



Étude biophysique de l'interaction protéine tau - zinc

Romain La Rocca

► To cite this version:

Romain La Rocca. Étude biophysique de l'interaction protéine tau - zinc. Biologie structurale [q-bio.BM]. Aix-Marseille Université, 2020. Français. NNT : . tel-03137380

HAL Id: tel-03137380

<https://theses.hal.science/tel-03137380>

Submitted on 10 Feb 2021

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

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



Université d'Aix-Marseille

Institut de Neurophysiopathologie (UMR 7051)

Faculté de Médecine

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Spécialité : Biochimie Structurale

Romain LA ROCCA

"Étude biophysique de l'interaction protéine tau - zinc"

Directeur de thèse : François DEVRED

Soutenue le 20/11/2020 devant le jury :

Isabelle LANDRIEU	Université de Lille	Rapporteur
Cyrille GARNIER	Université de Rennes	Rapporteur
Santiago RIVERA	Aix-Marseille Université	Examineur
François DEVRED	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse François Devred, pour ses qualités humaines premièrement. Ta sympathie, la proximité que nous avons eu tout au long de ces 3 ans ainsi que ton ouverture d'esprit m'ont rendu la vie plus facile au laboratoire et m'ont permis de me focaliser sur mon travail de thèse. Sur le plan scientifique, j'ai beaucoup appris à ton contact et j'ai énormément gagné en autonomie sur de nombreux aspects (vie de laboratoire, rédaction d'articles et de projets, communications scientifiques, expériences, pédagogie). Merci d'avoir trouvé le juste milieu entre encadrement et autonomie, ce qui m'a permis de me former et de prendre confiance en moi.

Je remercie tout autant Philipp Tsvetkov, qui a contribué à toutes mes recherches et qui m'a formé sur l'utilisation des appareils ITC et nanoDSF, ainsi que sur l'interprétation des nombreuses courbes expérimentales. Merci pour ta sympathie, tes discussions avec François, ta patience, ton aide précieuse sur mon après-thèse et ton temps accordé quand j'en avais besoin.

Je remercie chaleureusement Diane Allegro et Soazig Malesinski, pour tout leur temps, leur attention, et leur énergie passée à me former sur les protocoles de purification et de culture bactérienne. Merci à vous d'avoir été mes "mamans de labo", d'avoir répondu à mes innombrables questions, et d'avoir toujours gardé de la rigueur quand j'en manquais parfois.

Merci à Pascale Barbier pour avoir été une source inépuisable de références bibliographiques et de discussions scientifiques tout au long de ces années. Ta passion et ton investissement m'ont aidé à ne pas oublier ce pour quoi je fais de la recherche. Un grand merci aussi pour tes purifications de tubuline : tu n'hésites jamais à revenir à la paillasse quand il le faut.

Merci à Françoise Guerlesquin pour m'avoir formé à l'utilisation du spectromètre RMN et à l'interprétation des spectres. Ton aide durant ma deuxième année de thèse a été primordiale, que ça soit sur le plan humain ou sur le plan scientifique. Merci pour ton calme, ta personnalité apaisante et profondément gentille, qui m'ont permis de prendre du recul et de la hauteur sur ma thèse.

Merci à Géraldine Ferracci pour son accessibilité, ses conseils, son honnêteté et sa bienveillance. En peu de temps, tu as réussi à faire du lien dans l'équipe et à renforcer les échanges et les discussions au sein de la plateforme.

Merci à tous les étudiants que j'ai côtoyé pendant ces 3 ans. Merci à Mathieu particulièrement, qui m'a apporté toute son expérience dans des choix importants, mais aussi sa sympathie et quelques rires qui arrivaient toujours au bon moment. Merci à Dahbia, Fatima et Cécilia d'avoir fini cette aventure avec moi, vous êtes devenues de vraies amies et vous m'avez apporté un soutien indispensable durant cette dernière année. Je remercie également tous les étudiants de l'école d'Oléron RéNaFoBiS 2019 (Léa, Marine, Bouchra, Kendall), avec qui j'ai passé une semaine inoubliable, qui restera mon meilleur souvenir de thèse à n'en pas douter.

Merci à Michel Khrestchatisky, Hervé Kovacic, Vincent Peyrot ainsi qu'aux équipes des laboratoires CRO2, INP, et IMM (Alessandra Pagano, Fabrice Parat, Ludovic Leloup, Raphaël Bergès, Noé Dumas, Chiara Bastiancich, Deborah Byrne) pour avoir mis à disposition les ressources dont j'avais besoin afin d'avancer dans mes recherches.

Merci à NanoTemper pour leur aide pour l'interprétation et la réalisation des expériences de nanoDSF. Merci à Pierre Soule et à Cyril Castel particulièrement pour leur sympathie et leurs invitations aux nombreux séminaires organisés par NanoTemper.

Un grand merci aux membres du jury Isabelle Landrieu, Cyrille Garnier et Santiago Rivera pour m'avoir fait l'honneur de juger et de critiquer ma thèse. Vos remarques, toujours constructives et bienveillantes, ont grandement contribué à l'élaboration de ce manuscrit et m'ont permis de finaliser mon travail de la meilleure des façons. Merci également à James Sturgis pour ses conseils précieux lors de mon comité de suivi de thèse à mi-parcours.

Merci à Nina d'avoir été si présente durant cette dernière année, et notamment pendant le confinement où j'ai écrit une grande partie de ma thèse. Merci d'avoir supporté mes humeurs, de m'avoir soutenu, et d'avoir toujours été moteur pour moi.

Enfin, merci à mes parents, à ma famille et à mes amis (Sandra, Camille, Kévin et Ben particulièrement) pour votre soutien indéfectible et votre compréhension, quelques soient les choix que j'ai fait au cours de ces 3 années.

