sont capables d'accélérer l'interconversion des isomères *Cis-Trans* de liaisons peptidiques X-Pro. Les FKBP sont également connues dans leur rôle de chaperonne où elles aident au repliement des protéines qui présentent des prolines en conformation *Cis* [286] ou des structure comportant un nombre élevé de prolines en conformation *Trans* comme le collagène [287]. Plusieurs autres fonctions ont également été attribuées à la famille FKBP, comme la régulation des niveaux de Ca^{2+} dans les muscles [288] [289].

Les protéines de la famille des FKBP (notamment: FKBP12, FKBP52, FKBP65 et FKBP38) ont des niveaux d'expression très élevés dans les neurones humains et plus spécifiquement dans les neurones de la *Substantia Nigra* [290] [291] [292]. Différentes études leur attribuent des propriétés neuroprotectrices et neurorégénératrices [293]. Mais plusieurs autres études lient leurs activités à des phénomènes de neurodégénérescence [294] [295] [296].

Avramut et Achim ont démontré que FKBP12 co-localise avec AS dans les Lewy Bodies et Lewy neurites [294].

En 2006 Gerard *et al.* [297] découvrent (*in vitro*) que dans un test classique d'agrégation, l'agrégation d'AS est fortement accélérée par l'addition de protéines de la famille des FKBP (modèle en secouant). Cet effet est neutralisé par l'addition de FK506 (un inhibiteur qui se lie au site actif prolyl *Cis-Trans* isomérase des FKBP [298]) ou par mutation des prolines de l'extrémité C-terminale en alanines. Ceci laisse penser que l'activité Prolyl *Cis-Trans* isomérase des FKBP serait fortement impliquée dans l'accélération de l'agrégation de l'AS.

Deleersnijder *et al.* démontrent *in vitro* que les FKBP peuvent induire l'agrégation d'AS sans besoin de secouer [299]. Ils comparent également différentes PPIases (FKBP12, FKBP38, FKBP52, FKBP65, PIN1 et la Cyclophiline A) présentes dans les neurones et déterminent que seules les FKBP sont capables d'induire l'agrégation *in vitro* et *in vivo* [299]. Parmi toutes les PPlases testées *in vitro*, FKBP12 est la plus performante [299] et cette différence d'activité est surtout liée à une diminution conséquente du temps de latence et non de la constante de vitesse. Ce qui indiquerait que FKBP agirait pendant l'étape de nucléation (figure 30).

En 2010, dans un modèle cellulaire Parkinsonien, Gerard *et al.* démontrent que FK506, un inhibiteur spécifique de la famille des FKBP, réduit l'agrégation d'AS ainsi que la mort cellulaire [300]. Dans ce même modèle, ils démontrent que la surexpression de FKBP12 et FKBP52 augmente la présence d'agrégats et provoque la mort cellulaire, tandis qu'une suppression de leur expression diminue la présence d'agrégats et la mort cellulaire. Des essais sur des souris surexprimant AS ont démontré que l'administration orale de FK506 diminue la quantité d'agrégats ainsi que la dégénérescence neuronale [300].

Les données *in vitro* et les données *in vivo* fournissent des preuves solides pour penser que FKBP12 serait un modulateur important de l'agrégation d'AS, ce qui ferait d'elle une importante cible thérapeutique pour la maladie de Parkinson [299] [300] [301].

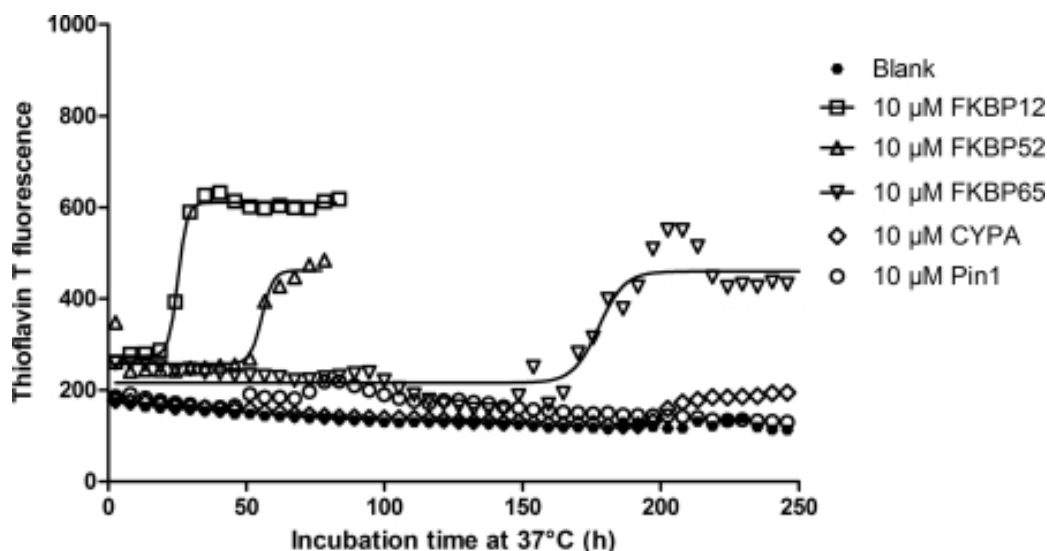


Figure 30 : Cinétique d'agrégation d'AS (140 μ M) induite par différents PPIases (GST-FKBP12, GST-FKBP52, His-FKBP65, CYPA et PIN1) sans secouer à 37°C, suivie par fluorescence du THT. Figure extraite de Deleersnijder *et al.* [299].

La totalité des travaux qui relatent l'étude de l'agrégation *in vitro* d'AS induite par FKBP12 a été réalisée à partir de protéine FKBP12 étiquetée GST. L'hypothèse soutenue est que la stimulation de l'agrégation est liée à l'activité prolyl *Cis-Trans* isomérase, et par conséquent, l'étiquette GST n'influence pas l'agrégation. Comme nous verrons par la suite, nous avons retrouvé des différences importantes dans l'agrégation d'AS induite par FKBP12 selon que la protéine est étiquetée GST ou non. Par conséquent, nous avons décidé de faire une caractérisation de l'interaction d'AS avec GST-FKBP12 et FKBP12 non étiquetée.

4.4.2) Interaction entre AS et FKBP12 *in vitro*

La première étape pour étudier l'interaction d'AS avec FKBP12 a consisté en l'attribution des résonances du spectre ^1H - ^{15}N HSQC d'AS dans nos conditions expérimentales. Cela a été réalisé par une combinaison de spectres tridimensionnels NOTO et TONO [123] (voir chapitre 1). AS présente également des pics minoritaires correspondant à des résidus voisins de proline qui ressentent l'état d'isomérisation de la proline. Nous avons attribué ces résonances à l'aide d'un spectre HNCaCb.

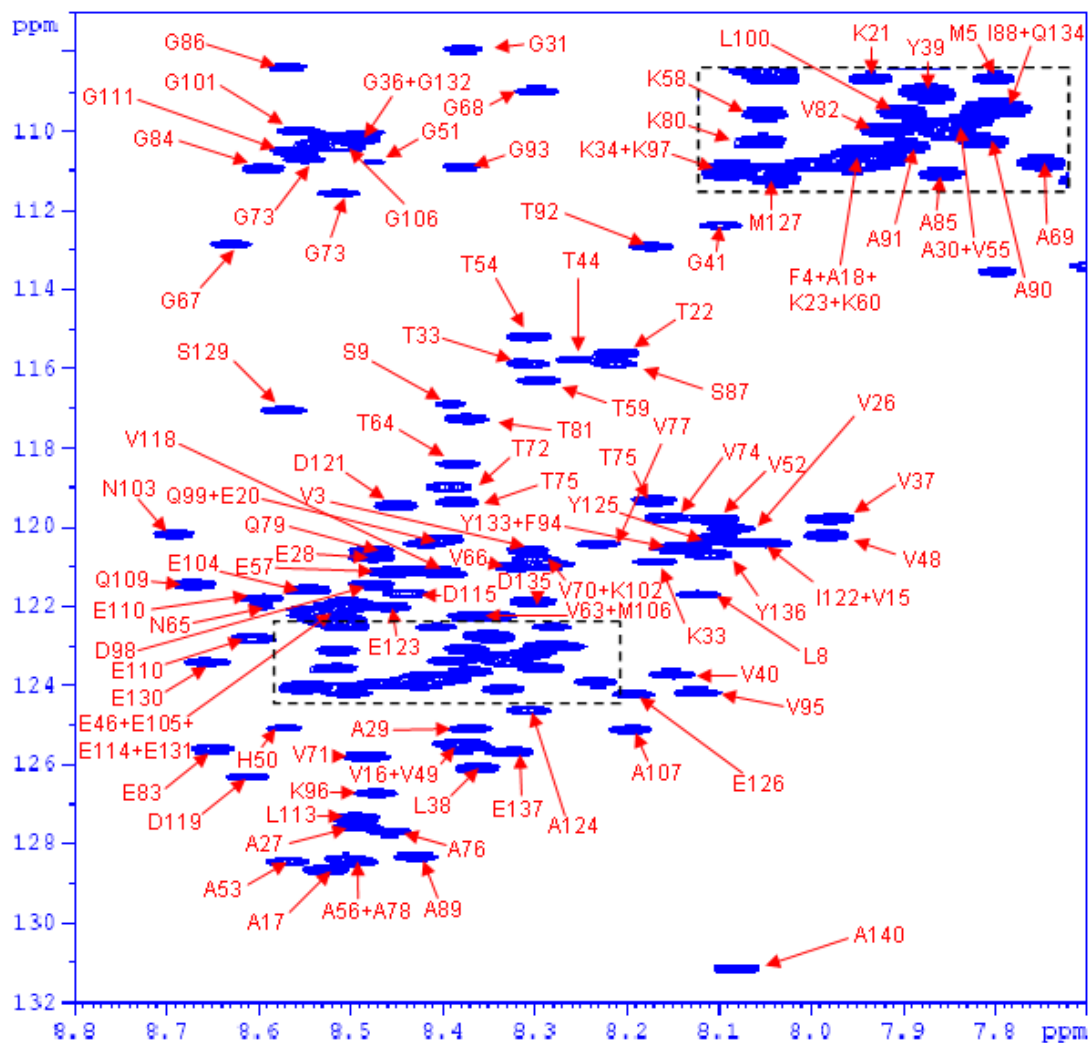
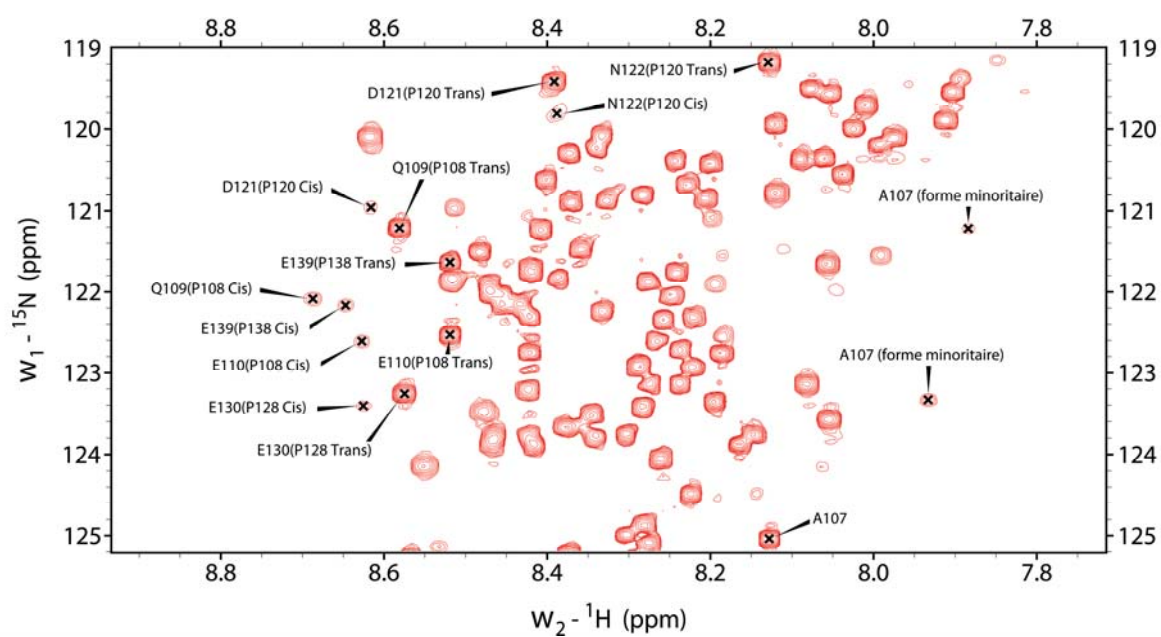


Figure 31 : Spectre ^1H - ^{15}N HSQC d'AS attribué à 25°C.



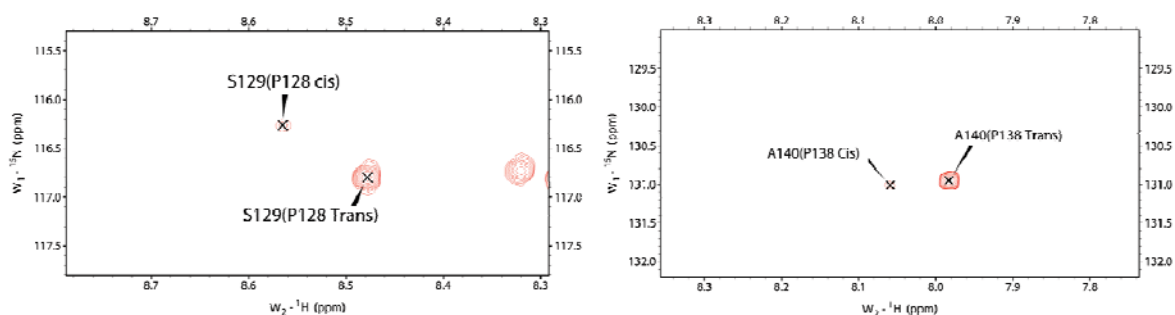


Figure 32 : Attribution des formes minoritaires d'AS (spectre ^1H - ^{15}N HSQC) à 25°C .

4.4.2.1) Activité proline *Cis-Trans* isomérase

L'état d'isomérisation de la proline va induire un changement de l'environnement chimique des résidus voisins. Ceci se traduit par une différence de déplacement chimique entre le résidu lié à une proline en conformation *Cis* et le même résidu lié à une proline en conformation *Trans*. Les figures 32 et 33 montrent les deux résonances de la Sérine 129 d'AS, selon que la proline 128 est en conformation *Cis* ou *Trans*. En présence de FKBP12, nous observons dans le spectre ^1H - ^{15}N ZZ-exchange deux pics d'échange connectant les deux résonances de S129, ce qui prouve que FKBP12 catalyse un changement conformationnel de la proline 128 durant le temps de mélange de l'expérience ^1H - ^{15}N ZZ-exchange (200 ms) [302] [303]. S129 est le seul résidu présentant ces pics d'échange. Ces résultats sont les mêmes que la protéine FKBP12 soit étiquetée GST ou non. Nous pouvons alors déduire que FKBP12 a une activité proline *Cis-Trans* isomérase spécifique pour la proline 128 d'AS.

En figure 34, nous montrons que seuls les pics des acides aminés ressentant la conformation *Cis* de la proline 128 s'éteignent avec une quantité croissante de FKBP12. En effet, l'interaction entre FKBP12 et AS résulte en une diminution des pics « diagonaux » et cela, d'abord, pour le pic correspondant à la proline en *cis* (contribution de l'échange à la relaxation). Ce résultat confirme la spécificité de FKBP12 pour la proline 128.

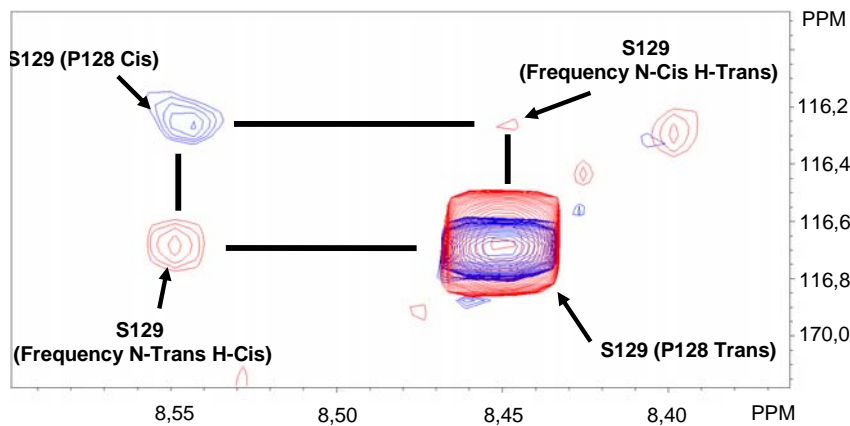
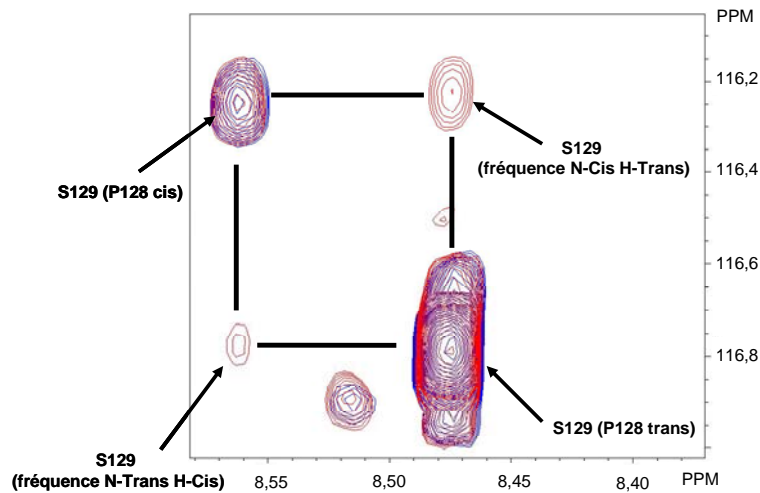


Figure 33 : cette figure montre les deux résonances de la Sérine 129 d'AS selon que la proline 128 est en conformation *Cis* ou en *Trans*. En bleu, le spectre ^1H - ^{15}N HSQC et en rouge le spectre de ^1H - ^{15}N ZZ-exchange (temps de mélange 200ms). En haut ^{15}N -AS 350 μM + 35 μM FKBP12 et en bas ^{15}N -AS 150 μM + 150 μM GST-FKBP12.

L'absence de variation de l'intensité des pics minoritaires (sauf de S129 et E130), même après ajout d'un excès de FKBP12, montre que FKBP12 interagit spécifiquement et seulement avec la proline 128.

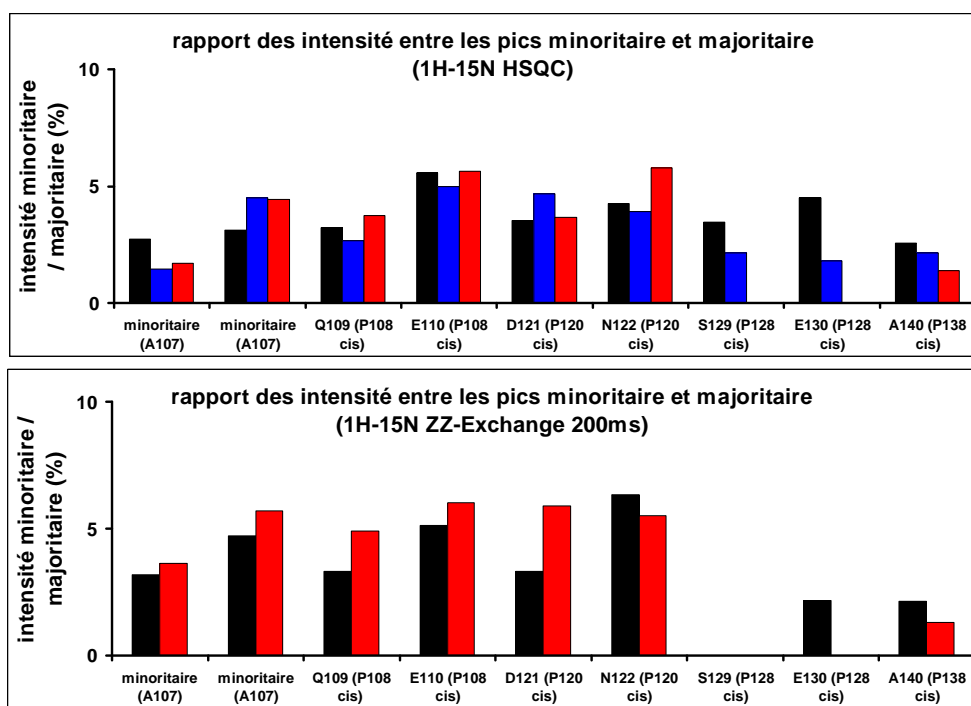


Figure 34 : Pourcentage d'intensité des pics minoritaires par rapport aux pics majoritaires d'AS pour différents ratios AS/FKBP12. En haut, les rapports d'intensité mesurés sur des spectres $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC (en noir $150\ \mu\text{M}$ ^{15}N -AS, en bleu $150\ \mu\text{M}$ ^{15}N -AS + $150\ \mu\text{M}$ FKBP12 et en rouge $50\ \mu\text{M}$ ^{15}N -AS + $350\ \mu\text{M}$ FKBP12) et, en bas, les rapports d'intensité mesurés sur les spectres $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ ZZ-exchange (en noir $150\ \mu\text{M}$ ^{15}N -AS + $150\ \mu\text{M}$ FKBP12 et en rouge $50\ \mu\text{M}$ ^{15}N -AS + $350\ \mu\text{M}$ FKBP12). Spectres enregistrés à 25°C .

4.4.2.2) Cartographie de l'interaction

FKBP12 est une protéine structurée constituée de cinq brins beta et d'une petite hélice alpha [298]. L'environnement chimique particulier du site actif, est à la base d'un déplacement chimique très éloigné de leur valeur « *random coil* » pour les acides aminés qui pointent vers l'intérieur du site actif. Notamment, les méthyles pointant vers l'intérieur de la cavité catalytique vont avoir des déplacements chimiques proches de 0 ppm [304]. Nous utilisons ces groupes méthyle comme sondes pour regarder l'interaction d'AS avec le site actif de FKBP12.

La protéine GST-FKBP12 présente un long *linker* entre la partie FKBP12 et la partie GST. Comme la GST est dimérique, ses résonances sont très larges et disparaissent du spectre. La présence d'un *linker* (site de coupure à la protéase Precision) fait que FKBP12 ait un temps de corrélation suffisamment court

pour pouvoir observer ces résonances (séquence du *linker* : GST-LEVLFQGPLGS-FKBP12)

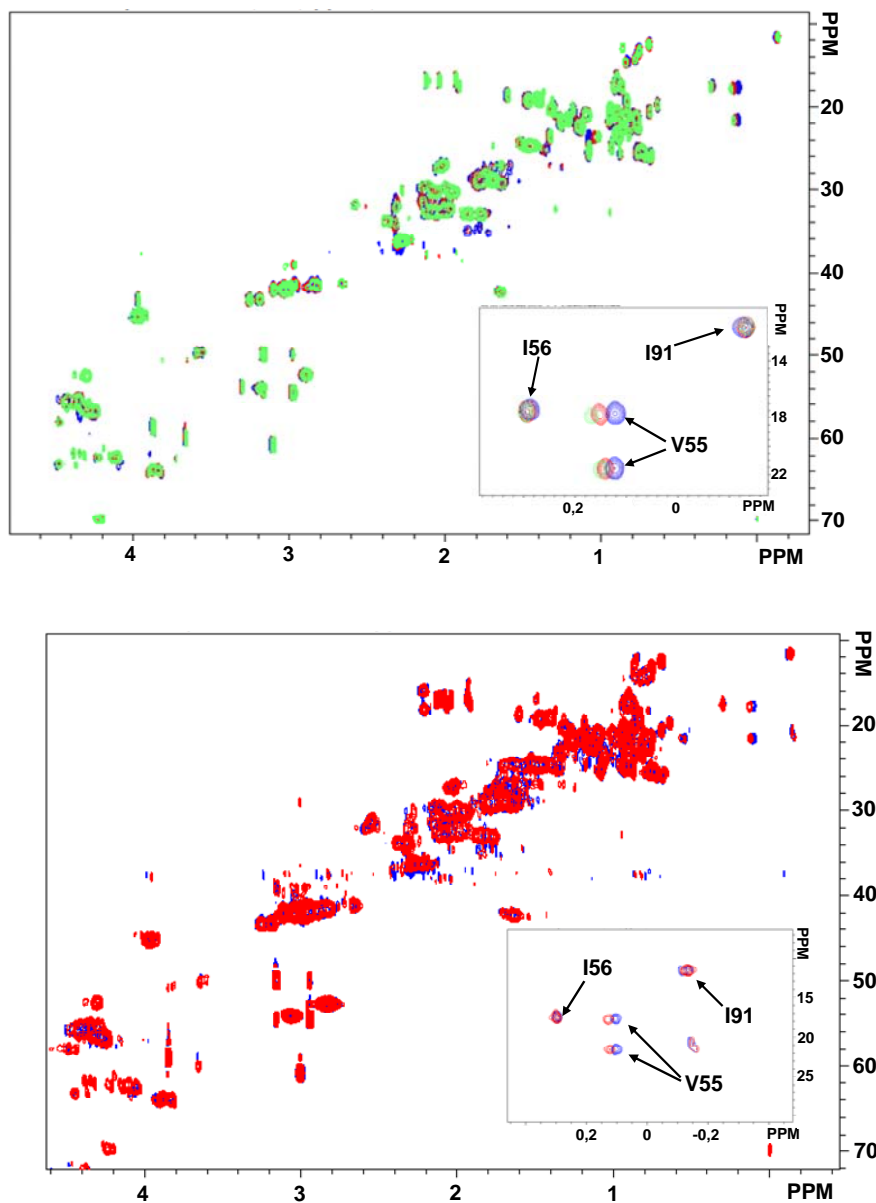


Figure 35 : En haut, superposition des spectres ^1H - ^{13}C HSQC : ^{13}C -FKBP12 (57.5 μM) en bleu, ^{13}C -FKBP12 (57.5 μM) + AS (350 μM) en rouge et ^{13}C -FKBP12 (57.5 μM) + AS (700 μM) en vert. En bas, superposition des spectres ^1H - ^{13}C HSQC : ^{13}C -GST-FKBP12 (72 μM) en bleu et ^{13}C -GST-FKBP12 (72 μM) + AS (350 μM). Les spectres ont été enregistrés à 37°C.

Dans la figure 35, on observe une interaction faible entre le site actif de FKBP12 (étiquette GST ou non) et AS. Nous estimons une constante de dissociation supérieure à 100 μM , ce qui caractérise une affinité attendue pour une enzyme envers son substrat. La faible affinité serait en adéquation avec un rôle catalytique de FKBP12 dans l'agrégation d'AS.

Du côté d'AS, nous pouvons faire une cartographie classique d'interaction en comparant les spectres ^1H - ^{15}N HSQC d'AS avec et sans FKBP12 (GST ou non GST) (figure 37). Dans les deux cas, nous observons de très faibles variations de déplacement chimique (les *shifts* les plus prononcés concernent les résidus F4, M5, V37, L38, Y39, V40 H50, figure 37). Néanmoins, si on compare les intensités des résidus, nous observons des pertes d'intensité plus importantes, en présence de GST-FKBP12 (figure 36).

Avec GST-FKBP12, nous observons trois zones de diminution de l'intensité :

- Entre les résidus 3 et 9.
- Entre les résidus 38 et 45 qui correspondent à la boucle entre les deux hélices amphipathiques que forme AS quand elle interagit avec la membrane.
- A l'extrémité C-terminale, entre les résidus 125 et 140, où se trouve la Proline 128.

Avec FKBP12 non GST, nous observons des diminutions d'intensité seulement dans deux zones :

- Entre les résidus 3 et 9.
- Entre les résidus 38 et 45

L'interaction entre FKBP12 et AS est de faible affinité, nous pensons que la perte d'intensité observée à l'extrémité C-terminale est due à l'interaction avec la proline 128. Cette perte d'intensité est visible seulement quand FKBP12 est étiquetée GST car son temps d'autocorrélation est plus long. Les pertes d'intensité ainsi que les variations de déplacement chimique dans le N-terminus et le domaine 38-45 sont vraisemblablement la conséquence de changements dans le nuage conformationnel d'AS induit par l'interaction de FKBP12 avec la proline 128. L'autre hypothèse serait que FKBP12 interagirait dans trois zones différentes (résidus 3 et 9, 38 et 45 et sur la proline 128). Comme GST-FKBP12 est dimérique, la perte d'intensité plus importante serait liée à un phénomène d'avidité, avec une molécule d'AS liée aux deux copies de FKBP12 dans le dimère GST-FKBP12.

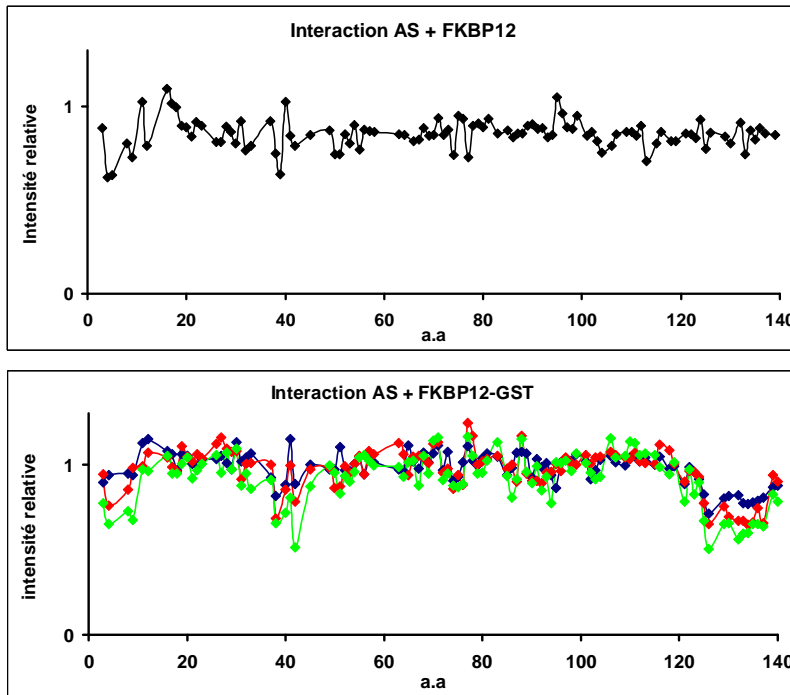


Figure 36 : En haut, le rapport d'intensité par acide aminé entre ^{15}N -AS (50 μM) et ^{15}N -AS (50 μM) + FKBP12 (300 μM). Spectres enregistrés à 25°C. En bas, le rapport d'intensité par acide aminé à différents ratios AS/GST-FKBP12 (en bleu, rouge et vert les rapport respectif pour 150 μM ^{15}N -AS + 150 μM GST-FKBP12, 50 μM ^{15}N -AS + 350 μM GST-FKBP12, 30 μM ^{15}N -AS + 350 μM GST-FKBP12. Spectres enregistrés à 25°C.

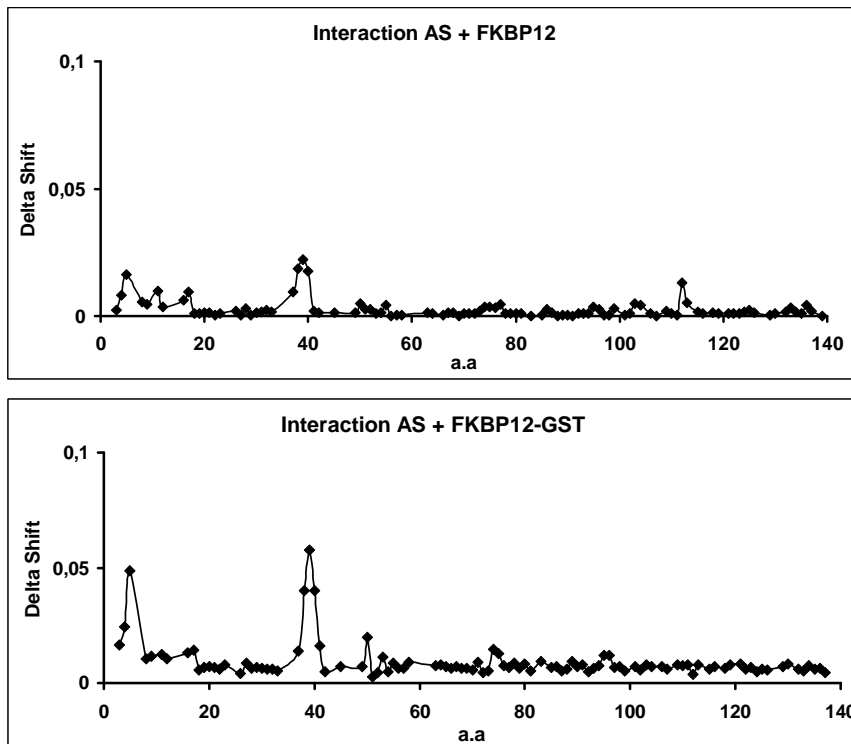


Figure 37 : Variation de déplacement chimique, en haut, entre ^{15}N -AS (25 μM) et ^{15}N -AS (25 μM) + FKBP12 (250 μM). En bas, entre ^{15}N -AS (50 μM) et ^{15}N -AS (50 μM) + GST-FKBP12 (350 μM). Spectres enregistrés à 25°C.
 $\text{Shift} = \sqrt{\Delta\delta(H)^2 + 0.2 * \Delta\delta(N)^2}$.

Pour vérifier si FKBP12 induit ou non des structures secondaires, nous avons comparé les déplacements chimiques (Ca et Cb) d'AS par rapport aux valeurs *random coil*, en présence ou absence de FKBP12 (figure 38 et 39). Aucune tendance à former des structures secondaires n'a été détectée. On peut donc conclure que FKBP12 n'induit aucun changement structural (structure secondaire) détectable par RMN.

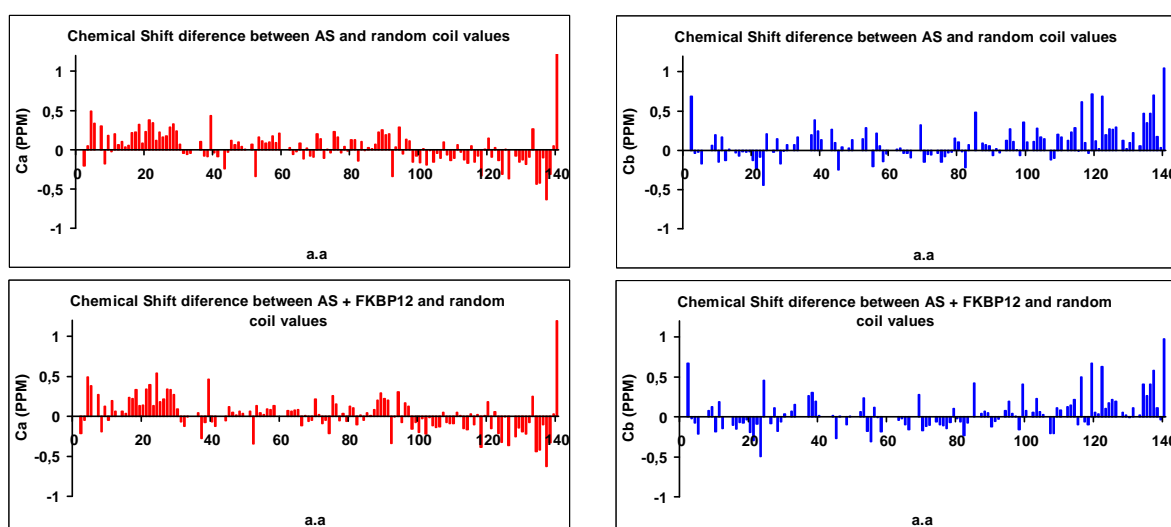


Figure 38 : Comparaison des déplacements chimiques (carbone alpha et beta) aux valeurs « *random coil* » en fonction de la séquence primaire d'AS. Comparaison en présence ou absence de FKBP12, en haut, 350 μM ^{15}N - ^{13}C -AS et en bas, 350 μM ^{15}N - ^{13}C -AS + 150 μM FKBP12. Les valeurs de déplacement chimique « *random coil* » ont été calculées à partir du serveur « Poulsen IDP/IUP *random coil chemical shifts* » (<http://spin.niddk.nih.gov/bax/>) [305] [306].

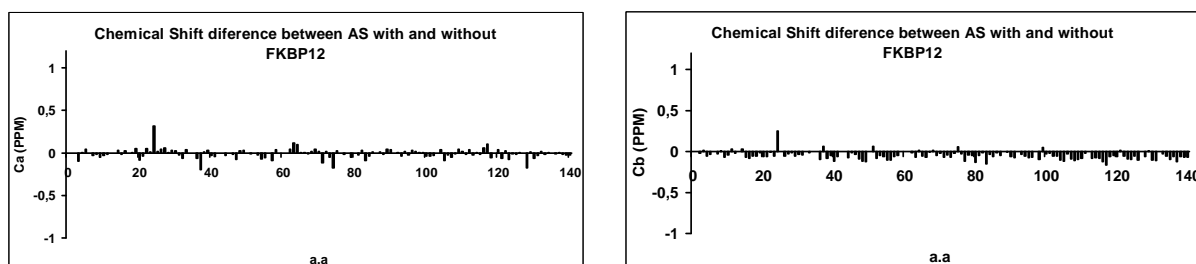


Figure 39 : Comparaison des déplacements chimiques (carbone alpha et beta) en présence ou absence de FKBP12 (350 μM ^{15}N - ^{13}C -AS avec 350 μM ^{15}N - ^{13}C -AS + 150 μM FKBP12).

4.4.2.3) Conclusion

Nous avons montré, *in vitro*, que FKBP12 (GST ou non) interagit avec AS. L'affinité de cette interaction est faible (centaines de micro-molaire) et elle est localisée sur le site actif de FKBP12. Nous avons également démontré pour la première fois que FKBP12 (GST ou non) a une activité prolyl-*Cis-Trans* isomérase spécifique pour la proline 128 d'AS. Du côté d'AS, l'interaction avec FKBP12 n'induit pas de stabilisation de structure secondaire (détectable par RMN). Néanmoins, sur AS, nous observons trois zones perturbées par l'interaction, entre les résidus 3 et 9, les résidus 38 et 45 (qui correspondent à la boucle entre les deux hélices amphipathiques qui forment AS quand il interagit avec la membrane) et à l'extrémité C-terminale entre les résidus 125 et 140 où se trouve la Proline 128. Pour l'instant, nous ne pouvons pas déterminer si FKBP12 interagit sur les trois zones d'AS ou si FKBP12 interagit seulement sur la proline 128, induisant ainsi des changements conformationnels dans le N-terminus et dans le domaine 38 à 45. Il faudrait, pour confirmer une de ces deux hypothèses, vérifier par RMN qu'il n'y a pas d'interaction entre le mutant P128A et/ou la forme tronquée AS (1-110).

Bien que l'on observe une isomérisation spécifique de la proline 128, ce phénomène ne peut pas être lié directement à l'induction de l'agrégation. FKBP12 peut tout à fait jouer un rôle très différent dans l'agrégation. Néanmoins, l'induction de l'agrégation par isomérisation de la proline ne peut pas être exclue à ce moment.

4.4.3) Etude de l'agrégation d'AS par différentes techniques biophysiques

Dans ce chapitre, nous allons décrire et comparer l'agrégation d'AS dans deux modèles d'agrégation : le modèle, induit par FKBP12 sans secouer et le modèle en secouant. Nous allons également essayer de comprendre si l'étiquette GST joue un rôle dans l'agrégation d'AS.

4.4.3.1) Modèle en secouant

Comme nous ne pouvons pas créer une agitation suffisante dans le spectromètre RMN pour agréger AS, nous ne pouvons pas suivre la cinétique d'agrégation en temps réel dans cet appareil. Par conséquent, nous avons incubé AS à 37°C (350 µM) dans un incubateur sous agitation (900 RPM dans un incubateur Thermomixer Comfort) et nous faisons des prélèvements. Chaque prélèvement a été dilué 10 fois et nous mesurons le *light scattering* à 600 nm et nous enregistrons un spectre ^1H - ^{15}N HSQC à 10°C.

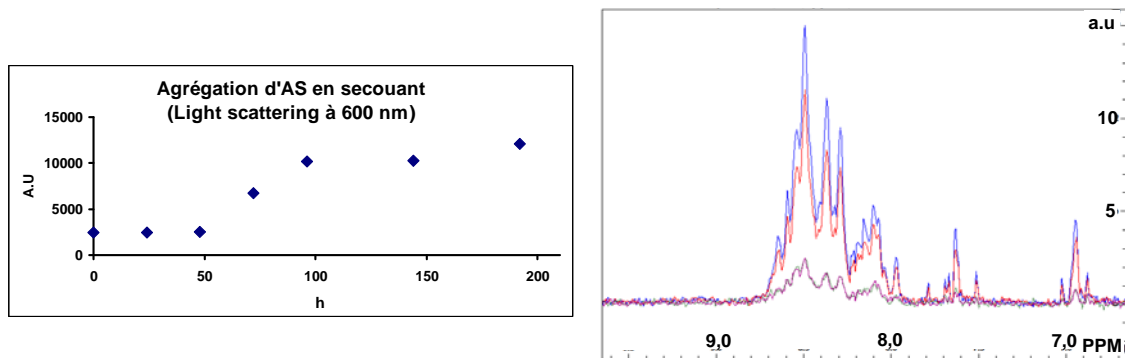
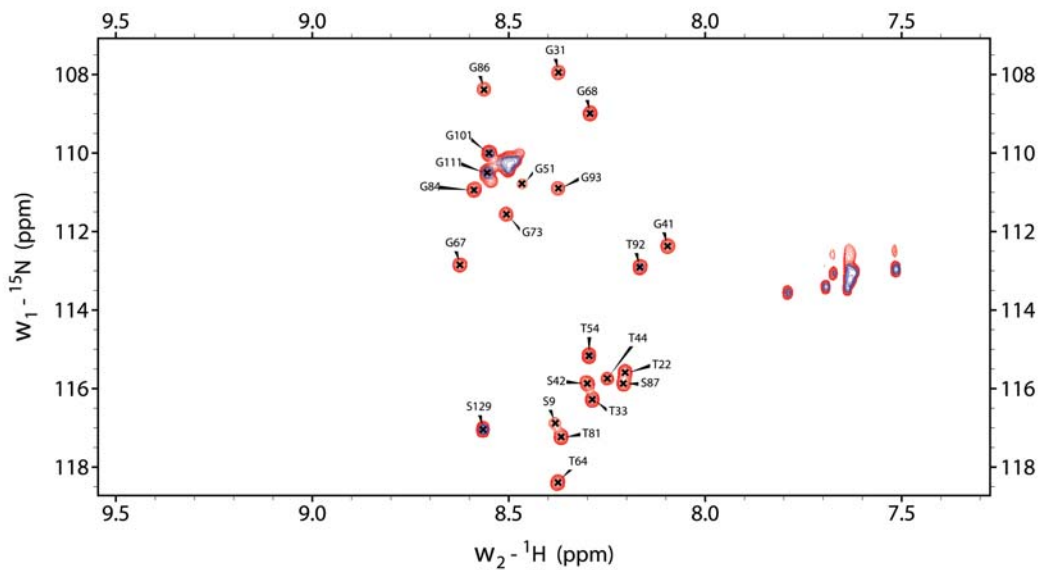


Figure 40 : Agrégation de ^{15}N -AS en secouant sans FKBP12. À gauche, le *light scattering* à 600 nm en fonction du temps et à droite, le premier incrément du spectre ^1H - ^{15}N HSQC (en bleu avant incubation, en rouge, violet et vert après 72, 144 et 196 heures respectivement).



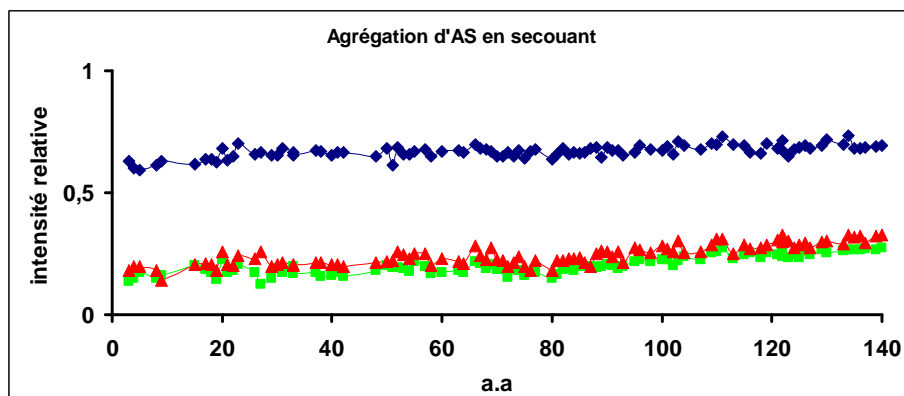


Figure 43 : Rapport d'intensité des résonances du spectre ^1H - ^{15}N HSQC après incubation à 37°C sous agitation (900 RPM, incubateur Thermomixer Comfort). Les intensités sont comparées par rapport à l'intensité du spectre avant incubation. Respectivement en bleu, rouge et vert les prélèvements effectués après 72, 144 et 196 heures d'incubation.