Table des matières

Remerciements.....	2
Liste des abréviations	7
Introduction.....	8
Les protéines intrinsèquement désordonnées.....	8
Caractéristiques générales des protéines intrinsèquement désordonnées	8
Implications des protéines intrinsèquement désordonnées dans les protéinopathies	12
La protéine tau	15
Découverte de la protéine tau	15
Structure	16
Fonctions	30
Implications pathologiques.....	34
Contribution du laboratoire à la recherche sur la protéine tau	37
Le zinc	46
Fonctions et homéostasie du zinc	46
Implications pathologiques du zinc chez l'homme	50
Le zinc et la protéine tau	53
Agrégation de tau en présence de zinc	53
Interaction protéine tau - zinc	54
Méthodes biophysiques de référence	56
Etude des interactions	56
Microcalorimétrie à titration isotherme (ITC)	56
Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	59
Etude de l'agrégation	61
Turbidimétrie	61
Dynamic Light Scattering (DLS).....	61

nanoDSF Prometheus NT.Plex : un outil pour étudier les interactions et l'agrégation des protéines	64
Principe des mesures	65
Mesure de fluorescence (DSF)	65
Mesure de turbidité	66
Principe du chauffage	67
Étude de la polymérisation de tubuline avec le nanoDSF Prometheus NT.Plex	69
Polymérisation de tubuline <i>in vitro</i> : expérience classique	71
Polymérisation de tubuline <i>in vitro</i> : expérience en mode “melting”	73
Etude des interactions tubuline - MTA.....	77
Etude de la polymérisation de tubuline et de ses interactions avec les MTA au cours d'une seule expérience.....	83
Conclusion.....	86
Cas de l'interaction protéine tau – zinc.....	88
Objectifs de thèse.....	89
Résultats	90
Le zinc induit l'agrégation de la protéine tau de façon réversible et température-dépendante.....	90
Le zinc interagit avec la protéine tau via 3 sites et induit son agrégation réversible	101
Discussion	132
Caractéristiques physiques des agrégats tau-zinc et mécanisme moléculaire	132
Caractéristiques physiques des agrégats	132
Mécanisme moléculaire à l'origine de l'agrégation	133
Rôle physiologique	136
Implications pathologiques.....	137
Agrégats réversibles de tau en conditions pathologiques	137
Contribution à la formation des PHF	139
Similarités avec le phénomène LLPS	140
Intérêt thérapeutique	142

Conclusion	145
Références	146
Annexe 1 : Caractérisation des interactions MAP-tubuline par ITC.....	177
Annexe 2 : Interactions tubuline - MTA en tampon phosphate	193
Annexe 3 : Polymérisation de tubuline en présence de MTA (tampon PEMGT)	194
Résumé / abstract	195

Liste des abréviations

IDP : Protéines intrinsèquement désordonnées (Intrinsically Disordered Proteins)

IDR : Régions intrinsèquement désordonnées (Intrinsically Disordered Regions)

NFT : Nœuds neurofibrillaires (NeuroFibrillary Tangles)

PHF : Paires de filaments en hélice (Paired Helical Filaments)

MTBD : Domaine de liaison aux microtubules (MicroTubules Binding Domain)

MAP : Protéines associées aux microtubules (Microtubules Associated Proteins)

MTA : Agents ciblant les microtubules (Microtubules Targetting Agents)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

HSQC : HeteroNuclear Single Quantum Coherence

BMRB : Biological Magnetic Resonance Bank

ITC : Microcalorimétrie à titration isotherme (Isothermal Titration Calorimetry)

DLS : Dynamic Light Scattering

DSF : Fluorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Fluorimetry)

DSC : Calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry)

FRET : Forster Resonance Energy Transfer

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SOD1 : SuperOxyde Dismutase

Introduction

Les protéines intrinsèquement désordonnées

Caractéristiques générales des protéines intrinsèquement désordonnées

Les protéines constituent chez tous les organismes vivants une classe de biomolécules essentielles à la vie. Pour la majorité d'entre elles, leur fonction s'explique par leur structure (de la séquence primaire jusqu'à l'organisation en structure quaternaire fonctionnelle) grâce à laquelle elles remplissent des rôles spécifiques. Il existe de très nombreuses possibilités de structures, notamment grâce à la diversité naturelle des acides aminés, mais aussi grâce à l'organisation de ces acides aminés entre eux. Ils peuvent bouger au travers des rotations des angles dièdres et interagir via leurs chaînes latérales, ce qui permet à chaque protéine d'avoir une structure et donc un rôle unique.

Il existe cependant une catégorie de protéines n'ayant pas de structure tridimensionnelle définie. Ces protéines sont dites intrinsèquement désordonnées (*Intrinsically Disordered Proteins*, IDP), et adoptent une organisation spatiale variable. En réalité, elles possèdent un nombre important de structures ayant des énergies de repliement comparables (Figure 1A), ce qui fait qu'elles passent très facilement d'une structure à l'autre, sans avoir besoin de l'aide d'un facteur extérieur (présence d'un ligand, augmentation de la température etc). Ceci s'explique notamment par le fait que la séquence primaire des IDP est souvent riche en acides aminés chargés et pauvre en acides aminés hydrophobes. Ainsi, elles ne forment pas spontanément de cœur hydrophobe, ce qui offre beaucoup plus de possibilités de repliements. Par opposition, les protéines structurées possèdent une structure ayant un minimum d'énergie significativement bas, et ne peuvent changer de structure sans apport énergétique (Figure 1B).