Afin de pousser la réaction d'agrégation jusqu'au bout, nous avons incubé un autre échantillon ($275\ \mu\text{M}$) pendant 7 jours à 37°C sous agitation. Après cette période, nous pouvons voir visiblement des flocons dans le tube. Nous avons vortexé pendant une longue période jusqu'à obtenir une solution plus ou moins homogène. Le spectre RMN à 10°C montre une diminution globale de toutes les résonances. Cette perte d'intensité est moins importante du côté C-terminal et N-terminal. Ceci est totalement en accord avec les données de structures de fibres décrites dans plusieurs publications qui montrent que le domaine N-terminal et C-terminal ne constituent pas le cœur de la fibre. La perte d'intensité dans le spectre HSQC peut alors être expliquée par une perte de la mobilité qui est de moins en moins accentuée quand on s'éloigne du cœur de la fibre.

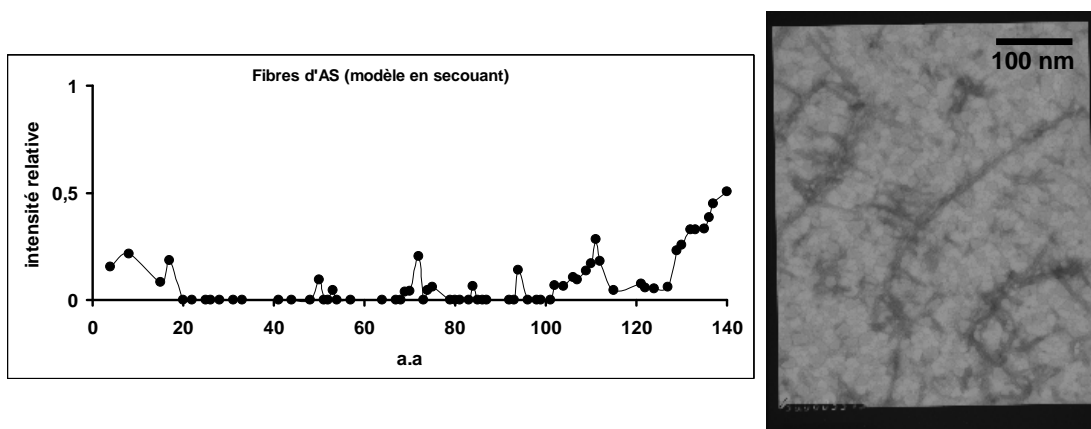


Figure 44 : A gauche, le rapport d'intensité entre le spectre de ^{15}N -AS ($275\ \mu\text{M}$) avant et après incubation, 7 jours à 37°C sous agitation (900 RPM, incubateur).

Thermomixer Comfort). Spectres enregistrés à 10°C. L'échantillon a été vortexé pendant une longue période pour essayer de casser les gros paquets de fibres et essayer d'avoir la totalité des fibres en solution. A droite, une image de microscopie électronique du même échantillon, où nous observons clairement des fibres amyloïdes.

4.4.3.2) Modèle d'agrégation induit par FKBP12 sans secouer

Nos essais ont démontré que le modèle d'agrégation d'AS incubée avec GST-FKBP12 sans secouer présente d'énormes variabilités cinétiques (cinétique mesurée par fluorescence du THT). Nous avons une variabilité du temps de latence de 5 jours à 15 jours. Nous avons remarqué également que si on enlève l'étiquette GST, FKBP12 perd sa capacité à agréger AS sans secouer (il n'y a plus de réponse positive au THT ni d'augmentation de la turbidité). Ce résultat étrange nous a poussé à caractériser plus loin l'agrégation d'AS avec GST-FKBP12 et sans GST (figures 45 et 46).

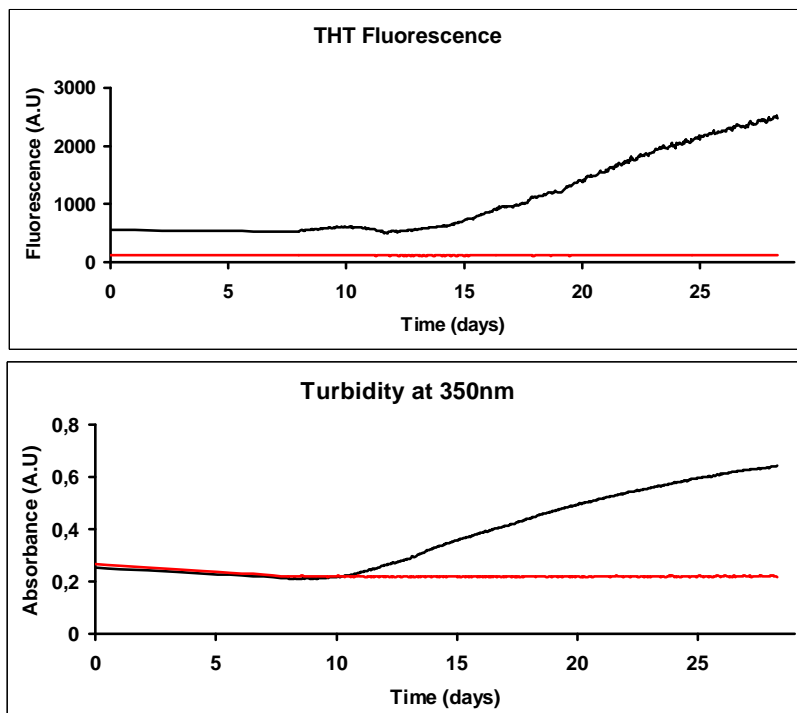


Figure 45 : Agrégation d'AS induite par FKBP12 sans secouer. En haut, fluorescence du THT en fonction du temps (50 μM de THT, excitation à 446 nm émission à 482 nm). En bas, turbidité (à 350 nm) en fonction du temps. En noir, l'échantillon 140 μM AS + 25 μM GST-FKBP12 et en rouge l'échantillon 140 μM AS + 25 μM FKBP12.

Le premier résultat important est que l'incubation d'AS avec FKBP12 sans étiquette GST n'induit pas de réponse THT ni une augmentation de la turbidité ni de changement dans le spectre ^1H - ^{15}N HSQC sur une échelle de temps d'un mois. Ce résultat pose la question de savoir si FKBP12 sans l'étiquette GST est capable d'agrégier AS dans ces conditions expérimentales.

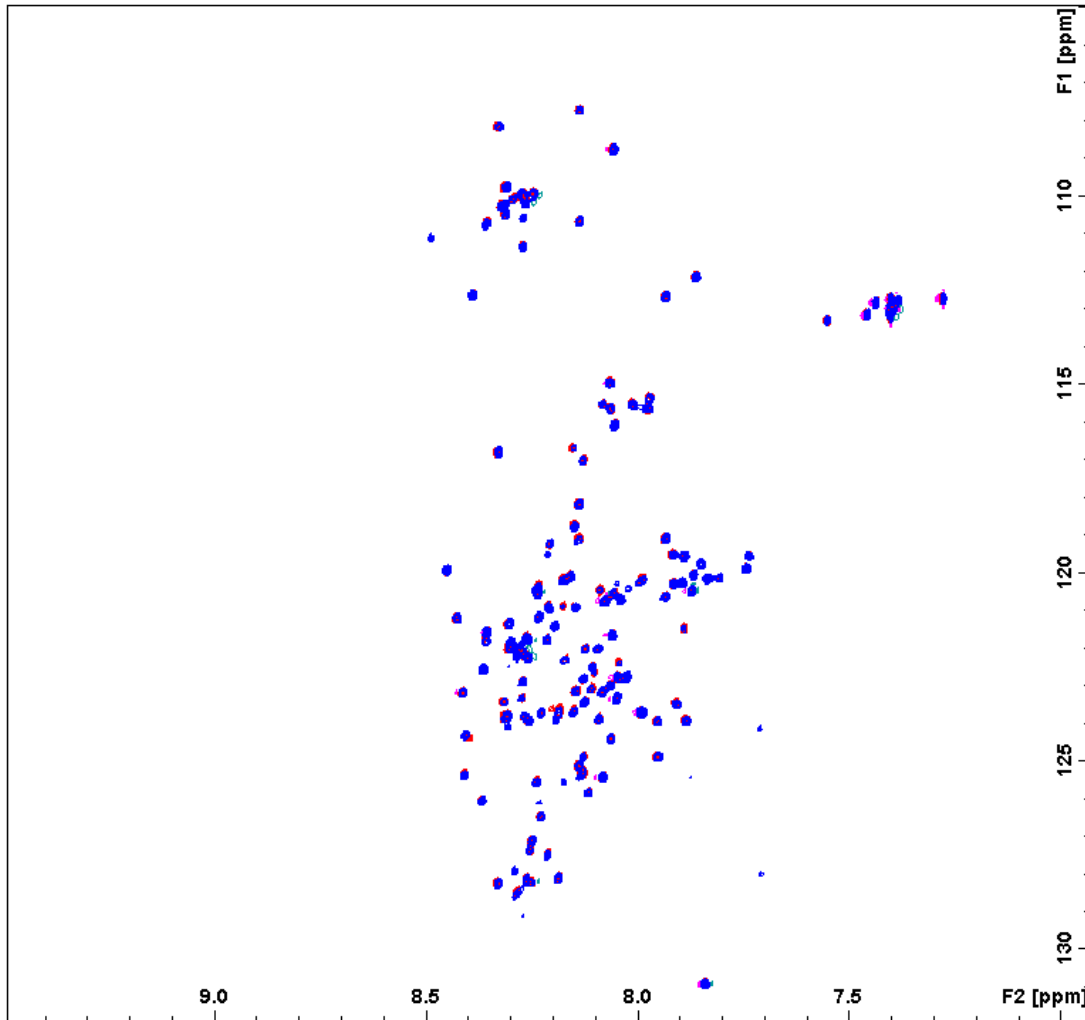
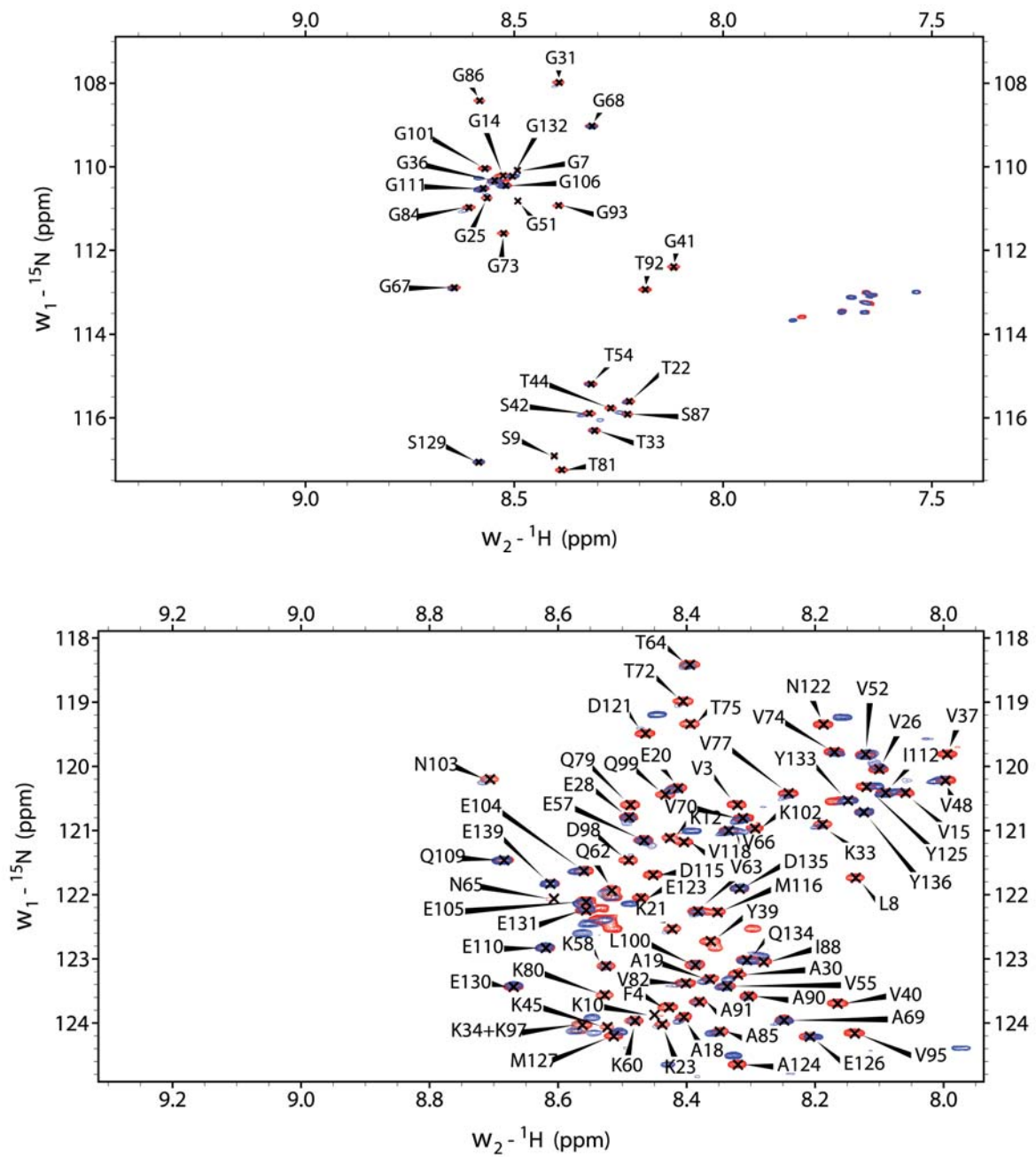


Figure 46 : Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -AS (350 μM) + FKBP12 (91.6 μM) avant et après incubation (8 jours à 37°C). Les spectres ont été enregistrés à 10°C. En rouge, le spectre avant agrégation et, en bleu, le spectre après 8 jours à 37°C sans agitation.

Par contre, si on incube AS avec GST-FKBP12 nous observons une augmentation de la turbidité ainsi que de la fluorescence du THT. Si nous comparons le spectre ^1H - ^{15}N HSQC d'AS avant et après agrégation induit par GST-FKBP12, nous observons également une forte diminution de l'intensité de certains résidus de la protéine : dans le N-terminus (résidus 3-9), dans le

domaine G36 à G41 et entre V71 et K102. Le domaine C-terminal reste flexible (Les figures 47 et 48).



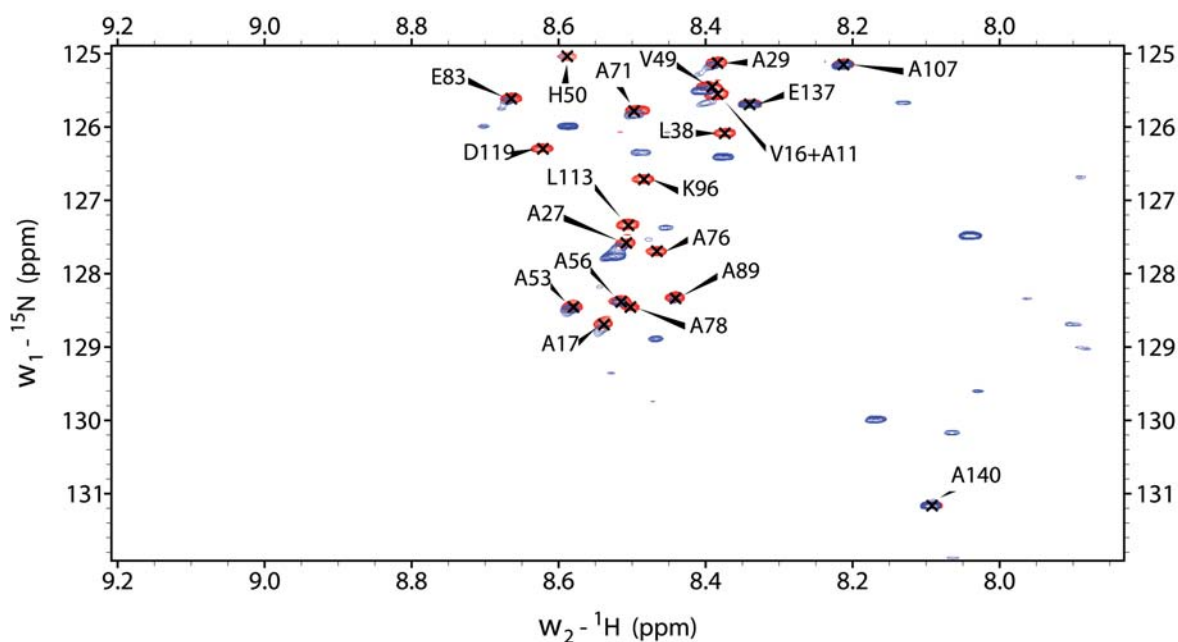


Figure 47 : Superposition des spectres ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -AS (350 μM) + GST-FKBP12 (64 μM) avant et après agrégation. Les spectres ont été enregistrés à 10°C. En rouge, le spectre avant agrégation et, en bleu, le spectre après 8 jours à 37°C sans agitation.

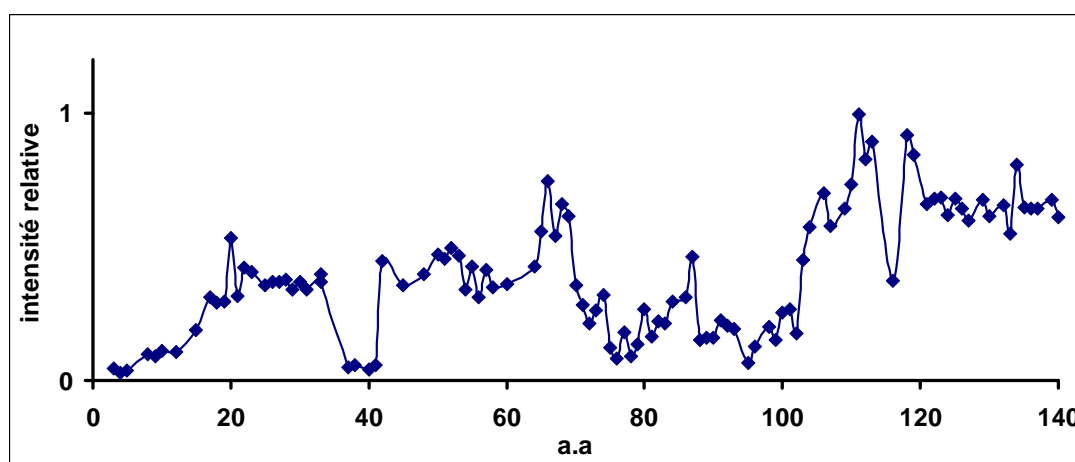


Figure 48 : Rapport des intensités de ^{15}N -AS (350 μM) + GST-FKBP12 (64 μM) avant et après agrégation (8 jours à 37°C). Les intensités ont été mesurées sur les spectres HSQC à 10°C.

L'incubation d'AS avec GST-FKBP12 sans secouer induit donc des changements importants dans le spectre ^1H - ^{15}N HSQC, mais le profil d'intensité n'est pas celui que l'on retrouve dans un modèle obtenu en secouant (figure 48). Ce profil d'intensité semble plus en adéquation avec la formation d'oligomères.

Quand on contrôle par microscopie électronique les agrégats formés par le modèle d'agrégation induit par GST-FKBP12 sans secouer, nous n'observons pas de fibres amyloïdes mais seulement des agrégats (figure 49). Ceci nous laisse penser que nous n'atteignons pas le stade de fibres amyloïdes mais que nous sommes plutôt dans un stade oligomérique.

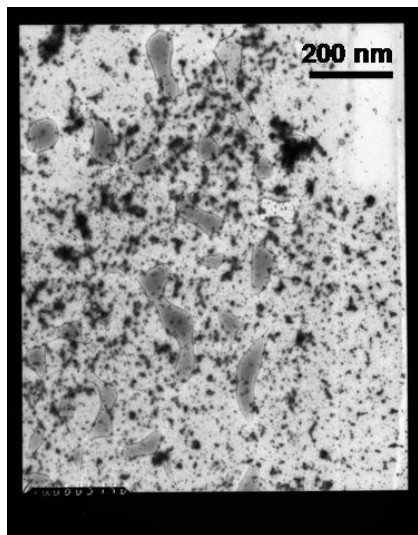


Figure 49 : Image de microscopie électronique des agrégats formés par incubation d'AS avec GST-FKBP12 sans secouer après 8 jours à 37°C. L'image correspond à l'échantillon utilisé dans les figures 47 et 48.

Avec GST-FKBP12 (sans secouer), AS évolue donc vers un état oligomérique et/ou d'agrégats (amorphes ou pas); cet état présente une surface hydrophobe capable d'interagir avec le THT, ce qui se traduit par une augmentation de sa fluorescence. Le C-terminus d'AS reste accessible dans cet état, mais pas le N-terminus, contrairement à ce que l'on retrouve dans les fibres matures (figure 44 et 48).

4.4.3.3) Cinétique d'agrégation par RMN :

Nous avons voulu étudier l'agrégation d'AS en temps réel par RMN. Un des avantages de la spectroscopie RMN est qu'on peut extraire des informations à la résolution du résidu individuel. Par conséquent, si on arrive à suivre l'agrégation en temps réel, nous pourrions avoir une idée des cinétiques, résidu par résidu. Cela pourrait nous renseigner sur d'éventuels états intermédiaires ainsi que sur le caractère concomitant ou séquentiel des interactions. Un des problèmes principaux dans le suivi de l'agrégation en temps réel est que la réaction se fait à 37°C et pH 7.4; par conséquent, il est impossible d'utiliser les

séquences ^1H - ^{15}N HSQC classiques, car l'échange avec les protons de l'eau est trop rapide. Il faut donc utiliser des spectres bidimensionnels non conventionnels comme les corrélations ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N [307] [308] ou l'expérience de détection directe carbone ^{13}C - ^{15}N CoN [130] qui ne souffrent pas de l'échange avec l'eau. Nous avons alors développé une méthodologie en quatre étapes pour attribuer facilement le spectre ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N à 37°C, dans un solvant deutéré. La méthodologie est décrite dans l'annexe 4.

Bien entendu, nous ne pouvons pas suivre l'agrégation d'AS en secouant car on ne peut pas produire une telle agitation dans le tube RMN. Nous avons donc décidé de mettre en place la méthodologie dans un modèle AS/GST-FKBP12 (qui donne une réponse positive en THT). Nous étudions la cinétique d'agrégation d' ^{15}N - ^{13}C -AS induite par ^{13}C -GST-FKBP12 par une série de spectres ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N à 37°C intercalés avec un spectre ^1H - ^{13}C HSQC pour observer également la GST-FKBP12 qui est marquée ^{13}C .

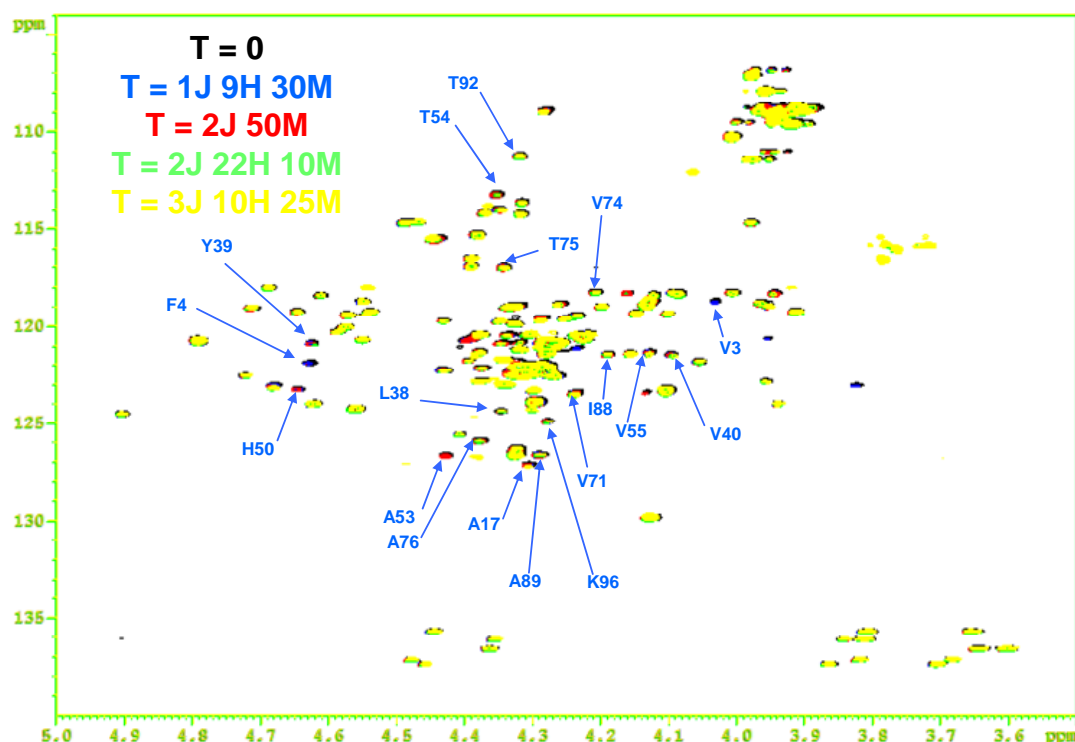
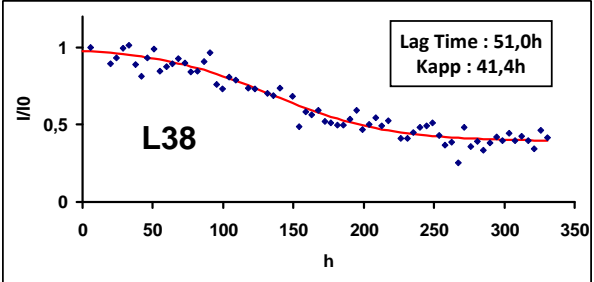
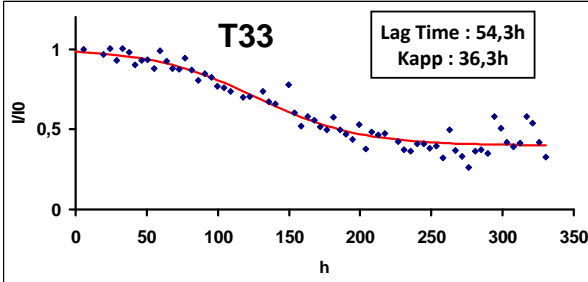
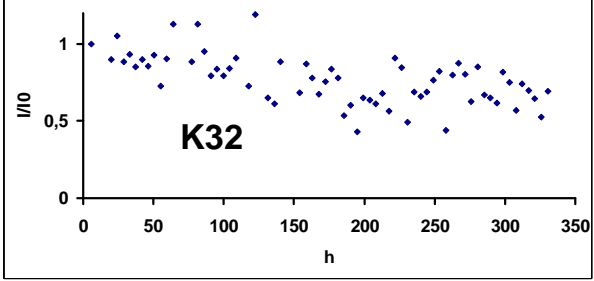
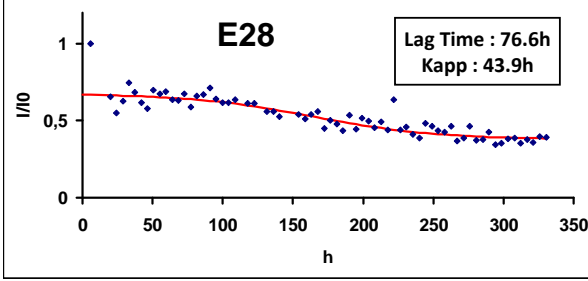
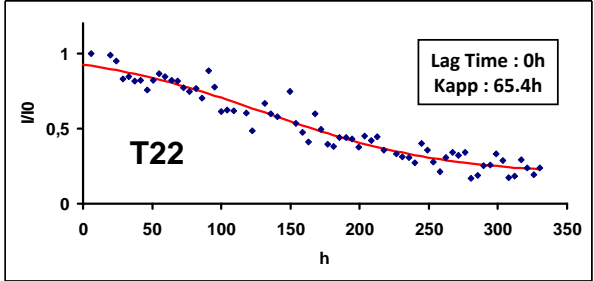
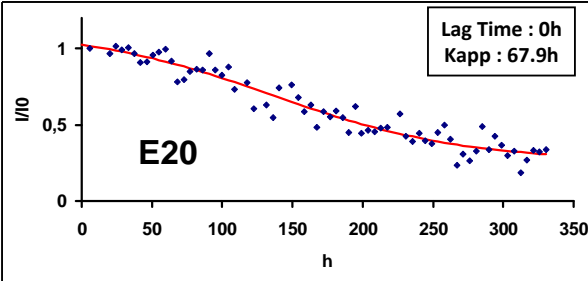
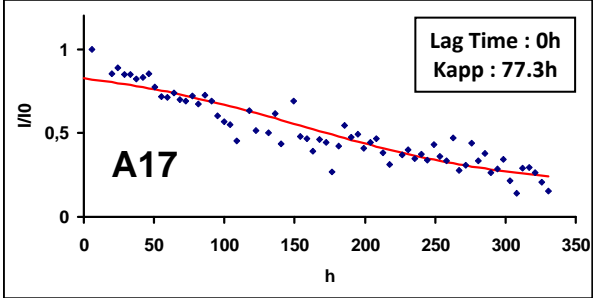
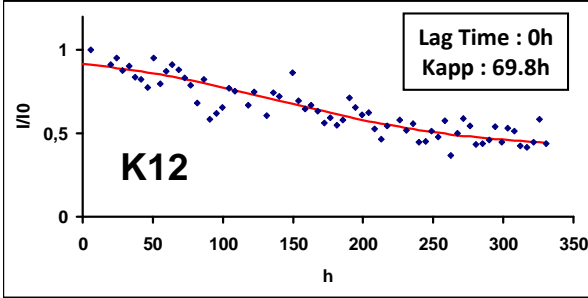
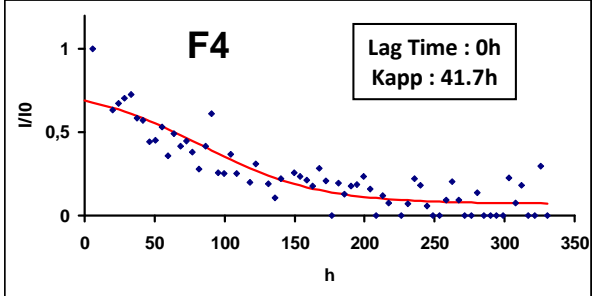
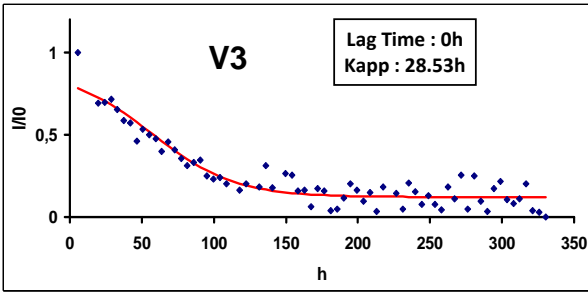
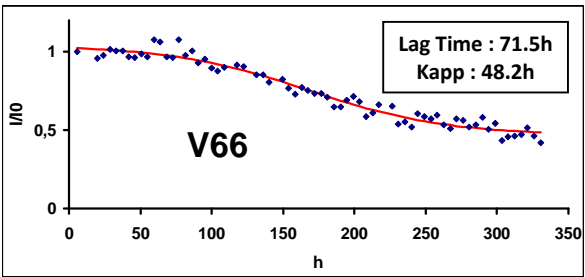
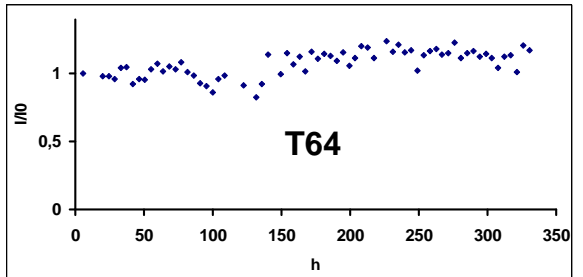
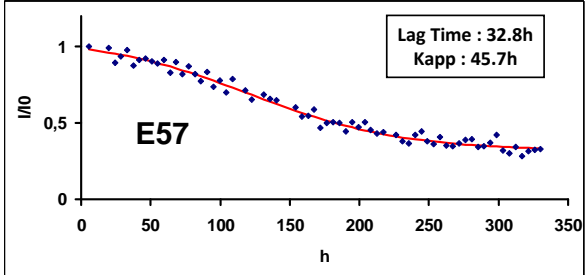
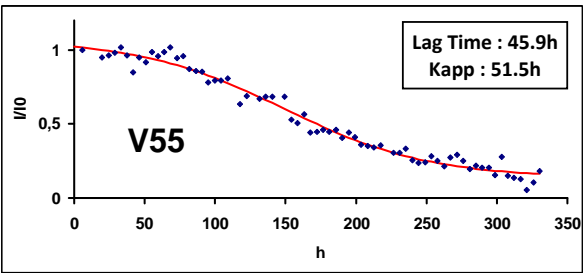
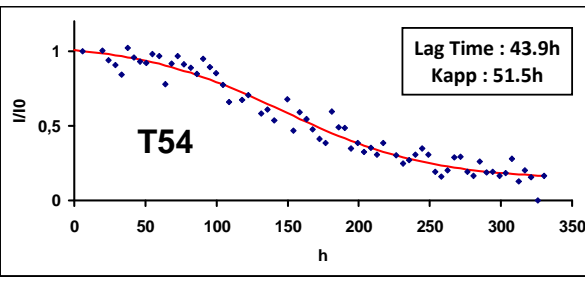
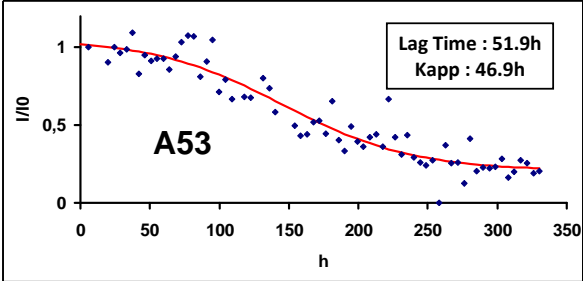
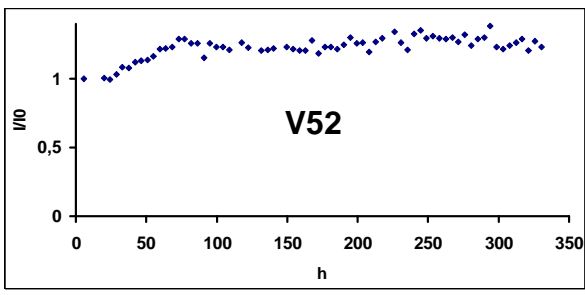
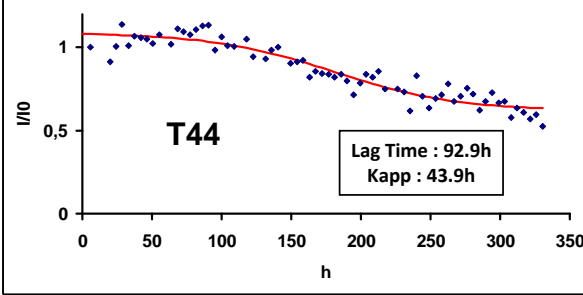
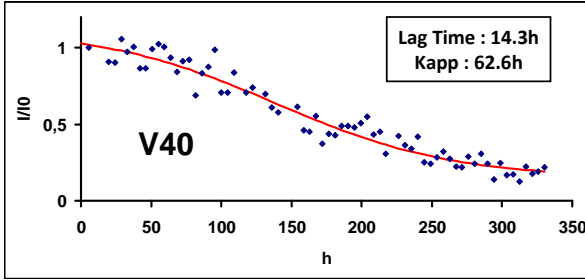
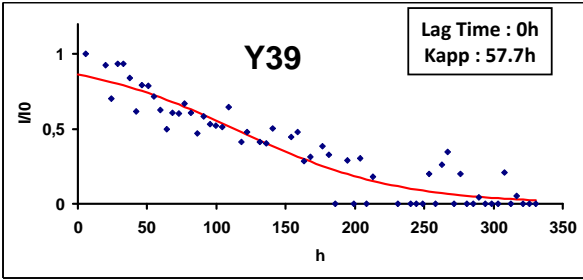
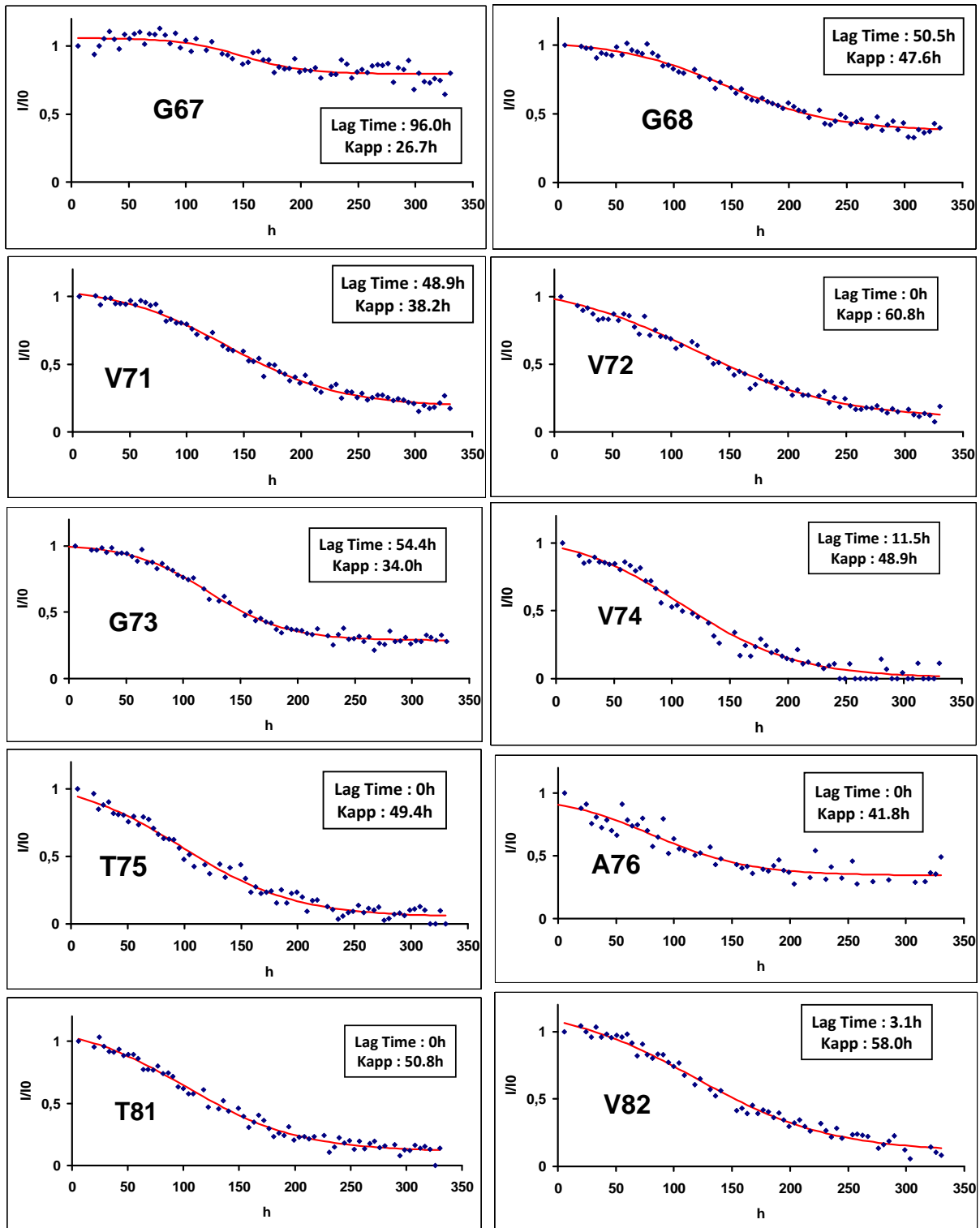
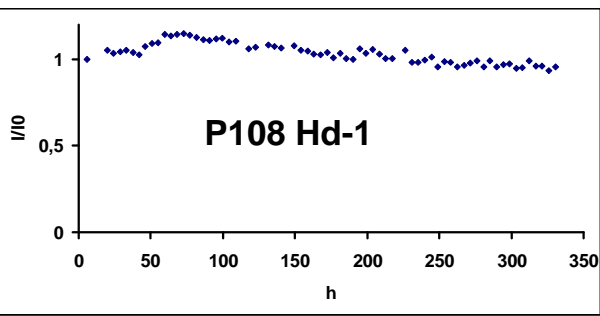
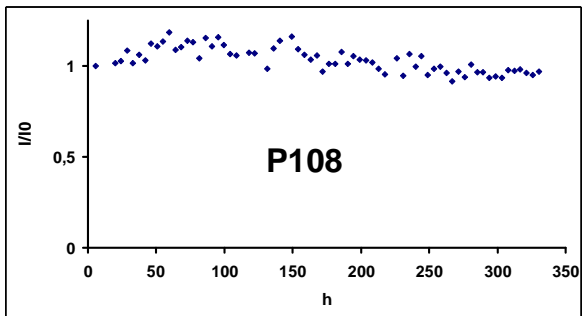
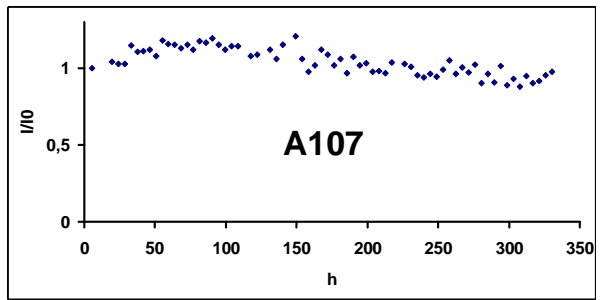
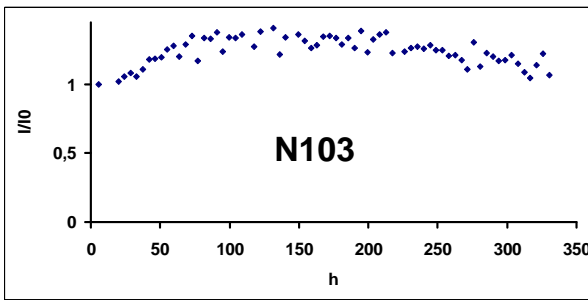
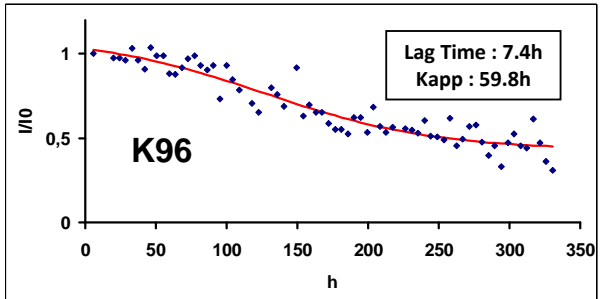
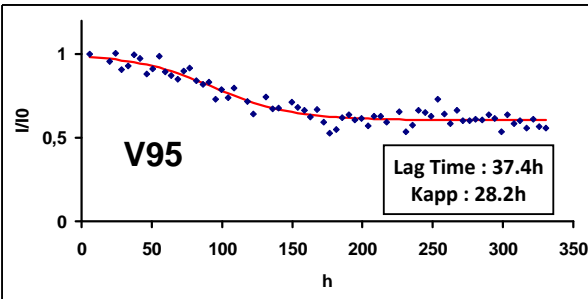
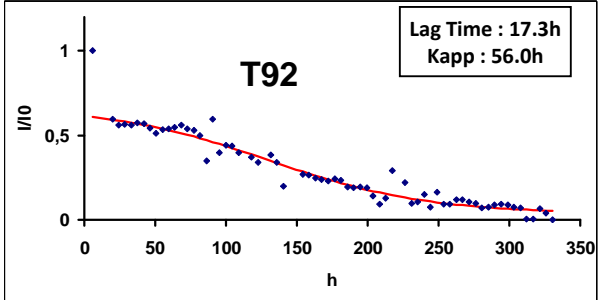
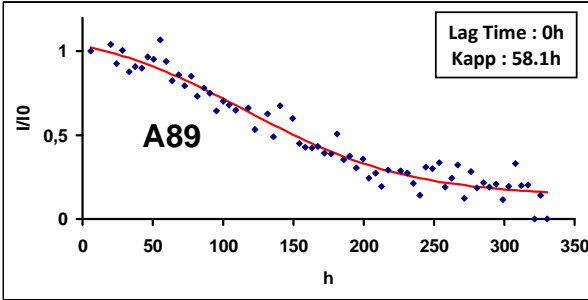
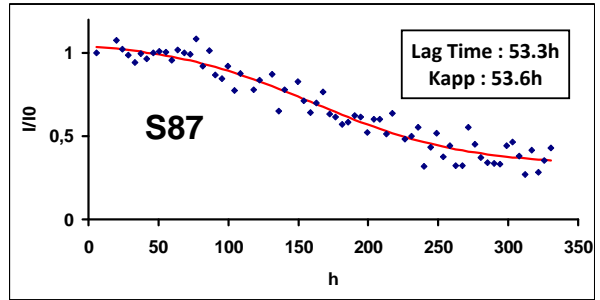
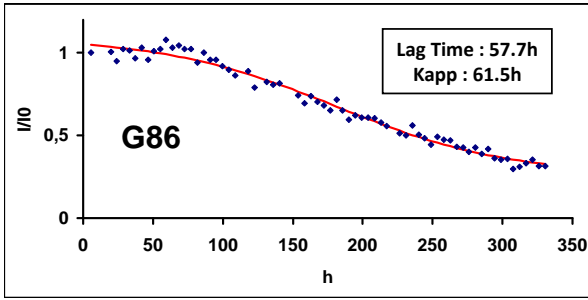


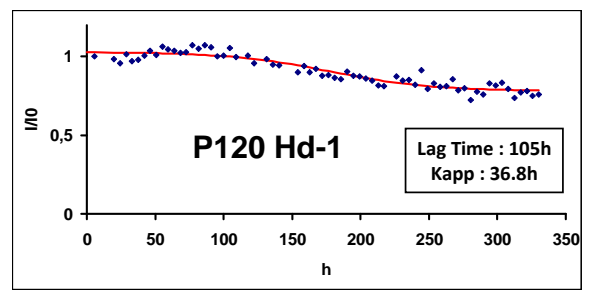
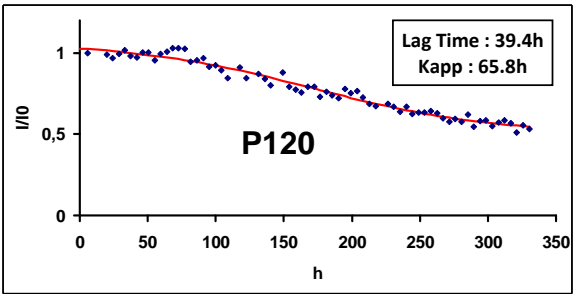
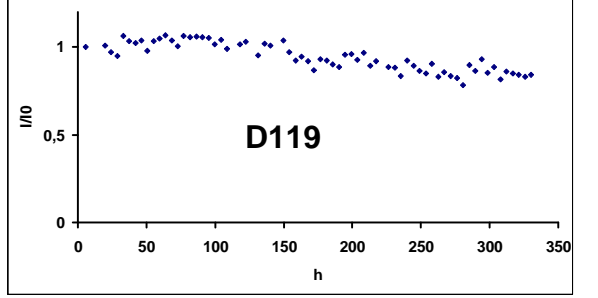
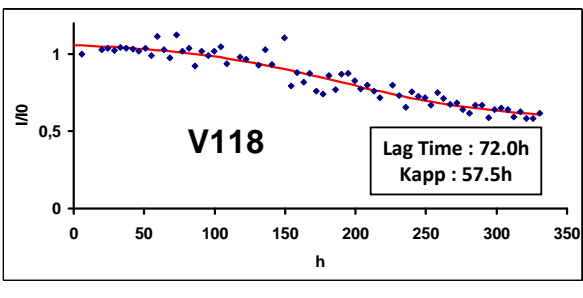
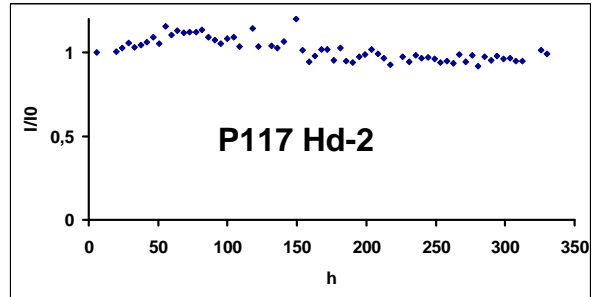
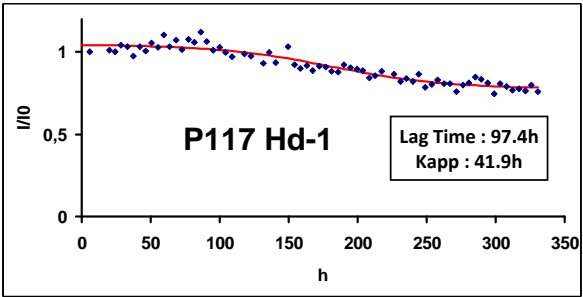
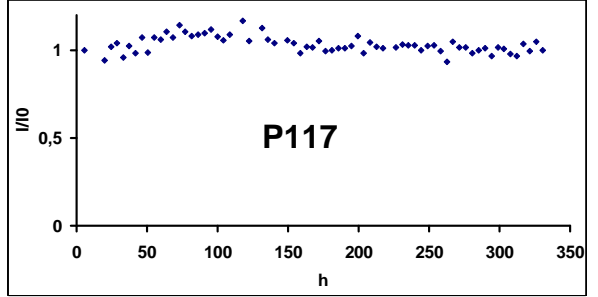
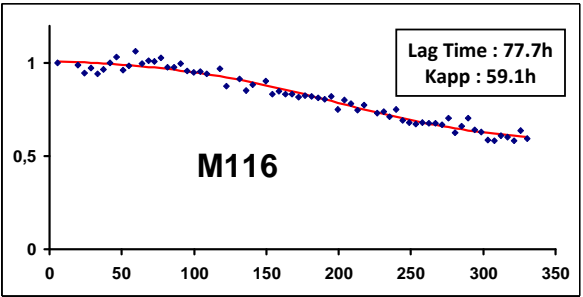
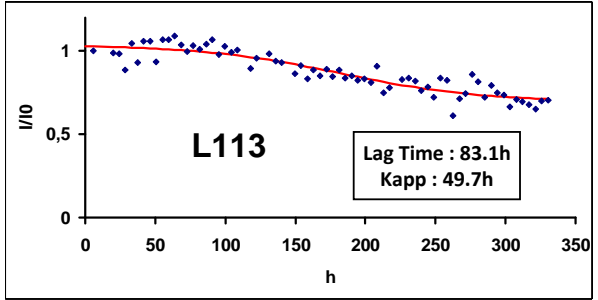
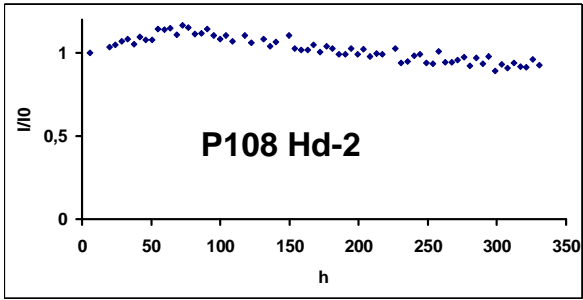
Figure 50 : Superposition de plusieurs spectres ^1H - ^{15}N -Ha(Ca)N enregistrés durant la cinétique d'agrégation de ^{15}N - ^{13}C -AS (350 μM) + ^{13}C -GST-FKBP12 (68 μM) à 37°C (tampon 20 mM de Hépès, 150 mM NaCl, pH 7.4) chaque spectre dure 3h05. Les différentes couleurs correspondent à différents temps de la cinétique, en noir, le temps zéro, en bleu t=1j 9h 30m, en rouge t=2j 50m, en vert t=2j 22h 10m et en jaune t=3j 10h 25m.