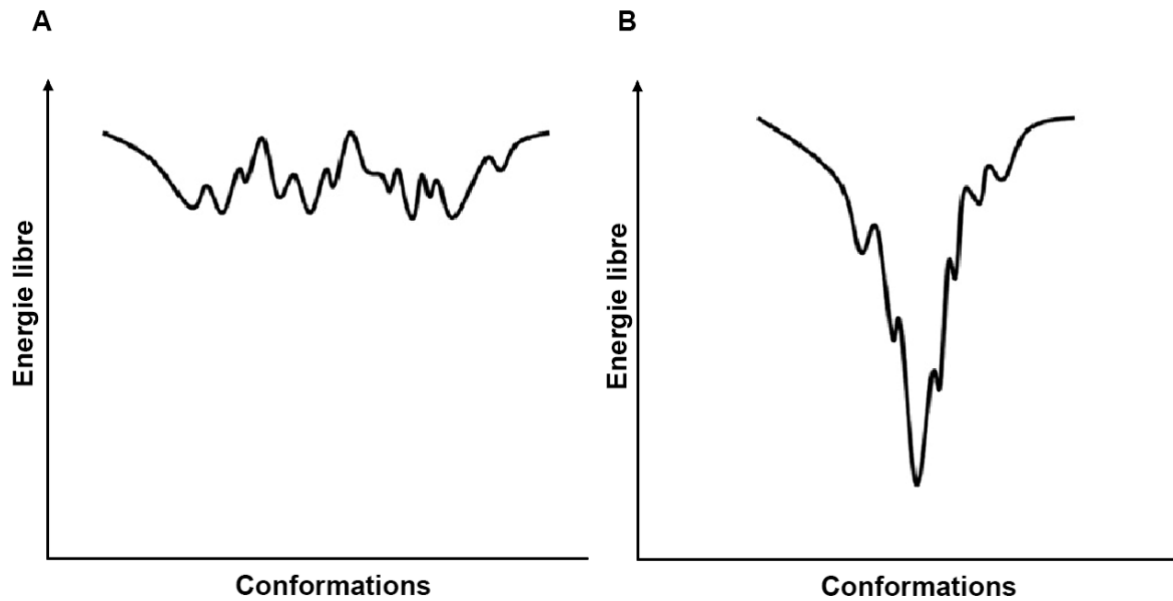


Figure 1 : Energies de repliement des différentes conformations dans le cas des IDP (A) et des protéines structurées (B) (adaptée de Mészáros, Simon, and Dosztányi 2011). Contrairement aux protéines structurées, les IDP ne possèdent pas de conformation avec un minimum d'énergie suffisamment bas pour adopter une structure majoritaire.

Outre les IDP, on distingue aussi des régions intrinsèquement désordonnées (*Intrinsically Disordered Regions*, IDR) pour un grand nombre de protéines eucaryotes structurées (environ 40% du génome humain) (R. van der Lee et al. 2014). En effet, ces protéines possèdent une alternance de zones structurées et non structurées (Figure 2). De par leur nature unique, les IDP et IDR jouent souvent le rôle de hub dans des voies de signalisation importantes dans la cellule comme le cycle cellulaire, l'assemblage de complexes macromoléculaires, la mitose, ou la régulation de la transcription (Haynes et al. 2006). Elles vont à l'encontre du paradigme structure-fonction largement répandu en biochimie, car elles parviennent à assurer leur fonction biologique malgré l'absence de structure majoritaire grâce à un fonctionnement spécifique.

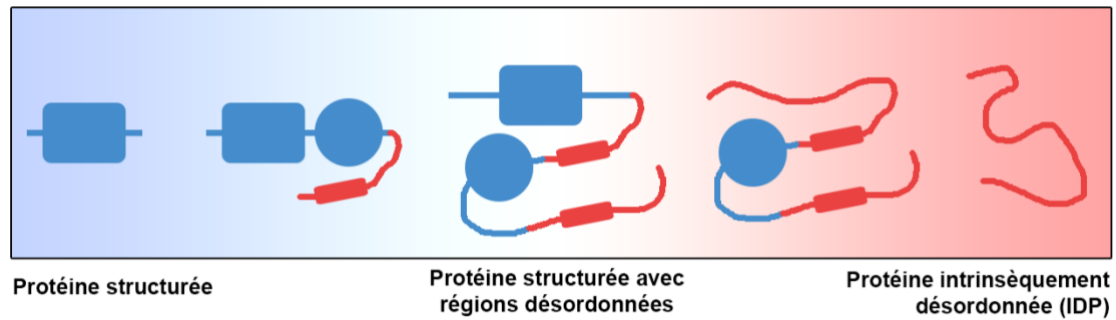


Figure 2 : Différentes possibilités de repliement existants chez les protéines (adaptée de R. van der Lee et al. 2014). En bleu : régions structurées ; en rouge : régions désordonnées. Les protéines peuvent être soit entièrement structurée (gauche), soit désordonnées (droite), soit structurées et désordonnées par régions (milieu).

Spécificités de fonctions des protéines intrinsèquement désordonnées

Bien que les IDR aient été historiquement considérées comme des “linkers” reliant deux parties structurées fonctionnelles, elles sont décrites depuis plusieurs années comme des régions fonctionnelles à part entière. En effet, elles sont sujettes à des modifications post-traductionnelles qui changent les propriétés biochimiques de la protéine, et donc qui peuvent favoriser l'apparition d'une conformation tridimensionnelle spécifique au détriment d'une autre (R. van der Lee et al. 2014). De plus, les IDR contiennent de courtes séquences pouvant interagir avec les régions structurées de la protéine. Ainsi, les IDR participent à la fonction protéique en augmentant les possibilités de repliement et d'interaction dans certains contextes cellulaires, et en rendant possible la formation de complexes protéiques dynamiques (Diella et al. 2008).

En ce qui concerne leurs interactions, en opposition au modèle de Fischer (parfois appelé modèle “clé-serrure”), plusieurs études ont décrit un modèle d'interaction pour les IDP et IDR appelé pêche à la mouche (“fly-casting”) (Shoemaker, Portman, and Wolynes 2000; Yongqi Huang and Liu 2009; Kannan, Lane, and Verma 2016). Selon ce modèle, la flexibilité des IDP et IDR permettrait de réduire la distance entre la protéine et le ligand, et donc d'augmenter la probabilité de rencontre entre les deux partenaires, ce qui est

particulièrement utile quand les concentrations des deux partenaires sont basses (Figure 3). De plus, les barrières énergétiques nécessaires à la formation du complexe seraient plus faciles à franchir dans le cas d'une interaction avec des IDP/IDR qu'avec une protéine structurée (Yongqi Huang and Liu 2009; Trizac, Levy, and Wolynes 2010). Cependant, étant donné que les IDP et IDR varient énormément par leurs propriétés et qu'il est difficile de définir expérimentalement un modèle d'interaction, le comportement des IDP et IDR dans la cellule dépend très largement du contexte et de l'interaction considérée (Yongqi Huang and Liu 2009; Mollica et al. 2016).