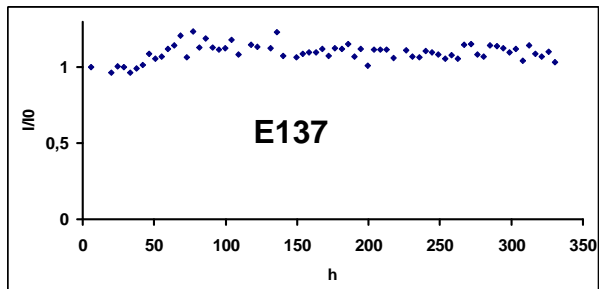
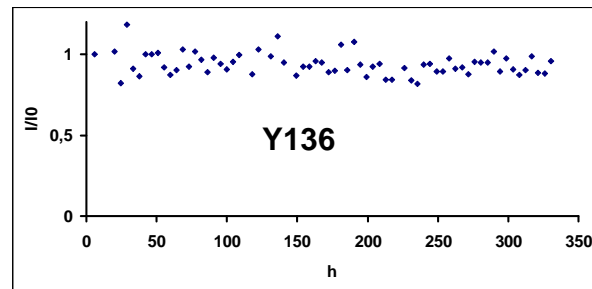
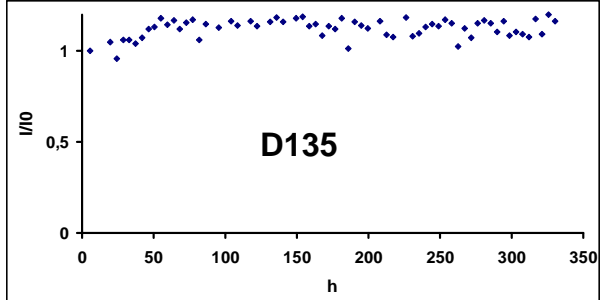
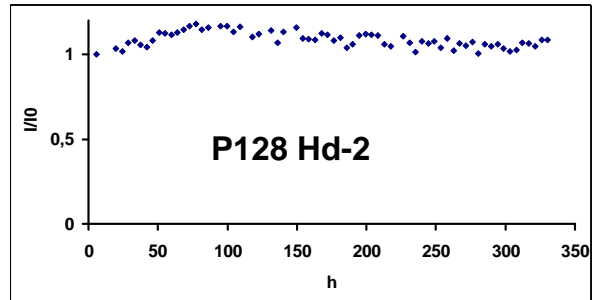
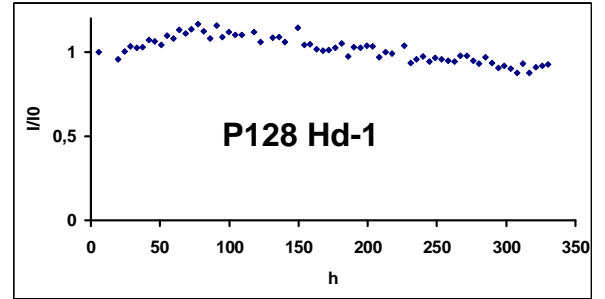
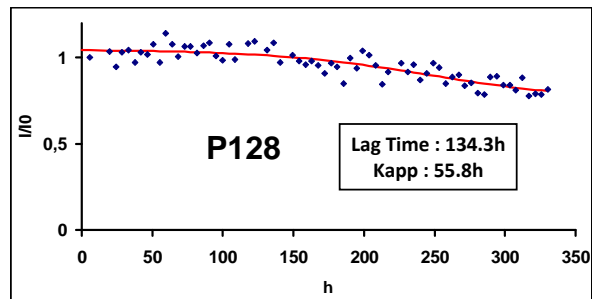
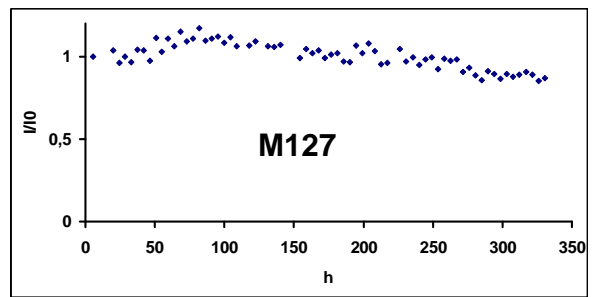
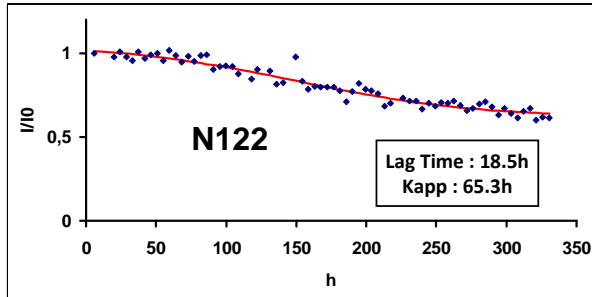
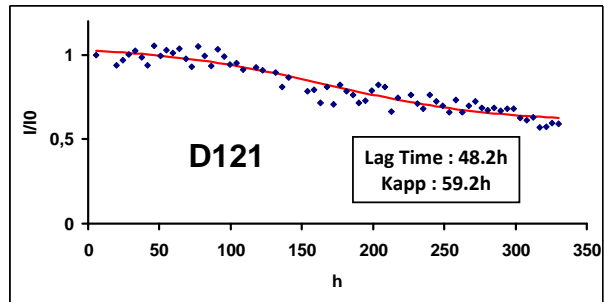
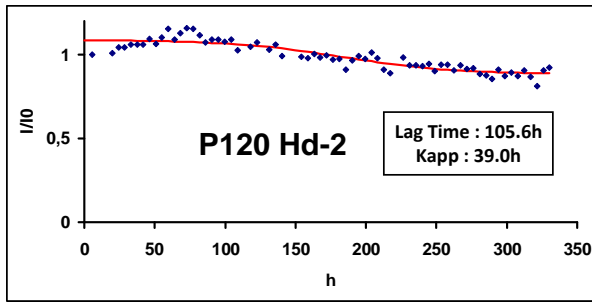












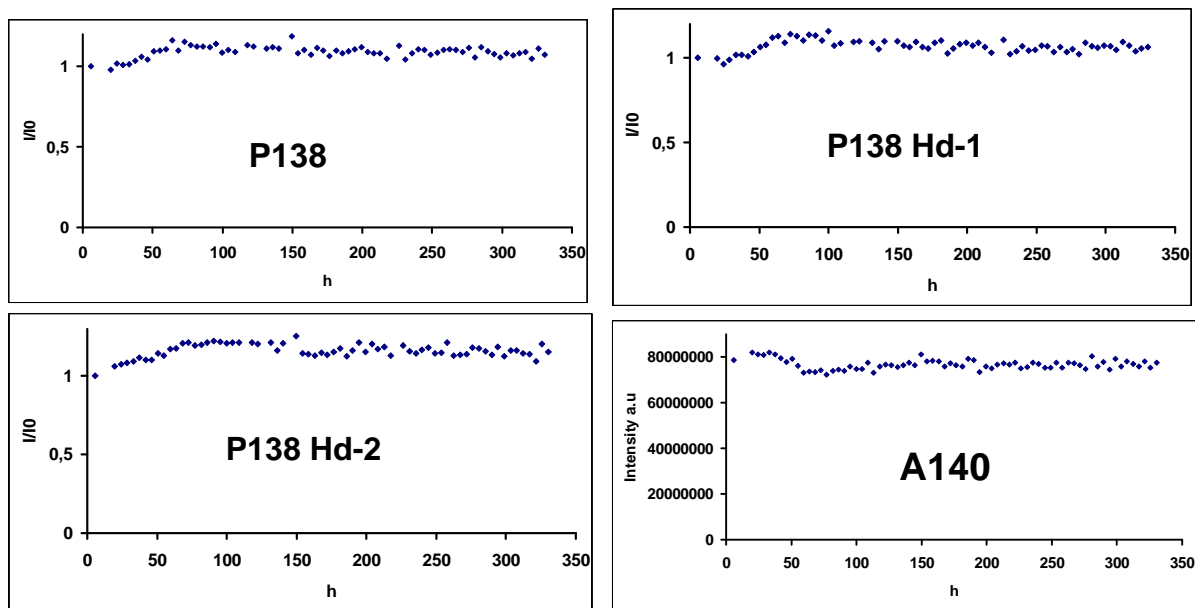


Figure 51 : Cinétique, résidu par résidu, de l'agrégation de ^{15}N - ^{13}C -AS (350 μM) + ^{13}C -GST-FKBP12 (68 μM) à 37°C. Chaque courbe correspond à l'intensité relative normalisée en fonction du temps pour un résidu d'AS (normalisée par rapport au pic A140). Le dernier panneau montre l'intensité d'A140 non normalisée.

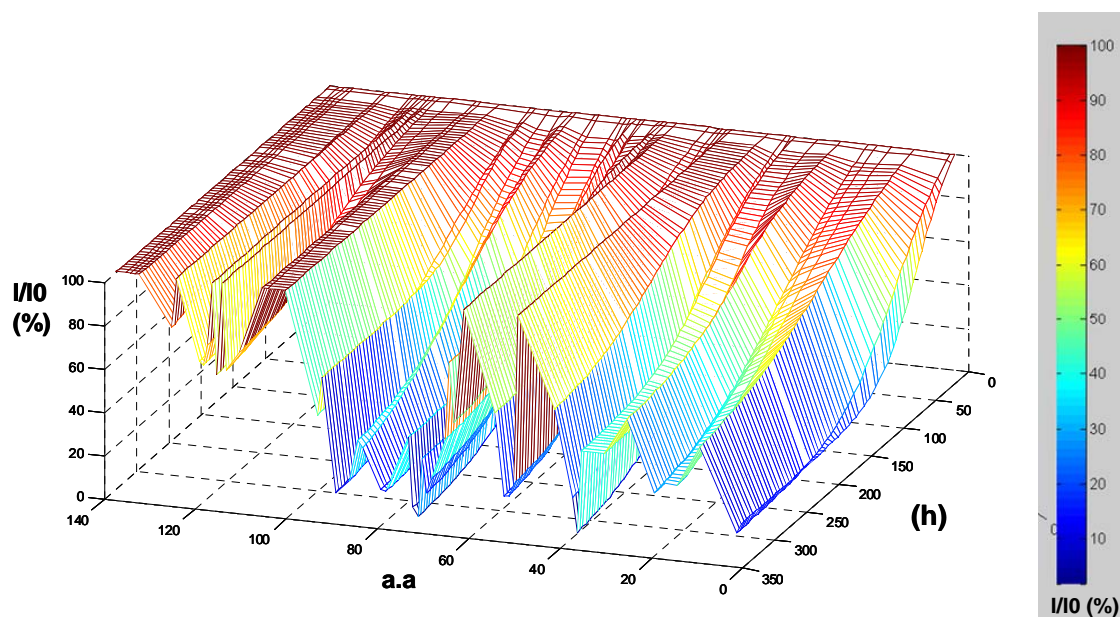


Figure 52 : Cinétique résidu par résidu de l'agrégation de ^{15}N - ^{13}C -AS (350 μM) + ^{13}C -GST-FKBP12 (68 μM) à 37°C. Le graphique correspond à l'intensité relative normalisée en fonction du temps et en fonction de la position des résidus dans la chaîne primaire. L'axe vertical correspond à l'intensité relative exprimée en pourcentage. Ce pourcentage est également représenté par un dégradé de couleurs (en suivant le sens de l'arc en ciel, le rouge représente l'intensité

maximale et le bleu le 0%). Les mesures d'intensité ont été réalisées sur les spectres ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N en fonction du temps.

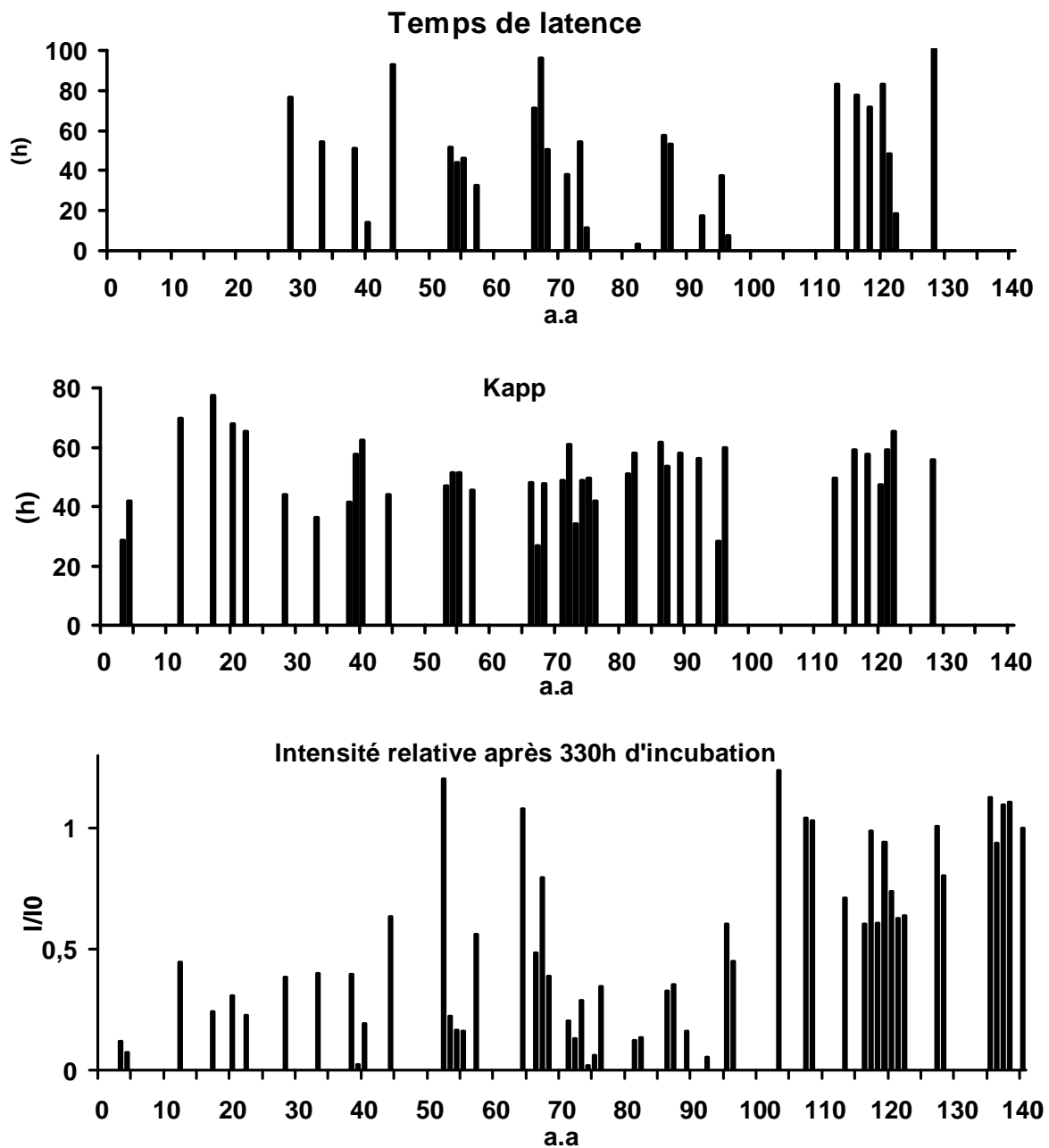


Figure 53 : Valeurs de Kapp et du temps de latence en fonction de la séquence primaire, calculées à partir des données cinétiques d'agrégation de ^{15}N - ^{13}C -AS (350 μM) + ^{13}C -GST-FKBP12 (68 μM) à 37°C. Pour chaque résidu, nous avons déterminé la constante de vitesse apparente Kapp et le temps de latence (*lag time*) selon les équations cinétiques :

$$I(t) = I(0) - \frac{I(0) - I(\infty)}{1 + \exp(\text{Tau} - t/K_{app})}$$

Kapp est la constante de vitesse apparente, Tau est une constante reliée au temps de latence par la formule: Temps de latence = Tau-2*Kapp, $I(\infty)$ est l'intensité des pics à la fin de l'agrégation et $I(0)$ la valeur initiale. En bas l'intensité, relative en fonction de la séquence primaire à la fin de la cinétique (330 heures et 23 minutes). Les mesures d'intensité ont été réalisées sur les spectres ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N en fonction du temps.

L'extrémité N-terminale (résidus 1-30) est décrite dans la littérature [275] [276] [277] [278] (figures 28 et 44) comme ne faisant pas partie intégrante du corps de la fibre (modèle en secouant). Si on regarde la cinétique d'agrégation par RMN (spectre ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N figures 51, 52 et 53), nous observons que l'extrémité N-terminale (résidus V3 et F4) a une cinétique très rapide, nous n'observons pas de temps de latence et avec un Kapp inférieur à 40 heures (figures 51-53). Ceci montre que l'agrégation, amyloïde ou pas, commence par le N-terminus d'AS. La région NAC suit, mais progressivement plus lentement. Egalement, la cinétique du résidu Y39 ne comporte pas de temps de latence et le Kapp est de 58 heures (figures 51-53). Plusieurs publications ont décrit la mutation de Y39 inhibant l'agrégation en secouant [309]. Ces pertes d'intensité précoces sont sûrement liées à des changements de conformation et à des interactions non amyloïdes qui doivent précéder la formation des agrégats.

Entre les résidus 71 et 82 (NAC région), nous observons également des pertes d'intensité importantes avec des temps de latence proches de zéro (sauf pour les résidus V71 et G73) et avec des Kapp entre 35 et 60 heures (figures 52). Il est possible que cela soit dû à une combinaison entre interactions préfibrillaires et formation d'agrégats.

Les autres résidus situés entre les résidus 12-38 et 48-68 perdent en intensité mais ne disparaissent pas complètement. On peut penser que leur cinétique ne dépend que de l'augmentation de la taille de l'objet (augmentation du temps d'autocorrélation) et la perte de mobilité de la chaîne peptidique. A partir de ces pics, nous pouvons estimer le temps de latence de l'agrégation entre 48 et 76 heures.

Du côté C-terminal, il n'y a pas de perte significative de l'intensité sauf pour quelques résidus. Cette perte d'intensité pourrait être liée à l'interaction des agrégats avec GST-FKBP12 (figures 52-53).

Les résultats du modèle d'agrégation d'AS incubé avec GST-FKBP12 sans secouer et le modèle en secouant sans FKBP12 sont complètement différents. Premièrement, la cinétique d'agrégation est beaucoup plus rapide pour le modèle en secouant (figures 40 et 45). Ceci peut être expliqué facilement : il a été démontré que l'agrégation se passe à l'interface eau/air

[273], mais également que l'agitation est un mécanisme de propagation de la nucléation qui agit par fragmentation des fibres [310]. Par contre, la différence majeure entre les deux modèles est que nous n'observons pas de fibres amyloïdes par microscopie électronique dans le modèle induit par GST-FKBP12. Nous observons seulement des agrégats amorphes. Si on observe le spectre RMN en fin d'agrégation, nous observons que le spectre ne correspond pas à ce que l'on attendrait comme spectre ^1H - ^{15}N HSQC de fibres amyloïdes, nous observons plusieurs zones qui perdent en intensité mais beaucoup d'autres restent très intenses.

Dans le modèle d'agrégation induit par GST-FKBP12, nous observons des pertes d'intensité très importantes dans le N-terminus (résidus 3 à 12), entre G36 et G41 et entre V71 et K102 (où se situe la NAC région). Étrangement, le reste des acides aminés diminue faiblement en intensité, notamment dans le domaine C-terminal. Nous pouvons remarquer que les pertes d'intensité affectent exactement les deux domaines identifiés précédemment pour être affectés par l'interaction avec FKBP12 (résidus V3 à 12), entre G36 et G41 (GST ou non), mais aussi le domaine NAC connu pour être indispensable à l'agrégation. Néanmoins, le spectre ne ressemble pas à un spectre attendu pour des fibres. Ceci nous laisse penser que quand on incube AS avec GST-FKBP12, nous formons des oligomères et non des fibres amyloïdes. Cet oligomère présente une surface hydrophobe qui interagit avec le THT et se traduit par un signal de fluorescence au test THT.

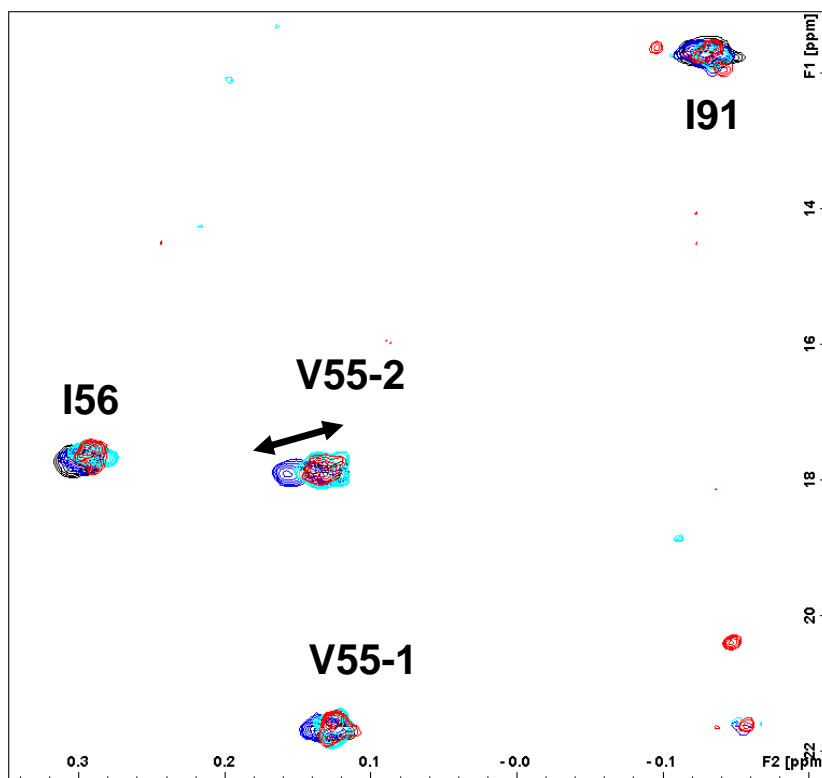


Figure 54 : Superposition de plusieurs spectres ^1H - ^{13}C HSQC enregistrés durant la cinétique d'agrégation de ^{15}N - ^{13}C -AS (350 μM) + ^{13}C GST-FKBP12 (68 μM) à 37°C (tampon 20 mM de Hépès, 150 mM NaCl, pH 7.4). Les différentes couleurs correspondent à différents temps de la cinétique, en noir, le temps zéro, en bleu t=3j 0h 29m, en bleu clair t=9j 7h 09m et en rouge t=13j 8h 15m.

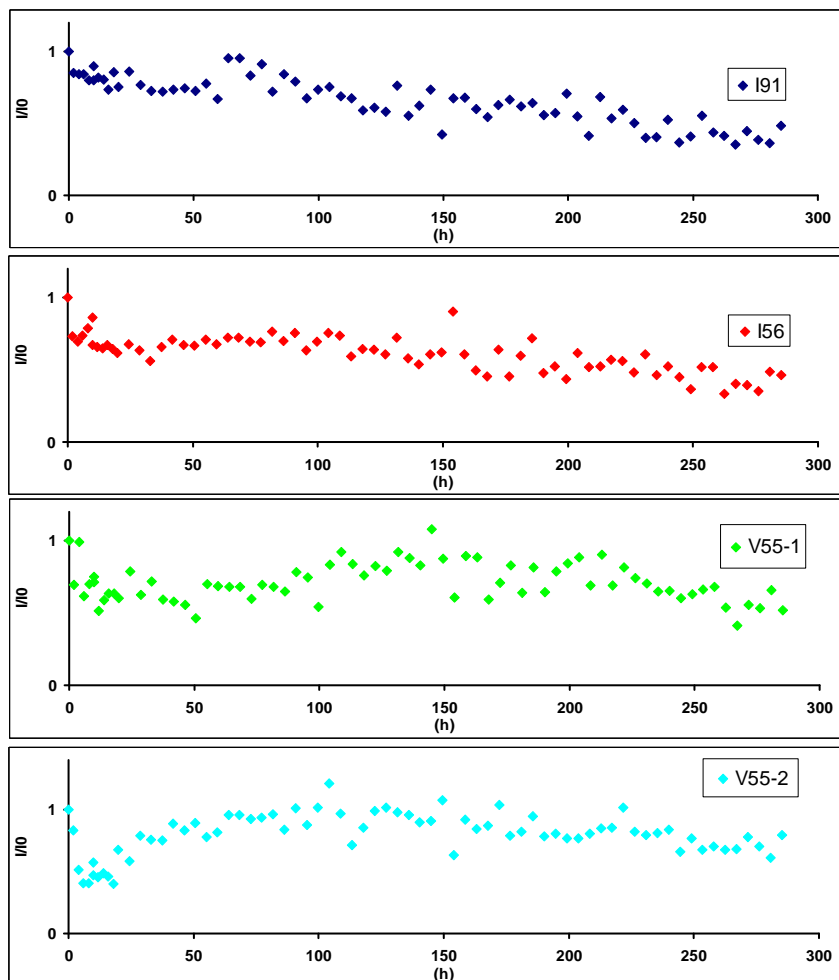


Figure 55 : Cinétique de l'agrégation de ^{15}N - ^{13}C -AS (350 μM) + ^{13}C -GST-FKBP12 (68 μM) à 37°C. Chaque courbe correspond à l'intensité relative normalisée en fonction du temps (normalisée par rapport au pic de TMSP) pour quatre résonances du site actif de FKBP12. Les mesures d'intensité ont été réalisées sur les spectres ^1H - ^{13}C -HSQC en fonction du temps.

Du côté de GST-FKBP12, nous avons utilisé le spectre ^1H - ^{13}C HSQC pour suivre la cinétique. Le spectre ^1H - ^{13}C HSQC est extrêmement encombré car nous observons également les résonances intenses de ^{15}N - ^{13}C AS (350 μM). Dans la zone des méthyles autour de 0 ppm, il y a néanmoins seulement les résonances correspondant au site actif de FKBP12. Si on observe le signal des méthyles proche de 0 PPM, nous observons une faible variation de déplacement chimique qui concerne surtout les deux résonances de V55 (V55-1 et V55-2).

Durant la cinétique d'agrégation, la résonance de la Valine 55 se déplace vers les bas champs puis elle retourne à sa position initiale. Le signal des méthyles de V55 perd rapidement en intensité puis retourne vers son niveau d'intensité initiale. Au cours du temps, tous les signaux de FKBP12 ont une légère perte d'intensité progressive. Nous pouvons conclure que GST-FKBP12 n'est pas intégrée dans les agrégats, confirmant les résultats de Gerard *et al.* qui démontrent que GST-FKBP12 n'est pas intégrée dans la structure des fibres d'AS [297]. Un rôle catalytique de GST-FKBP12 dans la formation des oligomères d'AS semble donc être une bonne hypothèse dans ce modèle.

4.5) Conclusion

Nous avons démontré que FKBP12 interagit avec AS (faible affinité) et qu'elle a également une activité proline *Cis/Trans* isomérase avec une spécificité pour la proline 128. Nous n'observons pas de stabilisation de structure secondaire mais nous observons des perturbations dans le N-terminus et entre G36 et G41. Ces perturbations pourraient être liées à une interaction directe, ou à des changements dans le nuage conformationnel d'AS. Du point de vue de l'interaction, on trouve les mêmes résultats que FKBP12 soit étiquetée GST ou non.

Dans l'étude de l'agrégation d'AS induit par FKBP12, nous avons deux résultats majeurs. Le premier est que l'incubation d'AS en présence de FKBP12 non étiquetée GST ne donne pas de réponse positive en THT. Si on incube AS en présence de GST-FKBP12, nous observons une réponse positive en THT (modèle sans secouer). Dans nos conditions expérimentales FKBP12 semble donc ne pas induire la fibrillation d'AS.

La deuxième constatation importante, est que dans le modèle d'agrégation d'AS induit par GST-FKBP12 sans secouer, nous n'observons pas de formation de fibres amyloïdes par microscopie électronique (même si on a une réponse positive au THT).

Le rôle de l'étiquette GST reste très énigmatique. Comme la GST va forcer la formation d'un dimère de GST-FKBP12, il est possible que son rôle est d'augmenter la probabilité de rencontre entre deux AS dans cette conformation pro-amyloïde.

4.5.1) Hypothèse sur l'agrégation d'AS induit par FKBP12

Les données *in vivo* ont démontré que les protéines de la famille des FKBP sont très impliquées dans l'agrégation d'AS. Une des hypothèses serait que FKBP12 par interaction avec la proline 128 modifierait la dynamique et/ou le nuage conformationnel d'AS menant vers des interactions entre AS-AS, entre le domaine N-terminal (résidu 3 à 9) et le domaine entre G36-G41. Nous ne savons pas actuellement avec certitude si l'activité proline *Cis/Trans* isomérase joue un rôle dans l'agrégation. Ces interactions précoces vont permettre le rapprochement des domaines NAC formant ainsi les noyaux d'agrégation. Ces noyaux vont, par la suite, recruter d'autres AS. Nous pensons également que, dans le cas du modèle sans secouer, nous n'atteignons pas le stade de fibres mais nous formons des oligomères pro-amyloïdes. La présence de ces oligomères pro-amyloïdes expliquerait les observations de Gérard *et al.*, selon lesquelles la présence de FKBP12 diminue le temps de latence d'agrégation d'AS [297] (modèle en secouant).

4.5.2) Perspective

Mettre en place cette méthodologie avait pour but de corrélérer les résultats de la cinétique à la résolution du résidu individuel par RMN avec des études cinétiques macroscopique par DOSY, DLS, fluorescence (THT), dichroïsme circulaire et microscopie électronique. De cette façon, pouvoir déconvoluer l'information cinétique et déterminer la nature et l'ordre des interactions précoces (phase de nucléation) et la formation du cœur de la fibre (phase d'élongation) nous aurait mené vers une meilleure compréhension du mécanisme d'agrégation.

Malheureusement, la cinétique d'agrégation d'AS induit par FKBP12 est extrêmement variable. D'une expérience à une autre, nous observons de très grandes variations du temps de latence (temps de latence compris entre 5 et 15 jours) même en utilisant le même *batch* de protéine et quelquefois en utilisant le même *mix* de protéines. Ceci rend impossible l'obtention de conditions cinétiques reproductibles et il est donc difficile de corrélérer les études de cinétiques par RMN avec des études cinétiques par d'autres méthodes.

Le rôle de la GST dans nos observations reste à éclaircir, surtout qu'elle semble induire une vraie différence dans les expériences d'agrégation sans secouer mais pas dans l'activité *Cis/Trans* isomérase. Même avec GST-FKBP12, nous n'obtenons pas de fibres amyloïdes observables par microscopie électronique si nous ne secouons pas l'échantillon, ce qui reste également énigmatique. Ces deux questions ont été une source de frustration importante durant ma thèse, et demande des études plus poussées.

5) Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans l'étude moléculaire du mécanisme d'agrégation de deux IDPs impliquées dans des maladies neurodégénératives.

Dans le premier chapitre nous avons développé deux méthodologies pour l'étude d'IDP par RMN.

La première méthodologie consiste en une nouvelle stratégie d'attribution du spectre ^1H - ^{15}N HSQC des IDPs basée sur un temps de mélange composite TOCSY-NOESY et NOESY-TOCSY. Nous avons utilisé cette méthodologie pour attribuer le spectre d'AS sans avoir besoin de marquage au carbone 13.

La deuxième méthodologie développée consiste en une nouvelle méthode de mesure de l'échange proton/deutérium. Nous avons appliqué cette méthodologie à un fragment fonctionnel de TAU avant et après phosphorylation par la kinase PKA.

Nous avons également attribué le spectre ^1H - ^{15}N HSQC de l'isoforme la plus longue de TAU. Grâce à cette attribution, nous avons pu déterminer l'épitope de nouveaux anticorps anti-TAU.

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes focalisés sur le développement d'une stratégie pour tester des inhibiteurs potentiels de l'agrégation de TAU. Nous avons tout d'abord exploré le modèle TAU-héparine et la détection de l'inhibition par fluorescence. Nous avons soulevé un certain nombre d'interférences dans le test d'inhibition par fluorescence qui mènent vers de faux positifs. Nous avons également décrit un fluorophore (la Primuline) qui semble plus performant que le THT. Due à sa grande affinité, la Primuline a également la propriété de détecter des agrégats précoces.

Nous avons commencé à explorer un nouveau modèle pour sonder l'inhibition de la phase de nucléation de TAU. Le modèle consiste à former des dimères du fragment fonctionnel TAU F4 par un seul pont disulfure, de façon à forcer l'interaction PHF6-PHF6. Nous avons démontré que le pont disulfure au niveau de la cystéine naturelle de TAU (C322) stabilise l'interaction PHF6-PHF6. Par conséquent, ce modèle pourrait servir à tester des molécules capables d'inhiber directement l'interaction PHF6-PHF6. Nous avons également commencé la caractérisation structurale de l'interaction PHF6-PHF6. Pour le moment, nous pouvons conclure que l'interaction est de faible affinité et qu'elle présente sûrement plusieurs conformations en échange lent et rapide.

Dans le troisième chapitre, nous avons étudié le mécanisme d'agrégation d'AS induit par FKBP12. Des données *in vitro* et des données *in vivo* fournissent des preuves pour penser que FKBP12 serait un modulateur de l'agrégation d'AS. Nous avons retrouvé des différences importantes dans l'agrégation d'AS induit par FKBP12 selon que la protéine FKBP12 est étiquetée GST ou pas. Par conséquent, nous avons décidé de faire une caractérisation de l'interaction d'AS avec GST-FKBP12 et FKBP12 non étiquetée.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'interaction d'AS et FKBP12 et nous avons démontré que FKBP12 a une activité *Cis-Trans* isomérase spécifique pour la proline 128 d'AS. Ces résultats sont indépendants de la présence ou non d'étiquette GST ou non.

Dans une deuxième phase, nous avons étudié et comparé le modèle d'agrégation d'AS induit par FKBP12 sans secouer avec le modèle d'agrégation d'AS en secouant. Nous avons conclu que FKBP12 non étiquetée GST n'induit pas d'agrégation d'AS dans nos conditions expérimentales. Nous avons également démontré que GST-FKBP12 induit une agrégation d'AS, mais cette agrégation ne mène pas à des fibres amyloïde mais plutôt à des oligomères.

Nous avons également développé dans le modèle AS + GST-FKBP12 une méthodologie pour suivre l'agrégation des IDPs en temps réel à température et pH physiologiques (37°C et pH 7.4), cette méthodologie par RMN devrait plus généralement permettre le suivi de l'agrégation à une résolution du résidu.

ANNEXE 1 : Utilisation du logiciel du Dr Verdegem pour l'attribution d'IDPs

Opérations sur les spectres :

Chaque point du spectre tridimensionnel est défini par 4 valeurs : une fréquence proton, une fréquence azote, une fréquence carbone et une valeur intensité.

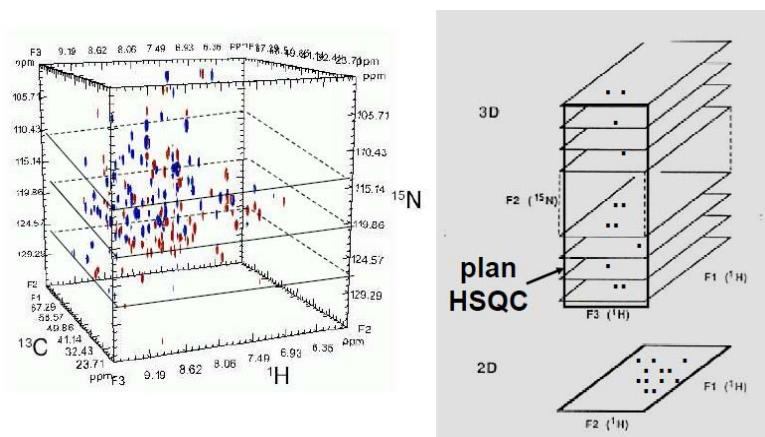


Figure A1 : Spectre 3D et extraction des plans à la fréquence azote.

Le logiciel nous permet d'extraire des plans à une fréquence donnée. C'est à dire d'extraire l'ensemble des points qui correspondent à cette valeur de fréquence. Par exemple si on extrait un plan à une fréquence azote cela équivaut à extraire tous les points qui correspondent à cette fréquence azote. on obtient donc un pseudo spectre défini par des valeurs de fréquence proton, de fréquence azote et d'intensité. Le logiciel nous permet de faire des opérations mathématiques points par points sur les différents pseudos spectres.

Exemple d'opérations :

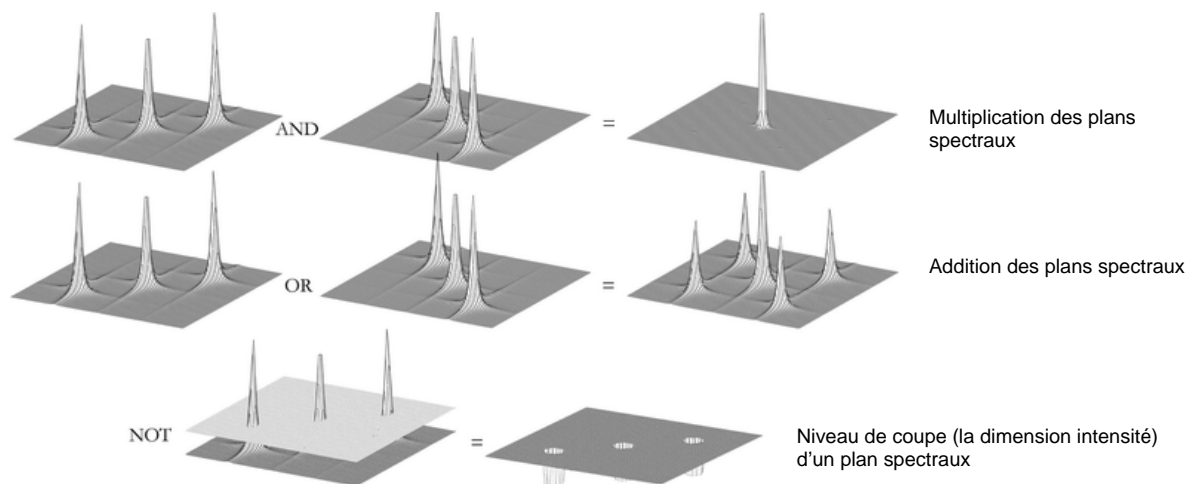


Figure A2 : Opérations sur les plans spectraux [133].

Présentation du logiciel :

Le logiciel est divisé en plusieurs fenêtres :

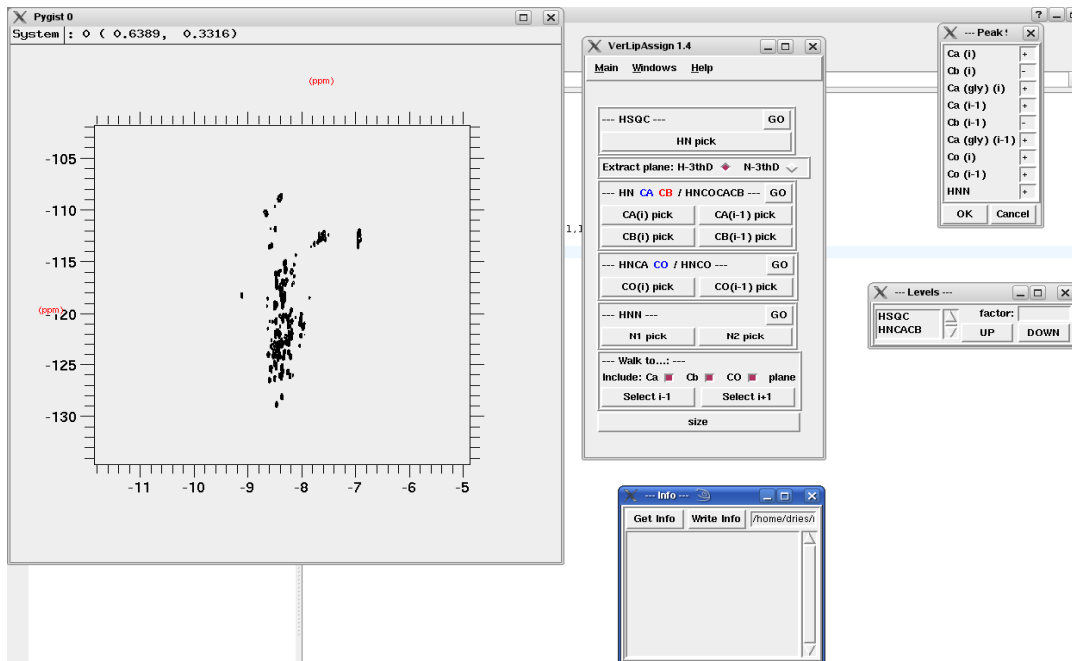


Figure A3. Image du logiciel NMRpython

- Fenêtre de visualisation des spectres :

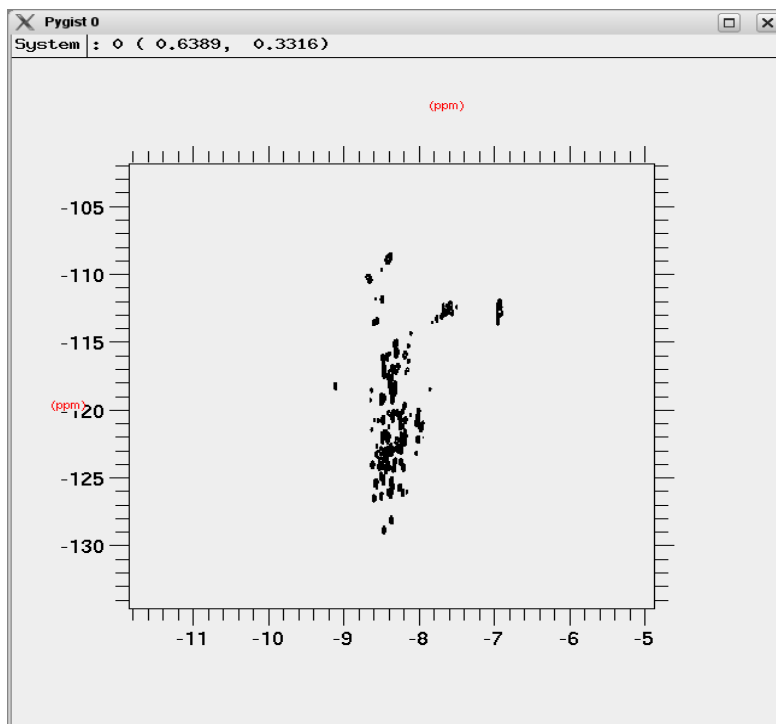
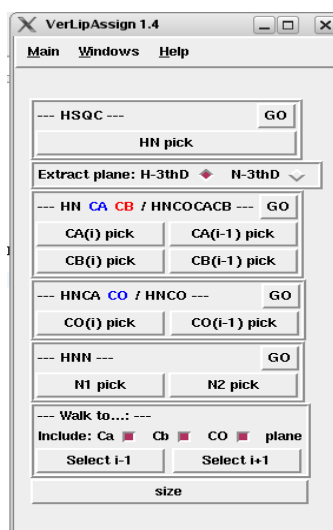


Figure A4. Spectre ^1H - ^{15}N HSQC pS262-TAU F4.

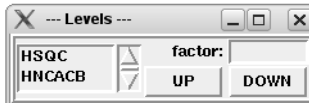
Elle nous permet de visualiser le spectre HSQC et les différents plans extraits des spectres 3D. On peut également sélectionner les différents pics et zoomer sur les parties d'intérêt.

- Fenêtre de commande :



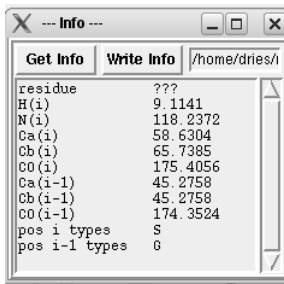
Elle contient les commandes pour sélectionner les différents pics, les plans de coupe et la multiplication des plans. Elle nous permet de sélectionner les plans de coupe en fréquence proton ou en fréquence azote.

- Fenêtre d'intensité :



Elle nous permet de faire varier les différents niveaux de coupe (la dimension intensité) de chaque spectre.

- Fenêtre d'information :



Elle nous permet d'enregistrer les différentes valeurs de déplacement chimique et de les comparer aux données standards. Elle nous propose un ou plusieurs types d'acide aminé qui peuvent correspondre au résidu en position i et i-1.

Attribution des spectres : Exemple l'attribution des spectres de TAU F4 phosphorylé en S262.

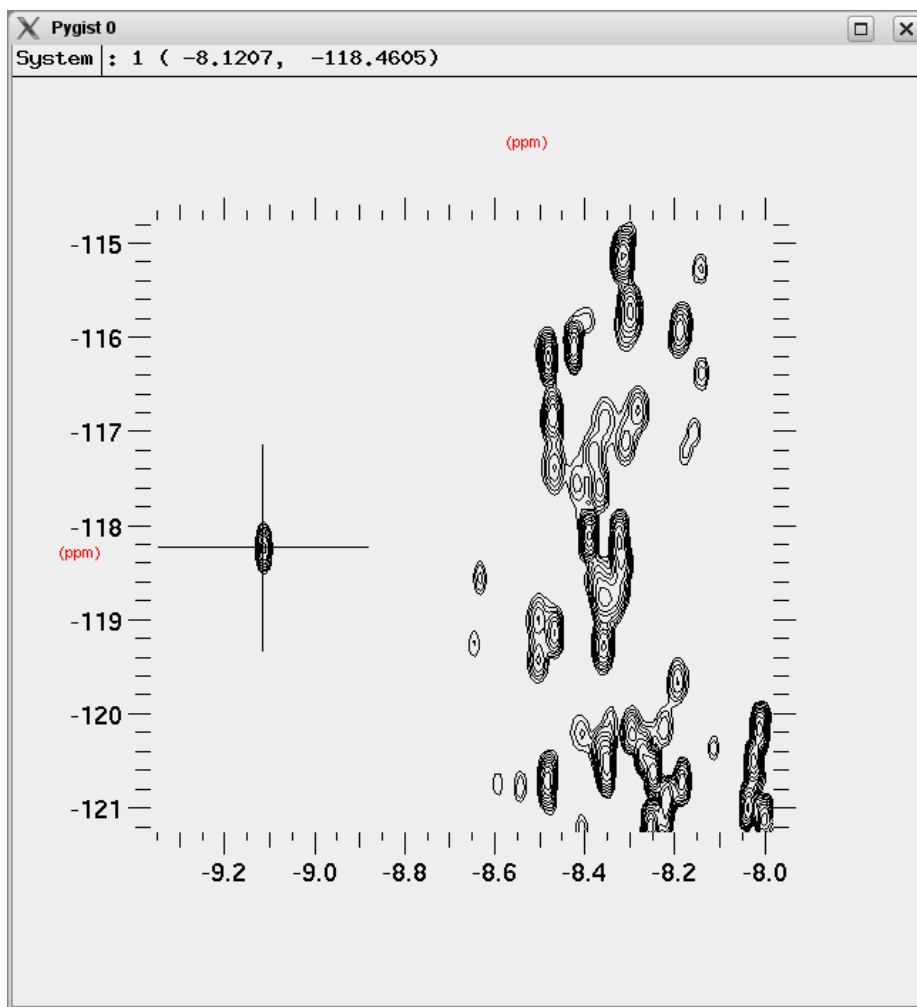


Figure A5. Spectre ^1H - ^{15}N HSQC pS262-TAU F4

Premièrement, il faut choisir un pic sur le spectre ^1H - ^{15}N HSQC. Puis, on coupe un plan (^1H - ^{13}C) sur le HNCaCb / HN(Co)CaCb à la fréquence azote.

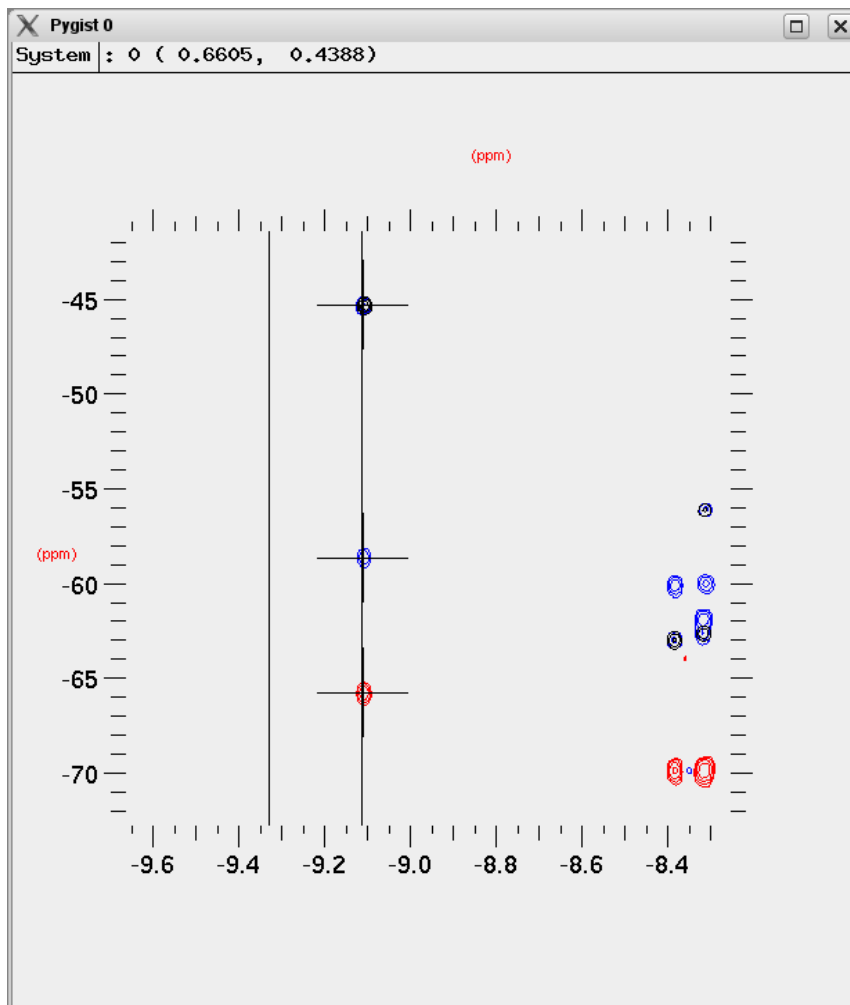


Figure A6. Superposition des plans ^1H - ^{13}C des spectres HNCaCb pS262-TAU F4 et HN(Co)CaCb pS262-TAU F4 à la fréquence ^{15}N de 118.24 PPM. On observe la fréquence de résonance du Ca en bleu et du Cb en rouge pour la phosphosérine 262 (position i). On observe également en bleu et noir la fréquence de résonance du Ca de la glycine 261 (position i-1)

On peut donc déterminer le déplacement chimique du Ca et du Cb des résidus en position i et i-1. On clique sur les différents pics et on enregistre leurs déplacements chimiques.

Puis, on coupe un plan (^1H - ^{13}C) sur le HNCa / HN(Ca)Co à la fréquence azote.

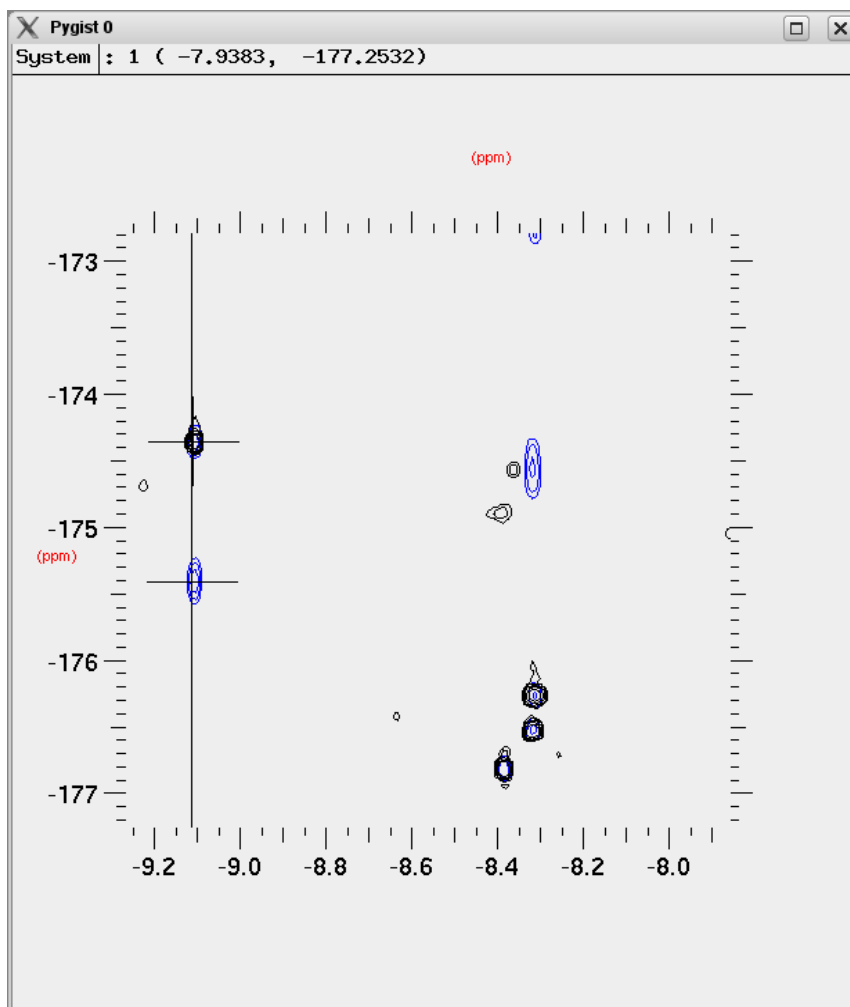


Figure A7. Superposition des plans $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ des spectres HNC α pS262-TAU F4 et HN(C α)Co pS262-TAU F4 à la fréquence ^{15}N de 118.24 PPM. On observe en bleu la fréquence de résonance du Co de la phosphosérine 262 (position i) et en bleu et noir la fréquence de résonance du Co de la glycine 261 (position i-1).

On peut donc déterminer le déplacement chimique du Co des résidus en position i et i-1. On clique sur les différents pics et on enregistre leurs déplacements chimiques. Puis on coupe un plan ($^1\text{H}-^{15}\text{N}$) sur le HN(C α)NNH à la fréquence azote.

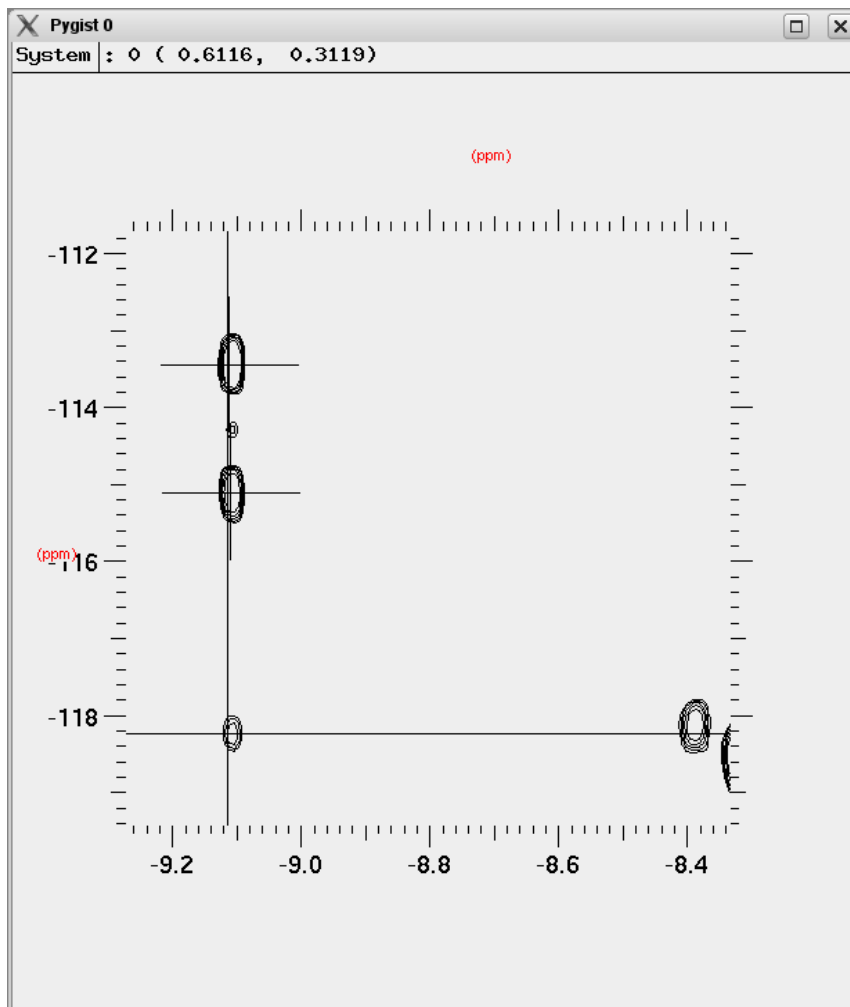


Figure A8. Plan ^1H - ^{13}C du spectre HN(Ca)NNH pS262-TAU F4 à la fréquence ^{15}N de 118.24 PPM.. On observe deux pics de corrélation intense qui correspondent à la fréquence de résonance ^{15}N de la glycine 261 (position i-1) et de la thréonine 263 (position i+1). On observe également un résiduel du signal du ^{15}N de la phosphosérine 262 en position i.

On peut donc déterminer le déplacement chimique ^{15}N des résidus en position i+1 et i-1. Le logiciel compare les valeurs à la banque de données et nous propose le type de résidu en position i et i-1.

Multiplication des plans spectraux :

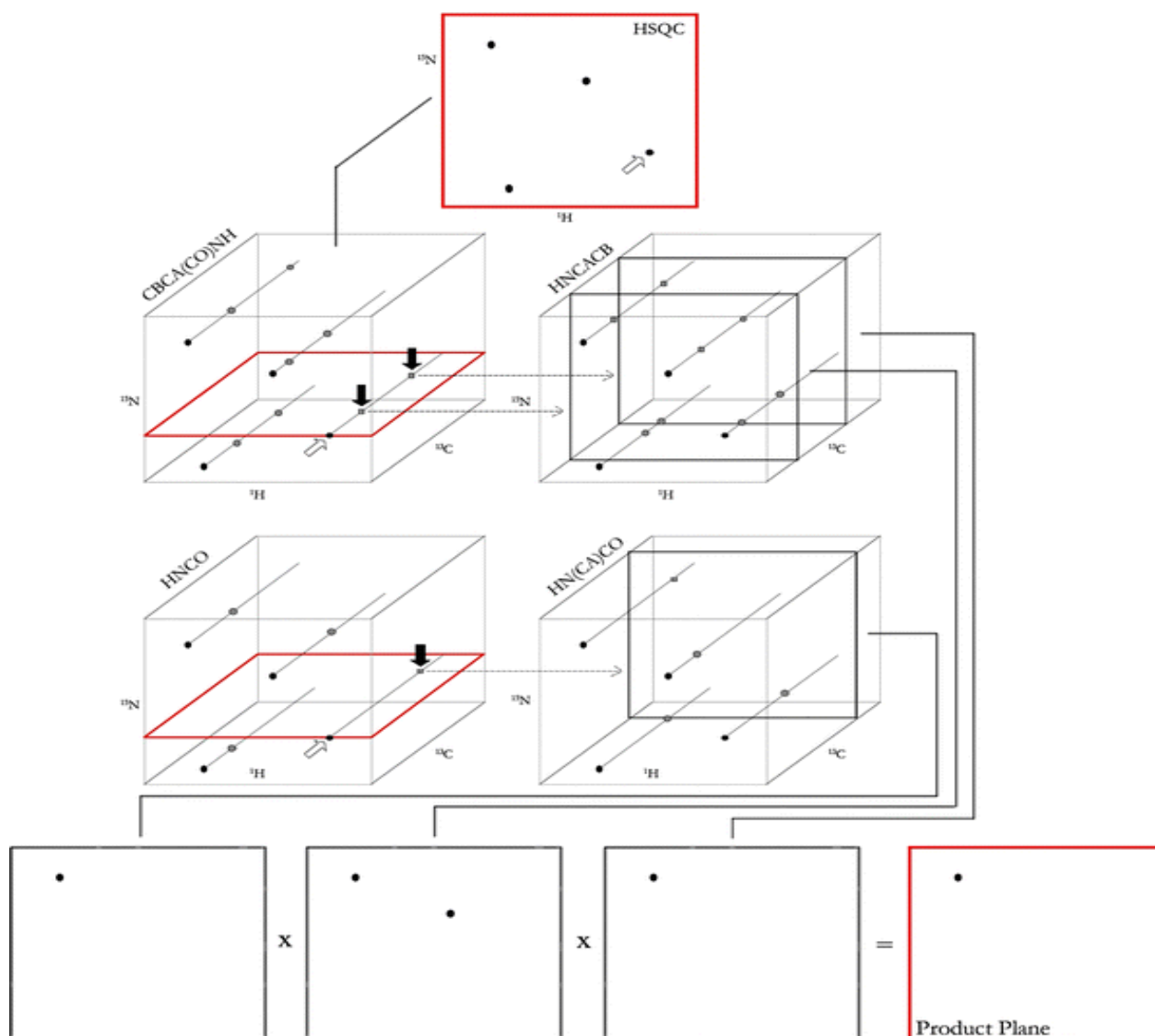


Figure A9 : Multiplication des plans spectraux [133].

Résidu en position i+1 :

Le logiciel extrait trois plans ($^1\text{H}-^{15}\text{N}$) aux fréquences ^{13}C correspondant au Ca(i), Cb(i) et Co(i). On obtient donc trois plans $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ qui passent respectivement par Ca(i), Cb(i) et Co(i). Chaque plan contient tous les acides aminés ayant ces déplacements chimiques en ^{13}C . Nous superposons les 3 plans et nous multiplions les signaux points par points. Nous obtenons un plan $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ correspondant à la ou les résonances qui présentent cette combinaison de déplacements chimiques en Ca,Cb et Co. Dans le cas idéal, nous obtenons un seul pic correspondant à l'acide aminé en position i+1. Le pic est coloré en violet et superposé sur le HSQC de départ. Dans beaucoup de cas, on a plusieurs pics qui peuvent correspondre au résidu i+1. Pour pouvoir départager les pics, on utilise le HN(Ca)NNH. Le pic violet doit correspondre à une des deux fréquences, ^{15}N du HN(Ca)NNH (représentée par des lignes noires).

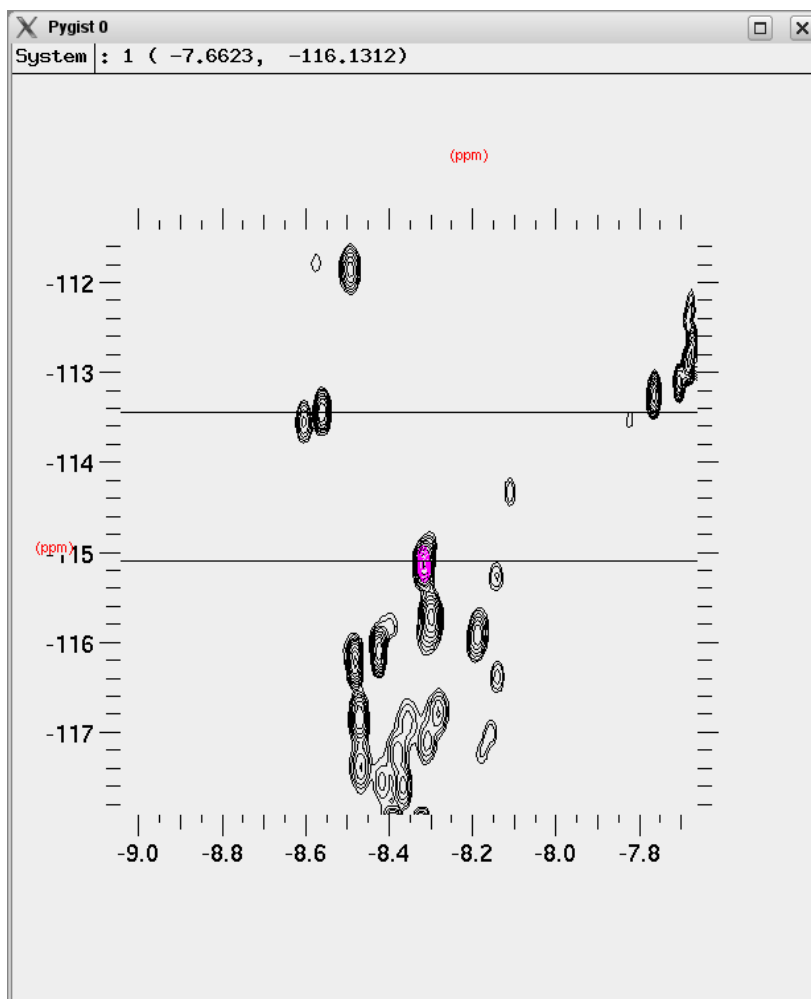


Figure A10 : Zoom du spectre ^1H - ^{15}N HSQC pS262-TAU F4. Le résidu (T263) en position $i+1$ de la phosphosérine 261 est coloré en violet.

Le logiciel extrait trois plans (^1H - ^{15}N) aux fréquences ^{13}C correspondant au Ca($i-1$), Cb($i-1$) et Co($i-1$). On obtient donc trois plans ^1H - ^{15}N qui passent respectivement par Ca($i-1$), Cb($i-1$) et Co($i-1$). Chaque plan contient tous les acides aminés ayant ces déplacements chimiques en ^{13}C . Nous superposons les 3 plans et nous multiplions les signaux points par points. Nous obtenons un plan ^1H - ^{15}N correspondant à la ou les résonances qui présentent cette combinaison de déplacements chimiques en Ca, Cb et Co. Dans le cas idéal, nous obtenons un seul pic correspondant à l'acide aminé en position $i-1$. Le pic est coloré en vert et superposé sur le HSQC de départ. Dans beaucoup de cas, on a plusieurs pics qui peuvent correspondre au résidu $i-1$. Pour pouvoir départager les pics on utilise le HN(Ca)NNH. Le pic vert doit correspondre à une des deux fréquences, ^{15}N du HN(Ca)NNH (représentée par des lignes noires).

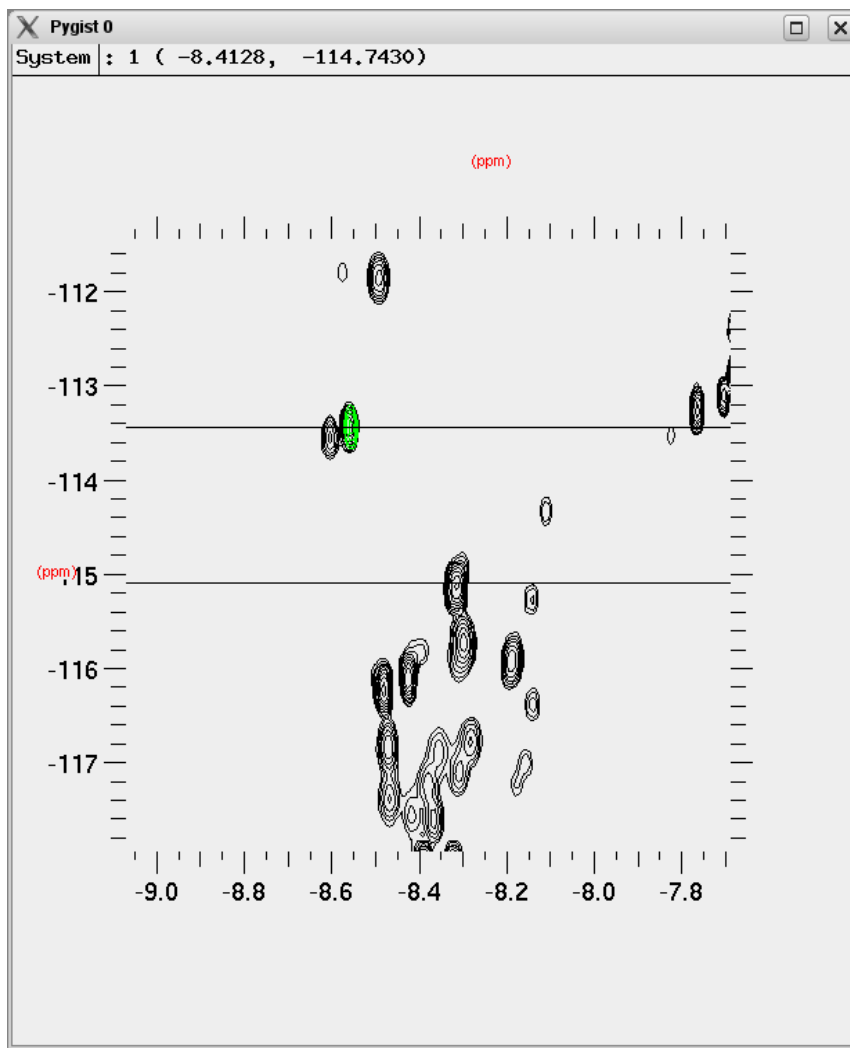


Figure A11 : Zoom du spectre ^1H - ^{15}N HSQC pS262-TAU F4. Le résidu (G261) en position $i-1$ de la phosphosérine 261 est coloré en vert.

Pour continuer l'attribution, on sélectionne le pic vert ou violet et on recommence la même opération. De cette façon, on peut attribuer de manière séquentielle toutes les résonances des spectres.

**ANNEXE 2 : Table des déplacements chimiques des résonances de TAU
441 (spectre ¹H-¹⁵N HSQC)**

A.A	H [ppm]	N [ppm]
M1		
A2		
E3		
P4		
R5	8,48	121,60
Q6	8,54	122,51
E7	8,52	122,35
F8	8,13	119,49
E9	8,30	122,37
V10	8,24	121,90
M11	8,50	124,80
E12	8,46	122,63
D13		
H14		
A15	8,38	124,46
G16	8,42	107,95
T17	8,00	113,60
Y18	8,32	122,66
G19	8,38	110,73
L20	8,13	121,43
G21	8,47	109,27
D22	8,24	120,49
R23	8,36	121,22
K24	8,49	122,48
D25	8,41	120,70
Q26	8,34	120,37
G27	8,48	109,41
G28	8,26	108,59
Y29	8,11	120,23
T30	8,13	116,74
M31	8,31	122,86
H32	8,48	120,61
Q33	8,46	122,39
D34	8,58	121,95
Q35	8,38	120,08
E36	8,52	122,25
G37		
D38	8,31	120,67
T39	8,23	114,63
D40	8,43	122,80
A41	8,28	124,97
G42	8,43	107,36
L43	7,98	121,31
K44	8,26	122,10
E45	8,37	121,81
S46	8,47	118,70
P47		
L48	8,31	122,16
Q49	8,39	121,60
T50	8,32	118,79

A.A	H [ppm]	N [ppm]
P51		
T52	8,34	115,07
E53	8,54	123,33
D54	8,47	121,75
G55	8,48	110,15
S56	8,26	115,86
E57	8,56	122,54
E58	8,48	123,68
P59		
G60	8,65	109,97
S61	8,25	115,68
E62	8,74	122,92
T63	8,26	114,81
S64	8,38	118,12
D65	8,41	122,69
A66	8,23	124,39
K67	8,30	120,08
S68	8,29	116,89
T69	8,23	118,61
P70		
T71	8,38	115,30
A72	8,44	126,61
E73	8,41	120,05
D74	8,37	121,57
V75	8,14	120,28
T76	8,29	118,18
A77	8,26	128,40
P78		
L79	8,38	122,75
V80	8,18	121,52
D81	8,45	124,59
E82	8,56	122,92
G83	8,52	109,41
A84	8,02	124,74
P85		
G86	8,51	108,95
K87	8,13	120,84
Q88	8,44	121,66
A89	8,40	125,85
A90	8,29	123,42
A91	8,26	123,51
Q92	8,36	120,87
P93		
H94	8,60	119,61
T95	8,16	116,59
E96	8,57	123,95
I97	8,34	124,15
P98		
E99	8,63	122,16
G100	8,57	110,56

A.A	H [ppm]	N [ppm]
T101	8,09	114,01
T102	8,33	116,80
A103	8,49	126,61
E104	8,45	120,23
E105	8,38	121,98
A106	8,34	125,09
G107	8,39	108,18
I108	8,03	119,61
G109	8,51	112,55
D110	8,24	120,58
T111	8,24	116,94
P112		
S113	8,57	116,83
L114	8,49	124,68
E115	8,45	120,87
D116	8,25	121,22
E117	8,42	122,04
A118	8,27	123,71
A119	8,04	121,84
G120	8,20	106,92
H121	8,14	118,70
V122	8,13	121,54
T123	8,30	118,41
Q124	8,43	122,98
A125	8,36	125,03
R126	8,27	119,79
M127	8,36	121,75
V128	8,20	121,72
S129	8,43	119,79
K130	8,46	123,89
S131	8,38	117,15
K132	8,52	123,57
D133	8,31	120,90
G134	8,39	109,41
T135	8,23	113,08
G136	8,61	111,49
S137	8,29	115,77
D138	8,50	122,34
D139	8,27	120,99
K140	8,27	120,99
K141	8,14	121,02
A142	8,20	124,65
K143	8,31	120,67
G144	8,45	109,94
A145	8,32	124,01
D146	8,36	118,97
G147	8,34	109,00
K148	8,17	120,49
T149	8,22	115,89
K150	8,42	124,94

A.A	H [ppm]	N [ppm]
I151	8,22	123,10
A152	8,48	129,19
T153	8,25	117,06
P154		
R155	8,55	121,98
G156	8,47	110,50
A157	8,15	123,77
A158	8,34	125,09
P159		
P160		
G161	8,51	108,95
Q162	8,21	119,93
K163	8,52	123,01
G164	8,51	110,26
Q165	8,27	119,96
A166	8,48	125,44
N167	8,45	117,82
A168	8,27	124,33
T169	8,17	113,78
R170	8,34	124,15
I171	8,32	124,62
P172		
A173	8,41	124,71
K174	8,39	121,11
T175	8,27	118,82
P176		
P177		
A178	8,40	125,76
P179		
K180	8,51	121,98
T181	8,23	118,32
P182		
P183		
S184	8,51	116,33
S185	8,57	116,83
G186	8,40	110,67
E187	8,24	121,90
P188		
P189		
K190	8,56	122,07
S191	8,40	116,86
G192	8,51	110,95
D193	8,24	120,49
R194	8,50	122,07
S195	8,44	117,00
G196	8,46	110,67
Y197	8,04	120,23
S198	8,17	118,18
S199	8,33	118,97
P200		

A.A	H [ppm]	N [ppm]
G201	8,48	109,41
S202	8,17	116,83
P203		
G204	8,48	109,12
T205	8,08	115,68
P206		
G207	8,59	109,56
S208	8,18	115,63
R209	8,46	122,92
S210		
R211	8,45	123,16
T212		
P213		
S214	8,45	116,77
L215	8,33	125,56
P216		
T217	8,35	117,97
P218		
P219		
T220	8,27	115,01
R221	8,43	123,74
E222	8,48	124,01
P223		
K224	8,43	121,87
K225	8,43	123,86
V226	8,23	122,60
A227	8,44	128,72
V228	8,21	120,99
V229	8,36	125,85
R230	8,57	126,35
T231	8,33	119,14
P232		
P233		
K234		
S235	8,47	118,88
P236		
S237	8,46	116,12
S238	8,38	118,12
A239	8,34	126,06
K240	8,26	120,08
S241	8,25	116,65
R242	8,37	123,07
L243	8,21	122,83
Q244	8,41	121,63
T245	8,16	115,80
A246	8,34	128,02
P247		
V248		
P249		
M250	8,45	122,10

A.A	H [ppm]	N [ppm]
P251		
D252	8,45	120,61
L253	8,29	123,68
K254	8,32	120,46
N255	8,30	118,67
V256	8,00	120,40
K257	8,45	124,86
S258	8,28	117,03
K259	8,43	123,63
I260	8,20	122,31
G261	8,57	113,43
S262	8,28	115,68
T263	8,37	115,82
E264	8,43	122,98
N265	8,47	119,35
L266	8,16	122,28
K267	8,19	120,99
H268	8,23	119,85
Q269	8,37	123,07
P270		
G271	8,65	110,21
G272		
G273	8,37	108,67
K274	8,20	120,84
V275	8,21	122,07
Q276	8,54	125,27
I277	8,37	124,12
I278	8,34	126,06
N279	8,60	123,96
K280	8,39	122,92
K281	8,35	122,60
L282	8,21	123,68
D283	8,39	122,10
L284	8,39	123,98
S285	8,40	116,04
N286	8,34	120,37
V287	7,98	120,05
Q288	8,48	123,58
S289	8,35	117,15
K290	8,44	123,28
C291	8,39	120,03
G292	8,51	111,60
S293	8,28	115,86
K294	8,52	123,19
D295	8,24	120,49
N296	8,34	118,73
I297	8,01	120,90
K298	8,35	125,17
H299	8,41	121,75
V300	8,21	124,04

A.A	H [ppm]	N [ppm]
P301		
G302	8,67	110,48
G303	8,41	108,80
G304		
S305		
V306	8,21	121,81
Q307	8,47	124,80
I308	8,30	124,15
V309	8,23	125,59
Y310	8,47	126,17
K311	8,21	125,94
P312		
V313	8,21	120,52
D314	8,41	124,33
L315	8,56	125,35
S316	8,46	116,12
K317	7,99	121,95
V318	7,94	120,72
T319	8,26	117,77
S320		
K321		
C322		
G323		
S324		
L325	8,39	123,86
G326	8,37	108,77
N327	8,30	118,67
I328	8,02	120,43
H329	8,38	122,75
H330		
K331		
P332		
G333		
G334		
G335		
Q336	8,31	119,99
V337	8,25	121,75
E338	8,54	125,53
V339	8,38	123,48
K340	8,54	126,29
S341	8,41	117,71
E342	8,58	123,54
K343	8,36	122,28
L344	8,26	123,65
D345	8,34	121,31
F346	8,22	121,11
K347	8,24	121,90
D348	8,19	120,11
R349	8,09	120,84
V350	8,17	121,37

A.A	H [ppm]	N [ppm]
Q351	8,52	124,18
S352	8,37	117,44
K353	8,41	123,39
I354	8,18	122,16
G355	8,55	113,40
S356	8,19	115,57
L357	8,44	123,98
D358	8,23	120,26
N359	8,32	118,56
I360	8,06	120,55
T361	8,25	118,03
H362		
V363	8,19	123,83
P364		
G365		
G366		
G367		
N368	8,39	118,59
K369	8,32	121,90
K370	8,38	123,24
I371	8,25	123,27
E372	8,59	126,00
T373		
H374		
K375	8,29	122,60
L376	8,34	123,51
T377	8,10	114,84
F378	8,31	122,72
R379	8,21	122,98
E380	8,42	122,15
N381	8,52	119,90
A382	8,28	124,42
K383	8,21	120,14
A384	8,23	124,97
K385	8,36	120,87
T386	8,18	114,72
D387	8,36	122,69
H388	8,42	119,90
G389	8,51	110,00
A390	8,17	123,68
E391	8,43	120,23
I392	8,19	123,01
V393	8,15	125,21
Y394	8,42	125,65
K395	8,14	124,68
S396	8,35	119,29
P397		
V398	8,21	120,99
V399	8,32	124,86
S400	8,47	120,11

A.A	H [ppm]	N [ppm]
G401	8,49	111,32
D402	8,29	120,58
T403	8,22	114,31
S404	8,35	119,90
P405		
R406		
H407		
L408	8,25	123,71
S409	8,33	116,21
N410	8,50	120,82
V411	8,08	119,75
S412	8,46	119,41
S413	8,51	118,30
T414	8,24	114,92
G415	8,37	111,17
S416	8,19	115,77
I417	8,26	122,10
D418	8,37	123,80
M419	8,27	120,99
V420	8,15	121,22
D421	8,43	123,63
S422	8,18	116,94
P423		
Q424	8,50	120,43
L425	8,25	123,71
A426	8,32	124,86
T427	8,12	113,49
L428	8,27	124,71
A429	8,30	124,45
D430	8,24	119,44
E431	8,36	121,22
V432	8,19	121,22
S433	8,36	118,35
A434	8,32	125,71
S435	8,13	114,25
L436	8,05	123,63
A437	8,06	123,51
K438	8,09	119,82
Q439	8,27	120,99
G440	8,39	110,47
L441	7,78	127,14

ANNEXE 3 : « *Tau Monoclonal Antibody Generation based on Humanized Yeast Models: Impact on Tau Oligomerization and Diagnostics* »

Tau Monoclonal Antibody Generation based on Humanized Yeast Models: Impact on Tau Oligomerization and Diagnostics.^{°§}

Joëlle Rosseels^{1#}, Jeff Van den Brande^{1,2,3#}, Marie Violet^{4,5,6,#}, Dirk Jacobs², Pierre Grognet^{3,x}, Juan Lopez^{7,8}, Isabelle Huvent^{7,8}, Marina Caldara¹, Erwin Swinnen¹, Anthony Papegaey^{4,5,6}, Raphaëlle Caillierez^{4,5,6}, Valerie Buée-Scherrer^{4,5,6}, Sebastiaan Engelborghs^{9,10}, Guy Lippens^{7,8}, Morvane Colin^{4,5,6}, Luc Buée^{4,5,6}, Marie-Christine Galas^{4,5,6}, Eugene Vanmechelen^{2*§}, Joris Winderickx^{1*§}

¹Functional Biology, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 31 box 2433, 3001 Heverlee, Belgium

²ADx NeuroSciences NV, Technologiepark Zwijnaarde 4, 9052 Ghent, Belgium

³Fujirebio Europe (formerly Innogenetics NV), Technologiepark Zwijnaarde 6, 9052 Ghent, Belgium

⁴Inserm, UMR1172, JPArc, Alzheimer & Tauopathies, rue Polonovski, 59045 Lille, France

⁵Université de Lille, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille, France

⁶CHRU, Memory Clinic, 59037 Lille, France

⁷Université Lille Nord de France, 59000 Lille, France

⁸CNRS UMR8576 Structural and Functional Glycobiology, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

⁹Reference Center for Biological Markers (BIODEM), Institute Born-Bunge, University of Antwerp, 2610 Wilrijk, Belgium

¹⁰Department of Neurology and Memory Clinic, Hospital Network Antwerp (ZNA) Middelheim and Hoge Beuken, 2660 Antwerp, Belgium

[#]contributed equally to this study and in alphabetical order

^xpresent address: CODA-CERVA, Groesenlenberg 80, 1180 Brussels, Belgium

[°]Running title: *Novel Tau monoclonal antibodies*

*To whom correspondence should be addressed: Joris Winderickx, Functional Biology, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 31 box 2433, 3001 Heverlee, Belgium, Tel.: +32-(0)16-321516; Fax.:+32-(0)16-321967; E-mail: joris.winderickx@bio.kuleuven.be

Eugeen Vanmechelen, ADx NeuroSciences NV, Technologiepark Zwijnaarde 4, 9052 Ghent, Belgium, Tel.: +32-(0)92-616984; Fax.:+32-(0)92-616981; E-mail: Eugeen.vanmechelen@adxneurosciences.com

Keywords: Tau protein, Alzheimer disease, protein folding, antibody, protein oligomer, yeast

Background: Oligomers of protein Tau are associated with neurodegenerative diseases.

Results: New antibodies were generated and validated that recognize different degrees of oligomerization of protein Tau.

Conclusion: Low-order and higher-order oligomers differ in C-terminal Tau phosphorylation and reflect consecutive stages in disease progression.

Significance: Antibodies recognizing Tau oligomers provide insight in disease etiology and are promising diagnostic tools.