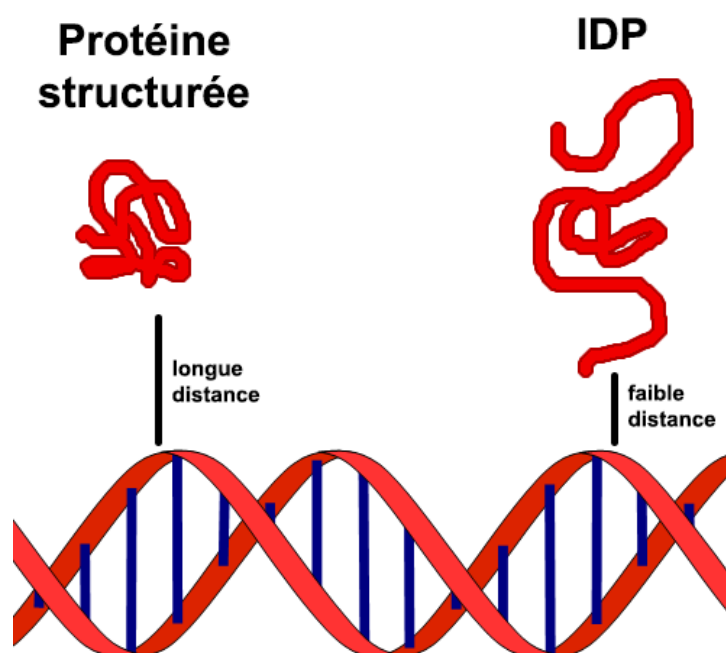


Figure 3 : Mécanisme de “fly-casting” des IDP, permettant d’augmenter les probabilités de rencontre entre la protéine et le ligand (adaptée de Shoemaker, Portman, and Wolynes 2000). Les IDP (droite) détectent leur partenaire à plus longue distance en modulant leur repliement.

Dans certaines pathologies, quelques IDP voient leurs propriétés modifiées, au point de perdre leur fonction et de former des agrégats cytotoxiques.

Implications des protéines intrinsèquement désordonnées dans les protéinopathies

On appelle protéinopathies les pathologies caractérisées par le mauvais repliement et l'agrégation de certaines protéines. Bien que ces maladies soient retrouvées dans plusieurs organes incluant le foie ou le cœur, elles touchent principalement le système nerveux central (Bayer 2015; Bitan 2019). En regardant la structure des principales protéines associées à ces maladies, on remarque que certaines d'entre elles sont soit désordonnées, soit possèdent des régions non structurées (Uversky 2015) :

Protéine impliquée dans au moins une protéinopathie	Pourcentage de séquence désordonnée
Amyloïde bêta	28,6%
Tau	99,1%
Alpha-synucléine	37,1%
Prion	61,0%
TDP-43	35,8%
FUS	72,6%

Table 1 : Protéines majoritaires impliquées dans des protéinopathies et leur pourcentage de désordre structural (adaptée de Uversky 2015).

Le mauvais repliement à l'origine de ces protéinopathies peut s'expliquer par exemple par la présence d'un cofacteur ou par une modification de la séquence primaire de la protéine, comme une mutation ou une modification post-traductionnelle (incluant les phosphorylations, acétylations, et glycosylations) (Pejaver et al. 2014). Ceci entraîne des changements de propriétés de la protéine, conduisant à un repliement alternatif non fonctionnel et donc à une agrégation. Aussi, un mauvais repliement peut provoquer un problème de signalisation de la protéine dans la cellule, pouvant favoriser sa dégradation ou un mauvais adressage. Dans le cas des IDP et des IDR, cette modification peut avoir d'autant plus d'impact quand on considère leur importance et leur implication dans de nombreux processus essentiels à la cellule.

Les protéinopathies les plus étudiées sont celles touchant le système nerveux central (Bayer 2015). Parmi elles, on retrouve la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie des corps de Lewy ou encore les démences fronto-temporales, toutes associées au mauvais repliement d'une ou plusieurs IDP : la protéine amyloïde bêta, l'alpha synucléine, et la protéine tau. Si certaines de ces maladies sont associées à l'agrégation d'une seule protéine, d'autres sont caractérisées par la présence d'agrégats issus de plusieurs protéines différentes (Figure 4).

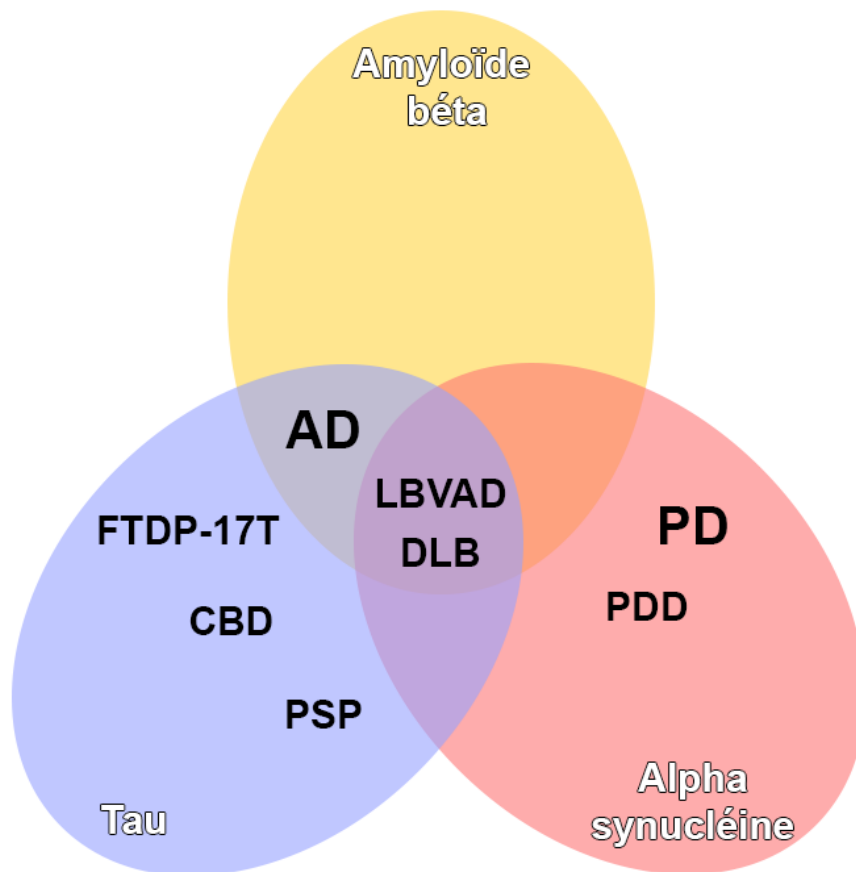


Figure 4 : Pathologies neurodégénératives associées à l'agrégation des protéines amyloïde bêta, tau, et alpha synucléine (adaptée de Moussaud et al. 2014). AD : Maladie d'Alzheimer ; LBVAD : Maladie vasculaire à corps de Lewy ; DLB : Démence à corps de Lewy ; FTDP-17T : Démence frontotemporale due à tau ; CBD : Dégénération corticobasale ; PSP : Paralyse supranucléaire progressive ; PD : Maladie de Parkinson ; PDD : Troubles envahissants du développement.

La protéine tau, à elle seule, est responsable d'une sous-catégorie de protéinopathies appelée tauopathies. Du fait de son importance dans les pathologies neurodégénératives, elle est étudiée depuis plusieurs décennies par de nombreuses équipes de recherche, bien qu'elle fût découverte de par sa fonction de régulation de la polymérisation des microtubules.

La protéine tau

Découverte de la protéine tau

La découverte de la protéine tau a eu lieu lors des premières études réalisées sur les microtubules. A partir des années 60, de nombreuses recherches tendent à comprendre comment ces structures fonctionnent (Wolfe 1965; Behnke and Forer 1966; Finkiewicz 1967; Kirkpatrick 1969). Leurs fonctions dans la cellule, encore peu connues, sont peu à peu dévoilées. Ils sont ainsi identifiés comme des acteurs du transport cellulaire et du maintien de la forme de la cellule (Porter 1966; Weber, Pollack, and Bibring 1975), mais aussi comme des acteurs spécifiques du transport axonal (Schmitt and Samson 1968). Au début des années 70, des études se focalisent sur la polymérisation des microtubules *in vitro* et analysent les protéines impliquées dans ce phénomène (Borisy and Olmsted 1972; M. W. Kirschner et al. 1974; Erickson 1974; M. W. Kirschner and Williams 1974). Par ultracentrifugation analytique, deux espèces de tubuline sont mises en évidence suite à la dépolymérisation des microtubules : la tubuline dimérique (6S) et la tubuline formant des structures appelées “double anneaux” (36S) (Weingarten et al. 1974; M. W. Kirschner et al. 1974). La présence de cette forme en double anneaux semble indispensable à la repolymérisation de la tubuline en microtubules. Ainsi, les chercheurs ont essayé d'identifier et d'expliquer les différences entre ces deux formes de tubuline. Les deux hypothèses les plus probables furent une modification post-traductionnelle de la tubuline, ou bien la présence d'un facteur échangeable, conduisant à la formation de ces doubles anneaux. C'est en 1975 que la seconde hypothèse a été validée, grâce à l'identification de ce facteur qui sera appelé par la suite : protéine tau (Weingarten et al. 1975).

En parallèle, l'implication de la protéine tau dans les maladies neurodégénératives a été peu à peu dévoilé tout au long du 20ème siècle. En 1907, ce sont d'abord des structures appelées noeuds neurofibrillaires (*NeuroFibrillary Tangles, NFT*) qui ont été identifiés par Alois Alzheimer comme des agrégats toxiques provoquant la neurodégénérescence (Alzheimer 1907). Plus de 50 ans après, l'analyse des NFT a dévoilé des structures en hélice appelées paires de filaments en hélice (*Paired Helical Filaments, PHF*), qui en sont les principaux composants (Kidd 1963; Terry 1963). C'est en

1985 que la protéine tau se révèle être le constituant majeur des PHF (Brion et al. 1985), et donc liée à la mort des neurones dans la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, dès le milieu des années 80, les deux implications principales de tau sont mises en évidence : sa fonction physiologique via son interaction avec les microtubules, et son implication pathologique dans la formation des PHF dans la maladie d'Alzheimer. Toutes deux découlent des caractéristiques biochimiques de la protéine tau, et donc de sa structure.

Structure

Structure primaire

La protéine tau, chez l'homme, est exprimée dans de nombreux tissus incluant le colon, la peau, le foie ou le cuir chevelu (Ingelson, Vanmechelen, and Lannfelt 1996; Vanier et al. 1998; Dugger et al. 2016) mais aussi et surtout dans le cerveau, où elle présente les plus forts niveaux d'expression (Tucker 1990; Schoenfeld and Obar 1994; Dugger et al. 2016). Dans cet organe, elle peut être traduite en six isoformes différentes, chacune d'entre elles étant issue de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 du gène MAPT (M. Goedert, Spillantini, Jakes, et al. 1989). Il existe également un exon supplémentaire (exon 4a) responsable de l'apparition d'isoformes minoritaires de tau, plus longues, qui sont présents uniquement dans les tissus périphériques du cerveau (M. Goedert, Spillantini, Potier, et al. 1989). C'est à la fin des années 80 que les séquences en acides aminés caractéristiques des six isoformes sont identifiées (M. Goedert et al. 1988; M. Goedert, Spillantini, Jakes, et al. 1989). Elles possèdent 352 à 441 résidus, et diffèrent par la présence ou l'absence de courtes séquences de 29 acides aminés appelées "inserts" situées dans la partie N-terminale (Kosik, Kowall, and McKee 1989; M. Goedert et al. 1988; M. Goedert, Spillantini, Jakes, et al. 1989), mais aussi de trois ou quatre séquences répétées dans la partie C-terminale (M. Goedert et al. 1988; Himmler et al. 1989) (Figure 5). L'isoforme la plus courte (0N3R) est uniquement exprimée pendant le développement du fœtus, alors qu'à l'âge adulte les six isoformes de la protéine sont présentes dans le cerveau (Kosik, Kowall, and McKee 1989). Aussi, elles sont distribuées

différemment en fonction des types de neurones (M. Goedert, Spillantini, Jakes, et al. 1989), ce qui souligne leur hétérogénéité au sein du cerveau humain.