ABSTRACT

A link between Tau phosphorylation and aggregation has been shown in different models for Alzheimer disease, including yeast. We used

human Tau purified from yeast models to generate new monoclonal antibodies, of which three were further characterized. The first antibody, ADx201, binds the Tau proline-rich region independently of the phosphorylation status, while the second, ADx215, detects an epitope formed by the Tau N-terminus when Tau is not phosphorylated at Tyr₁₈. For the third antibody, ADx210, the binding site could not be determined since its epitope is probably conformational. All three antibodies stained tangle-like structures in different brain sections of THY-Tau22 transgenic mice and Alzheimer patients and ADx201 and ADx210 also detected neuritic plaques in the cortex of the patient brains. In hippocampal homogenates from THY-Tau22 mice and cortex homogenates

obtained from Alzheimer patients, ADx215 consistently stained specific low-order Tau oligomers in diseased brain, which in size correspond to Tau dimers. ADx201 and ADx210 additionally reacted to higher-order Tau oligomers and presumed prefibrillar structures in the patient samples. Our data further suggest that formation of low-order Tau oligomers marks an early disease stage that is initiated by Tau phosphorylation at N-terminal sites. Formation of higher-order oligomers appears to require additional phosphorylation in the C-terminus of Tau. When used to assess Tau levels in human cerebrospinal fluid, the antibodies permitted to discriminate patients with Alzheimer disease or other dementia like vascular dementia, indicative that these antibodies hold promising diagnostic potential.

The microtubule associated protein Tau is an 'intrinsically disordered protein', which undergoes posttranslational modifications like phosphorylation, glycosylation, truncation, oxidation and acetylation (1-3). During Alzheimer's Disease (AD), a large pool of protein Tau becomes abnormally hyperphosphorylated, resulting in the loss of microtubule (MT) stabilization and the induction of conformational changes that allow the protein to oligomerize and aggregate into paired helical filaments (PHF) and neurofibrillary tangles (NFT) (4). The close correlation between the Tau pathology and the disease progression makes protein Tau a good biomarker for diagnosis. The protein is released from neurons into cerebrospinal fluid (CSF) and, indeed, several studies established that AD patients display CSF changes with elevated levels of total Tau and phosphorylated Tau, next to decreased levels of the A β 42 peptide. Hence, the quantification of these parameters proved to be accurate for early diagnosis of AD (5,6).

Data obtained from conditional Tau expression in transgenic mice point towards oligomeric Tau intermediates as toxic species and effectors in the etiology of AD (7). As such, recently developed oligomer-specific antibodies, like T22 (8) or TOC1 (9,10), have shown to preferentially label neurons at early stages of AD before the formation of NFT. Moreover, these antibodies also improved the discrimination between AD and control patients using total brain extracts, indicating their potential use as a pathophysiological biomarker (8-10). Most

recent studies demonstrated that oligomers detecting antibodies can block Tau seeding activity and the propagation of Tau pathology in brain of transgenic mice when administrated intracerebroventricularly, indicative that such antibodies have promising therapeutic potential (11,12).

During the last decade, we and others reported on the use of *Saccharomyces cerevisiae*, or baker's yeast, as valuable model organism to study protein aggregation disorders, such as Huntington's and Parkinson's disease as well as AD (13). For the latter, this not only included toxicity models for the amyloid beta (A β) peptides (14,15), but also models based on expression of human wild-type Tau or its clinical mutants (16-19). These so-called humanized yeast models recapitulated robustly different important aspects of the Tau pathobiology associated with AD pathology, including Tau hyperphosphorylation, conformational change and Tau self-aggregation (18,19). Given the ease of genetic amenability of yeast, it was possible to modify major pathogenic phospho-epitopes on Tau, like the AD2 (P-Ser₃₉₆/P-Ser₄₀₄) and PG5 (P-Ser₄₀₉) epitopes, simply by deletion of the genes encoding for the protein kinases Mds1 and Pho85, the yeast orthologues of the two most important mammalian Tau kinases, i.e. GSK3- β and cdk5, respectively. Importantly, while the lack of Mds1 coincides with reduced Tau phosphorylation at typical GSK3- β phospho-epitopes, the deletion of Pho85 triggers Tau hyperphosphorylation due to the secondary activation of different protein kinases, including Mds1/GSK3- β (18). Moreover, also in yeast the phosphorylation status of protein Tau correlates with its immunoreactivity to the conformation specific monoclonal antibody (mAb) MC1 and the amount of sarkosyl insoluble Tau, while an inverse correlation is found between Tau-phosphorylation and its ability to bind and stabilize MT *in vitro*. In addition, purification of phosphorylated protein Tau from the yeast *Δ pho85* strain revealed spontaneous filament formation without addition of anionic aggregation-inducing agents as well as the capacity of the hyperphosphorylated subfraction to drastically accelerate Tau aggregation *in vitro* (18). Notably, crude extracts and purified Tau preparations from humanized yeast contained higher molecular weight species, which based on their apparent molecular weight were tentatively

identified as dimers and higher-order oligomers (17,19).

In this study, we used the hyperphosphorylated protein Tau isolated from the *Δpho85* yeast strain to generate novel high affinity Tau mAbs. Their characterization and validation in different model systems and AD brains indicated that the mAbs stained tangle-like structures and neuritic plaques in brain sections and recognized either low-order or higher-order Tau oligomers and presumed prefibrillar structures besides different monomeric Tau isoforms in protein extracts from diseased brain. This allowed to show that Tau oligomerization occurs early in the disease process. Furthermore, the novel mAbs proved to be valuable diagnostic tools, allowing discriminating patients clinically diagnosed with AD or vascular dementia from control persons based on immunodetection of total Tau in CSF samples.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast strains, culture conditions and Tau purification - Yeast strains were obtained from the genome-wide yeast deletion collection and grown according to standard procedures on glucose-containing selective medium. Constructs and protocols for the expression of the longest human Tau isoform (Tau-2N/4R; 441 amino acids (aa)) were as described previously (17-19). The Y18E point mutation was introduced in Tau using the Quickchange II XL Site Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Diegem, Belgium) using the forward and reverse mutagenesis primers 5'-TCACGCTGGGACGGAGGGGTTGGGGGACA-3' and 5'-TGTCCTCCCAACCCCTCCGTCCCAGCGTGA-3'. Native protein Tau-2N/4R was purified from the *Δpho85* yeast strain as reported earlier (18), concentrated using 50kDa centricon filters (Millipore, Overijse, Belgium) and dialyzed overnight against PBS buffer (137mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ and 2mM KH₂PO₄, pH 7.0) at 4°C. For immunizations, the purified tau was activated with glutaraldehyde and coupled to KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) via a two steps enamine covalent coupling to generate KLH-coupled Tau. For the dephosphorylation studies, purified Tau extracted from the *Δpho85* strain was treated with shrimp alkaline phosphatase (Roche, Vilvoorde, Belgium) according to the manufacturer's recommendations (17,18).

Immunizations and hybridoma generation - After determination of the base titer via a pre-immune tail bleeding, 8 BALB/c mice were immunized with 5μg of KLH-coupled Tau to start the immune response, followed by a monthly check-up and four booster immunizations using 5 μg of purified Tau in Complete Freund's Adjuvant, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA, Lonza, Verviers, Belgium) and PBS, respectively. Titers were determined after the IFA immunization via tail bleeding. The spleen of the mouse with the highest titer was removed, washed in PBS + 0.5 % BSA + 2.5 mM EDTA and dissociated using the Gentle MACS dissociator T4171 until single cells were obtained. Cells were collected by centrifugation at 1000 rpm (228 g) for 10 minutes at room temperature, and resuspended in ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) lysis buffer (Lonza, Verviers, Belgium) for 5 minutes at room temperature, in order to remove red blood cells. Hemolysis was stopped by adding PBS + 0.5 % BSA + 2.5 mM EDTA. The remaining cells were collected by centrifugation at 1000 rpm (228 g) for 10 minutes at room temperature, and resuspended in PBS. Spleen cells were added to SP2/0 myeloma cells in a 1/1 ratio. The cell mixture was collected by centrifugation at 1000 rpm (228 g) for 5 minutes at 4°C. Cell fusion was performed using the HVJ-viral fusion kit as described before (20). The resulting cells were sown out over 36 x 96 well plates and selected using HAT medium.

Antibody screening - Antibodies were selected using a sandwich ELISA setup using purified Tau-2N/4R from yeast or bacterial recombinant Tau as coated antigen (0.1 μg/mL). Detection was performed using goat anti-mouse coupled to Horseradish Peroxidase (0.05 μg/mL) (Jackson, Suffolk, UK), urea hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (VWR, Haasrode, Belgium). Plate reading was done in a BIO-Tek SL800 spectrophotometer (Bio Tek, Potton Bedfordshire, UK) at 600 nm.

Biotinylation of monoclonal antibodies - For biotinylation, the antibodies were dialyzed overnight at 4°C to boric acid buffer (113 mM, pH 8.6) in Slide-a-Lyzer cassettes with a molecular weight cut-off of 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, Aalst, Belgium). After dialysis, all antibodies were diluted to a concentration of 0.5 mg/mL. Sulfo-NHS-L-C-biotin (Pierce Thermo Fisher, Aalst,

Belgium) was added to the antibodies at 32/1, 64/1 and 128/1 biotin to antibody ratio and incubated for 1 hour, shaking (400 rpm) at room temperature. The reaction was stopped using an equal volume of 1 M glycine and again incubated for 1 hour, shaking (400 rpm) at room temperature. The biotinylated antibodies were then dialyzed to PBS, overnight at 4°C.

ELISA on bio-peptides - For ELISA using bio-peptides (Proteogenix, Strasbourg, France), Nunc 96-well plates (VWR, Haasrode, Belgium) were coated with streptavidin at a concentration of 5 µg/mL, overnight at 4°C. The plates were subsequently blocked with a PBS + 0.5 % casein buffer solution. Biotinylated peptides were loaded onto the coated plates with a starting concentration of 100.000 pg/mL in PBS followed by a serial dilution of 1/4. The plate was incubated at 37°C for 1 hour. The wells were washed 4 times for 1 minute with PBS + 0.05 % tween-20. The assay was then incubated with biotinylated antibodies ADx215 and ADx201 (0.125 µg/mL in PBS + 0.1% tween-20) for 1 hour at room temperature. Detection was performed using urea hydrogen peroxide and TMB. The plates were scanned using a BIO-Tek SL800 spectrophotometer (Bio Tek, Potton Bedfordshire, UK) at 450 nm (and 630 nm for background). The peptide sequences are given in Tables 1 and 2.

NMR based epitope mapping - ¹⁵N labeled Tau-2N/4R was prepared as described previously (21). The protein was prepared without His-tag and thus purification, after an initial heating step of the bacterial extract at 75°C during 15 minutes, involved one further step of cation exchange chromatography (using a SPFF column, GE Healthcare). The sampling was desalted on a G25 Superdex column in a 50 mM ammonium bicarbonate buffer before estimation of the concentration by absorbance at 280 nm and subsequent lyophilisation of 1 mg aliquots. A sample of 30 µM of Tau-2N/4R in 200 µl buffer (100 mM phosphate pH 6.6, 75 mM NaCl, 1 mM DTT; 5% D₂O) was the reference, and equivalent samples of Tau-2N/4R with 30 µM ADx215 or ADx201 were prepared. The ¹H, ¹⁵N HSQC NMR spectrum was recorded on a 900MHz Bruker Avance III spectrometer equipped with a cryogenic triple resonance probe head. The spectra were acquired with 4k x 512 complex points in t₂, t₁, with 16 scans per increment. Total time for an experiment was 2 hours 50 minutes. Spectra were

zero filled and transformed after multiplication with a squared sine bell apodization function. Signal intensities were determined with the Bruker Topspin 3.1 software.

Determination of the antibody affinity - A BIAcore 3000 instrument (GE Healthcare) was used at 25 °C with a BIAcore CM5 sensor mounted into the system. The sensor was preconditioned by a 1 minute injection at 100 µl/min of 0.1 % SDS, 50 mM NaOH, 10 mM HCl and 100 mM H₃PO₄. As a running buffer HBS-EP buffer was used (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % (w/v) P20). The sample buffer was the system buffer supplemented with 1 mg/ml CMD (Carboxymethyl dextran, Sigma). An antibody capture system was established on the sensor surface. 6500 RU RAM-Fcγ (relative units of Fcγ-fragment RamIgG, GE Healthcare) were immobilized according to the manufacturer's instructions using EDC/NHS chemistry on all four flow cells. The sensor was deactivated using 1 M ethanolamine. Antibodies were captured at 35 nM concentration by a 1 minute injection at 10 µl/min on the flow cells 2 and 3. Flow cell 1 served as a reference. The flow rate was set to 100 µl/min and the 45 kDa Tau analyte in solution was injected for 2 minutes. The dissociation was monitored for 5 minutes. Analytes in solution were injected for 2 minutes in a concentration series of 0 nM, 3 nM, 11 nM, 2x 33 nM, 90 nM and 180 nM. The dissociation was monitored for 5 minutes. The sensor was regenerated by 3 consecutive injections of 10 mM glycine buffer pH 1.7 for 1 min at 100 µl/min. ADx201 showed a biphasic binding behavior for Tau-2N/4R. A 4 parameter sigmoidal model (22) was used to describe an apparent affinity. ADx215 showed a single exponential sensorgram curvature and was evaluated according to a Langmuir fit. Since ADx215 showed a too high complex stability beyond the instruments limits of resolution the dissociation rate K_d was set to 1.0E-05/s.

Immunoblotting and immunohistochemistry - Samples for immunoblotting were prepared and processed as described previously (18,23). Bacterial recombinant His-tagged human Tau-2N/4R (Merck Millipore, Nottingham, UK; rPeptide, Bogart, USA) was used as standard in the initial yeast-based assays. All antibodies used for detection of Tau or reference proteins are listed in Table 3. Dephosphorylation of Tau in yeast extracts

was performed using alkaline phosphatase as previously described (17). For immunohistochemistry we used free-floating coronal sections of 40 μm for THY-Tau22 transgenic mice (23) and human hippocampal sections and paraffin-embedded sections of 7 μm in case of human cortex. Human brain samples were obtained from the brain bank of university hospital in Lille (Table 4). Protocols for tissue treatment, the preparation of the sections and the immunostainings were described previously (23,24). The phospho-dependent Tau antibody AT8 (P-Ser₂₀₂/PThr₂₀₅ Tau) (Pierce, Illkirch Cedex, France) served as a reference antibody for immunohistochemistry.

In situ immunodetection in yeast cells - Exponentially growing *pho85 Δ* yeast cells expressing human Tau 2N/4R were fixed by adding formaldehyde at final concentration of 4 % and incubated for 15 minutes at RT. Cells were then collected and suspended in 0.1 M phosphate buffer pH 6.5 (PBS ;1 M: 32.95 ml K₂HPO₄ 1 M; 67.05 ml KH₂PO₄ 1 M). Formaldehyde was added a second time to a final concentration of 4 %. The suspension was incubated at 30°C for two hours. Cells were then washed in PBS and then in PBSorb (PBS containing 1.2 M sorbitol). For spheroplasting cells were immersed in PBSorb containing β -mercaptoethanol and lyticase (Sigma Aldrich), incubated for 40 minutes at 30°C, and then collected by centrifugation at low speed (200 x g). Next, spheroplasts were added onto a polylysine slide (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) and incubated for 10 minutes at room temperature in a humidified chamber. The liquid was then drained and the slides left to dry. The samples were subsequently submerged in ice-cold methanol and acetone (6 minutes respectively 30 seconds at -20°C) and blocked with PBSB (PB containing BSA at 10 mg/ml) for 30 minutes. After washing, solutions of PBSB containing antibodies TAU5, TOC1 and MC1 at a concentration of 1:200 were added, and the slides incubated overnight at 4°C. The day after the samples were washed with PBSB and dried at room temperature in the dark. Finally, a solution of PBSB containing the secondary antibody Goat anti mouse-Alexa594 (Molecular Probes, concentration 1:200) was added and the slides incubated for two more hours in the dark. In the last step, samples were washed, and mounting medium was added. At any critical step quality of

the spheroplast was checked by microscopy. Analysis was performed with a fluorescence microscope, model DFC420C, Leica.

CSF samples and ELISA detection total Tau - Cerebrospinal fluid (CSF) samples were selected from the Biobank of the Institute Born-Bunge (Antwerp, Belgium). Patients with AD (n=20), vascular dementia (VAD; n=20) and controls (n=20) were included (Table 5). Patients with dementia due to AD were diagnosed according to the National Institute of Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) criteria (25). VAD was diagnosed according to the NINDS-AIREN criteria (26). The inclusion criteria for the control group were: (1) no neurological or psychiatric antecedents and (2) no organic disease involving the central nervous system following extensive clinical examination. The study was approved by the local ethics committee. CSF was obtained by lumbar puncture (LP) at the L3/L4 or L4/L5 interspace. CSF samples were collected in polypropylene vials (Nalgene® Cat No 5000-1020) immediately frozen in liquid nitrogen, and subsequently stored at -80°C until analysis.

For the CSF total Tau ELISA assay we used a peptide comparable to T217/Y18 (Table 1) as calibrator and mixed 25 μl CSF sample or calibrator with 100 μl sample diluent (0.1 % casein in PBS, 0.2 % Triton X-705 (Sigma T70570)) containing the biotinylated detector antibody, ADx215bio. ADx201 was coated as a capture antibody on the plate. Plates were washed 5 times with 400 μl per well wash buffer (0.05 % Tween (Merck S6299684) in PBS) after the 3 hour sample incubation at room temperature. Detection of the biotinylated antibody was done with a ready-to-use streptavidine-peroxidase complex (SA-PolyHRP80, SDT GmbH SP80C) and after another 5 washes, color development was done at room temperature for 30 minutes. The enzymatic reaction was stopped with 100 μl stop solution (0.5 N H₂SO₄) and optical density was measured at OD450 and OD630. Conversion of OD values to pg/ml was done using a 4-parameter logistic curve fitting using the values assigned to the calibrator.

Lipid rafts isolation - The procedure for lipid raft isolation has been described previously (27). Briefly, cortex homogenates were prepared in TBS containing 1 % triton-X-100, phosphatase inhibitors (1 mM Na₃VO₄, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ okadaic acid) and a protease inhibitors mix (Roche, Mannheim,

Germany) and then incubated on ice for 30 minutes. The homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 minutes and supernatants were collected. The total protein concentrations were then determined by using the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). A total amount of 1 mg of protein extract was taken for fractionation and mixed with a sucrose solution to reach 40 % concentration (m/v), then overlaid with 6 ml of 30 % sucrose (m/v) and subsequently with 1.3 ml of 5 % sucrose (m/v). The samples were centrifuged at 100,000 g for 18 hours at 4°C in SW60 rotor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Eight equal fractions were taken and every fraction was precipitated by adding 100 % trichloroacetic acid. Samples were centrifuged and protein pellets were suspended in 2×SDS-PAGE buffer. Equal volumes of particular fractions were analyzed by SDS-PAGE and western blotting.

RESULTS

Generation and characterization of the novel mAbs - The expression of human Tau (longest isoform, 2N/4R; 441 aa) in yeast has been characterized extensively before, thereby showing robust traits found in AD (17-19). In this study, we focused mainly on expression of Tau in the *pho85Δ* strain, which lacks the yeast orthologue of cdk5 and displays extensive hyperphosphorylation of protein Tau and higher levels of sarkosyl-insoluble Tau as compared to the BY4741 wild type strain (18). Using in situ immunodetection with the pan-antibody TAU5, we now show that human Tau is not evenly distributed throughout the cytoplasm in *pho85Δ* cells as the protein forms diffuse foci. With the mAbs MC1 and TOC1, we confirm that also in yeast protein Tau does adopt an aggregation-prone conformation and forms prefibrillar oligomers (Fig. 1A). For the generation of novel mAbs, human Tau was purified from the *Δpho85* strain using anion exchange chromatography.

After ELISA-based selection of the hybridomas, the newly generated Tau-mAbs were further characterized using different methods. As evidenced by SDS-PAGE and Western blot analysis of total protein extracts from the humanized BY4741 wild type yeast strain and the isogenic *Δmds1* and *Δpho85* deletion mutants (Fig.1B), two of the mAbs, i.e. ADx201 and ADx215, recognized monomeric Tau phospho-isoforms in all yeast extracts and provided a

banding pattern in the 65 kDa to 75 kDa molecular weight (M_r) region that was comparable to that obtained with TAU5, which was used as control. Both antibodies also recognized non-phosphorylated bacterial recombinant His-tagged human Tau. Interestingly, ADx215 reacted as well to Tau oligomers found at 100 kDa and above (Fig. 1B). These oligomers were observed at similar levels in extracts of the wild type strain and the *Δmds1* or *Δpho85* kinase-deletion mutants, indicative that their formation is not dependent on the hyperphosphorylation of Tau. Another mAb, i.e. ADx210, had weaker affinity for monomeric Tau isoforms in the extracts of wild type yeast and the *Δmds1* mutant where its detection required overexposure (insert Fig 1B). In contrast, in the extract of the *Δpho85* strain, ADx210 displayed strong reactivity towards monomeric hyperphosphorylated Tau as well as Tau oligomers, thereby suggesting that the formation of these oligomers would require Tau hyperphosphorylation. In line with this, ADx210 did not react to bacterial recombinant Tau, which is not phosphorylated.

To confirm differences in phosphorylation dependency of the generated mAbs, we treated the protein extracts of the *Δpho85* strain with alkaline phosphatase (AP) for different time intervals, and again checked the immunoreactivity though with lower exposure times in order to be able to distinguish the different monomeric phospho-isoforms. As shown for ADx201 and ADx215 (Fig. 1C), the AP treatment resulted in the disappearance of the highest monomeric Tau phospho-isoforms, seen on Western blot at an approximate M_r around 75 kDa, and in an increase of less phosphorylated isoforms running at lower molecular weight. Similar to the pan-Tau antibody TAU5, the overall immunoreactivity of ADx201 or ADx215 remained equal in all samples examined. In contrast, an increased immunoreactivity was observed after prolonged AP treatment with the commercially available antibody BT2, specifically recognizing non-phosphorylated protein Tau (28), while a gradual decreased immunoreactivity was seen with the Thr-181 phospho-specific antibody AT270 (29). Hence, these data suggest that ADx201 and ADx215 do not have phospho-dependency.

Although AP treatment resulted in the appearance of intermediate bands running between 75 kDa and 85 kDa, the major fraction of the Tau

oligomers detected with ADx215 were resistant to AP treatment and persisted even after 2 hours of treatment at 37°C. In contrast, the Tau oligomers detected with ADx210 steadily diminished upon prolonged AP treatment and, interestingly, this coincided with the appearance of monomeric Tau isoforms. The observation of a gradual decrease of ADx210-positive oligomeric Tau upon dephosphorylation corroborates a link between Tau-phosphorylation and Tau self-assembly. Moreover, these data nicely illustrate that oligomers detected by ADx210 have different properties than those detected by ADx215. Note, however, that there is no inverse correlation with the disappearance of oligomers and the appearance of the monomeric forms as detected by ADx210, while such correlation is found for the appearance of non-phospho Tau based on staining with BT2. This suggests that monomeric Tau detected by ADx210 still has some degree of phosphorylation and thus that the ADx210 epitope may be destroyed upon further dephosphorylation. This could explain in part the lower affinity of ADx210 for Tau-monomers.

Determination of the mAb epitopes - Different strategies were applied to determine the epitopes of ADx201 and ADx215. First, for the phospho-independent mAbs, the use of recombinant Tau-fragments, covering different regions of protein Tau (30), allowed to roughly position the epitope for ADx201 within the proline-rich region of Tau, and that of ADx215 closer to the N-terminus. Next, different sandwich ELISA formats were performed, whereby ADx201 and ADx215 competed with previously characterized commercial and non-commercial antibodies for binding of the recombinant protein Tau fragments. This approach successfully determined the approximate epitope for ADx201 as it turned out that the AT120 antibody (30) inhibited ADx201 reactivity. This was confirmed by using synthetic biotinylated peptides that contained the epitope P₂₁₈PTREPK₂₂₄ (Fig. 2A; Table 1). In contrast to ADx201, no significant competition was found when ADx215 was used in the sandwich ELISA assays, indicative that this mAb recognized a novel epitope. Therefore, the epitope was mapped by scanning the N-terminus of Tau using a series of small overlapping peptides (Table 2). This approach eventually narrowed the binding site of ADx215 to G₁₆TYGLGDRK₂₄ (Fig. 2A), an epitope that is

specific for primates and not present in Tau of bovine or rodents.

The ADx201 epitope is just adjacent to the Thr₂₁₇ residue, a known phospho-site of Tau associated to AD that is targeted by different kinases (4). To test whether the phosphorylation of Thr₂₁₇ influences the binding of ADx201, we performed an ELISA using synthesized peptides, one of which contained the phosphorylated Thr₂₁₇ (Table 1). As shown, phosphorylation of the latter had only a minimal effect on ADx201 binding (Fig. 2B), thereby confirming the results obtained with Tau-dephosphorylation. Since the peptides used also contained the ADx215 epitope, the relative affinities of both mAbs could be compared. As expected, the affinity of ADx215 was better than that of ADx201 with EC₅₀ values for the non-phosphorylated peptide of 7.99 ± 1.79 pg/ml and 23.26 ± 2.58 pg/ml, respectively. To document this in more detail, the apparent K_D values were also calculated based on Biacore biomolecular interaction assays using full length recombinant bacterial Tau-2N/4R. This revealed apparent K_D values of 92pM for ADx201 and 14pM for ADx215.

In another ELISA, we tested the phosphorylation-dependency of ADx215 using peptides modified on Tyr₁₈ (Table 1). This residue is a known phospho-site targeted by the Src non-receptor tyrosine kinase family member, Fyn, that increases during disease progression (31). However, consistent with the Tau-dephosphorylation data, ADx215 shows preference for non-phosphorylated Tyr₁₈ (Fig. 2C). Furthermore, in contrast to a peptide containing a Tyr₁₈-Phe₁₈ substitution, ADx215 did not recognize a peptide containing a Tyr₁₈-Glu₁₈ substitution or the equivalent full length phospho-mimic Tyr₁₈-Glu₁₈ Tau protein when this was expressed in yeast (Fig. 2C and data not shown). In this context, it is interesting to note that while the yeast genome does not encode for bona fide tyrosine-kinases, comparative Western blot analysis with the phospho-Tyr₁₈ antibody 9G3 (31) revealed Tyr₁₈ to be targeted by the dual specificity kinase Yak1, the yeast orthologue of human Dyrk1 (Fig. 2D). Consistently, immunodetection with ADx215 yielded different Tau phospho-isoform profiles in wild type cells and cells lacking Yak1.

We could not use competitive sandwich ELISA or peptide scanning to determine the exact epitope

of ADx210 because this mAb has a higher affinity for oligomeric Tau than for monomeric Tau and thus apparently recognizes a non-linear epitope. Nonetheless, some of the data described below suggest that the ADx210 epitope most likely includes exposed sequences of the proline-rich region.

Finally, we used a recently developed NMR assay to directly map the epitope on full-length Tau (32). Hereby, the ^1H , ^{15}N HSQC spectrum of Tau-2N/4R when isolated in solution is compared to its spectrum when in a 1:1 complex with the antibody. Immobilization of the epitope at the surface of the large antibody thereby changes the NMR properties of the amide functions involved, leading to line broadening and concomitant disappearance of the epitope from the spectrum. For the ADx201 epitope, the relative intensity profile shows a pronounced intensity dip between Ser₂₁₄ and Ser₂₃₅ (Fig. 3A), whereas addition of the ADx215 antibody causes signal disappearance in the very N-terminal part of the protein, with detectable intensity only starting from Asp₂₅ (Fig. 3B). We cannot exclude that a couple of residues have their signal broadened because of the steric hindrance due to the antibody surface. Nonetheless, the NMR results confirm in a direct manner the epitopes obtained from the previous experiments.

Validation of the mAbs in samples of transgenic rodents and AD brains - To further validate the generated mAbs in mammalian brain, we performed immunoblotting using hippocampal homogenates from 3-month old wild type mice and 3- or 12-months-old THY-Tau22 transgenic mice (Fig. 4) that showed, respectively, weak or severe Tau pathology (23). ADx201 and ADx210 recognized a 55 kDa endogenous mouse Tau isoform in samples of non-transgenic mice. ADx215 failed to detect this isoform, which is consistent to the finding that this mAb recognized a primate-specific epitope. In protein extracts of the THY-Tau22 mice, all mAbs reacted well to monomeric human Tau isoforms running at approximately 60 kDa to 62 kDa as well as some breakdown products. In addition, ADx215 easily detected Tau oligomers with an approximate Mr of 115 kDa, which may correspond to Tau dimers. ADx215 also recognized a number of discrete intermediate bands around 75 kDa and 85 kDa. These oligomers and intermediate bands were hardly recognized by ADx201 and ADx210. While

there was a slight decrease in the overall intensity of ADx215-positive oligomers and monomeric Tau isoform as the transgenic mice grew older, their ratio did not appear change significantly with increasing age. This is interesting since previous characterization of the THY-Tau22 transgenic mice clearly documented Tau hyperphosphorylation to increase dramatically with age (23). Hence, it appears that these ADx215-positive oligomers may be formed prior to severe Tau hyperphosphorylation and thus that there is no strict correlation between Tau hyperphosphorylation and the formation of these low-order oligomers.

Next, we analyzed homogenates obtained from post-mortem cortex biopsies of healthy persons and AD patients at Braak stages 4, 5 and 6 (Table 4). Besides recognizing various monomeric Tau isoforms in the different samples tested, the three mAbs stained Tau oligomers specifically in the homogenates of AD diseased brains (Fig. 5A, B). Indeed, ADx215 recognized mainly low-order Tau oligomers of about 130 kDa and lower intermediate bands. ADx201 and ADx210, on the other hand, displayed a quite different pattern since they had the capacity to visualize additional folding intermediates, higher-order oligomers and presumed prefibrillary structures of Tau. Notably, Tau oligomers were already present at Braak stage 4 (Fig. 5B), suggesting that they mark an earlier stage in AD pathology. This corroborates previously reported data (8,9).

Tau dimers are phosphorylated in the N-terminal half - Our data on analysis of transgenic mice and human brain samples suggested that the formation of oligomers may precede severe Tau hyperphosphorylation, meaning that oligomerization would already start when Tau is aberrantly phosphorylated at only a few specific sites and that further hyperphosphorylation of Tau would subsequently drive low-order oligomers to grow into higher-order oligomeric structures. To test this scenario in more detail, we performed Western blot analysis with cortex homogenates prepared from healthy brain and AD patient brain at Braak stage 5. We used different antibodies to determine which of those would preferentially detect the 130 kDa oligomers or the higher-order oligomers. As shown in Fig. 6A, TAU1, a mAb specific for dephosphorylated Tau in the region between amino acids 189 to 207, failed to detect Tau oligomers, indicative that oligomers are indeed

phosphorylated in this region. In contrast, the mAb HT7, which recognizes an epitope formed by the amino acids 159 to 163 independently of the phosphorylation status, readily visualized 130 kDa oligomers in the AD brain sample and thereby displayed a profile similar as that obtained by ADx215. Also AT180 and 12E8 clearly visualized these 130 kDa oligomers in the AD sample and since these mAbs recognize the phospho-epitopes P-Ser₂₃₁/P-Thr₂₃₅ and P-Ser₂₆₂/P-Ser₃₅₆, respectively, this observation confirms that the 130kDa oligomers contain phosphorylated Tau. As mentioned above, ADx215 shows preference for non-phosphorylated Tyr₁₈ and therefore we also included immunodetection with the phospho-Tyr₁₈-specific mAb 9G3. As shown, 9G3 reasonably stained Tau monomeric isoforms and oligomers of an approximate M_r of 100 kDa and 150 kDa in both the healthy and AD brain sample, but it did not stain the 130 kDa oligomers. When using mAbs that recognize phospho-epitopes C-terminal of the microtubule-binding repeat (MTBR) region, such as AD2/PHF1 (P-Ser₃₉₆/P-Ser₄₀₄; Fig. 6A) or P-S₃₉₆ (P-Ser₃₉₆; Fig. 6B) a completely different pattern was obtained. This pattern more closely resembles that obtained with ADx201/ADx210 (see Fig. 5A, B) and is characterized by the detection of additional folding intermediates and higher-order oligomeric structures in the AD sample. Note that similar to 9G3, AD2 also recognized oligomers of approximately 100 kDa and 150 kDa in the healthy control sample. Combined, these data suggest that the ADx215-positive 130 kDa oligomers are typified by exposure of different phospho-epitopes N-terminal of, and in the MTBR region, while the higher-order oligomeric structures additionally expose phospho-epitopes in the Tau C-terminus.

To evaluate whether differences in Tau C-terminal phosphorylation may explain, at least in part, why we were unable to detect higher-order Tau oligomeric structures in the mice samples (Fig. 4), as opposed to the human AD samples (Fig. 5A, B), we compared the degree of Ser₃₉₆ Tau phosphorylation in cortex homogenates of a healthy person, an AD patient at Braak stage 5 and a THY-Tau22 transgenic mouse sacrificed at 12 months of age. As shown, P-Ser₃₉₆ reacted very strong with Tau monomers and higher-order Tau oligomeric structures in the sample of the AD patient, but only faintly detected Tau monomers and no oligomers in the sample of the transgenic mice and this despite

the fact that the levels of the Tau monomers in the mouse sample were significantly higher as evidenced by immunodetection with ADx201 (Fig. 6B). The latter was expected since the THY-Tau22 mice expresses 10 copies of the human Tau transgene (23). Thus, in comparison to human AD brain, Tau is significantly less phosphorylated in its C-terminus in brain of the THY-Tau22 transgenic mice.

Finally, since Tau oligomers are suspected to have an important role in disease propagation (11) and since previous studies indicated that phosphorylated Tau accumulated in detergent resistant membrane domains or lipid rafts during disease progression (33), we evaluated whether the 130 kDa oligomers would preferentially interact with these lipid domains. To this end, we separated the insoluble membranes of AD cortex homogenates at Braak stage 6 and performed fractionations by flotation on a sucrose gradient. Besides ADx215 and an antibody raised against the lipid raft marker flotillin-1, we also used polyclonal antibodies raised against the very N-terminus of protein Tau, i.e. M19G, or the C-terminus of protein Tau, i.e. TauCter (34). As shown, the study clearly confirmed the accumulation of Tau monomeric isoforms and the 130 kDa oligomers in the lipid raft enriched fractions (Fig. 6C). Interestingly, the two polyclonal antibodies TauCter and M19G additionally detected an 85 kDa Tau folding variant, which is mainly recovered in the triton-soluble fractions.

Performance of the mAbs for immunohistochemistry - The performance of the mAbs for immunohistochemistry was tested on sections of the hippocampal region of 12-months-old THY-Tau22 transgenic mice brains as well as on hippocampal and cortical sections of advanced AD patients (Braak stage 6). Here, we used both the native mAbs ADx201, ADx210 and ADx215 as well as biotinylated counterparts, while the phospho-dependent antibody AT8 served as control. As shown for mouse brain (Fig. 7), all mAbs robustly stained tangle-like structures that appeared as a dense perinuclear rim in neurons of the CA1 pyramidal layer, the CA3 field and the dentate gyrus. With ADx215 positive neurons were also clearly observed in the lateral posterior nucleus of the thalamus. In human brain, the different mAbs densely stained neurons with tangle-like structures in both the hippocampus (Fig. 8). In the

cortex, tangle-like structures were only detected with ADx201 and ADx210 (Fig. 8) and not with ADx215 because this mAb gave a very high background as compared to the labeling obtained with the other mAbs (data not shown). Interestingly, ADx201 and ADx210 also labeled neuritic plaques in the human cortex.

Diagnostic potential of the mAbs - Having validated the generated mAbs *in vivo*, we next completed a pilot study to evaluate their potential use for the quantitative detection of Tau in CSF and the ability to discriminate between healthy persons and patients suffering from AD and vascular dementia (VAD) (Table 5). To this end, we performed ELISA using ADx201 as capturing antibody and biotinylated ADx215 as detector antibody. For optimal comparison, we also included a calibrator peptide allowing to convert OD values into concentration values (pg/ml). Consistent with previously reported data (35-37), the levels of total Tau were significantly increased in samples of VAD and AD patients as compared to those of the healthy controls (Fig. 9). Using ROC (receiver operating characteristic) analysis, the area under the curve for AD versus controls is 0.87 (with a confidence interval set at 95% ranges were 0.75-0.98) and at a cut-off level of 404 pg/ml, the sensitivity and specificity were 80%. Thirteen of the twenty VAD patients had CSF Tau levels below this cut-off level, meaning 65% specificity as compared to AD.

DISCUSSION

It is well established that the deposition of protein Tau into NFTs correlates with neuronal cytopathology in AD. This self-assembly of the protein is believed to be triggered by its hyperphosphorylation and concomitant conformational changes (4). The latter is supported by several studies, including CSF based studies indicating a correlation between phospho-Tau and cognitive decline in patients with mild cognitive impairment as well as the neocortical neurofibrillary pathology in AD (38,39). Despite of these correlations, it is still a matter of debate whether or not NFTs should be considered as toxic agents in AD and other tauopathies, especially since more and more data suggest NFTs to be the inert or even protective end-stage deposits in a cascade where soluble oligomeric and prefibrillar forms of Tau may represent the true pathogenic entities (see

(40,41) and references therein). The interest in these oligomeric and prefibrillar forms of Tau has gained further momentum by the data obtained with Tau oligomer-specific antibodies and the presumed role of prefibrillar Tau oligomers in the propagation of Tau pathology during disease progression (8,9,11,12). Similar as for A β oligomers, Tau oligomers were suggested to act as seeds that are able to recruit and drive further oligomerization of monomeric Tau isoforms. In addition, the formation of the seeding oligomers was suggested to be influenced by post-translational modifications, including aberrant Tau phosphorylation (42).

The generation of monoclonal antibodies against different characteristics of Tau pathology has long been based on the extraction of NFT from AD brains and on recombinant Tau purified from *E.coli* or synthetic peptides (8,10,12). Studies on oligomerization relied on chemically treated recombinant Tau, or require preformed aggregates as seeding material (43,44). Such studies generate Tau dimers and trimers of various size ranging from an apparent 110 kDa to 180 kDa (8,9,12,45). The humanized yeast model discussed here offers an alternative *in cellulo* system for the production of post-translational modified mono- and oligomeric Tau, without the need of additional cross-linkers or seeding materials. In line with our previous studies, the purification of human Tau from the yeast model generates relatively pure Tau bearing many of the post-translational modifications typifying the protein in AD (17-19). Based on this, we generated an array of new high affinity mAbs with differential phospho- and oligo-specificity. Indeed, besides monomeric Tau, two of the mAbs, i.e. ADx201 and ADx210, have affinity towards higher-order oligomeric Tau structures, while the third, i.e. ADx215, recognizes low-order Tau oligomers with an apparent size of 130 kDa that may represent Tau dimers. It has been suggested that Tau oligomers consist of an antiparallel intermolecular interaction of the MTBR domains (9,46). Also, the oxidation of cysteine residues and the formation of intramolecular or intermolecular disulfide bridges was proposed as determining factor for oligomer formation and PHF assembly whereby intramolecular bonds would lead to compacted monomers that do not further assemble, while intermolecular bonds would give rise to stabilized dimers and thereby accelerate further

oligomerization (47). Interestingly, our previous studies in the yeast already revealed the presence of oligomers with an apparent M_r of 130 kDa in yeast extracts, which then could only be detected under non-reducing SDS-PAGE conditions (19). Hence, it remains to be clarified whether those oligomers correspond to the ADx215-positive oligomers detected in the current studies, since these are visualized under standard SDS-PAGE conditions with sampling buffer containing DTT as reducing agent.

In general, the data produced with ADx215 correspond well to those obtained in recent studies that used the oligomers-specific mAbs T22 and TOC1. Similar to ADx215, T22 and TOC1 also revealed significantly increased levels of low-order Tau oligomers in samples of AD patients as compared to healthy controls. Co-localization of T22- and TOC1-positive inclusions with early markers of NFT evolution demonstrated increased prefibrillar Tau oligomerization to mark a very early disease stage (8,9). Furthermore, while we found the ADx215-positive oligomers to be phosphorylated mainly in the N-terminal part and MTBR domain of Tau, the study with T22 nicely documented oligomerization to start once Tau is phosphorylated at Thr₂₃₁ (8). Phosphorylation of Thr₂₃₁ by Gsk-3 β is known to prevent Tau to bind microtubules (4) and to relieve of the inhibitory activity of the N-terminus over the C-terminus of Tau as to allow kinases such as Gsk-3 β to access and subsequently phosphorylate Tau at other epitopes (48). Indeed, monomeric Tau is thought to adopt a so-called ‘paperclip’ conformation when in solution, where the C-terminal end of Tau folds over the MTBR domain and the N-terminus folds back to come in close proximity to the C-terminus (49,50). It is conceivable that the opening of this paperclip conformation is a first essential step for Tau oligomerization. However, it remains to be studied in more detail whether this relies solely on phosphorylation of Thr₂₃₁ or requires the additional phosphorylation of some of the other sites we identified by phospho-epitope mapping in the ADx215-positive oligomers. In our opinion, these additional phosphorylation events may help to stabilize the oligomers while being formed. This idea comes from the observation that the ADx215-positive oligomers are only weakly detected and of lower molecular weight in healthy brain as compared to AD brain, and this indeed suggests

differences in the phosphorylation status and stability of the Tau oligomers between both conditions.

Besides its supposed importance to initiate the formation of Tau oligomers, the opening of the paperclip and exposure of the Tau N-terminus has additional consequences. Recent studies have shown that the N-terminus harbors a phosphatase-activating domain (PAD) between the residues Ala₂-Tyr₁₈ that, when exposed in Tau filaments, activates protein phosphatase 1 and GSK3 and results in the phosphorylation of kinesin light chains, the dissociation of kinesin from its cargo, and the disruption of fast axonal transport (FAT) (51,52). PAD overlaps in part with the minimal epitope of ADx215 and thus it appears that PAD might be exposed in the ADx215-positive oligomers detected in our present study. Moreover, a follow-up study recently showed that phosphorylation or pseudophosphorylation of Tyr₁₈, and to a lesser extent of Tyr₂₉, abrogates the inhibitory effect of PAD on FAT (53), while we found that Tyr₁₈ phosphorylation disrupts Tau detection by ADx215. Of particular importance are the immunohistochemical studies that used the anti-phospho-Tyr₁₈ mAb 9G3 and the PAD-specific mAb TNT1 to classify increased PAD exposure as early pathogenic event occurring before and more frequently than Tyr₁₈ phosphorylation in the path of NFT formation in AD (53). This led the authors to suggest that Tyr₁₈ phosphorylation is part of a compensatory mechanism aiming to reduce the toxicity associated to exposure of the Tau N-terminus. Whether exposure of PAD in the ADx215-positive oligomers already affects FAT and thus defines these oligomers as soluble toxic entities, needs to be examined in more detail because an inhibitory effect of PAD on FAT has so far only been observed with Tau filaments (51,53).

Concerning the Tau C-terminus, we observed that exposure of phospho-epitopes in this region comes along with the appearance of higher-order Tau oligomers and prefibrillary structures. There are several observations pointing towards an important role of Tau C-terminal phosphorylation in determining the Tau polymerization propensity and Tau toxicity. Similar as with the N-terminus, pseudophosphorylation of Ser₃₉₆ and Ser₄₀₄ in the AD2/PHF1 epitope of Tau was shown to move the C-terminal domain away from the MTBR region and thus to open the paperclip configuration.

However, the combined pseudophosphorylation in N- and C-terminal epitopes was found to result in compaction of the paperclip, such that the N-terminus approaches the MTBR region to form the conformation-dependent MC1/Alz50 epitope (49). The latter defines a pathogenic conformation of Tau that enhances its assembly into paired helical filaments (54). Consistently, we previously reported on a strong correlation between phosphorylation of Tau at the AD2/PHF1 and PG5 (P-Ser₄₀₉) epitopes, the immunoreactivity with the MC1 antibody and the level of sarkosyl-insoluble Tau in Tau-expressing yeast cells and demonstrated the capacity of this MC1-positive fraction to seed spontaneous Tau polymerization *in vitro* (18,19). Similar correlations have been reported based on studies in transgenic mice (55). In human brain, the AD2/PHF1 and PG5 phospho-epitopes and the MC1/Alz50 conformational epitope are established markers for tauopathy as seen in AD (56-59) and several studies confirmed the appearance of the MC1/Alz50 conformation to precede the formation of PHF and NFT (60-62). It is therefore tempting to speculate that C-terminal phosphorylation of Tau and the establishment of the MC1/Alz50 epitope define the transition between Tau low-order and higher-order oligomeric structures. Another important aspect is disease propagation by the secretion and uptake of Tau-oligomers that act as seeding templates for Tau misfolding and toxicity (63). In this context, we recently developed a lentiviral-mediated rat model that allowed us to monitor the spreading of Tau pathology from the CA1 region of the hippocampus to other brain areas, including the most distant ones (64,65). We then already used ADx215 as marker to demonstrate that the propagating Tau entity was not phosphorylated at Tyr₁₈ (65). Since ADx215 does not recognize higher-order oligomers, the data favor that Tau monomers or the 130 kDa low-order oligomers are propagating Tau entities. In line with this are the data from a study that tested the ability of anti-Tau mAbs to block the trans-cellular seeding activity when infused into the lateral ventricle of P301S transgenic mice (11). Here the most potent mAb was HJ8.5, which recognizes an

N-terminal epitope between Asp₂₅ and Thr₃₀. Since this epitope is just adjacent to the minimal epitope identified for ADx215, it indeed suggests that exposure of the N-terminus may be crucial for seeding. Hence, it would be useful to confirm the ability of ADx215 to block the Tau seeding and propagation activity as this would make it a good candidate for immune therapy.