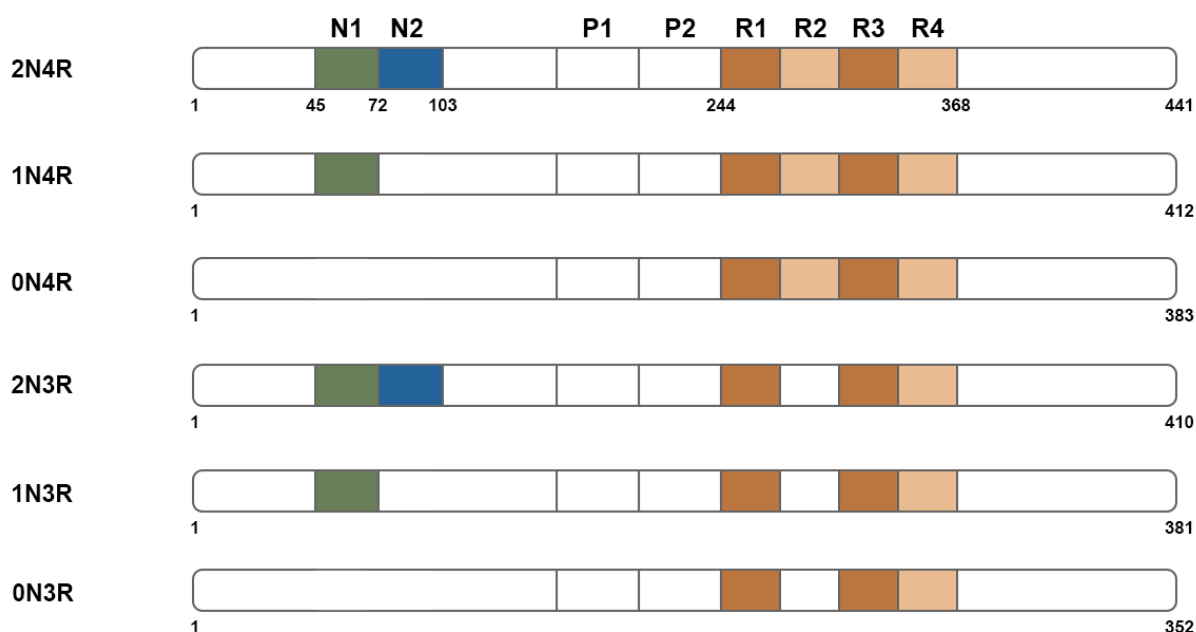


Figure 5 : Les six isoformes de tau dans le cerveau. Ces isoformes varient par la présence ou l'absence de 2 inserts (N1 et N2) et d'une séquence répétée R2.

On distingue plusieurs parties sur la séquence de tau. La partie N-terminale peut contenir 0, 1 ou 2 inserts en fonction de l'isoforme, suivis par une séquence riche en proline (résidus 165 à 243). La partie C-terminale est composée de 4 séquences partiellement répétées de 31 résidus dénommées R1, R2, R3, R4 (résidus 244 à 368), avec ou sans la partie R2 qui résulte de la traduction de l'exon 10. Enfin, la queue C-terminale (résidus 369 à 441) complète la séquence (Himmler et al. 1989; M. Goedert, Spillantini, Jakes, et al. 1989).

D'un point de vue fonctionnel, la séquence peut être divisée en 2 domaines : le domaine de projection et le domaine de liaison aux microtubules. Le domaine de projection est constitué de tous les résidus de l'extrémité N-terminale jusqu'à la moitié de la région riche en proline (résidus 1 à 198). Il joue un rôle dans l'espacement entre les microtubules dans les dendrites et les axones (Chen et al. 1992; Rosenberg et al. 2008). Plus récemment, ce domaine a été identifié comme une cible d'intérêt pour empêcher

l'agrégation pathologique de tau (Dai et al. 2015). Des anticorps ciblant les épitopes en début (résidus 6 à 18) et en fin de domaine (résidus 184 à 195) provoquent un rétablissement des capacités cognitives chez la souris. De plus, la coupure de la partie N-terminale de tau provoque une augmentation de la neurotoxicité, *in vitro* et *in vivo* (Amadoro et al. 2020). En ce qui concerne le domaine de liaison au microtubule (Microtubule Binding Domain, MTBD), il est composé de 4 séquences répétées R1, R2, R3 et R4 (résidus 244 à 368). Il constitue l'interface principale entre la protéine tau et la tubuline, constituant majoritaire des microtubules (Kosik, Kowall, and McKee 1989; Pascale Barbier et al. 2019). Ce domaine possède des histidines conservées, qui permettent à la protéine de moduler son activité en fonction du pH environnant (Charafeddine et al. 2019). Il a été montré que de nombreuses mutations de résidus présents dans ce domaine provoquent une baisse de l'activité pro-polymérisante de tau (Xia et al. 2019), conduisant parfois à une augmentation de son agrégation *in vitro* et *in vivo*.



Figure 6 : Répartition des charges sur la séquence de tau et résidus phosphorylables. Les parties rouges sont globalement chargées négativement, les parties bleues positivement, tandis que la partie grise est neutre. Les résidus phosphorylables sont indiqués par des barres noires.

Au niveau de la nature de ses résidus, la protéine tau se distingue par un nombre élevé d'acides aminés hydrophiles chargés et non chargés, pour un faible nombre d'acides aminés hydrophobes (107). Elle possède une partie N-terminale avec un point isoélectrique de 3.8, qui constitue la partie acide de la séquence (chargée globalement négativement), pouvant contenir 1 ou 2 inserts en fonction de la longueur de l'isoforme (Figure 6). La zone riche en proline est beaucoup plus basique, avec un pI de 11.4. Les régions répétées (pI de 9.8) sont elles aussi globalement chargées positivement, tandis que l'extrémité C-terminale (pI de 5.8) est plutôt neutre. Sur les 441 résidus, 85 sont phosphorylables (sérines, thréonines et tyrosines), ce qui modifie considérablement la

charge globale de la protéine et ses propriétés biochimiques lorsqu'elle est phosphorylée par des kinases.

De nombreuses modifications post-traductionnelles viennent modifier les propriétés biochimiques de la protéine tau dans la cellule. Elle subit notamment des acétylations, glycosylations, clivages, oxydations, ubiquitinations, prolyl-isomérisations, glycations, aminations, nitrations et des sumoylations (Martin, Latypova, and Terro 2011; Seoyoung et al. 2018). Parmi elles, les phosphorylations sont les modifications post-traductionnelles de tau les plus étudiées (Buée et al. 2000; Devred et al. 2002; J.-Z. Wang et al. 2013; Alavi Naini and Soussi-Yanicostas 2015; Pascale Barbier et al. 2019). Lorsqu'elle est hyperphosphorylée, la protéine tau se décroche des microtubules et forme des PHF, qui sont des marqueurs de la maladie d'Alzheimer. Sur les 85 sites de phosphorylation potentiels sur sa séquence, certains ont été décrits comme physiologiques, d'autres provoquent une perte de fonction de la protéine et sont reliées à des pathologies (Stoothoff and Johnson 2005). Ces modifications sont complexes, car elles ont des effets différents si une modification touche un ou plusieurs sites (Fichou et al. 2019), et de nombreuses combinaisons sont possibles (Morris et al. 2015). Particulièrement, les modifications post-traductionnelles ciblant des résidus spécifiques du MTBD (l'arginine 279, la lysine 280, la cystéine 322, et l'aspartate 368) augmentent la toxicité de tau dans la cellule (Dan et al. 2013; Z. Zhang et al. 2014; Y. Wang and Mandelkow 2016; Gorsky et al. 2016). En dehors du MTBD, l'acétylation de la lysine 174 et la phosphorylation de la sérine 409 conduisent aussi à la mort cellulaire (Min et al. 2015; Gentry et al. 2016).

Toutes ces modifications entraînent des effets de charges importants au sein de la protéine tau, ce qui influe grandement sur sa structure secondaire.

Structure secondaire en l'absence de partenaire

La protéine tau fait partie de la classe des IDP, car ne présente pas de structure secondaire définie. La première étude sur les structures secondaires de la protéine tau a été réalisée en 1977 (Cleveland, Hwo, and Kirschner 1977), dans laquelle les auteurs utilisent le dichroïsme circulaire. Les conclusions de ce travail indiquent que tau ne possède pas ou peu de structure secondaire (une légère propension à former des hélices alpha), et que sa forme est asymétrique. Quelques années plus tard, tau est étudiée par

RMN (Woody et al. 1983) et les résultats révèlent sa nature flexible en l'absence de partenaire. De ce fait, la protéine tau est donc thermostable, très soluble, et stable en milieu acide.

Cependant, de nombreuses études mentionnant des tendances à se structurer localement ont été publiées depuis sa découverte, tout en maintenant l'idée que tau est globalement non structurée et très flexible. Au milieu des années 2000 (Eliezer et al. 2005), une étude de RMN sur un fragment court de la protéine (fragment K19, contenant les séquences répétées R1, R3, R4) a révélé que les acides aminés 306 - 311 de la séquence R3 ont tendance à former un court feuillet bêta. Ce petit hexapeptide (³⁰⁶VQIVYK³¹¹), ainsi qu'un autre hexapeptide très similaire présent dans le R2 (²⁷⁵VQIINK²⁸⁰), jouent un rôle important dans l'agrégation pathologique de la protéine tau (Figure 7). La séquence ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ est la portion minimale de la protéine requise pour former des PHF *in vitro* (M. von Bergen et al. 2000), et elle se structure en feuillet bêta en l'absence du reste de la séquence. De façon similaire, l'hexapeptide présent dans le R2 (²⁷⁵VQIINK²⁸⁰) favorise également l'agrégation par la formation d'un feuillet bêta (M. von Bergen et al. 2001), et forme un cœur en feuillet bêta avec l'autre hexapeptide du R3 dans les PHF. Des mutations sur les résidus K280 et P301 déclenchent la formation de ce cœur en provoquant un meilleur arrangement des chaînes latérales entre elles, ce qui favorise les liaisons hydrogènes au sein du feuillet (M. von Bergen et al. 2001; Inouye et al. 2006). Des données de diffraction aux rayons X confirment l'implication de ces hexapeptides dans la formation du cœur en feuillet bêta des PHF (Goux et al. 2004), en soulignant leur forte tendance à former des feuillets bêta au seins de petits peptides. Concernant la protéine entière, il a été montré par spectroscopie Raman que la proportion en random-coil de l'isoforme le plus long de tau (2N4R) tendait à augmenter quand la température augmentait (Gorantla et al. 2017), ce qui signifie qu'il existe un certain degré de structuration à basse température.

La protéine tau reste néanmoins non structurée et n'affiche aucune structure secondaire bien définie en l'absence de partenaire, étant donné que toutes les études de dichroïsme circulaire réalisées sur la protéine entière jusqu'à maintenant montrent qu'elle possède un fort degré de random-coil (Smet et al. 2004; Lippens et al. 2004; Martin von Bergen et al. 2005).

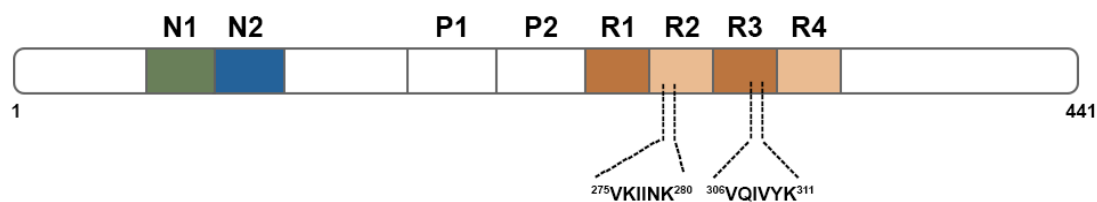


Figure 7 : Localisations des hexapeptides de tau dans les séquences R2 et R3 (275-280 et 306-311) ayant une tendance à former des feuillets bêta.

Structure secondaire de tau liée à la tubuline

Lors de son interaction avec les microtubules, tau se fixe à la tubuline via sa région MTBD, ce qui modifierait légèrement sa structure. En effet, deux études ont révélé que les séquences répétées de tau ont une propension à former des hélices alpha lorsqu'elles se lient à la tubuline (Eliezer et al. 2005; X.-H. Li, Culver, and Rhoades 2015). Cependant, tau conserve une grande flexibilité même une fois liée à la tubuline, et reste considérée comme non structurée (Tompa and Fuxreiter 2008; Martinho et al. 2018). Plusieurs études discutent du mode de fixation de tau sur les microtubules, optant pour un modèle longitudinal, latéral, ou mixte (Martinho et al. 2018; Gigant et al. 2014; Lippens et al. 2016; Duan et al. 2017).

Structure secondaire de tau agrégée

Dans le cas de l'agrégation pathologique de tau, on observe pour la première fois une nette structuration des séquences répétées de la protéine. Les premières études structurales concernant les PHF étaient contradictoires, indiquant d'une part un feuillet bêta observée par rayons X (D. A. Kirschner, Abraham, and Selkoe 1986), puis 8 ans plus tard une absence de structure secondaire au sein des agrégats (Schweers et al. 1994). Au début des années 2000, plusieurs études font l'état d'un cœur en feuillet bêta formant les PHF (Giannetti et al. 2000; Goux 2002; Eliezer et al. 2005). Comme expliqué