Finally, we tested the use of our novel high-affinity mAbs for diagnostics and documented that the combined use of ADx201 and ADx215 as capturing and detecting antibodies, respectively, have the potential to discriminate patients clinically diagnosed with VAD or AD from healthy persons based on increased levels in CSF of total Tau. This is in agreement with previously published studies (35-37). Recently, improved characterization of CSF Tau using reverse-phase high performance liquid chromatography lead to exploring five total Tau assays side by side and the two assays containing N-terminal sequences exhibited the most significant differences between AD and control CSF (66). This suggests that the use of mAbs such as ADx215, recognizing the N-terminus of Tau, may indeed improve diagnostic accuracy. That ADx215 might also recognize a presumed propagating Tau seeding conformation only adds relevance for its discriminative capacity between the healthy and diseased persons.

In conclusion, we expressed human Tau-2N/4R in *pho85Δ* yeast cells and used the purified protein as antigen to generate novel mAbs. These mAbs recognize specific Tau oligomeric species in diseased brain besides monomeric Tau upon Western blot analysis and they have capacity to stain tangle-like structures and neuritic plaques in diseased brain sections upon immunohistochemical analysis. Moreover, the mAbs proved to be ideal tools to discriminate patients suffering from AD or VAD from healthy controls using CSF-based ELISA. As such, our studies unequivocally demonstrate that Tau must adopt pathologically relevant conformations when expressed in yeast and illustrates how the use of this simple eukaryotic model organism can contribute in the quest to understand the etiology of tauopathies.

REFERENCES

1. Buée, L., Bussiere, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **33**, 95-130
2. Irwin, D. J., Cohen, T. J., Grossman, M., Arnold, S. E., Xie, S. X., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2012) Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Brain* **135**, 807-818
3. Wang, Y., Garg, S., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2010) Proteolytic processing of tau. *Biochem Soc Trans* **38**, 955-961
4. Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M. L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., Schraen-Maschke, S., and Buée, L. (2008) Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* **5**, 207-224
5. Irwin, D. J., McMillan, C. T., Toledo, J. B., Arnold, S. E., Shaw, L. M., Wang, L. S., Van Deerlin, V., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., and Grossman, M. (2012) Comparison of cerebrospinal fluid levels of tau and Abeta 1-42 in Alzheimer disease and frontotemporal degeneration using 2 analytical platforms. *Arch Neurol* **69**, 1018-1025
6. Le Bastard, N., Coart, E., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Martin, J. J., and Engelborghs, S. (2013) Comparison of two analytical platforms for the clinical qualification of Alzheimer's disease biomarkers in pathologically-confirmed dementia. *J Alzheimers Dis* **33**, 117-131
7. Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., Wszolek, Z., Ashe, K., Knight, J., Dickson, D., Andorfer, C., Rosenberry, T. L., Lewis, J., Hutton, M., and Janus, C. (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci* **27**, 3650-3662
8. Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G. R., and Kaye, R. (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J* **26**, 1946-1959
9. Patterson, K. R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N. M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J. F., Philibert, K., Glucksman, M. J., and Binder, L. I. (2011) Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* **286**, 23063-23076
10. Ward, S. M., Himmelstein, D. S., Lancia, J. K., Fu, Y., Patterson, K. R., and Binder, L. I. (2013) TOC1: Characterization of a Selective Oligomeric Tau Antibody. *J Alzheimers Dis* **37**, 593-602
11. Yanamandra, K., Kfoury, N., Jiang, H., Mahan, T. E., Ma, S., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Diamond, M. I., and Holtzman, D. M. (2013) Anti-Tau Antibodies that Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition In Vivo. *Neuron* **80**, 402-414
12. Castillo-Carranza, D. L., Gerson, J. E., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Lasagna-Reeves, C. A., and Kaye, R. (2014) Specific Targeting of Tau Oligomers in Htau Mice Prevents Cognitive Impairment and Tau Toxicity Following Injection with Brain-Derived Tau Oligomeric Seeds. *J Alzheimers Dis* **40** suppl 1, S97-S111
13. Winderickx, J., Delay, C., De Vos, A., Klinger, H., Pellens, K., Vanhelmont, T., Van Leuven, F., and Zabrocki, P. (2008) Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 1381-1395
14. D'Angelo, F., Vignaud, H., Di Martino, J., Salin, B., Devin, A., Cullin, C., and Marchal, C. (2013) A yeast model for amyloid-beta aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. *Dis Model Mech* **6**, 206-216

15. Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J. L., Matlack, K. E., Chung, C. Y., Baru, V., Shulman, J. M., Parrado, A., Bevis, B. J., Valastyan, J. S., Han, H., Lindhagen-Persson, M., Reiman, E. M., Evans, D. A., Bennett, D. A., Olofsson, A., DeJager, P. L., Tanzi, R. E., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., and Lindquist, S. (2011) Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* **334**, 1241-1245
16. De Vos, A., Anandhakumar, J., Van den Brande, J., Verduyck, M., Franssens, V., Winderickx, J., and Swinnen, E. (2011) Yeast as a model system to study tau biology. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, 428970
17. Vandebroek, T., Terwel, D., Vanhelmont, T., Gysemans, M., Van Haesendonck, C., Engelborghs, Y., Winderickx, J., and Van Leuven, F. (2006) Microtubule binding and clustering of human Tau-4R and Tau-P301L proteins isolated from yeast deficient in orthologues of glycogen synthase kinase-3beta or cdk5. *J Biol Chem* **281**, 25388-25397
18. Vandebroek, T., Vanhelmont, T., Terwel, D., Borghgraef, P., Lemaire, K., Snauwaert, J., Wera, S., Van Leuven, F., and Winderickx, J. (2005) Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. *Biochemistry* **44**, 11466-11475
19. Vanhelmont, T., Vandebroek, T., De Vos, A., Terwel, D., Lemaire, K., Anandhakumar, J., Franssens, V., Swinnen, E., Van Leuven, F., and Winderickx, J. (2010) Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. *FEMS Yeast Res* **10**, 992-1005
20. Kato, Y., Jin, G., Kuan, C. T., McLendon, R. E., Yan, H., and Bigner, D. D. (2009) A monoclonal antibody IMA1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 547-551
21. Lippens, G., Wieruszkeski, J. M., Leroy, A., Smet, C., Sillen, A., Buée, L., and 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
22. Gottschalk, P. G., and Dunn, J. R. (2005) The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal Biochem* **343**, 54-65
23. Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Begard, 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
24. Delacourte, A., and Defossez, A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* **76**, 173-186
25. McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Jr., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., and Phelps, C. H. (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **7**, 263-269
26. Roman, G. C., Tatemichi, T. K., Erkinjuntti, T., Cummings, J. L., Masdeu, J. C., Garcia, J. H., Amaducci, L., Orgogozo, J. M., Brun, A., Hofman, A., and et al. (1993) Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* **43**, 250-260
27. Buttner, S., Delay, C., Franssens, V., Bammens, T., Ruli, D., Zaunschirm, S., de Oliveira, R. M., Outeiro, T. F., Madeo, F., Buée, L., Galas, M. C., and Winderickx, J. (2010) Synphilin-1 enhances alpha-synuclein aggregation in yeast and contributes to cellular stress and cell death in a Sir2-dependent manner. *PLoS One* **5**, e13700
28. Rosner, H., Rebhan, M., Vacun, G., and Vanmechelen, E. (1994) Expression of a paired helical filament tau epitope in embryonic chicken central nervous system. *Neuroreport* **5**, 1164-1166

29. 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
30. Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Davidsson, P., Van Kerschaver, E., Van Der Perre, B., Sjogren, M., Andreasen, N., and Blennow, K. (2000) Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett* **285**, 49-52
31. Bhaskar, K., Hobbs, G. A., Yen, S. H., and Lee, G. (2010) Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* **36**, 462-477
32. Amniai, L., Lippens, G., and Landrieu, I. (2011) Characterization of the AT180 epitope of phosphorylated Tau protein by a combined nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopy approach. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 743-746
33. Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L. H., Wen-Lang, L., Dickson, D. W., Murakami, T., Matsubara, E., Abe, K., Ashe, K. H., and Younkin, S. G. (2004) Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **24**, 3801-3809
34. Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Watzet, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* **10**, 2143-2155
35. Olsson, A., Vanderstichele, H., Andreasen, N., De Meyer, G., Wallin, A., Holmberg, B., Rosengren, L., Vanmechelen, E., and Blennow, K. (2005) Simultaneous measurement of beta-amyloid(1-42), total tau, and phosphorylated tau (Thr181) in cerebrospinal fluid by the xMAP technology. *Clin Chem* **51**, 336-345
36. Sjogren, M., Davidsson, P., Gottfries, J., Vanderstichele, H., Edman, A., Vanmechelen, E., Wallin, A., and Blennow, K. (2001) The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. *Dement Geriatr Cogn Disord* **12**, 257-264
37. Hertze, J., Minthon, L., Zetterberg, H., Vanmechelen, E., Blennow, K., and Hansson, O. (2010) Evaluation of CSF biomarkers as predictors of Alzheimer's disease: a clinical follow-up study of 4.7 years. *J Alzheimers Dis* **21**, 1119-1128
38. Buerger, K., Ewers, M., Andreasen, N., Zinkowski, R., Ishiguro, K., Vanmechelen, E., Teipel, S. J., Graz, C., Blennow, K., and Hampel, H. (2005) Phosphorylated tau predicts rate of cognitive decline in MCI subjects: a comparative CSF study. *Neurology* **65**, 1502-1503
39. Buerger, K., Ewers, M., Pirttila, T., Zinkowski, R., Alafuzoff, I., Teipel, S. J., DeBernardis, J., Kerkman, D., McCulloch, C., Soininen, H., and Hampel, H. (2006) CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* **129**, 3035-3041
40. Cowan, C. M., and Mudher, A. (2013) Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front Neurol* **4**, 114
41. Iqbal, K., Gong, C. X., and Liu, F. (2013) Hyperphosphorylation-induced tau oligomers. *Front Neurol* **4**, 112
42. Gerson, J. E., and Kaye, R. (2013) Formation and propagation of tau oligomeric seeds. *Front Neurol* **4**, 93
43. Dinkel, P. D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., and Margittai, M. (2011) Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. *Biochemistry* **50**, 4330-4336
44. Guo, J. L., and Lee, V. M. (2011) Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J Biol Chem* **286**, 15317-15331

45. Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Guerrero-Muoz, M. J., Jackson, G. R., and Kaye, R. (2010) Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry* **49**, 10039-10041
46. 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
47. Barghorn, S., and Mandelkow, E. (2002) Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **41**, 14885-14896
48. Lin, Y. T., Cheng, J. T., Liang, L. C., Ko, C. Y., Lo, Y. K., and Lu, P. J. (2007) The binding and phosphorylation of Thr231 is critical for Tau's hyperphosphorylation and functional regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem* **103**, 802-813
49. Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2008) Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem* **283**, 32066-32076
50. Jeganathan, S., von Bergen, M., Brützlach, H., Steinhoff, H. J., and Mandelkow, E. (2006) Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* **45**, 2283-2293
51. Kanaan, N. M., Morfini, G. A., LaPointe, N. E., Pigino, G. F., Patterson, K. R., Song, Y., Andreadis, A., Fu, Y., Brady, S. T., and Binder, L. I. (2011) Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J Neurosci* **31**, 9858-9868
52. LaPointe, N. E., Morfini, G., Pigino, G., Gaisina, I. N., Kozikowski, A. P., Binder, L. I., and Brady, S. T. (2009) The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J Neurosci Res* **87**, 440-451
53. Kanaan, N. M., Morfini, G., Pigino, G., LaPointe, N. E., Andreadis, A., Song, Y., Leitman, E., Binder, L. I., and Brady, S. T. (2012) Phosphorylation in the amino terminus of tau prevents inhibition of anterograde axonal transport. *Neurobiol Aging* **33**, 826 e815-830
54. Gamblin, T. C., Berry, R. W., and Binder, L. I. (2003) Tau polymerization: role of the amino terminus. *Biochemistry* **42**, 2252-2257
55. Sahara, N., Lewis, J., DeTure, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Hutton, M., and Yen, S. H. (2002) Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility. *J Neurochem* **83**, 1498-1508
56. Galvan, M., David, J. P., Delacourte, A., Luna, J., and Mena, R. (2001) Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: A confocal study with phospho-tau antibody, AD2. *J Alzheimers Dis* **3**, 417-425
57. Kimura, T., Ono, T., Takamatsu, J., Yamamoto, H., Ikegami, K., Kondo, A., Hasegawa, M., Ihara, Y., Miyamoto, E., and Miyakawa, T. (1996) Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* **7**, 177-181
58. Mondragon-Rodriguez, S., Perry, G., Luna-Munoz, J., Acevedo-Aquino, M., and Williams, S. (2013) Phosphorylation of tau protein at sites Ser 396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol* **40**, 121-125
59. Jicha, G. A., Lane, E., Vincent, I., Otvos, L., Jr., Hoffmann, R., and Davies, P. (1997) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **69**, 2087-2095
60. Haroutunian, V., Davies, P., Vianna, C., Buxbaum, J. D., and Purohit, D. P. (2007) Tau protein abnormalities associated with the progression of alzheimer disease type dementia. *Neurobiol Aging* **28**, 1-7
61. Luna-Munoz, J., Chavez-Macias, L., Garcia-Sierra, F., and Mena, R. (2007) Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **12**, 365-375

62. Weaver, C. L., Espinoza, M., Kress, Y., and Davies, P. (2000) Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**, 719-727
63. Gendreau, K. L., and Hall, G. F. (2013) Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol* **4**, 160
64. Caillierez, R., Begard, S., Lecolle, K., Deramecourt, V., Zommer, N., Dujardin, S., Loyens, A., Dufour, N., Auregan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Deglon, N., Buée, L., and Colin, M. (2013) Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. *Mol Ther* **21**, 1358-1368
65. Dujardin, S., Lecolle, K., Caillierez, R., Begard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Auregan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Deglon, N., Colin, M., and Buée, L. (2014) Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun* **2**, 14
66. Meredith, J. E., Jr., Sankaranarayanan, S., Guss, V., Lanzetti, A. J., Berisha, F., Neely, R. J., Slemmon, J. R., Portelius, E., Zetterberg, H., Blennow, K., Soares, H., Ahljanian, M., and Albright, C. F. (2013) Characterization of novel CSF Tau and ptau biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e76523

Acknowledgements - We would like to thank the CNRS Large Scale Facility NMR THC Fr3050 for their support M. Michels, A. Chauderlier and M-E. Grosjean for excellent technical assistance, Dr. F.-X. Cantrelle for maintenance of the 900MHz NMR spectrometer, Prof. Dr. F. Van Leuven for advise and additional validation in mice models. We also thank Dr M. Schraeml (Roche Professional Diagnostics), Dr T. Bittner (Roche) for providing the Biacore affinity data and Dr. Lester (Skip) Binder for providing the TOC1 antibody. We would like to dedicate this manuscript to Skip Binder as a token of our appreciation for his generosity and his scientific legacy that counts numerous and significant contributions to the Tau field.

FOOTNOTES

[§]This investigation was supported by grants of Research Foundation Flanders (FWO-Vlaanderen) to JW and SE, KU Leuven Research Fund (KU Leuven-BOF; KU Leuven-IOF), KU Leuven R&D to JW and the Agency for Innovation by Science and Technology (IWT) to JW, EV and SE. We are grateful to IWT for a PhD fellowship to JvDB and to FWO-Vlaanderen for postdoc fellowships to MC and ES. This work was also supported through the LabEx DISTALZ (an excellent laboratory-Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's disease), the CNRS Large Scale Facility NMR THC Fr3050, Inserm, CNRS, University of Lille 2, Lille Métropole Communauté Urbaine (LMCU), Région Nord/Pas-de-Calais, FEDER and by the University of Antwerp Research Fund; the Alzheimer Research Foundation (SAO-FRA), the central Biobank facility of the Institute Born-Bunge/University Antwerp, the Belgian Science Policy Office Interuniversity Attraction Poles (IAP) program and the Flemish Government initiated Methusalem excellence grant..

*To whom correspondence should be addressed: Joris Winderickx, Functional Biology, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 31 box 2433, 3001 Heverlee, Belgium, Tel.: +32-(0)16-321516; Fax.:+32-(0)16-321967; E-mail: joris.winderickx@bio.kuleuven.be

Eugeen Vanmechelen, ADx NeuroSciences NV, Technologiepark Zwijnaarde 4, 9052 Ghent, Belgium, Tel.: +32-(0)92-616984; Fax.:+32-(0)92-616981; E-mail: eugeen.vanmechelen@adxneurosciences.com

[§]Conflict of Interest: JW and EV are both co-founders of ADx NeuroSciences and co-inventors on the patent entitled Antibodies to phosphorylated Tau aggregates (WO2013007839 (A1)).

⁺The abbreviations used are: aa, amino acid(s); AD, Alzheimer's disease; PHF, paired helical filaments; NFT, neurofibrillary tangles; CSF, cerebrospinal fluid; FAT, fast axonal transport; MT, microtubule(s); M_r, molecular weight; MMSE, minimal mental state examination; MTBR, microtubule-binding repeat; PAD, phosphatase-activating domain; VAD, vascular dementia

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: *In situ immunodetection of Tau and characterization of novel monoclonal antibodies in yeast.* A, in situ immunodetection of total Tau (TAU5), the pathogenic Tau conformation (MC1) and oligomeric Tau (TOC1) in spheroplasts of the BY4741 wild-type strain expressing human Tau-2N/4R. The scale bar is 2 μm. B, Western blot analysis of protein extracts made from the BY4741 wild type strain with the empty vector (lane 1), the BY4741 wild type strain expressing Tau-2N/4R (lane 2), the *Δmcs1* strain expressing 2N/4R Tau (lane 3) and the *Δpho85* strain expressing human Tau-2N/4R (lane 4). TAU5 was used as a control antibody. Exposure times were 10 seconds for ADx215, 2 minutes for ADx201 and ADx210 and 1 minute for TAU5. The open arrows indicate oligomeric Tau as detected by ADx210 and ADx215. The insert for ADx210 shows that this mAb also recognizes monomeric Tau at longer exposure times. C, Western blot analysis of SAP-treated samples. Lane 1 represents extracts of the *Δpho85* strain transformed with the empty vector. Lane 2 contains untreated extracts of the *Δpho85* strain expressing Tau while lanes 3 to 6 contain the same extract, but treated with SAP for 30', 60', 90' and 120', respectively. Lane 7 contains 5ng of recombinant Tau.

FIGURE 2: Epitope mapping and phosphorylation dependency. A, Schematic representation of human Tau-2N/4R with the shaded regions corresponding to the two N-terminal inserts and the four microtubule binding repeats (MTBR) as indicated. Shown are the epitope of ADx215 (aa 16 to 24), which is specific for primates, and the epitope of ADx201 (aa 218 to 224), which is found in different mammalian Tau-sequences. B and C, ELISA using synthetic peptides to analyze phosphorylation dependency of ADx201 and ADx215 binding. The peptides used in panel B combined the epitopes of ADx201 and ADx215 and differed by the presence (closed symbols) or absence (open symbols) of a phospho-Thr, corresponding to position 217 in human Tau-2N/4R. Circles represent the data for ADx201 and squares those for ADx215. The peptides used in panel C all contained the epitope for ADx215 but differed by the presence (closed triangles) or absence (open diamonds) of a phospho-Tyr₁₈, or contained the substitution Tyr₁₈-Phe₁₈ (open squares) or the phosphomimic substitution Tyr₁₈-Glu₁₈ (closed circles). The sequences of the peptides are given in Table 1. D, Western blot analysis of protein extracts made from the BY4741 wild-type strain and mutant strains lacking the dual specificity kinases Yak1, Swe1, Kns1 or Mck1 as indicated. All strain express human Tau-2N/4R, of which various phospho-isoforms were detected with TAU5, 9G3 or ADx215.

FIGURE 3: Confirmation of the ADx215 and ADx201 epitopes by NMR spectroscopy. NMR analysis of the ADx201 (A) and ADx215 (B) epitopes. The ¹H, ¹⁵N heteronuclear single-quantum correlation (HSQC) NMR spectra at 900 MHz of a 1/1 Tau antigen to antibody sample (red) and a pure antigen sample (black) were recorded. Some relevant regions of the spectra showing peak disappearance are depicted in the upper panel. The ratio of the relative intensities per amino acid is shown in the lower panel. A ratio close to zero indicates that this particular amino acid is in the potential epitope of the antibody.

FIGURE 4: Biochemical validation in brain of transgenic rodents. Western blot analysis of hippocampal brain extracts obtained from wild type control mice (WT) or the transgenic THY-Tau22 mouse model at the age of 3 or 12 months (mn) using the mAbs ADx201, ADx210 or ADx215. The closed arrows next to the pictures obtained with ADx201 or ADx210 mark the position where Tau oligomers are faintly detected in the THY-Tau22 samples. The filter probed with ADx201 was stripped and used to detect actin, which served as loading control.

FIGURE 5: Biochemical validation in diseased human brain. A, Western blot analysis of cortex brain extracts obtained from a healthy person (Control) and AD patients at Braak stages 5 and 6 (resp. AD5, AD6) using the mAbs ADx201, ADx210 or ADx215. The open arrow next to the picture obtained with ADx215 indicates Tau oligomers with a M_r below 100 kDa in brain samples of healthy controls. B, Western blot analysis of cortex brain extracts obtained from AD patients at Braak stages 4 (AD4, n=2), 5 (AD5, n=3) and 6 (AD6, n=5) using the mAbs ADx201, ADx210 and ADx215 as indicated. The molecular weights (Mr) are given on each picture. Filters probed with ADx201 were stripped and used to detect actin, which served as loading control in panels A and B.

FIGURE 6: Phospho-epitope mapping in Tau oligomers and Tau-lipid raft interaction. A, Western blot analysis of cortex brain extracts obtained from a healthy person (C) and an AD patient at Braak stages 5 (AD) using different phosphorylation specific mAbs as indicated. B, Comparison of ADx201 detection and Tau Ser₃₉₆ phosphorylation using the P-S396 mAb in cortex brain extracts obtained from a healthy persons (C), an AD patients at Braak stages 5 and the transgenic THY-Tau22 mouse model at the age of 12 months. Exposure times (min) for the two mAbs are indicated on top of the pictures. C, Detection of Tau in membrane fractions obtained from post-mortem human cortex samples of an AD patient at Braak stage 5 using the mAb ADx215 and the polyclonal antibodies M19G and TauCter. Lipid rafts were identified using the mammalian lipid raft marker flotillin-1 and were enriched in fractions 3 and 4 (underlined). The black arrow next to the pictures indicates the 85 kDa Tau folding variant detected by the polyclonal antibodies.

FIGURE 7: Immunohistochemical validation in transgenic rodents. Shown are representative pictures obtained with immunohistochemical analysis using the mAbs ADx201, ADx210 and ADx215 on different regions in the hippocampus of THY-Tau22 mouse brain. AT8 was used as a reference antibody. The brain

regions analysed are indicated in the boxes in the left lower resolution pictures and correspond to the higher resolution pictures shown on the right. Scale bar: 200 μ m. CA, Ammon's horn; DG, dentate gyrus; LP, lateral posterior nucleus of the thalamus

FIGURE 8: *Immunohistochemical validation in brain of AD patients.* Immunohistochemical analysis with ADx201, ADx210 and ADx215 of the cortex and hippocampus in brain of an AD patient at Braak stage 6. AT8 was used as a reference antibody. The boxes in the left pictures correspond to the higher resolution pictures shown in the right panels. Indents in the higher resolution pictures of the cortex sections show neuritic plaques. Scale bar: 200 μ m

FIGURE 9: *Diagnostic performance of the novel mAbs in CSF.* Shown are the scatter dot blot of levels of total Tau in CSF obtained from healthy persons (n=20) and patients suffering from AD (n=20) or VAD (n=20). The line presented in each scatter dot blot is the median levels and bars are the interquartile range, ns = non-significant.

Table 1: Synthetic peptides used for epitope mapping and phospho-dependency studies

Specificity	Sequence
Y18	MAEPRQEFEFV MEDHA <u>GTYGLGDRK</u>
Y18(p)	MAEPRQEFEFV MEDHA <u>GTY(p)GLGDRK</u>
Y18E	MAEPRQEFEFV MEDHA <u>GTEGLGDRK</u>
Y18F	MAEPRQEFEFV MEDHA <u>GTFGLGDRK</u>
T217/Y18	GSRSRTPSLPT <u>T</u> <u>PPTREP</u> <u>KKVAGE</u> <u>FEFV MEDHA</u> <u>GTYGLGDRK</u>
T217(p)/Y18	GSRSRTPSLPT <u>T(p)</u> <u>PPTREP</u> <u>KKVAGE</u> <u>FEFV MEDHA</u> <u>GTYGLGDRK</u>

Table 2: Peptide scanning results for ADx215 epitope determination

Start	Stop	Sequence	milliOD_{450nm}
6	20	QEFV <u>MEDHAGTYGL</u>	50
7	21	EFV <u>MEDHAGTYGLG</u>	97
8	22	FEV <u>MEDHAGTYGLGD</u>	141
9	23	EV <u>MEDHAGTYGLGDR</u>	911
10	24	V <u>MEDHAGTYGLGDRK</u>	2055
11	25	M <u>EDHAGTYGLGDRKD</u>	2161
12	26	ED <u>HAGTYGLGDRKDQ</u>	2100
13	27	DH <u>AGTYGLGDRKDQG</u>	2082
14	28	H <u>AGTYGLGDRKDQGG</u>	2387
15	29	A <u>GTYGLGDRKDQGGY</u>	2434
16	30	<u>GTYGLGDRKDQGGYT</u>	2229
17	31	<u>TYGLGDRKDQGGYTM</u>	1364
18	32	<u>YGLGDRKDQGGYTMH</u>	171
19	33	<u>GLGDRKDQGGYTMHQ</u>	60
20	34	<u>LGDRKDQGGYTMHQD</u>	49
21	35	<u>GDRKDQGGYTMHQDQ</u>	49

Table 3: Antibodies used in these studies

Antibody	Specificity	Source
PRIMARY Abs		
Actin (AC-18)	β -actin	Sigma Aldrich (Bornem, Belgium)
9G3/P-Tyr18	Tau; P-Tyr ₁₈	Medimabs (Montréal, Canada)
12E8	Tau; P-Ser ₂₆₂ /P-Ser ₃₅₆	Elan Pharmaceuticals (San Francisco, CA, USA)
AD2	Tau; P-Ser ₃₉₆ /P-Ser ₄₀₄	Sigma Aldrich (Bornem, Belgium)
AT8	Tau; P-Ser ₂₀₂ /P-Thr ₂₀₅	Innogenetics (Ghent, Belgium)
AT180	Tau; P-Thr ₂₃₁	Innogenetics (Ghent, Belgium)
AT270	Tau; P-Thr ₁₈₁	Innogenetics (Ghent, Belgium)
BT2	Tau; aa 193-198	Innogenetics (Ghent, Belgium)
HT7	Tau; aa 159-163	Innogenetics (Ghent, Belgium)
M19G	Tau; aa 1-19	A. Delacourte (34)
MC1	Tau; aa 5-15/312-322; Conformation-dependent	Generous gift from P. Davies (59)
TauCter	Tau; aa 426-441	A. Delacourte (34)
TAU1	Tau; Ser ₁₉₈ /Ser ₁₉₉ /Ser ₂₀₂	Chemicon (Temecula, CA, USA)
TAU5	Tau; aa 218-225	BD Pharmingen (San Diego, CA)
TOC1	Tau; aa 155-244/376-421; Oligomer-specific	Generous gift from L. Binder (9)
ADx201	Tau; aa 218-224	Generated in this study
ADx201-bio	Tau; aa 218-224	Generated in this study
ADx215	Tau; aa 16-24	Generated in this study
ADx215-bio	Tau; aa 16-24	Generated in this study
ADx210	Tau; conformational epitope	Generated in this study
ADx210-bio	Tau; conformational epitope	Generated in this study
SECONDARY Abs		
GAM-HRP	Anti-mouse mAb	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
GAM-Alexa594	Anti-mouse mAb	Abcam (Cambridge, UK)
RAM-HRP	Anti-mouse mAb	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

GAM: goat anti-mouse; RAM: rabbit anti-mouse

Table 4: Human samples used for validation of the mAbs

Code	Age (years)	Sex	PMI (h)	Pathology	Braak stage
C29	29	Male	20	none	
C49	49	Male	34	none	
C52	52	Female	28	none	
C53	53	Male	28	none	
C61	61	Male	20	none	
C61B	61	Male	ND	none	
C75	75	Male	7	none	
C76	76	Female	14	none	
C80	80	Female	24	none	
AD84	84	Male	18	AD	4
AD91	91	Female	18	AD	4
AD62	62	Male	10	AD	5
AD73	73	Male	15	AD	5
AD76	76	Female	3	AD	5
AD77	77	Male	6	AD	5
AD57	57	Male	23	AD	6
AD59	59	Female	26	AD	6
AD72	72	Female	5.5	AD	6
AD73B	73	Female	22	AD	6
AD74	74	Male	4	AD	6
AD76B	76	Male	7	AD	6
AD86	86	Female	10	AD	6
AD86B	86	Male	10	AD	6

PMI: post-mortem interval; ND: not determined

Table 5: Sample details for CSF-based ELISA.

	AD	VAD	Control
n (F/M)	20 (7/13)	20 (11/9)	20 (11/9)
Age (yrs) (range)	81 (62-97)	77 (56-87)	48 (25-85)
MMSE score (range)	13.5 (4-27)	15 (0-26)	NA
Age at onset (yrs) (range)	79 (60-95)	75 (56-85)	NA
Disease duration (yrs) (range)	2 (1-7)	2 (0-9)	NA
CSF-tau (pg/ml) (median-percentile)	596 (457-881)	391 (305-629)	271 (178-355)

F: female; M: male; yrs: years; MMSE: Minimal Mental State Examination (score on 30)

Figure 1

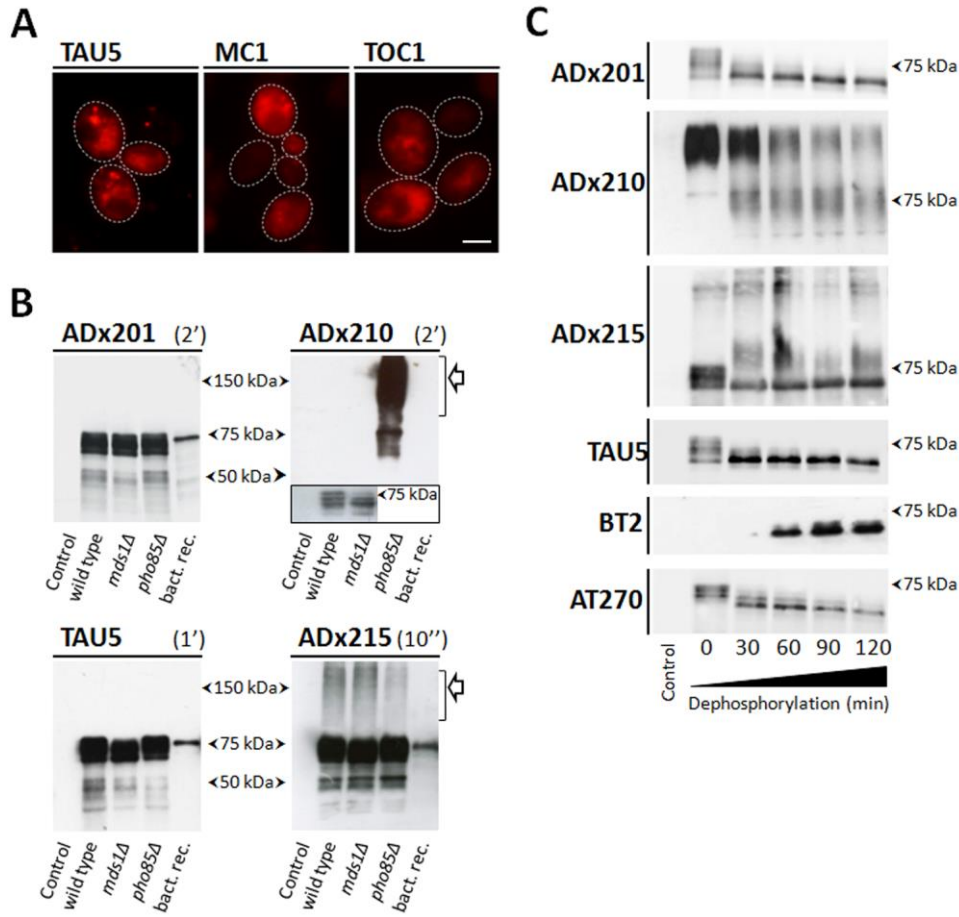


Figure 2

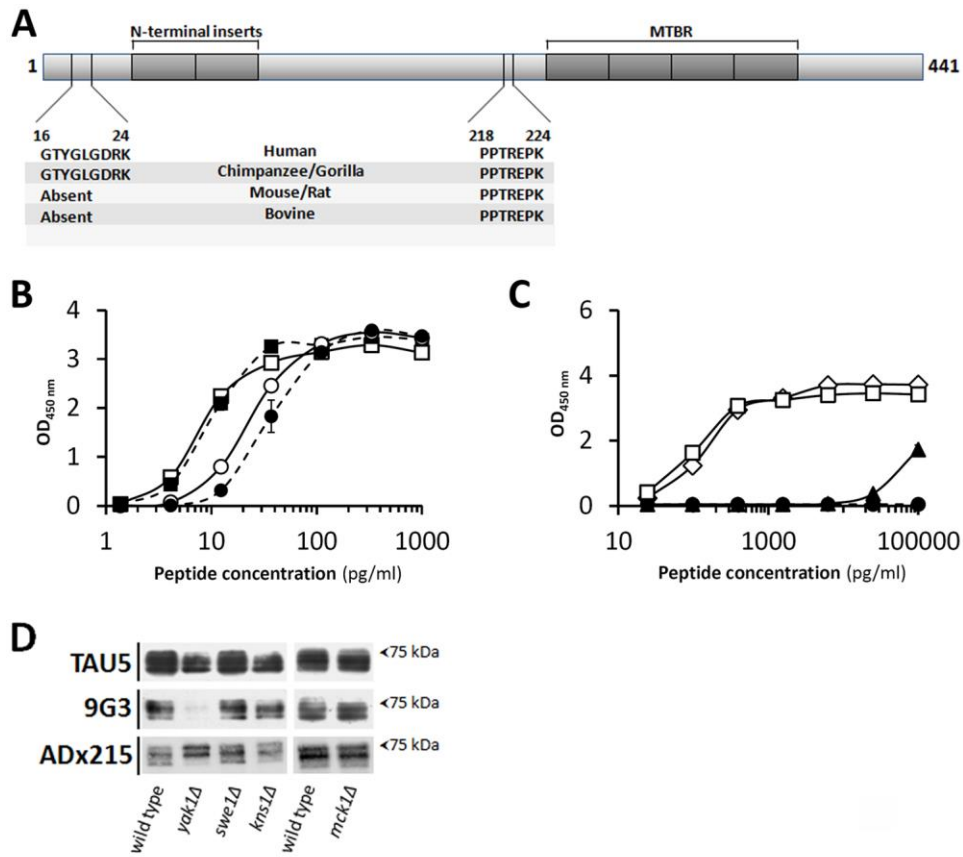


Figure 3

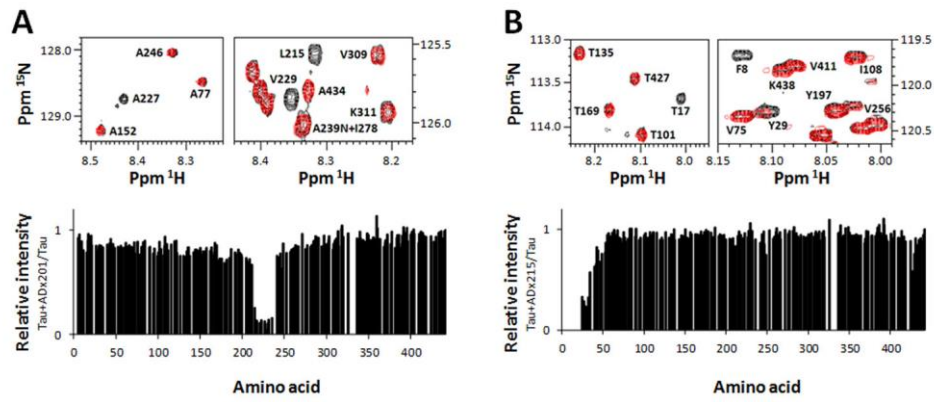


Figure 4

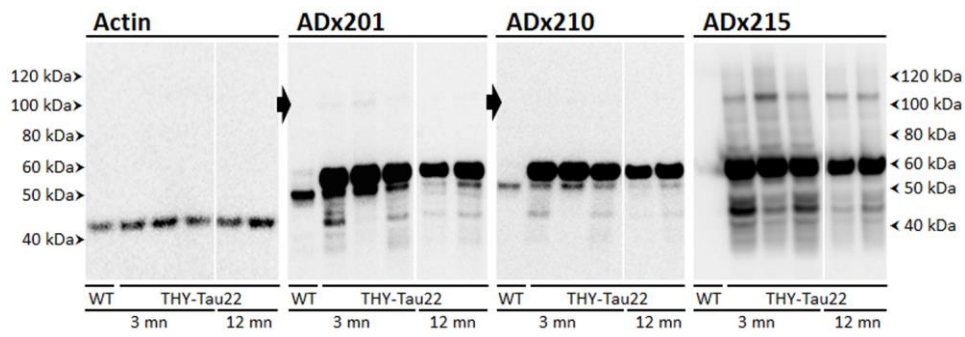


Figure 5

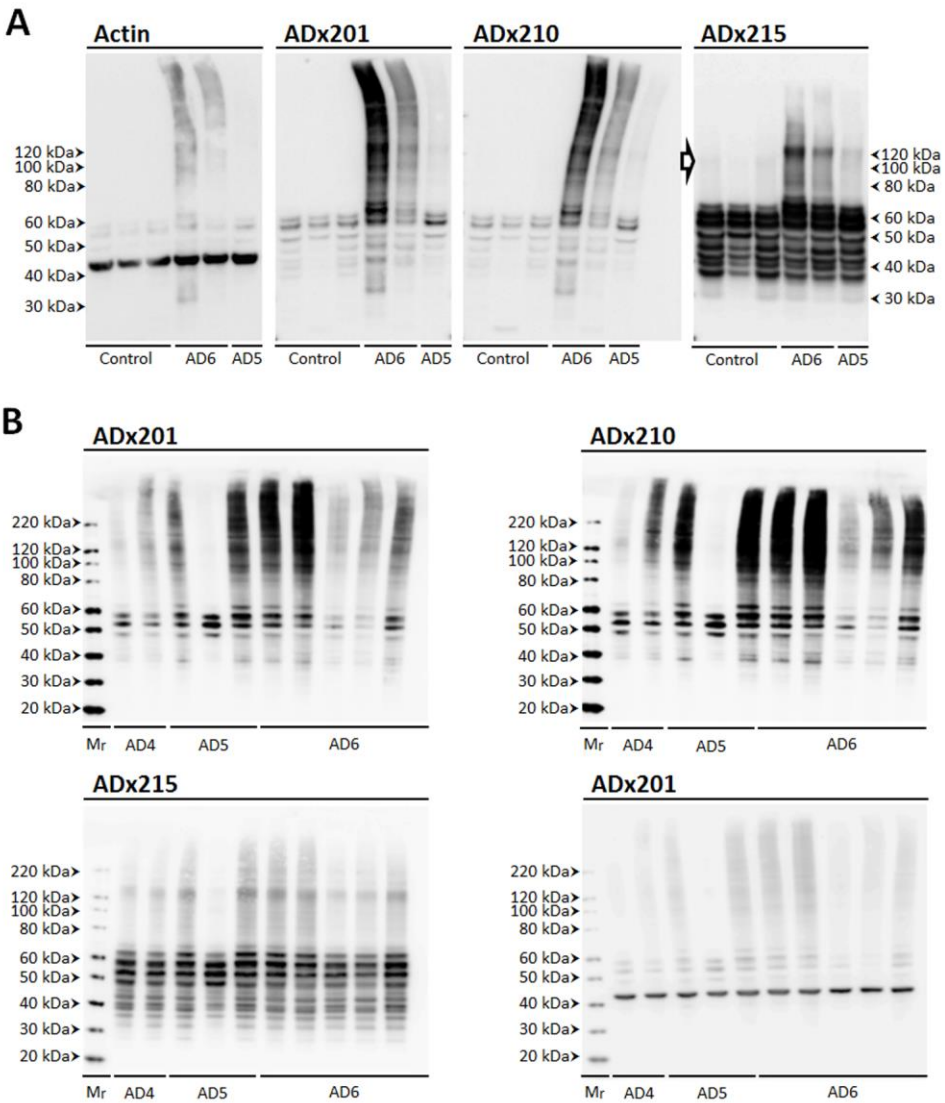


Figure 6

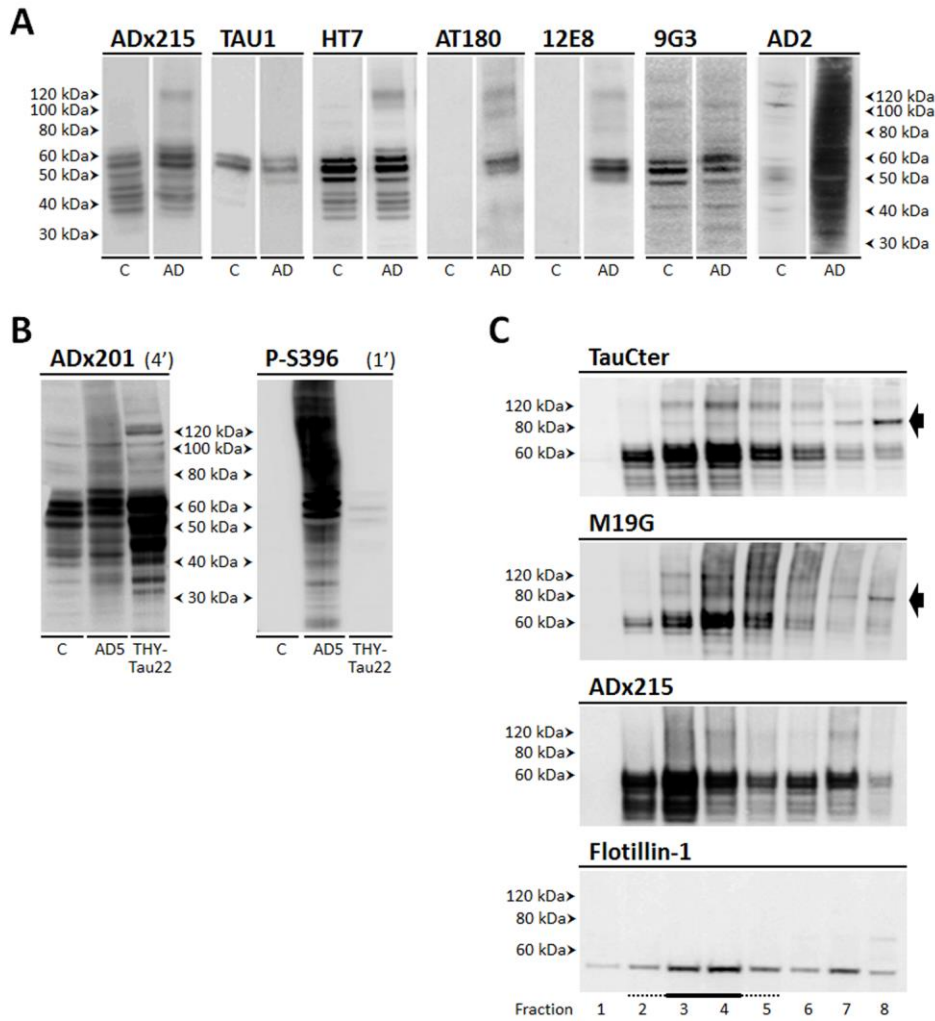


Figure 7

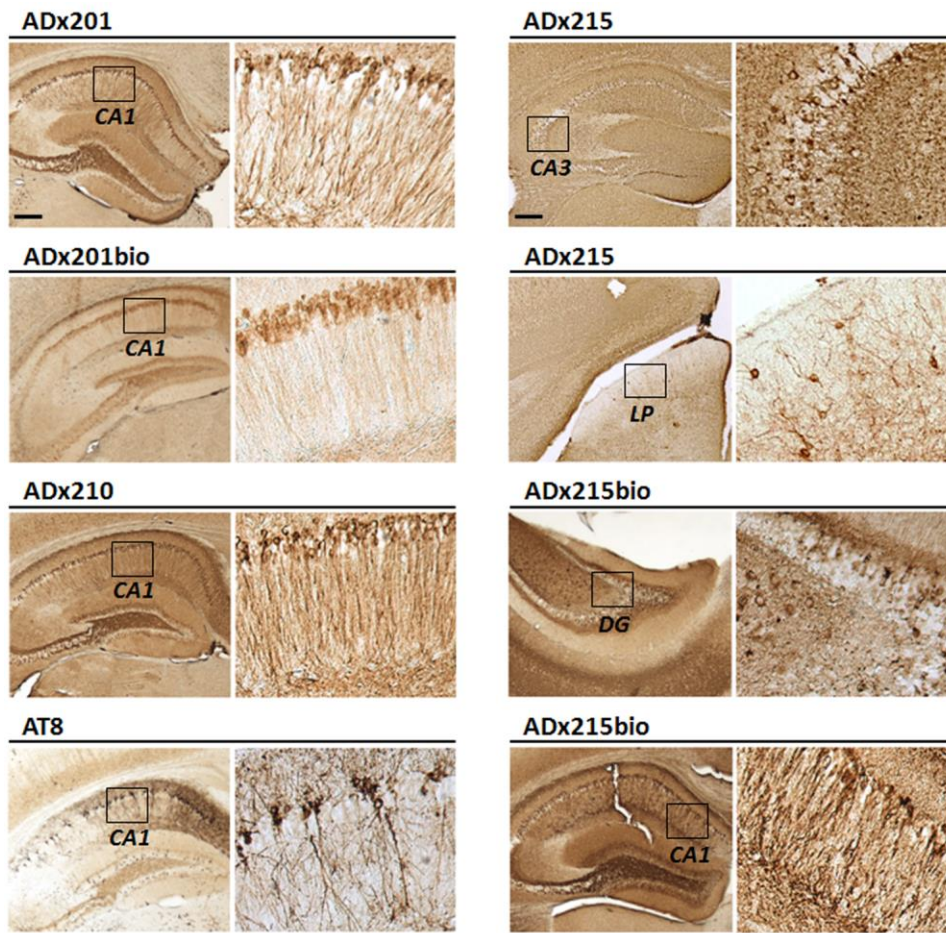


Figure 8

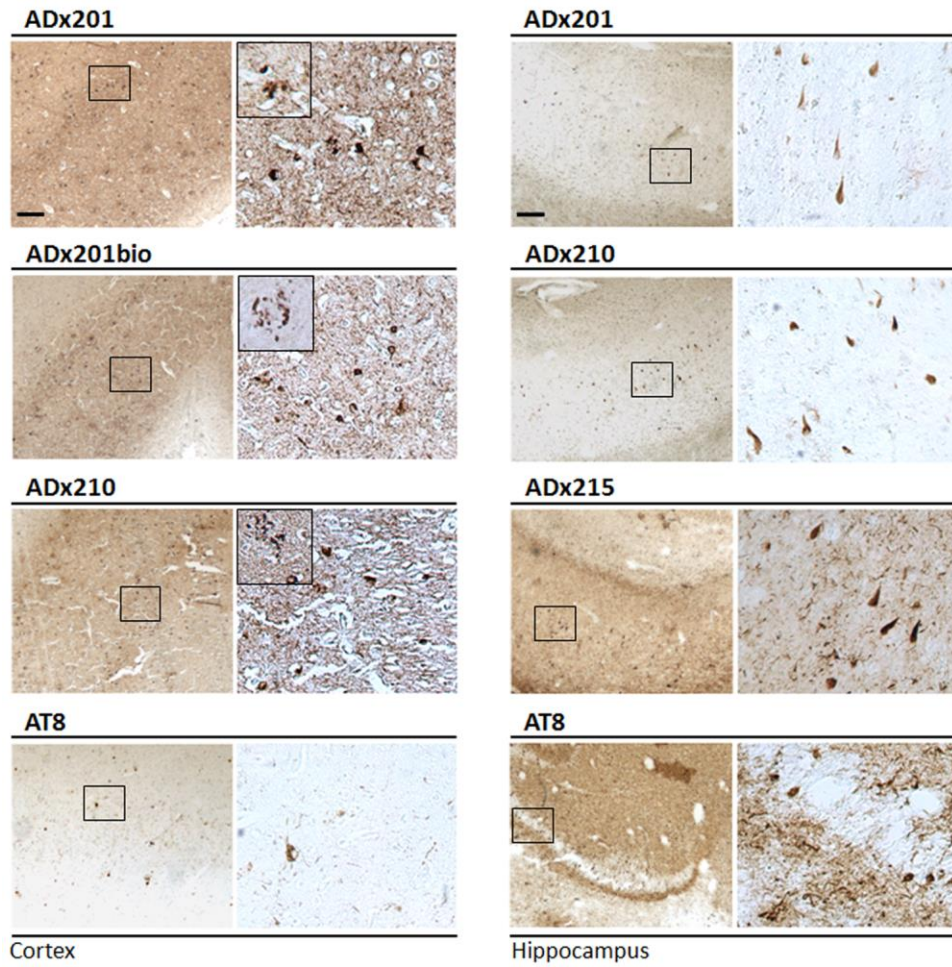
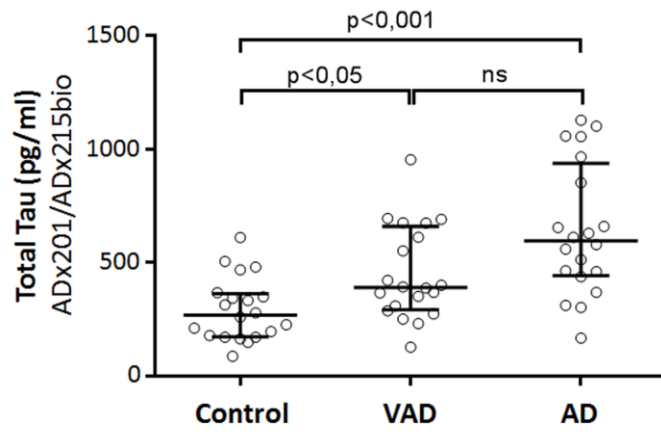


Figure 9



ANNEXE 4 : Stratégie d'attribution du spectre ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N

Un des problèmes principaux d'enregistrer les protons alpha en dimension directe est que leur déplacement chimique est très proche du déplacement chimique de l'eau. Le déplacement chimique de l'eau est extrêmement dépendant de la température et à basse température (10°C) le signal de l'eau est suffisamment éloigné pour pouvoir enregistrer convenablement les résonances des protons alpha. Pour enregistrer des spectres à plus haute température, nous devons utiliser des tampons deutérés de façon à éliminer le signal de l'eau. Or, l'attribution du spectre Ha(Ca)N est beaucoup plus simple à réaliser en tampon protoné, car on peut directement la corréler à l'attribution du ^1H - ^{15}N HSQC. Nous avons développé une stratégie d'attribution des spectres ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N en quatre étapes (figure A12).

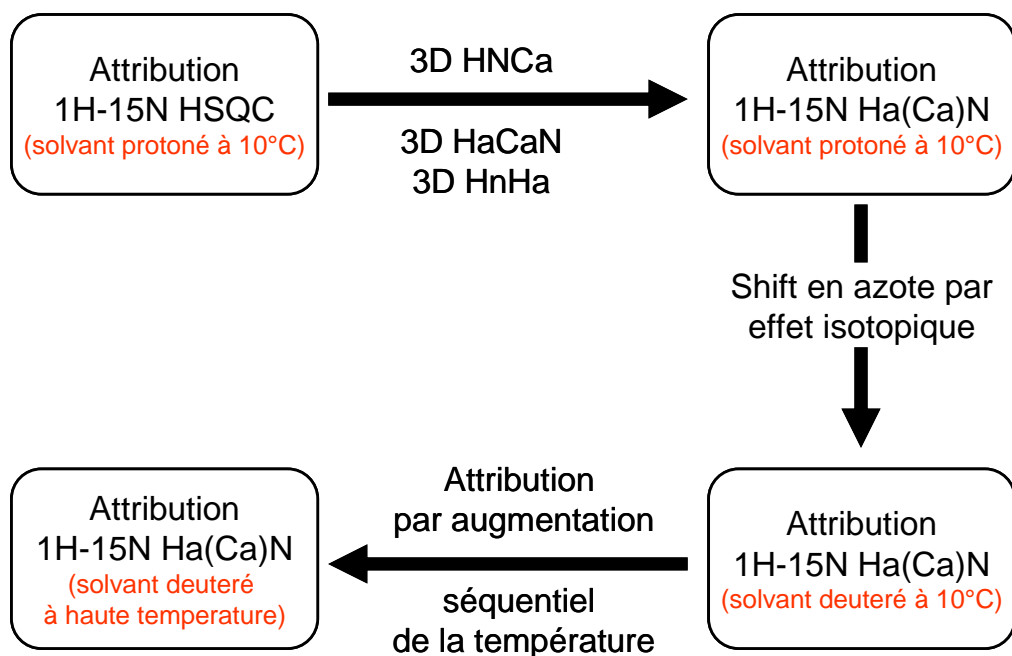


Figure A12 Stratégies d'attribution des spectres Ha(Ca)N.

Première étape : attribution du spectre ^1H - ^{15}N HSQC à 10°C par les méthodes classiques d'attribution.

Deuxième étape : à partir de l'attribution du spectre ^1H - ^{15}N HSQC à 10°C nous pouvons attribuer le spectre ^1H - ^{15}N Ha(Ca)N à 10°C en utilisant une combinaison d'expériences tridimensionnelles ^1H - ^{13}C - ^{15}N HaCaN, ^1H - ^{15}N - ^{13}C HNCa et ^1H - ^{15}N - ^1H HnHa.

Troisième étape : nous attribuons le spectre Ha(Ca)N dans un tampon deutéré par comparaison avec l'attribution du spectre Ha(Ca)N dans le solvant

protoné en tenant compte de l'effet isotopique. Le déplacement chimique de l'azote amide est extrêmement dépendant de la nature de l'isotope d'hydrogène. Cet effet est dû à une altération de la longueur et de la forme de l'orbitale électronique de la liaison amide ainsi que des propriétés vibrationnelles [311]. Cet effet isotopique peut facilement être approximé par des équations empiriques. Nous avons utilisé l'équation empirique d'Abildgaard *et al.* pour déterminer les fréquence azote deuteré [312] :

$$\Delta\delta(\text{N}) = 0.0054 * \delta(\text{N}) + 0.0754$$

Avec

$$\Delta\delta(\text{N}) = |\delta(\text{N}_H) - \delta(\text{N}_D)|$$

Grosso modo, la différence de déplacement chimique azote entre la forme protonée et la forme deuterée est plus ou moins 0.7 PPM.

Quatrième étape : nous attribuons tout simplement les spectres à plus haute température par incrémentation progressive de la température.

Toutes les attributions de spectre ont été réalisées avec le logiciel NMRpy [133].

ANNEXE 5 : Expression et purification des protéines

Expression des protéines

Le gène codant l'isoforme la plus longue de TAU (441 AA) ainsi que l'ADN correspondant à ses différents mutants ont été clonés dans le plasmide PET15-b (Novagen), le gène de l'AS et l'ADN de ses mutants ont été, quant à eux, clonés dans le plasmide pT7-7 [313]. Le gène codant la protéine FKBP12 est cloné dans un plasmide pGEX (GE Healthcare). Les protéines TAU et AS sauvages ainsi que les mutants ponctuels de TAU sont sans étiquette. Tous les mutants de délétion de TAU sont étiquetés avec une séquence 6His à l'extrémité N-terminale. Le gène codant FKBP12 a été cloné dans le vecteur pGEX-2TK et la protéine est donc étiquetée GST.

L'ensemble des protéines est produit chez *E.coli* BL21 *Star*TM (DE3) (Invitrogen) après transfection du plasmide permettant l'expression recombinante.

L'ensemble des protéines non marquées est produit en milieu LB additionné d'ampicilline (100 mg/l). Pour produire des protéines marquées ¹⁵N, et/ou ¹³C, et/ou ²H, le milieu riche de culture est remplacé par du milieu minimum (milieu M9 : Na₂HPO₄ (6 g/l), KH₂PO₄ (3 g/l), NaCl (0,5 g/l)) additionné de nutriments marqués avec les isotopes que l'on veut intégrer dans la protéine. NH₄Cl (1 g/l), Glc (2 g/l), ISOGRO® (qui est un supplément du milieu minimum) (0,5 g/l) (Cortecnet), MgSO₄ (1 mM), CaCl₂ (100 μM), cocktail de métaux (*trace elements*) (1ml/l) et éventuellement de vitamines (10 ml/l) (MEM, Sigma-Aldrich), ampicilline (100 mg/l). Pour les différents marquages, on adapte le milieu minimum. Pour marquer au ¹⁵N, nous utilisons du ¹⁵NH₄Cl et de l'ISOGRO® (¹⁵N) comme seule source d'azote. Pour marquer au ¹⁵N-¹³C, nous utilisons du ¹⁵NH₄Cl, du glucose marqué ¹³C et de l'ISOGRO® (¹⁵N-¹³C). Pour marquer au ¹⁵N-²H, nous utilisons du ¹⁵NH₄Cl, de l'ISOGRO® (¹⁵N-²H), du glucose (²H) et on remplace l'eau par du D₂O. Finalement, pour marquer au ¹⁵N-¹³C-²H, nous faisons la culture dans du D₂O avec du glucose (¹³C-²H), de l'ISOGRO® (¹⁵N-¹³C-²H) et du ¹⁵NH₄Cl.

La production des 3 protéines est initiée par l'addition de 0,4 mM d'isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) aux cultures bactériennes de densité optique 0,8. Les cultures correspondant à la protéine TAU et ses mutants sont alors laissées 2h30 à 37°C, celle de l'AS à 22°C toute la nuit et la protéine FKBP12 à 28°C pendant 4 h.

Purification des protéines

AS, TAU et ses mutants:

Les culots correspondant aux différentes cultures bactériennes sont alors repris dans une trentaine de ml de tampon approprié. Pour la protéine TAU sauvage et ses mutants ponctuels, le culot est resuspendu dans le tampon A1 (50 mM NaPi, 2,5 mM EDTA, pH 6,2). Pour les mutants de délétion de Tau qui sont étiquetés 6His, le tampon de resuspension est le tampon A2 (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7,6). Le culot de bactéries ayant produit l'AS est, quant à lui, repris dans le tampon A3 (25 mM Tris, 2,5 mM EDTA, pH 7,7). A chacun de ces tampons sont ajoutés une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéases (CompleteTM, Roche Applied Science), 0,25 mM de DTT et 0,25% de Triton X-100. Les extraits solubles sont obtenus par incubation des suspensions bactériennes à 4°C, pendant 20 mn avec 0,3mg/ml de lysozyme et 0,03 mg/ml de DNase I suivie par 2 cycles de 12 mn de sonication puis centrifugation à 25000g durant 30 mn. Tous les extraits bactériens sont alors chauffés à 75°C pendant 20 minutes et débarrassés du matériel insoluble par centrifugation 20 mn à 25000g.

L'extrait correspondant à TAU ou à ses mutants ponctuels est chargé sur une colonne échangeuse de cations Hi-TrapTM SP FF (GE Healthcare) préalablement équilibrée avec le tampon A1, tandis que ceux correspondant aux protéines tronquées sont purifiés par chromatographie d'affinité sur résine de nickel HiTrapTM Chelating HP (GE Healthcare) équilibrée en tampon A2.

La fraction soluble correspondant à l'AS est soumise à une précipitation au sulfate de streptomycine (10 mg/ml) durant 20 mn à 4°C puis centrifugée à 25000g afin d'éliminer l'ADN résiduel. Le surnageant est ensuite incubé avec 400 mg/ml de sulfate d'ammonium pendant 30 mn à 4°C puis soumis à une centrifugation à 25000g durant 20 mn et ce, à 4°C. Le culot en résultant est alors repris en tampon A3 et dialysé une nuit à 4°C contre ce même tampon de manière à éliminer le sulfate d'ammonium puis chargé sur une colonne échangeuse d'anions Hi-TrapTM Q FF (GE Healthcare). Les protéines sont alors éluées par gradient avec le tampon B1 (50 mM NaPi, 2,5 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 6,2) pour les versions de TAU non étiquetées et avec le tampon B2 (50 mM NaPi, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7,6) pour les versions tronquées de TAU. Pour l'AS, c'est le tampon B3 (25 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 1M NaCl, pH 7,7) qui est utilisé dans l'étape d'éluion.

Les protéines purifiées sont vérifiées par SDS-PAGE et soumises à gel filtration contre du tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM avant d'être lyophilisées.

FKBP12-GST et FKBP12 :

Le culot correspondant à la culture bactérienne exprimant FKBP12 étiqueté GST en N-terminal est repris dans 30 ml de tampon PBS (8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl) additionné de 1% Triton X-100, 5mM DTT et d'une pastille d'inhibiteurs de protéases. La lyse des cellules est réalisée par ajout de 1 ml de lysozyme (10 mg/ml) et de 100 μl de DNase I (10 mg/ml) et incubation 20 mn sur glace. L'échantillon est alors soumis aux ultrasons pour 2 cycles de 12 mn puis à une centrifugation de 30 mn à 25000g de façon à s'affranchir de tout débris bactérien. Le surnageant est incubé avec de la résine d'affinité Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). La résine est ensuite lavée avec du tampon PBS auquel sont ajoutés 5 mM de DTT. Pour l'obtention de protéines conservant l'étiquette, l'élution est réalisée en ajoutant une solution de glutathion réduit (10 mM glutathion, 50 mM Tris, pH 8) à la résine. Pour ce qui est de protéines débarrassées de l'étiquette GST, les billes de résine chargées par la protéine recombinante sont incubées avec une solution d'enzyme PreScission (GE Healthcare) et par conséquent la protéine FKBP12 dépourvue de son étiquette est éluee suite au clivage dû à l'enzyme.

Reference :

- [1] E. Fischer, « Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme », *Berichte Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 27, n° 3, p. 2985-2993, (1894).
- [2] J. Habchi, P. Tompa, S. Longhi, et V. N. Uversky, « Introducing Protein Intrinsic Disorder », *Chem. Rev.*, (2014).
- [3] A. J. Baldwin et L. E. Kay, « Structural biology: Dynamic binding », *Nature*, vol. 488, n° 7410, p. 165-166, (2012).
- [4] E. Z. Eisenmesser, O. Millet, W. Labeikovsky, D. M. Korzhnev, M. Wolf-Watz, D. A. Bosco, J. J. Skalicky, L. E. Kay, et D. Kern, « Intrinsic dynamics of an enzyme underlies catalysis », *Nature*, vol. 438, n° 7064, p. 117-121, (2005).
- [5] E. Z. Eisenmesser, D. A. Bosco, M. Akke, et D. Kern, « Enzyme Dynamics During Catalysis », *Science*, vol. 295, n° 5559, p. 1520-1523, (2002).
- [6] P. Tompa, *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*. CRC Press, 2009.
- [7] D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, et M. W. Kirschner, « Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin », *J. Mol. Biol.*, vol. 116, n° 2, p. 207-225, (1977).
- [8] K. A. Butner et M. W. Kirschner, « Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites », *J. Cell Biol.*, vol. 115, n° 3, p. 717-730, (1991).
- [9] S. Konzack, E. Thies, A. Marx, E.-M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 27, n° 37, p. 9916-9927, (2007).
- [10] P. E. Wright et H. J. Dyson, « Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm », *J. Mol. Biol.*, vol. 293, n° 2, p. 321-331, (1999).
- [11] P. Romero, Z. Obradovic, C. R. Kissinger, J. E. Villafranca, E. Garner, S. Guilliot, et A. K. Dunker, « Thousands of proteins likely to have long disordered regions », *Pac. Symp. Biocomput. Pac. Symp. Biocomput.*, p. 437-448, (1998).
- [12] A. K. Dunker et Z. Obradovic, « The protein trinity—linking function and disorder », *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, n° 9, p. 805-806, (2001).
- [13] J. J. Ward, J. S. Sodhi, L. J. McGuffin, B. F. Buxton, et D. T. Jones, « Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life », *J. Mol. Biol.*, vol. 337, n° 3, p. 635-645, (2004).
- [14] F. Chiti, M. Stefani, N. Taddei, G. Ramponi, et C. M. Dobson, « Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates », *Nature*, vol. 424, n° 6950, p. 805-808, (2003).
- [15] V. N. Uversky, « Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics », *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 11, n° 4, p. 739-756, (2002).
- [16] V. N. Uversky, « A decade and a half of protein intrinsic disorder: biology still waits for physics », *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 22, n° 6, p. 693-724, (2013).
- [17] J. C. Wootton, « Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures », *Comput. Chem.*, vol. 18, n° 3, p. 269-285, (1994).
- [18] R. Linding, R. B. Russell, V. Neduva, et T. J. Gibson, « GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder », *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, n° 13, p. 3701-3708, (2003).
- [19] R. Linding, L. J. Jensen, F. Diella, P. Bork, T. J. Gibson, et R. B. Russell, « Protein disorder prediction: implications for structural proteomics », *Struct. Lond. Engl. 1993*, vol. 11, n° 11, p. 1453-1459, (2003).

- [20] J. Liu et B. Rost, « NORSp: Predictions of long regions without regular secondary structure », *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, n° 13, p. 3833-3835, (2003).
- [21] J. Prilusky, C. E. Felder, T. Zeev-Ben-Mordehai, E. H. Rydberg, O. Man, J. S. Beckmann, I. Silman, et J. L. Sussman, « FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 21, n° 16, p. 3435-3438, (2005).
- [22] I. Callebaut, G. Labesse, P. Durand, A. Poupon, L. Canard, J. Chomilier, B. Henrissat, et J. P. Mornon, « Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 53, n° 8, p. 621-645, (1997).
- [23] K. Coeytaux et A. Poupon, « Prediction of unfolded segments in a protein sequence based on amino acid composition », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 21, n° 9, p. 1891-1900, (2005).
- [24] Z. Dosztányi, V. Csizmok, P. Tompa, et I. Simon, « IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 21, n° 16, p. 3433-3434, (2005).
- [25] Z. Dosztányi, V. Csizmók, P. Tompa, et I. Simon, « The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins », *J. Mol. Biol.*, vol. 347, n° 4, p. 827-839, (2005).
- [26] Z. R. Yang, R. Thomson, P. McNeil, et R. M. Esnouf, « RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 21, n° 16, p. 3369-3376, (2005).
- [27] J. Cheng, M. J. Sweredoski, et P. Baldi, « Accurate Prediction of Protein Disordered Regions by Mining Protein Structure Data », *Data Min. Knowl. Discov.*, vol. 11, n° 3, p. 213-222, (2005).
- [28] A. Vullo, O. Bortolami, G. Pollastri, et S. C. E. Tosatto, « Spritz: a server for the prediction of intrinsically disordered regions in protein sequences using kernel machines », *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, n° Web Server issue, p. W164-168, (2006).
- [29] T. Ishida et K. Kinoshita, « PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence », *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, n° Web Server issue, p. W460-464, (2007).
- [30] M. R. Jensen, G. Communie, E. A. Ribeiro, N. Martinez, A. Desfosses, L. Salmon, L. Mollica, F. Gabel, M. Jamin, S. Longhi, R. W. H. Ruigrok, et M. Blackledge, « Intrinsic disorder in measles virus nucleocapsids », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 24, p. 9839-9844, (2011).
- [31] S. Jeganathan, M. von Bergen, H. Brütlich, H.-J. Steinhoff, et E. Mandelkow, « Global Hairpin Folding of Tau in Solution† », *Biochemistry*, vol. 45, n° 7, p. 2283-2293, (2006).
- [32] M. M. Dedmon, K. Lindorff-Larsen, J. Christodoulou, M. Vendruscolo, et C. M. Dobson, « Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, n° 2, p. 476-477, (2005).
- [33] D. Eliezer, P. Barré, M. Kobaslija, D. Chan, X. Li, et L. Heend, « Residual structure in the repeat domain of tau: echoes of microtubule binding and paired helical filament formation », *Biochemistry*, vol. 44, n° 3, p. 1026-1036, (2005).
- [34] P. Vallurupalli, G. Bouvignies, et L. E. Kay, « Studying “invisible” excited protein states in slow exchange with a major state conformation », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 19, p. 8148-8161, (2012).

- [35] P. Schanda, V. Forge, et B. Brutscher, « Protein folding and unfolding studied at atomic resolution by fast two-dimensional NMR spectroscopy », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, n° 27, p. 11257-11262, (2007).
- [36] A. K. Dunker, M. M. Babu, E. Barbar, M. Blackledge, S. E. Bondos, Z. Dosztányi, H. J. Dyson, J. Forman-Kay, M. Fuxreiter, J. Gsponer, K.-H. Han, D. T. Jones, S. Longhi, S. J. Metallo, K. Nishikawa, R. Nussinov, Z. Obradovic, R. V. Pappu, B. Rost, P. Selenko, V. Subramaniam, J. L. Sussman, P. Tompa, et V. N. Uversky, « What's in a name? Why these proteins are intrinsically disordered », *Intrinsically Disord. Proteins*, vol. 1, n° 1, p. 0-4, (2013).
- [37] M. R. Jensen, R. W. Ruigrok, et M. Blackledge, « Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, n° 3, p. 426-435, (2013).
- [38] M. R. Jensen et M. Blackledge, « Testing the validity of ensemble descriptions of intrinsically disordered proteins », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n° 16, p. E1557-1558, (2014).
- [39] J. R. Allison, P. Varnai, C. M. Dobson, et M. Vendruscolo, « Determination of the free energy landscape of alpha-synuclein using spin label nuclear magnetic resonance measurements », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n° 51, p. 18314-18326, (2009).
- [40] M. Krzeminski, J. A. Marsh, C. Neale, W.-Y. Choy, et J. D. Forman-Kay, « Characterization of disordered proteins with ENSEMBLE », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 29, n° 3, p. 398-399, (2013).
- [41] M. R. Jensen, L. Salmon, G. Nodet, et M. Blackledge, « Defining conformational ensembles of intrinsically disordered and partially folded proteins directly from chemical shifts », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 4, p. 1270-1272, (2010).
- [42] V. Ozenne, F. Bauer, L. Salmon, J.-R. Huang, M. R. Jensen, S. Segard, P. Bernadó, C. Charavay, et M. Blackledge, « Flexible-meccano: a tool for the generation of explicit ensemble descriptions of intrinsically disordered proteins and their associated experimental observables », *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 28, n° 11, p. 1463-1470, (2012).
- [43] C. J. Oldfield, J. Meng, J. Y. Yang, M. Q. Yang, V. N. Uversky, et A. K. Dunker, « Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners », *BMC Genomics*, vol. 9, n° Suppl 1, p. S1, (2008).
- [44] V. N. Uversky, « The most important thing is the tail: Multitudinous functionalities of intrinsically disordered protein termini », *FEBS Lett.*, vol. 587, n° 13, p. 1891-1901, (2013).
- [45] T. Mittag, J. Marsh, A. Grishaev, S. Orlicky, H. Lin, F. Sicheri, M. Tyers, et J. D. Forman-Kay, « Structure/Function Implications in a Dynamic Complex of the Intrinsically Disordered Sic1 with the Cdc4 Subunit of an SCF Ubiquitin Ligase », *Structure*, vol. 18, n° 4, p. 494-506, (2010).
- [46] P. E. Wright et H. J. Dyson, « Linking folding and binding », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 19, n° 1, p. 31-38, (2009).
- [47] J. Song, L.-W. Guo, H. Muradov, N. O. Artemyev, A. E. Ruoho, et J. L. Markley, « Intrinsically disordered γ -subunit of cGMP phosphodiesterase encodes functionally relevant transient secondary and tertiary structure », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 5, p. 1505-1510, (2008).
- [48] T. S. Ulmer, A. Bax, N. B. Cole, et R. L. Nussbaum, « Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 10, p. 9595-9603, (2005).

- [49] M. Fuxreiter, I. Simon, P. Friedrich, et P. Tompa, « Preformed Structural Elements Feature in Partner Recognition by Intrinsically Unstructured Proteins », *J. Mol. Biol.*, vol. 338, n° 5, p. 1015-1026, (2004).
- [50] J. Higo, Y. Nishimura, et H. Nakamura, « A Free-Energy Landscape for Coupled Folding and Binding of an Intrinsically Disordered Protein in Explicit Solvent from Detailed All-Atom Computations », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, n° 27, p. 10448-10458, (2011).
- [51] J. Chen, « Intrinsically Disordered p53 Extreme C-Terminus Binds to S100B($\beta\beta$) through “Fly-Casting” », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n° 6, p. 2088-2089, (2009).
- [52] E. Trizac, Y. Levy, et P. G. Wolynes, « Capillarity theory for the fly-casting mechanism », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 7, p. 2746-2750, (2010).
- [53] D. Ganguly, W. Zhang, et J. Chen, « Synergistic folding of two intrinsically disordered proteins: searching for conformational selection », *Mol. Biosyst.*, vol. 8, n° 1, p. 198-209, (2011).
- [54] H.-X. Zhou, « From Induced Fit to Conformational Selection: A Continuum of Binding Mechanism Controlled by the Timescale of Conformational Transitions », *Biophys. J.*, vol. 98, n° 6, p. L15-L17, (2010).
- [55] F. Jin, C. Yu, L. Lai, et Z. Liu, « Ligand clouds around protein clouds: a scenario of ligand binding with intrinsically disordered proteins », *PLoS Comput. Biol.*, vol. 9, n° 10, p. e1003249, (2013).
- [56] J. Chen et C. L. Brooks, « Critical importance of length-scale dependence in implicit modeling of hydrophobic interactions », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 9, p. 2444-2445, (2007).
- [57] W. Zhang, D. Ganguly, et J. Chen, « Residual structures, conformational fluctuations, and electrostatic interactions in the synergistic folding of two intrinsically disordered proteins », *PLoS Comput. Biol.*, vol. 8, n° 1, p. e1002353, (2012).
- [58] E. T. C. Wong, D. Na, et J. Gsponer, « On the importance of polar interactions for complexes containing intrinsically disordered proteins », *PLoS Comput. Biol.*, vol. 9, n° 8, p. e1003192, (2013).
- [59] N. Sibille, A. Sillen, A. Leroy, J.-M. Wieruszkeski, B. Mulloy, I. Landrieu, et G. Lippens, « Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy », *Biochemistry*, vol. 45, n° 41, p. 12560-12572, (2006).
- [60] M.-O. Ebert, S.-H. Bae, H. J. Dyson, et P. E. Wright, « NMR relaxation study of the complex formed between CBP and the activation domain of the nuclear hormone receptor coactivator ACTR », *Biochemistry*, vol. 47, n° 5, p. 1299-1308, (2008).
- [61] C. I. Rubin et G. F. Atweh, « The role of stathmin in the regulation of the cell cycle », *J. Cell. Biochem.*, vol. 93, n° 2, p. 242-250, (2004).
- [62] R. B. G. Ravelli, B. Gigant, P. A. Curmi, I. Jourdain, S. Lachkar, A. Sobel, et M. Knossow, « Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain », *Nature*, vol. 428, n° 6979, p. 198-202, (2004).
- [63] B. Gigant, P. A. Curmi, C. Martin-Barbey, E. Charbaut, S. Lachkar, L. Lebeau, S. Siavoshian, A. Sobel, et M. Knossow, « The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex », *Cell*, vol. 102, n° 6, p. 809-816, (2000).
- [64] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, et M. W. Kirschner, « A protein factor essential for microtubule assembly », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, n° 5, p. 1858-1862, (1975).
- [65] M. Morris, S. Maeda, K. Vossel, et L. Mucke, « The Many Faces of Tau », *Neuron*, vol. 70, n° 3, p. 410-426, (2011).

- [66] A. Sillen, P. Barbier, I. Landrieu, S. Lefebvre, J.-M. Wieruszeski, A. Leroy, V. Peyrot, et G. Lippens, « NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules », *Biochemistry*, vol. 46, n° 11, p. 3055-3064, (2007).
- [67] M. H. Hinrichs, A. Jalal, B. Brenner, E. Mandelkow, S. Kumar, et T. Scholz, « Tau Protein Diffuses along the Microtubule Lattice », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 46, p. 38559-38568, (2012).
- [68] T. Scholz et E. Mandelkow, « Transport and diffusion of Tau protein in neurons », *Cell. Mol. Life Sci.*, p. 1-12, (2014).
- [69] S. Kar, « Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol », *EMBO J.*, vol. 22, n° 1, p. 70-77, (2003).
- [70] Y. S. Jho, E. B. Zhulina, M. W. Kim, et P. A. Pincus, « Monte Carlo Simulations of Tau Proteins: Effect of Phosphorylation », *Biophys. J.*, vol. 99, n° 8, p. 2387-2397, (2010).
- [71] E. Mandelkow, M. Von Bergen, J. Biernat, et E.-M. Mandelkow, « Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's Disease », *Brain Pathol.*, vol. 17, n° 1, p. 83-90, (2007).
- [72] M. D. Mukrasch, S. Bibow, J. Korukottu, S. Jeganathan, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, et M. Zweckstetter, « Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution », *PLoS Biol.*, vol. 7, n° 2, p. e1000034, (2009).
- [73] M. Schwalbe, V. Ozenne, S. Bibow, M. Jaremko, L. Jaremko, M. Gajda, M. R. Jensen, J. Biernat, S. Becker, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, et M. Blackledge, « Predictive Atomic Resolution Descriptions of Intrinsically Disordered hTau40 and α -Synuclein in Solution from NMR and Small Angle Scattering », *Structure*, vol. 22, n° 2, p. 238-249, (2014).
- [74] M. D. Mukrasch, M. von Bergen, J. Biernat, D. Fischer, C. Griesinger, E. Mandelkow, et M. Zweckstetter, « The "Jaws" of the Tau-Microtubule Interaction », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 16, p. 12230-12239, (2007).
- [75] V. Ozenne, R. Schneider, M. Yao, J. Huang, L. Salmon, M. Zweckstetter, M. R. Jensen, et M. Blackledge, « Mapping the Potential Energy Landscape of Intrinsically Disordered Proteins at Amino Acid Resolution », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 36, p. 15138-15148, (2012).
- [76] E. Mylonas, A. Hascher, P. Bernadó, M. Blackledge, E. Mandelkow, et D. I. Svergun, « Domain Conformation of Tau Protein Studied by Solution Small-Angle X-ray Scattering† », *Biochemistry*, vol. 47, n° 39, p. 10345-10353, (2008).
- [77] M. D. Mukrasch, P. Markwick, J. Biernat, M. von Bergen, P. Bernadó, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, et M. Blackledge, « Highly Populated Turn Conformations in Natively Unfolded Tau Protein Identified from Residual Dipolar Couplings and Molecular Simulation », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 16, p. 5235-5243, (2007).
- [78] M.-K. Cho, H.-Y. Kim, P. Bernado, C. O. Fernandez, M. Blackledge, et M. Zweckstetter, « Amino Acid Bulkiness Defines the Local Conformations and Dynamics of Natively Unfolded α -Synuclein and Tau », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 11, p. 3032-3033, (2007).
- [79] M. D. Mukrasch, J. Biernat, M. von Bergen, C. Griesinger, E. Mandelkow, et M. Zweckstetter, « Sites of Tau Important for Aggregation Populate β -Structure and Bind to Microtubules and Polyanions », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 26, p. 24978-24986, (2005).
- [80] B. Gigant, I. Landrieu, C. Fauquant, P. Barbier, I. Huvent, J.-M. Wieruszeski, M. Knossow, et G. Lippens, « Mechanism of tau-promoted microtubule assembly as probed by NMR spectroscopy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, n° 36, p. 12615-12623, (2014).

- [81] B. Ma, C.-J. Tsai, T. Haliloğlu, et R. Nussinov, « Dynamic Allostery: Linkers Are Not Merely Flexible », *Structure*, vol. 19, n° 7, p. 907-917, (2011).
- [82] R. Mukhopadhyay et J. H. Hoh, « AFM force measurements on microtubule-associated proteins: the projection domain exerts a long-range repulsive force », *FEBS Lett.*, vol. 505, n° 3, p. 374-378, (2001).
- [83] A. Tulin, S. McClerklin, Y. Huang, et R. Dixit, « Single-Molecule Analysis of the Microtubule Cross-Linking Protein MAP65-1 Reveals a Molecular Mechanism for Contact-Angle-Dependent Microtubule Bundling », *Biophys. J.*, vol. 102, n° 4, p. 802-809, (2012).
- [84] V. Bandaru, W. Cooper, S. S. Wallace, et S. Doublé, « Overproduction, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel human DNA-repair enzyme that recognizes oxidative DNA damage », *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, vol. 60, n° 6, p. 1142-1144, (2004).
- [85] Y. L. Deribe, T. Pawson, et I. Dikic, « Post-translational modifications in signal integration », *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, n° 6, p. 666-672, (2010).
- [86] M. Mann et O. N. Jensen, « Proteomic analysis of post-translational modifications », *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, n° 3, p. 255-261, (2003).
- [87] X.-J. Yang, « Multisite protein modification and intramolecular signaling », *Oncogene*, vol. 24, n° 10, p. 1653-1662, (2004).
- [88] C. Smet-Nocca, M. Broncel, J.-M. Wieruszeski, C. Tokarski, X. Hanouille, A. Leroy, I. Landrieu, C. Rolando, G. Lippens, et C. P. R. Hackenberger, « Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation », *Mol. Biosyst.*, vol. 7, n° 5, p. 1420-1429, (2011).
- [89] Z. Peng, M. J. Mizianty, B. Xue, L. Kurgan, et V. N. Uversky, « More than just tails: intrinsic disorder in histone proteins », *Mol. Biosyst.*, vol. 8, n° 7, p. 1886-1901, (2012).
- [90] J. M. Jenco, A. Rawlingson, B. Daniels, et A. J. Morris, « Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins », *Biochemistry*, vol. 37, n° 14, p. 4901-4909, (1998).
- [91] T. B. Green, O. Ganesh, K. Perry, L. Smith, L. H. Phylip, T. M. Logan, S. J. Hagen, B. M. Dunn, et A. S. Edison, « IA3, an aspartic proteinase inhibitor from *Saccharomyces cerevisiae*, is intrinsically unstructured in solution », *Biochemistry*, vol. 43, n° 14, p. 4071-4081, (2004).
- [92] O. K. Ganesh, T. B. Green, A. S. Edison, et S. J. Hagen, « Characterizing the residue level folding of the intrinsically unstructured IA3 », *Biochemistry*, vol. 45, n° 45, p. 13585-13596, (2006).
- [93] M. Domanski, M. Hertzog, J. Coutant, I. Gutsche-Perelroizen, F. Bontems, M.-F. Carlier, E. Guittet, et C. van Heijenoort, « Coupling of Folding and Binding of Thymosin β 4 upon Interaction with Monomeric Actin Monitored by Nuclear Magnetic Resonance », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n° 22, p. 23637-23645, (2004).
- [94] I. Bock-Marquette, A. Saxena, M. D. White, J. Michael DiMaio, et D. Srivastava, « Thymosin β 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair », *Nature*, vol. 432, n° 7016, p. 466-472, (2004).
- [95] D. M. Carlson, « Salivary proline-rich proteins: biochemistry, molecular biology, and regulation of expression », *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.*, vol. 4, n° 3-4, p. 495-502, (1993).
- [96] N. J. Baxter, T. H. Lilley, E. Haslam, et M. P. Williamson, « Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation », *Biochemistry*, vol. 36, n° 18, p. 5566-5577, (1997).

- [97] Y. Lu et A. Bennick, « Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins », *Arch. Oral Biol.*, vol. 43, n° 9, p. 717-728, (1998).
- [98] P. Faller, C. Hureau, et G. La Penna, « Metal Ions and Intrinsically Disordered Proteins and Peptides: From Cu/Zn Amyloid- β to General Principles », *Acc. Chem. Res.*, (2014).
- [99] S. D. Zakharov, J. D. Hulleman, E. A. Dutseva, Y. N. Antonenko, J.-C. Rochet, et W. A. Cramer, « Helical alpha-synuclein forms highly conductive ion channels », *Biochemistry*, vol. 46, n° 50, p. 14369-14379, (2007).
- [100] I. Boquet, R. Boujemaa, M.-F. Carlier, et T. Pr eat, « Ciboulot Regulates Actin Assembly during Drosophila Brain Metamorphosis », *Cell*, vol. 102, n° 6, p. 797-808, (2000).
- [101] S. F. Falsone, N. H. Meyer, E. Schrank, G. Leitinger, C. L. L. Pham, M. T. Fodero-Tavoletti, M. Holmberg, M. Dulle, B. Scicluna, B. Gesslbauer, H.-M. R uckert, G. E. Wagner, D. A. Merle, E. A. Nollen, A. J. Kungl, A. F. Hill, R. Cappai, et K. Zangger, « SERF protein is a direct modifier of amyloid fiber assembly », *Cell Rep.*, vol. 2, n° 2, p. 358-371, (2012).
- [102] P. Tompa et D. Kovacs, « Intrinsically disordered chaperones in plants and animals This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled “Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 52nd Annual Meeting — Protein Folding: Principles and Diseases” and has undergone the Journal’s usual peer review process. », *Biochem. Cell Biol.*, vol. 88, n° 2, p. 167-174, (2010).
- [103] P. Tompa et P. Csermely, « The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones », *FASEB J.*, vol. 18, n° 11, p. 1169-1175, (2004).
- [104] Y.-J. Chen et M. Inouye, « The intramolecular chaperone-mediated protein folding », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 18, n° 6, p. 765-770, (2008).
- [105] H. Ikemura, H. Takagi, et M. Inouye, « Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in Escherichia coli. », *J. Biol. Chem.*, vol. 262, n° 16, p. 7859-7864, (1987).
- [106] J. L. Silen, D. Frank, A. Fujishige, R. Bone, et D. A. Agard, « Analysis of prepro-alytic protease expression in Escherichia coli reveals that the pro region is required for activity », *J. Bacteriol.*, vol. 171, n° 3, p. 1320-1325, (1989).
- [107] J. D. Sipe et A. S. Cohen, « Review: history of the amyloid fibril », *J. Struct. Biol.*, vol. 130, n° 2-3, p. 88-98, (2000).
- [108] A. S. Cohen et E. Calkins, « Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins », *Nature*, vol. 183, n° 4669, p. 1202-1203, (1959).
- [109] J. C. Rochet et P. T. Lansbury, « Amyloid fibrillogenesis: themes and variations », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 10, n° 1, p. 60-68, (2000).
- [110] A. J. Geddes, K. D. Parker, E. D. T. Atkins, et E. Beighton, « “Cross- β ” conformation in proteins », *J. Mol. Biol.*, vol. 32, n° 2, p. 343-358, (1968).
- [111] A. J. Howie et D. B. Brewer, « Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms », *Micron Oxf. Engl.* 1993, vol. 40, n° 3, p. 285-301, (2009).
- [112] R. Tycko, « Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils », *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 14, n° 1, p. 96-103, (2004).
- [113] T. Eichner et S. E. Radford, « A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold », *Mol. Cell*, vol. 43, n° 1, p. 8-18, (2011).
- [114] J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff, et M. F andrich, « A β (1-40) Fibril Polymorphism Implies Diverse Interaction Patterns in Amyloid Fibrils », *J. Mol. Biol.*, vol. 386, n° 3, p. 869-877, (2009).

- [115] J.-X. Lu, W. Qiang, W.-M. Yau, C. D. Schwieters, S. C. Meredith, et R. Tycko, « Molecular Structure of β -Amyloid Fibrils in Alzheimer's Disease Brain Tissue », *Cell*, vol. 154, n° 6, p. 1257-1268, (2013).
- [116] R. Tycko, « Solid-state nuclear magnetic resonance techniques for structural studies of amyloid fibrils », *Methods Enzymol.*, vol. 339, p. 390-413, (2001).
- [117] M. Margittai et R. Langen, « Spin labeling analysis of amyloids and other protein aggregates », *Methods Enzymol.*, vol. 413, p. 122-139, (2006).
- [118] R. Nelson, M. R. Sawaya, M. Balbirnie, A. Ø. Madsen, C. Riek, R. Grothe, et D. Eisenberg, « Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils », *Nature*, vol. 435, n° 7043, p. 773-778, (2005).
- [119] M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. W. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. Ø. Madsen, C. Riek, et D. Eisenberg, « Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers », *Nature*, vol. 447, n° 7143, p. 453-457, (2007).
- [120] D. Eisenberg et M. Jucker, « The Amyloid State of Proteins in Human Diseases », *Cell*, vol. 148, n° 6, p. 1188-1203, (2012).
- [121] A. G. P. III, W. J. Fairbrother, J. Cavanagh, N. J. Skelton, et M. Rance, *Protein NMR Spectroscopy, Second Edition: Principles and Practice*, 2 edition. Amsterdam ; Boston: Academic Press, 2005.
- [122] S. C. Panchal, N. S. Bhavesh, et R. V. Hosur, « Improved 3D triple resonance experiments, HNN and HN(C)N, for HN and ^{15}N sequential correlations in (^{13}C , ^{15}N) labeled proteins: application to unfolded proteins », *J. Biomol. NMR*, vol. 20, n° 2, p. 135-147, (2001).
- [123] J. Lopez, P. Ahuja, M. Gerard, J.-M. Wieruszkeski, et G. Lippens, « A new strategy for sequential assignment of intrinsically unstructured proteins based on ^{15}N single isotope labelling », *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997*, vol. 236, p. 1-6, (2013).
- [124] S. Kosol, S. Contreras-Martos, C. Cedeño, et P. Tompa, « Structural characterization of intrinsically disordered proteins by NMR spectroscopy », *Mol. Basel Switz.*, vol. 18, n° 9, p. 10802-10828, (2013).
- [125] V. Motáčková, J. Nováček, A. Zawadzka-Kazimierczuk, K. Kazimierczuk, L. Zídek, H. Sanderová, L. Krásný, W. Koźmiński, et V. Sklenář, « Strategy for complete NMR assignment of disordered proteins with highly repetitive sequences based on resolution-enhanced 5D experiments », *J. Biomol. NMR*, vol. 48, n° 3, p. 169-177, (2010).
- [126] J. Nováček, N. Y. Haba, J. H. Chill, L. Zídek, et V. Sklenář, « 4D non-uniformly sampled HCBCACON and $^1\text{J}(\text{NC}\alpha)$ -selective HCBCANCO experiments for the sequential assignment and chemical shift analysis of intrinsically disordered proteins », *J. Biomol. NMR*, vol. 53, n° 2, p. 139-148, (2012).
- [127] J. C. Hoch, M. W. Maciejewski, M. Mobli, A. D. Schuyler, et A. S. Stern, « Nonuniform Sampling and Maximum Entropy Reconstruction in Multidimensional NMR », *Acc. Chem. Res.*, vol. 47, n° 2, p. 708-717, (2014).
- [128] S. G. Hyberts, H. Arthanari, et G. Wagner, « Applications of non-uniform sampling and processing », *Top. Curr. Chem.*, vol. 316, p. 125-148, (2012).
- [129] R. L. Narayanan, U. H. N. Dürr, S. Bibow, J. Biernat, E. Mandelkow, et M. Zweckstetter, « Automatic assignment of the intrinsically disordered protein Tau with 441-residues », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 34, p. 11906-11907, (2010).
- [130] W. Bermel, I. C. Felli, R. Kümmeler, et R. Pierattelli, « ^{13}C Direct-detection biomolecular NMR », *Concepts Magn. Reson. Part A*, vol. 32A, n° 3, p. 183-200, (2008).

- [131] S.-T. D. Hsu, C. W. Bertoncini, et C. M. Dobson, « Use of protonless NMR spectroscopy to alleviate the loss of information resulting from exchange-broadening », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n° 21, p. 7222-7223, (2009).
- [132] N. W. Harbison, S. Bhattacharya, et D. Eliezer, « Assigning Backbone NMR Resonances for Full Length Tau Isoforms: Efficient Compromise between Manual Assignments and Reduced Dimensionality », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 4, p. e34679, (2012).
- [133] D. Verdegem, K. Dijkstra, X. Hanouille, et G. Lippens, « Graphical interpretation of Boolean operators for protein NMR assignments », *J. Biomol. NMR*, vol. 42, n° 1, p. 11-21, (2008).
- [134] S. W. Englander et N. R. Kallenbach, « Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids », *Q. Rev. Biophys.*, vol. 16, n° 4, p. 521-655, (1983).
- [135] T. Uzawa, C. Nishimura, S. Akiyama, K. Ishimori, S. Takahashi, H. J. Dyson, et P. E. Wright, « Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 37, p. 13859-13864, (2008).
- [136] L. Tang, S. Sundaram, J. Zhang, P. Carlson, A. Matathia, B. Parekh, Q. Zhou, et M.-C. Hsieh, « Conformational characterization of the charge variants of a human IgG1 monoclonal antibody using H/D exchange mass spectrometry », *mAbs*, vol. 5, n° 1, p. 114-125, (2013).
- [137] A. Sljoka et D. Wilson, « Probing protein ensemble rigidity and hydrogen-deuterium exchange », *Phys. Biol.*, vol. 10, n° 5, p. 056013, (2013).
- [138] C. Del Mar, E. A. Greenbaum, L. Mayne, S. W. Englander, et V. L. Woods, « Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 43, p. 15477-15482, (2005).
- [139] S. Sharma, H. Zheng, Y. J. Huang, A. Ertekin, Y. Hamuro, P. Rossi, R. Tejero, T. B. Acton, R. Xiao, M. Jiang, L. Zhao, L.-C. Ma, G. V. T. Swapna, J. M. Aramini, et G. T. Montelione, « Construct optimization for protein NMR structure analysis using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry », *Proteins*, vol. 76, n° 4, p. 882-894, (2009).
- [140] Y.-H. Lee et Y. Goto, « Kinetic intermediates of amyloid fibrillation studied by hydrogen exchange methods with nuclear magnetic resonance », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1824, n° 12, p. 1307-1323, (2012).
- [141] J. G. Mandell, A. Baerga-Ortiz, A. M. Falick, et E. A. Komives, « Measurement of Solvent Accessibility at Protein-Protein Interfaces », in *Protein-Ligand Interactions*, G. U. Nienhaus, Éd. Humana Press, 2005, p. 65-79.
- [142] A. Baerga-Ortiz, C. A. Hughes, J. G. Mandell, et E. A. Komives, « Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein », *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 11, n° 6, p. 1300-1308, (2002).
- [143] D. Balasubramaniam et E. A. Komives, « Hydrogen-exchange mass spectrometry for the study of intrinsic disorder in proteins », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1834, n° 6, p. 1202-1209, (2013).
- [144] K. Wood, A. Paz, K. Dijkstra, R. M. Scheek, R. Otten, I. Silman, J. L. Sussman, et F. A. A. Mulder, « Backbone and side chain NMR assignments for the intrinsically disordered cytoplasmic domain of human neuroligin-3 », *Biomol. NMR Assign.*, vol. 6, n° 1, p. 15-18, (2012).

- [145] J. R. Engen, T. E. Wales, S. Chen, E. M. Marzluff, K. M. Hassell, D. D. Weis, et T. E. Smithgall, « Partial cooperative unfolding in proteins as observed by hydrogen exchange mass spectrometry », *Int. Rev. Phys. Chem.*, vol. 32, n° 1, p. 96-127, (2013).
- [146] C. H. Croy, S. Bergqvist, T. Huxford, G. Ghosh, et E. A. Komives, « Biophysical characterization of the free IκBα ankyrin repeat domain in solution », *Protein Sci.*, vol. 13, n° 7, p. 1767-1777, (2004).
- [147] C. Smet-Nocca, H. Launay, J.-M. Wieruszkeski, G. Lippens, et I. Landrieu, « Unraveling a phosphorylation event in a folded protein by NMR spectroscopy: phosphorylation of the Pin1 WW domain by PKA », *J. Biomol. NMR*, vol. 55, n° 4, p. 323-337, (2013).
- [148] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, et R. Riek, « 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 48, p. 17342-17347, (2005).
- [149] M. Goedert et M. G. Spillantini, « A century of Alzheimer's disease », *Science*, vol. 314, n° 5800, p. 777-781, (2006).
- [150] M. Kidd, « Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease », *Nature*, vol. 197, p. 192-193, (1963).
- [151] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, et M. W. Kirschner, « A protein factor essential for microtubule assembly », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 72, n° 5, p. 1858-1862, (1975).
- [152] J. G. Wood, S. S. Mirra, N. J. Pollock, et L. I. Binder, « Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau) », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, n° 11, p. 4040-4043, (1986).
- [153] H. Wille, G. Drewes, J. Biernat, E. M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro », *J. Cell Biol.*, vol. 118, n° 3, p. 573-584, (1992).
- [154] O. Schweers, E. M. Mandelkow, J. Biernat, et E. Mandelkow, « 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.*, vol. 92, n° 18, p. 8463-8467, (1995).
- [155] M. Goedert, R. Jakes, M. G. Spillantini, M. Hasegawa, M. J. Smith, et R. A. Crowther, « Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans », *Nature*, vol. 383, n° 6600, p. 550-553, (1996).
- [156] M. G. Spillantini, R. A. Crowther, W. Kamphorst, P. Heutink, et J. C. van Swieten, « Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau », *Am. J. Pathol.*, vol. 153, n° 5, p. 1359-1363, (1998).
- [157] E. M. Ingram et M. G. Spillantini, « Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17 », *Trends Mol. Med.*, vol. 8, n° 12, p. 555-562, (2002).
- [158] P. Nacharaju, J. Lewis, C. Easson, S. Yen, J. Hackett, M. Hutton, et S. H. Yen, « Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations », *FEBS Lett.*, vol. 447, n° 2-3, p. 195-199, (1999).
- [159] O. C. Andronesi, M. von Bergen, J. Biernat, K. Seidel, C. Griesinger, E. Mandelkow, et M. Baldus, « Characterization of Alzheimer's-like paired helical filaments from the core domain of tau protein using solid-state NMR spectroscopy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 18, p. 5922-5928, (2008).
- [160] V. Daebel, S. Chinnathambi, J. Biernat, M. Schwalbe, B. Habenstein, A. Loquet, E. Akoury, K. Tepper, H. Müller, M. Baldus, C. Griesinger, M. Zweckstetter, E. Mandelkow, V. Vijayan, et A. Lange, « β -Sheet core of tau paired helical filaments

- revealed by solid-state NMR », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 34, p. 13982-13989, (2012).
- [161] Y. Gu, F. Oyama, et Y. Ihara, « τ Is widely expressed in rat tissues », *J. Neurochem.*, vol. 67, n° 3, p. 1235-1244, (1996).
- [162] V. M.-Y. Lee, M. Goedert, et J. Q. Trojanowski, « Neurodegenerative Tauopathies », *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 24, n° 1, p. 1121-1159, (2001).
- [163] J. Q. Trojanowski, T. Schuck, M. L. Schmidt, et V. M. Lee, « Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. », *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 37, n° 2, p. 209-215, (1989).
- [164] K. Tashiro, M. Hasegawa, Y. Ihara, et T. Iwatsubo, « Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex », *NeuroReport*, vol. 8, n° 12, p. 2797-2801, (1997).
- [165] E.-M. Mandelkow, O. Schweers, G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, B. Trinczek, et E. Mandelkow, *Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein*, vol. 777. 1996.
- [166] M. Goedert, M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, et R. A. Crowther, « Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease », *Neuron*, vol. 3, n° 4, p. 519-526, (1989).
- [167] W. Chun et G. V. W. Johnson, « The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death », *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 12, p. 733-756, (2007).
- [168] C. H. Reynolds, C. J. Garwood, S. Wray, C. Price, S. Kellie, T. Perera, M. Zvelebil, A. Yang, P. W. Sheppard, I. M. Varndell, D. P. Hanger, et B. H. Anderton, « Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 26, p. 18177-18186, (2008).
- [169] G. Lee, S. T. Newman, D. L. Gard, H. Band, et G. Panthamoorthy, « Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases », *J. Cell Sci.*, vol. 111 (Pt 21), p. 3167-3177, (1998).
- [170] E. M. Jones, M. Dubey, P. J. Camp, B. C. Vernon, J. Biernat, E. Mandelkow, J. Majewski, et E. Y. Chi, « Interaction of Tau Protein with Model Lipid Membranes Induces Tau Structural Compaction and Membrane Disruption », *Biochemistry* , vol. 51, n° 12, p. 2539-2550, (2012).
- [171] R. Brandt, J. Léger, et G. Lee, « Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain », *J. Cell Biol.*, vol. 131, n° 5, p. 1327-1340, (1995).
- [172] A. Gauthier-Kemper, C. Weissmann, N. Golovyashkina, Z. Sebö-Lemke, G. Drewes, V. Gerke, J. J. Heinisch, et R. Brandt, « The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner », *J. Cell Biol.*, vol. 192, n° 4, p. 647-661, (2011).
- [173] V. Padmaraju, S. S. Indi, et K. S. J. Rao, « New evidences on Tau-DNA interactions and relevance to neurodegeneration », *Neurochem. Int.*, vol. 57, n° 1, p. 51-57, (2010).
- [174] H. He, X. Wang, R. Pan, D. Wang, M. Liu, et R. He, « The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin », *BMC Cell Biol.*, vol. 10, n° 1, p. 81, (2009).
- [175] G. Gallo, « Tau is actin up in Alzheimer's disease », *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, n° 2, p. 133-134, (2007).
- [176] S. C. Selden et T. D. Pollard, « Interaction of actin filaments with microtubules is mediated by microtubule-associated proteins and regulated by phosphorylation », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 466, p. 803-812, (1986).

- [177] J. Giustiniani, B. Chambraud, E. Sardin, O. Dounane, K. Guillemeau, H. Nakatani, D. Paquet, A. Kamah, I. Landrieu, G. Lippens, E.-E. Baulieu, et M. Tawk, « 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.*, vol. 111, n° 12, p. 4584-4589, (2014).
- [178] W. Cao et M. Konsolaki, « FKBP immunophilins and Alzheimer's disease: a chaperoned affair », *J. Biosci.*, vol. 36, n° 3, p. 493-498, (2011).
- [179] B. Chambraud, E. Sardin, J. Giustiniani, O. Dounane, M. Schumacher, M. Goedert, et E.-E. Baulieu, « A role for FKBP52 in Tau protein function », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, n° 6, p. 2658-2663, (2010).
- [180] B. Trinczek, J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules », *Mol. Biol. Cell*, vol. 6, n° 12, p. 1887-1902, (1995).
- [181] B. L. Goode et S. C. Feinstein, « Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau », *J. Cell Biol.*, vol. 124, n° 5, p. 769-782, (1994).
- [182] M. von Bergen, S. Barghorn, L. Li, A. Marx, J. Biernat, E. M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 51, p. 48165-48174, (2001).
- [183] C. Fauquant, V. Redeker, I. Landrieu, J.-M. Wieruszeski, D. Verdegem, O. Laprèvote, G. Lippens, B. Gigant, et M. Knossow, « Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein Tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly », *J. Biol. Chem.*, vol. 286, n° 38, p. 33358-33368, (2011).
- [184] N. Gustke, B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Domains of tau protein and interactions with microtubules », *Biochemistry*, vol. 33, n° 32, p. 9511-9522, (1994).
- [185] G. Lee et S. L. Rook, « Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization », *J. Cell Sci.*, vol. 102 (Pt 2), p. 227-237, (1992).
- [186] B. L. Goode, P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson, et S. C. Feinstein, « Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly », *Mol. Biol. Cell*, vol. 8, n° 2, p. 353-365, (1997).
- [187] C. Smet, A.-V. Sambo, J.-M. Wieruszeski, A. Leroy, I. Landrieu, L. Buée, et G. Lippens, « The Peptidyl Prolyl cis/trans-Isomerase Pin1 Recognizes the Phospho-Thr212-Pro213 Site on Tau[†] », *Biochemistry*, vol. 43, n° 7, p. 2032-2040, (2004).
- [188] I. Landrieu, C. Smet-Nocca, L. Amniai, J. V. Louis, J.-M. Wieruszeski, J. Goris, V. Janssens, et G. Lippens, « Molecular implication of PP2A and Pin1 in the Alzheimer's disease specific hyperphosphorylation of Tau », *PLoS One*, vol. 6, n° 6, p. e21521, (2011).
- [189] E. Sontag, V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, R. Brandt, C. Kamibayashi, J. Kuret, C. L. White, M. C. Mumby, et G. S. Bloom, « Molecular Interactions among Protein Phosphatase 2A, Tau, and Microtubules IMPLICATIONS FOR THE REGULATION OF TAU PHOSPHORYLATION AND THE DEVELOPMENT OF TAUOPATHIES », *J. Biol. Chem.*, vol. 274, n° 36, p. 25490-25498, (1999).
- [190] J. Chen, Y. Kanai, N. J. Cowan, et N. Hirokawa, « Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons », *Nature*, vol. 360, n° 6405, p. 674-677, (1992).

- [191] H. Yin et J. Kuret, « C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization », *FEBS Lett.*, vol. 580, n° 1, p. 211-215, (2006).
- [192] A. A. Bielska et N. J. Zondlo, « Hyperphosphorylation of tau induces local polyproline II helix », *Biochemistry*, vol. 45, n° 17, p. 5527-5537, (2006).
- [193] S. Jeganathan, A. Hascher, S. Chinnathambi, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Proline-directed Pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 Epitopes Induces a Compaction of the Paperclip Folding of Tau and Generates a Pathological (MC-1) Conformation », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 46, p. 32066-32076, (2008).
- [194] J. C. Augustinack, A. Schneider, E.-M. Mandelkow, et B. T. Hyman, « Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease », *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 103, n° 1, p. 26-35, (2002).
- [195] G. Lee, R. Thangavel, V. M. Sharma, J. M. Litersky, K. Bhaskar, S. M. Fang, L. H. Do, A. Andreadis, G. V. Hoesen, et H. Ksiezak-Reding, « Phosphorylation of Tau by Fyn: Implications for Alzheimer's Disease », *J. Neurosci.*, vol. 24, n° 9, p. 2304-2312, (2004).
- [196] G. Lippens, A. Sillen, I. Landrieu, L. Amniai, N. Sibille, P. Barbier, A. Leroy, X. Hanouille, et J.-M. Wieruszkeski, « Tau aggregation in Alzheimer's disease: what role for phosphorylation? », *Prion*, vol. 1, n° 1, p. 21-25, (2007).
- [197] T. J. Cohen, J. L. Guo, D. E. Hurtado, L. K. Kwong, I. P. Mills, J. Q. Trojanowski, et V. M. Y. Lee, « The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation », *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 252, (2011).
- [198] S.-W. Min, S.-H. Cho, Y. Zhou, S. Schroeder, V. Haroutunian, W. W. Seeley, E. J. Huang, Y. Shen, E. Masliah, C. Mukherjee, D. Meyers, P. A. Cole, M. Ott, et L. Gan, « Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to Tauopathy », *Neuron*, vol. 67, n° 6, p. 953-966, (2010).
- [199] M. M. M. Wilhelmus, S. C. S. Grunberg, J. G. J. M. Bol, A.-M. Van Dam, J. J. M. Hoozemans, A. J. M. Rozemuller, et B. Drukarch, « Transglutaminases and Transglutaminase-Catalyzed Cross-Links Colocalize with the Pathological Lesions in Alzheimer's Disease Brain », *Brain Pathol.*, vol. 19, n° 4, p. 612-622, (2009).
- [200] M. D. Ledesma, M. Medina, et J. Avila, « The in vitro formation of recombinant tau polymers: effect of phosphorylation and glycation », *Mol. Chem. Neuropathol. Spons. Int. Soc. Neurochem. World Fed. Neurol. Res. Groups Neurochem. Cerebrospinal Fluid*, vol. 27, n° 3, p. 249-258, (1996).
- [201] J. F. Reyes, M. R. Reynolds, P. M. Horowitz, Y. Fu, A. L. Guillozet-Bongaarts, R. Berry, et L. I. Binder, « A possible link between astrocyte activation and tau nitration in Alzheimer's disease », *Neurobiol. Dis.*, vol. 31, n° 2, p. 198-208, (2008).
- [202] V. Dorval et P. E. Fraser, « Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Modification of Natively Unfolded Proteins Tau and α -Synuclein », *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n° 15, p. 9919-9924, (2006).
- [203] D. Cripps, S. N. Thomas, Y. Jeng, F. Yang, P. Davies, et A. J. Yang, « 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.*, vol. 281, n° 16, p. 10825-10838, (2006).
- [204] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi, et H. M. Wisniewski, « Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments », *J. Biol. Chem.*, vol. 261, n° 13, p. 6084-6089, (1986).

- [205] H. Ksiezak-Reding, W. K. Liu, et S. H. Yen, « Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments », *Brain Res.*, vol. 597, n° 2, p. 209-219, (1992).
- [206] E. Köpke, Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal, et I. Grundke-Iqbal, « Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. », *J. Biol. Chem.*, vol. 268, n° 32, p. 24374-24384, (1993).
- [207] J.-M. Sontag et E. Sontag, « Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease », *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 7, p. 16, (2014).
- [208] J.-Z. Wang, Y.-Y. Xia, I. Grundke-Iqbal, et K. Iqbal, « Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration », *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 33 Suppl 1, p. S123-139, (2013).
- [209] L. Martin, X. Latypova, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M.-L. Perrin, C. Yardin, et F. Terro, « Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease », *Ageing Res. Rev.*, vol. 12, n° 1, p. 289-309, (2013).
- [210] G. V. W. Johnson et W. H. Stoothoff, « Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction », *J. Cell Sci.*, vol. 117, n° 24, p. 5721-5729, (2004).
- [211] D. P. Hanger, K. Hughes, J. R. Woodgett, J.-P. Brion, et B. H. Anderton, « 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.*, vol. 147, n° 1, p. 58-62, (1992).
- [212] E.-M. Mandelkow, G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenheede, et E. Mandelkow, « Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau », *FEBS Lett.*, vol. 314, n° 3, p. 315-321, (1992).
- [213] A. Leroy, I. Landrieu, I. Huvent, D. Legrand, B. Codeville, J.-M. Wieruszeski, et G. Lippens, « 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.*, vol. 285, n° 43, p. 33435-33444, (2010).
- [214] K. Baumann, E.-M. Mandelkow, J. Biernat, H. Piwnica-Worms, et E. Mandelkow, « Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5 », *FEBS Lett.*, vol. 336, n° 3, p. 417-424, (1993).
- [215] G. Drewes, B. Lichtenberg-Kraag, F. Döring, E. M. Mandelkow, J. Biernat, J. Goris, M. Dorée, et E. Mandelkow, « Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state », *EMBO J.*, vol. 11, n° 6, p. 2131-2138, (1992).
- [216] G. Drewes, A. Ebner, U. Preuss, E.-M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption », *Cell*, vol. 89, n° 2, p. 297-308, (1997).
- [217] M. Kishi, Y. A. Pan, J. G. Crump, et J. R. Sanes, « Mammalian SAD Kinases Are Required for Neuronal Polarization », *Science*, vol. 307, n° 5711, p. 929-932, (2005).
- [218] G. Drewes, B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E.-M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Microtubule-associated Protein/Microtubule Affinity-regulating Kinase (p110mark) A NOVEL PROTEIN KINASE THAT REGULATES TAU-MICROTUBULE INTERACTIONS AND DYNAMIC INSTABILITY BY PHOSPHORYLATION AT THE ALZHEIMER-SPECIFIC SITE SERINE 262 », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 13, p. 7679-7688, (1995).

- [219] K. Bhaskar, S.-H. Yen, et G. Lee, « Disease-related Modifications in Tau Affect the Interaction between Fyn and Tau », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 42, p. 35119-35125, (2005).
- [220] P. Derkinderen, T. M. E. Scales, D. P. Hanger, K.-Y. Leung, H. L. Byers, M. A. Ward, C. Lenz, C. Price, I. N. Bird, T. Perera, S. Kellie, R. Williamson, W. Noble, R. A. V. Etten, K. Leroy, J.-P. Brion, C. H. Reynolds, et B. H. Anderton, « Tyrosine 394 Is Phosphorylated in Alzheimer's Paired Helical Filament Tau and in Fetal Tau with c-Abl as the Candidate Tyrosine Kinase », *J. Neurosci.*, vol. 25, n° 28, p. 6584-6593, (2005).
- [221] R. Brandt, G. Lee, D. B. Teplow, D. Shalloway, et M. Abdel-Ghany, « Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation. », *J. Biol. Chem.*, vol. 269, n° 16, p. 11776-11782, (1994).
- [222] Q. Zheng-Fischhöfer, J. Biernat, E. M. Mandelkow, S. Illenberger, R. Godemann, et E. Mandelkow, « Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation », *Eur. J. Biochem. FEBS*, vol. 252, n° 3, p. 542-552, (1998).
- [223] A. Schneider, J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow, et E.-M. Mandelkow, « Phosphorylation that Detaches Tau Protein from Microtubules (Ser262, Ser214) Also Protects It against Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments† », *Biochemistry*, vol. 38, n° 12, p. 3549-3558, (1999).
- [224] A. Alonso, T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, et K. Iqbal, « Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, n° 12, p. 6923-6928, (2001).
- [225] M. O. Chohan, N. Haque, A. Alonso, E. El-Akkad, I. Grundke-Iqbal, A. Grover, et K. Iqbal, « Hyperphosphorylation-induced self assembly of murine tau: a comparison with human tau », *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996*, vol. 112, n° 8, p. 1035-1047, (2005).
- [226] P. Friedhoff, A. Schneider, E. M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution », *Biochemistry*, vol. 37, n° 28, p. 10223-10230, (1998).
- [227] T. Kampers, P. Friedhoff, J. Biernat, E. M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments », *FEBS Lett.*, vol. 399, n° 3, p. 344-349, (1996).
- [228] J. Madine, H. A. Davies, E. Hughes, et D. A. Middleton, « Heparin promotes the rapid fibrillization of a peptide with low intrinsic amyloidogenicity », *Biochemistry*, vol. 52, n° 50, p. 8984-8992, (2013).
- [229] A. R. Duan et H. V. Goodson, « Taxol-stabilized microtubules promote the formation of filaments from unmodified full-length Tau in vitro », *Mol. Biol. Cell*, vol. 23, n° 24, p. 4796-4806, (2012).
- [230] A. Sillen, A. Leroy, J.-M. Wieruszeski, A. Loyens, J.-C. Beauvillain, L. Buée, I. Landrieu, et G. Lippens, « Regions of Tau Implicated in the Paired Helical Fragment Core as Defined by NMR », *ChemBioChem*, vol. 6, n° 10, p. 1849-1856, (2005).
- [231] S. Taniguchi, N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert, et M. Hasegawa, « Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 9, p. 7614-7623, (2005).
- [232] R. L. Johnson, W. Huang, R. Huang, A. Crowe, C. Ballatore, J. Q. Trojanowski, K. R. Brunden, et V. M.-Y. Lee, « High Throughput Screening for Small Molecule Inhibitors

- of Heparin-induced Tau Fibril Formation », in *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2010.
- [233] A. Daccache, C. Lion, N. Sibille, M. Gerard, C. Slomianny, G. Lippens, et P. Cotelle, « Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors », *Neurochem. Int.*, vol. 58, n° 6, p. 700-707, (2011).
- [234] B. Bulic, M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow, et E. Mandelkow, « Tau protein and tau aggregation inhibitors », *Neuropharmacology*, vol. 59, n° 4-5, p. 276-289, (2010).
- [235] B. Bulic, M. Pickhardt, et E. Mandelkow, « Progress and Developments in Tau Aggregation Inhibitors for Alzheimer Disease », *J. Med. Chem.*, vol. 56, n° 11, p. 4135-4155, (2013).
- [236] M. Padurariu, A. Ciobica, R. Lefter, I. L. Serban, C. Stefanescu, et R. Chirita, « The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease », *Psychiatr. Danub.*, vol. 25, n° 4, p. 401-409, (2013).
- [237] I. Huvent, A. Kamah, F.-X. Cantrelle, N. Barois, C. Slomianny, C. Smet-Nocca, I. Landrieu, et G. Lippens, « A functional fragment of Tau forms fibers without the need for an intermolecular cysteine bridge », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 445, n° 2, p. 299-303, (2014).
- [238] E. Akoury, M. Pickhardt, M. Gajda, J. Biernat, E. Mandelkow, et M. Zweckstetter, « Mechanistic basis of phenothiazine-driven inhibition of Tau aggregation », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 52, n° 12, p. 3511-3515, (2013).
- [239] C. M. Wischik, P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth, et C. R. Harrington, « Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, n° 20, p. 11213-11218, (1996).
- [240] R. Khurana, V. N. Uversky, L. Nielsen, et A. L. Fink, « Is Congo red an amyloid-specific dye? », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 25, p. 22715-22721, (2001).
- [241] A. Noormägi, K. Primar, V. Tõugu, et P. Palumaa, « Interference of low-molecular substances with the thioflavin-T fluorescence assay of amyloid fibrils », *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, vol. 18, n° 1, p. 59-64, (2012).
- [242] Y. Suzuki, J. R. Brender, K. Hartman, A. Ramamoorthy, et E. N. G. Marsh, « Alternative pathways of human islet amyloid polypeptide aggregation distinguished by (19)f nuclear magnetic resonance-detected kinetics of monomer consumption », *Biochemistry*, vol. 51, n° 41, p. 8154-8162, (2012).
- [243] S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee, et J. A. Carver, « The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds », *FEBS J.*, vol. 276, n° 20, p. 5960-5972, (2009).
- [244] A. Crowe, C. Ballatore, E. Hyde, J. Q. Trojanowski, et V. M.-Y. Lee, « High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 358, n° 1, p. 1-6, (2007).
- [245] J. Lopez, P. Ahuja, I. Landrieu, F.-X. Cantrelle, I. Huvent, et G. Lippens, « H/D exchange of a (15)N labelled Tau fragment as measured by a simple Relax-EXSY experiment », *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997*, vol. 249C, p. 32-37, (2014).
- [246] J. W. Peng et G. Wagner, « Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in eglin c using heteronuclear relaxation experiments », *Biochemistry*, vol. 31, n° 36, p. 8571-8586, (1992).
- [247] N. A. Farrow, O. Zhang, A. Szabo, D. A. Torchia, et L. E. Kay, « Spectral density function mapping using 15N relaxation data exclusively », *J. Biomol. NMR*, vol. 6, n° 2, p. 153-162, (1995).

- [248] M. Goedert, « Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases », *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 2, n° 7, p. 492-501, (2001).
- [249] C. Hansen et J.-Y. Li, « Beyond α -synuclein transfer: pathology propagation in Parkinson's disease », *Trends Mol. Med.*, vol. 18, n° 5, p. 248-255, (2012).
- [250] M. G. Spillantini, M. L. Schmidt, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes, et M. Goedert, « α -Synuclein in Lewy bodies », *Nature*, vol. 388, n° 6645, p. 839-840, (1997).
- [251] M. Bisaglia, S. Mammi, et L. Bubacco, « Structural insights on physiological functions and pathological effects of α -synuclein », *FASEB J.*, vol. 23, n° 2, p. 329-340, (2009).
- [252] B. I. Giasson, I. V. Murray, J. Q. Trojanowski, et V. M. Lee, « A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 4, p. 2380-2386, (2001).
- [253] T. Bartels, J. G. Choi, et D. J. Selkoe, « α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation », *Nature*, vol. 477, n° 7362, p. 107-110, (2011).
- [254] W. Wang, I. Perovic, J. Chittuluru, A. Kaganovich, L. T. T. Nguyen, J. Liao, J. R. Auclair, D. Johnson, A. Landru, A. K. Simorellis, S. Ju, M. R. Cookson, F. J. Asturias, J. N. Agar, B. N. Webb, C. Kang, D. Ringe, G. A. Petsko, T. C. Pochapsky, et Q. Q. Hoang, « A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 43, p. 17797-17802, (2011).
- [255] B. Fauvet, M. K. Mbefo, M.-B. Fares, C. Desobry, S. Michael, M. T. Ardah, E. Tsika, P. Coune, M. Prudent, N. Lion, D. Eliezer, D. J. Moore, B. Schneider, P. Aebischer, O. M. El-Agnaf, E. Masliah, et H. A. Lashuel, « α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 19, p. 15345-15364, (2012).
- [256] J. M. George, H. Jin, W. S. Woods, et D. F. Clayton, « Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch », *Neuron*, vol. 15, n° 2, p. 361-372, (1995).
- [257] D. D. Murphy, S. M. Rueter, J. Q. Trojanowski, et V. M. Lee, « Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 20, n° 9, p. 3214-3220, (2000).
- [258] S. Chandra, G. Gallardo, R. Fernández-Chacón, O. M. Schlüter, et T. C. Südhof, « Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration », *Cell*, vol. 123, n° 3, p. 383-396, (2005).
- [259] A. Abeliovich, Y. Schmitz, I. Fariñas, D. Choi-Lundberg, W. H. Ho, P. E. Castillo, N. Shinsky, J. M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, et A. Rosenthal, « Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system », *Neuron*, vol. 25, n° 1, p. 239-252, (2000).
- [260] W. S. Davidson, A. Jonas, D. F. Clayton, et J. M. George, « Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 16, p. 9443-9449, (1998).
- [261] M. Zhu, J. Li, et A. L. Fink, « The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 41, p. 40186-40197, (2003).
- [262] K. E. Paleologou, A. Oueslati, G. Shakked, C. C. Rospigliosi, H.-Y. Kim, G. R. Lamberto, C. O. Fernandez, A. Schmid, F. Chegini, W. P. Gai, D. Chiappe, M. Moniatte, B. L. Schneider, P. Aebischer, D. Eliezer, M. Zweckstetter, E. Masliah, et H. A. Lashuel,

- « Phosphorylation at S87 Is Enhanced in Synucleinopathies, Inhibits α -Synuclein Oligomerization, and Influences Synuclein-Membrane Interactions », *J. Neurosci.*, vol. 30, n° 9, p. 3184-3198, (2010).
- [263] K. E. Paleologou, A. W. Schmid, C. C. Rospigliosi, H.-Y. Kim, G. R. Lamberto, R. A. Fredenburg, P. T. Lansbury, C. O. Fernandez, D. Eliezer, M. Zweckstetter, et H. A. Lashuel, « Phosphorylation at Ser-129 but Not the Phosphomimics S129E/D Inhibits the Fibrillation of α -Synuclein », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 24, p. 16895-16905, (2008).
- [264] M. Okochi, J. Walter, A. Koyama, S. Nakajo, M. Baba, T. Iwatsubo, L. Meijer, P. J. Kahle, et C. Haass, « Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 1, p. 390-397, (2000).
- [265] T. Kuwahara, R. Tonegawa, G. Ito, S. Mitani, et T. Iwatsubo, « Phosphorylation of α -Synuclein Protein at Ser-129 Reduces Neuronal Dysfunction by Lowering Its Membrane Binding Property in *Caenorhabditis elegans* », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 10, p. 7098-7109, (2012).
- [266] D. Latawiec, F. Herrera, A. Bek, V. Losasso, M. Candotti, F. Benetti, E. Carlino, A. Kranjc, M. Lazzarino, S. Gustincich, P. Carloni, et G. Legname, « Modulation of alpha-synuclein aggregation by dopamine analogs », *PLoS One*, vol. 5, n° 2, p. e9234, (2010).
- [267] J. Li, M. Zhu, A. B. Manning-Bog, D. A. Di Monte, et A. L. Fink, « Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson's and Alzheimer's disease », *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 18, n° 9, p. 962-964, (2004).
- [268] H.-T. Li, D.-H. Lin, X.-Y. Luo, F. Zhang, L.-N. Ji, H.-N. Du, G.-Q. Song, J. Hu, J.-W. Zhou, et H.-Y. Hu, « Inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopamine analogs via reaction with the amino groups of alpha-synuclein. Implication for dopaminergic neurodegeneration », *FEBS J.*, vol. 272, n° 14, p. 3661-3672, (2005).
- [269] A. Rekas, R. B. Knott, A. Sokolova, K. J. Barnham, K. A. Perez, C. L. Masters, S. C. Drew, R. Cappai, C. C. Curtain, et C. L. L. Pham, « The structure of dopamine induced alpha-synuclein oligomers », *Eur. Biophys. J. EBJ*, vol. 39, n° 10, p. 1407-1419, (2010).
- [270] E. H. Norris, B. I. Giasson, R. Hodara, S. Xu, J. Q. Trojanowski, H. Ischiropoulos, et V. M.-Y. Lee, « Reversible Inhibition of α -Synuclein Fibrillization by Dopaminochrome-mediated Conformational Alterations », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n° 22, p. 21212-21219, (2005).
- [271] W. J. Burke, V. B. Kumar, N. Pandey, W. M. Panneton, Q. Gan, M. W. Franko, M. O'Dell, S. W. Li, Y. Pan, H. D. Chung, et J. E. Galvin, « Aggregation of alpha-synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine », *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 115, n° 2, p. 193-203, (2008).
- [272] R. Vácha, S. Linse, et M. Lund, « Surface effects on aggregation kinetics of amyloidogenic peptides », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, n° 33, p. 11776-11782, (2014).
- [273] C. Wang, N. Shah, G. Thakur, F. Zhou, et R. M. Leblanc, « α -Synuclein in α -helical conformation at air-water interface: implication of conformation and orientation changes during its accumulation/aggregation », *Chem. Commun.*, vol. 46, n° 36, p. 6702, (2010).
- [274] C. F. Lee, S. Bird, M. Shaw, L. Jean, et D. J. Vaux, « Combined effects of agitation, macromolecular crowding, and interfaces on amyloidogenesis », *J. Biol. Chem.*, vol. 287, n° 45, p. 38006-38019, (2012).
- [275] C. Del Mar, E. A. Greenbaum, L. Mayne, S. W. Englander, et V. L. Woods Jr, « Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 43, p. 15477-15482, (2005).

- [276] M. Vilar, H.-T. Chou, T. Lührs, S. K. Maji, D. Riek-Loher, R. Verel, G. Manning, H. Stahlberg, et R. Riek, « The fold of alpha-synuclein fibrils », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, n° 25, p. 8637-8642, (2008).
- [277] H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, et M. Baldus, « Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length alpha-synuclein fibrils studied by solid-state NMR », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 44, p. 15871-15876, (2005).
- [278] M. Chen, M. Margittai, J. Chen, et R. Langen, « Investigation of alpha-synuclein fibril structure by site-directed spin labeling », *J. Biol. Chem.*, vol. 282, n° 34, p. 24970-24979, (2007).
- [279] T. Gurry, O. Ullman, C. K. Fisher, I. Perovic, T. Pochapsky, et C. M. Stultz, « The dynamic structure of α -synuclein multimers », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, n° 10, p. 3865-3872, (2013).
- [280] W. Ariesandi, C.-F. Chang, T.-E. Chen, et Y.-R. Chen, « Temperature-dependent structural changes of Parkinson's alpha-synuclein reveal the role of pre-existing oligomers in alpha-synuclein fibrillization », *PLoS One*, vol. 8, n° 1, p. e53487, (2013).
- [281] W. Hoyer, D. Cherny, V. Subramaniam, et T. M. Jovin, « Impact of the Acidic C-Terminal Region Comprising Amino Acids 109–140 on α -Synuclein Aggregation in Vitro† », *Biochemistry*, vol. 43, n° 51, p. 16233-16242, (2004).
- [282] A. Ulusoy, F. Febbraro, P. H. Jensen, D. Kirik, et M. Romero-Ramos, « Co-expression of C-terminal truncated alpha-synuclein enhances full-length alpha-synuclein-induced pathology », *Eur. J. Neurosci.*, vol. 32, n° 3, p. 409–422, (2010).
- [283] W. Li, N. West, E. Colla, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, L. Marsh, T. M. Dawson, P. Jäkälä, T. Hartmann, D. L. Price, et M. K. Lee, « Aggregation promoting C-terminal truncation of α -synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 6, p. 2162-2167, (2005).
- [284] A. Galat, « Peptidylprolyl Cis / Trans Isomerases (Immunophilins): Biological Diversity - Targets - Functions », *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 3, n° 12, p. 1315-1347, (2003).
- [285] S. F. Göthel et M. A. Marahiel, « Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts », *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 55, n° 3, p. 423-436, (1999).
- [286] K. Lang, F. X. Schmid, et G. Fischer, « Catalysis of protein folding by prolyl isomerase », *Nature*, vol. 329, n° 6136, p. 268-270, (1987).
- [287] Y. Ishikawa et H. P. Bächinger, « A substrate preference for the rough endoplasmic reticulum resident protein FKBP22 during collagen biosynthesis », *J. Biol. Chem.*, vol. 289, n° 26, p. 18189-18201, (2014).
- [288] S. O. Marx, S. Reiken, Y. Hisamatsu, T. Jayaraman, D. Burkhoff, N. Rosemblyt, et A. R. Marks, « PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts », *Cell*, vol. 101, n° 4, p. 365-376, (2000).
- [289] D. W. Shin, Z. Pan, A. Bandyopadhyay, M. B. Bhat, D. H. Kim, et J. Ma, « Ca(2+)-dependent interaction between FKBP12 and calcineurin regulates activity of the Ca(2+) release channel in skeletal muscle », *Biophys. J.*, vol. 83, n° 5, p. 2539-2549, (2002).
- [290] J. P. Steiner, T. M. Dawson, M. Fotuhi, C. E. Glatt, A. M. Snowman, N. Cohen, et S. H. Snyder, « High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with calcineurin », *Nature*, vol. 358, n° 6387, p. 584-587, (1992).

- [291] A. R. Charters, M. Kobayashi, et S. P. Butcher, « Immunochemical analysis of FK506 binding proteins in neuronal cell lines and rat brain », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 22, n° 4, p. 411S, (1994).
- [292] M. C. Coss, R. M. Stephens, D. K. Morrison, D. Winterstein, L. M. Smith, et S. L. Simek, « The immunophilin FKBP65 forms an association with the serine/threonine kinase c-Raf-1 », *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 9, n° 1, p. 41-48, (1998).
- [293] M. O. Poulter, K. B. Payne, et J. P. Steiner, « Neuroimmunophilins: A novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease? », *Neuroscience*, vol. 128, n° 1, p. 1-6, (2004).
- [294] M. Avramut et C. L. Achim, « Immunophilins and their ligands: insights into survival and growth of human neurons », *Physiol. Behav.*, vol. 77, n° 4-5, p. 463-468, (2002).
- [295] J. P. Steiner, G. S. Hamilton, D. T. Ross, H. L. Valentine, H. Guo, M. A. Connolly, S. Liang, C. Ramsey, J.-H. J. Li, W. Huang, P. Howorth, R. Soni, M. Fuller, H. Sauer, A. C. Nowotnik, et P. D. Suzdak, « Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, n° 5, p. 2019-2024, (1997).
- [296] B. G. Gold, E. Udina, D. Bourdette, et X. Navarro, « Neuroregenerative and neuroprotective actions of neuroimmunophilin compounds in traumatic and inflammatory neuropathies », *Neurol. Res.*, vol. 26, n° 4, p. 371-380, (2004).
- [297] M. Gerard, Z. Debyser, L. Desender, P. J. Kahle, J. Baert, V. Baekelandt, et Y. Engelborghs, « The aggregation of alpha-synuclein is stimulated by FK506 binding proteins as shown by fluorescence correlation spectroscopy », *FASEB J.*, (2006).
- [298] S. W. Michnick, M. K. Rosen, T. J. Wandless, M. Karplus, et S. L. Schreiber, « Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin », *Science*, vol. 252, n° 5007, p. 836-839, (1991).
- [299] A. Deleersnijder, A.-S. V. Rompuy, L. Desender, H. Pottel, L. Buée, Z. Debyser, V. Baekelandt, et M. Gerard, « Comparative Analysis of Different Peptidyl-Prolyl Isomerases Reveals FK506-binding Protein 12 as the Most Potent Enhancer of α -Synuclein Aggregation », *J. Biol. Chem.*, vol. 286, n° 30, p. 26687-26701, (2011).
- [300] M. Gerard, A. Deleersnijder, V. Daniëls, S. Schreurs, S. Munck, V. Reumers, H. Pottel, Y. Engelborghs, C. V. den Haute, J.-M. Taymans, Z. Debyser, et V. Baekelandt, « Inhibition of FK506 Binding Proteins Reduces α -Synuclein Aggregation and Parkinson's Disease-Like Pathology », *J. Neurosci.*, vol. 30, n° 7, p. 2454-2463, (2010).
- [301] M. Gerard, Z. Debyser, L. Desender, J. Baert, I. Brandt, V. Baekelandt, et Y. Engelborghs, « FK506 binding protein 12 differentially accelerates fibril formation of wild type alpha-synuclein and its clinical mutants A30P or A53T », *J. Neurochem.*, vol. 106, n° 1, p. 121-133, (2008).
- [302] N. A. Farrow, O. Zhang, J. D. Forman-Kay, et L. E. Kay, « A heteronuclear correlation experiment for simultaneous determination of ^{15}N longitudinal decay and chemical exchange rates of systems in slow equilibrium », *J. Biomol. NMR*, vol. 4, n° 5, p. 727-734, (1994).
- [303] X. Hanouille, A. Badillo, J.-M. Wieruszeski, D. Verdegem, I. Landrieu, R. Bartenschlager, F. Penin, et G. Lippens, « Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 20, p. 13589-13601, (2009).
- [304] C. Sich, S. Improta, D. J. Cowley, C. Guenet, J.-P. Merly, M. Teufel, et V. Saudek, « Solution structure of a neurotrophic ligand bound to FKBP12 and its effects on protein dynamics », *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, n° 17, p. 5342-5355, (2000).

- [305] M. Kjaergaard et F. M. Poulsen, « Sequence correction of random coil chemical shifts: correlation between neighbor correction factors and changes in the Ramachandran distribution », *J. Biomol. NMR*, vol. 50, n° 2, p. 157-165, (2011).
- [306] M. Kjaergaard, S. Brander, et F. M. Poulsen, « Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH », *J. Biomol. NMR*, vol. 49, n° 2, p. 139-149, (2011).
- [307] A. C. Wang et A. Bax, « Reparametrization of the Karplus Relation for 3J(H.alpha.-N) and 3J(HN-C') in Peptides from Uniformly 13C/15N-Enriched Human Ubiquitin », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, n° 6, p. 1810-1813, (1995).
- [308] P. Würtz, K. Fredriksson, et P. Permi, « A set of HA-detected experiments for measuring scalar and residual dipolar couplings », *J. Biomol. NMR*, vol. 31, n° 4, p. 321-330, (2005).
- [309] G. R. Lamberto, A. Binolfi, M. L. Orcellet, C. W. Bertocini, M. Zweckstetter, C. Griesinger, et C. O. Fernandez, « Structural and mechanistic basis behind the inhibitory interaction of PcTS on -synuclein amyloid fibril formation », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, n° 50, p. 21057-21062, (2009).
- [310] T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, G. L. Devlin, S. I. A. Cohen, A. Aguzzi, M. Vendruscolo, E. M. Terentjev, M. E. Welland, et C. M. Dobson, « An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly », *Science*, vol. 326, n° 5959, p. 1533-1537, (2009).
- [311] C. J. Jameson, « The dynamic and electronic factors in isotope effects on NMR parameters », *Isot. Phys. Biomed. Sci.*, vol. 2, p. 1-54, (1991).
- [312] J. Abildgaard, P. E. Hansen, M. N. Manalo, et A. LiWang, « Deuterium isotope effects on 15N backbone chemical shifts in proteins », *J. Biomol. NMR*, vol. 44, n° 3, p. 119-126, (2009).
- [313] S. Tabor et C. C. Richardson, « A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, n° 4, p. 1074-1078, (1985).