précédemment, les hexapeptides des séquences R2 et R3 formeraient ce cœur en feuillet bêta (Figure 8) (Goux et al. 2004; Daebel et al. 2012), bien que les séquences R1 et R4 aient été elles aussi retrouvées structurées en feuillets bêta dans les PHF (Martin von Bergen et al. 2006; Andronesi et al. 2008). Malgré un important consensus de la littérature sur la présence de structures en feuillet bêta au sein des PHF, des structures en hélice alpha sont également révélées (Sadqi et al. 2002; Goux 2002). Elles sont mêmes majoritaires dans plusieurs agrégats d'origine différentes : à la fois dans des PHF formés *in vitro* mais aussi dans des agrégats issus de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces résultats complexifient la littérature et tendent à penser que les PHF sont des structures hétérogènes. Le consensus soulevé ici est que le cœur en feuillet bêta des PHF serait uniquement formé de courtes séquences (notamment des hexapeptides) alors que le reste de la séquence serait soit non structuré, soit organisé en hélices alpha. Cependant, les résultats obtenus en dichroïsme circulaire sur les PHF laissent penser que tau n'est pas entièrement structurée, et conserve une certaine flexibilité (Goux 2002). Deux études de RMN en 2005 ont révélé que les parties N-terminale et C-terminale de tau sont beaucoup plus mobiles que les séquences répétées (Mukrasch et al. 2005; Sillen et al. 2005), ce qui explique le pourcentage élevé de structures en random-coil obtenu précédemment. Cette partie des PHF est appelé le "fuzzy coat", et elle constitue la région soluble des agrégats de tau. Par microscopie électronique, les PHF formés avec la protéine entière (2N4R) et ceux formés uniquement à partir des séquences répétées ont la même allure hélicoïdale (Barghorn, Davies, and Mandelkow 2004). Cette observation indique que les parties N et C-terminale de tau ne contribuent pas à l'organisation en hélice des filaments au sein des PHF.

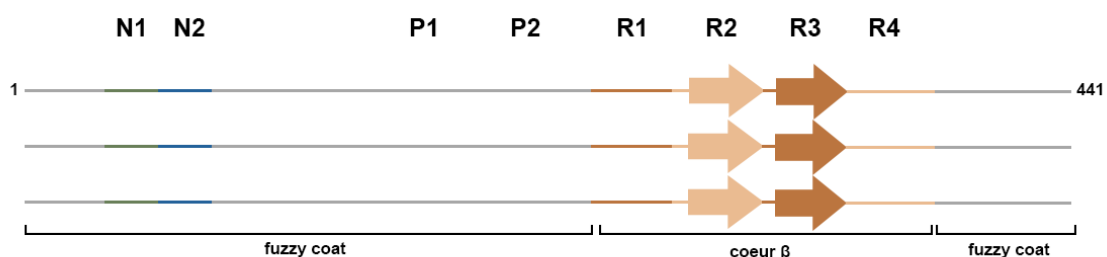


Figure 8 : Structures secondaires de tau lorsqu'elle s'agrège en PHF. Les PHF sont constitués d'un cœur en feuillet bêta (séquences répétées), tandis que les parties N et C-terminales constituent le domaine flexible de la protéine.

De façon similaire à sa structure secondaire, la protéine tau possède quelques rares éléments de structure tertiaire.

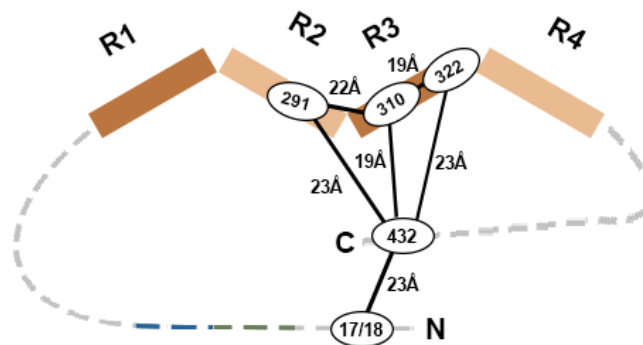
Structure tertiaire

Bien qu'elle appartienne à la famille des IDP, différentes études ont dévoilé que la protéine tau est en réalité légèrement compactée. En 2006, en utilisant des mesures de FRET et de RPE, une équipe a montré que la structure de tau est semblable à une épingle à cheveux (Figure 9a) (Jeganathan et al. 2006). Malgré sa très grande flexibilité, en la présence d'aucun partenaire, tau replie sa partie C-terminale sur ses séquences répétées à une distance d'environ 20 angström. La partie N-terminale se replie ensuite, elle aussi à environ 20 angström de la partie C-terminale. Deux ans après, tau a été étudiée par SAXS (Mylonas et al. 2008) et la structure obtenue révèle aussi des contacts entre les parties N-terminale et C-terminale, en accord avec le modèle en épingle à cheveux précédemment suggéré (Jeganathan et al. 2006). Par RMN, une étude a mis en évidence des contacts transitoires de longue distances entre des acides aminés de tau, pouvant provoquer une légère compaction de la protéine (Mukrasch et al. 2009). En 2012, une combinaison de mesures de FRET et de simulations bio-informatiques ont permis d'étudier les changements de structures de tau lors de son agrégation en PHF (Nath et al. 2012). En plus de confirmer une extension des zones impliquées dans la formation du cœur des PHF, cette étude montre que même en absence d'agrégation, la protéine tau possède un rayon de giration différent de celui attendu dans le cas d'un random-coil total, ce qui renforce l'hypothèse de l'existence d'une certaine compaction dans la structure.

Plus récemment, et de façon étonnante, une étude bio-informatique a modélisé la structure tridimensionnelle de tau, et l'a décrite comme compacte avec plusieurs sous-domaines (Figure 9b) (Popov et al. 2019). Dans cette étude, les chercheurs ont utilisé une technique de cross-linking à l'aide d'agents photo-réactifs : ainsi, la protéine a formé des ponts entre ses résidus espacés de moins de 7 angström dans l'espace. Tau a ensuite été digérée par des endopeptidases, et les peptides ont été séparés par SDS-PAGE et analysés par spectrométrie de masse. Les peptides cross-linkés (c'est à dire distants de moins de 7 angström dans l'espace) ont permis de fournir des contraintes de distances lors de la simulation, pour calculer la structure tridimensionnelle de tau. Cette dernière est

beaucoup plus compacte que précédemment décrit, avec beaucoup d'éléments de structures secondaires. Les auteurs insistent cependant sur le fait que la protéine tau fait partie des IDP, et décrivent cette structure comme utile pour étudier les origines de l'agrégation de tau, car elle contient de l'information structurale "résiduelle" probablement à l'origine des événements pathologiques.

A



B

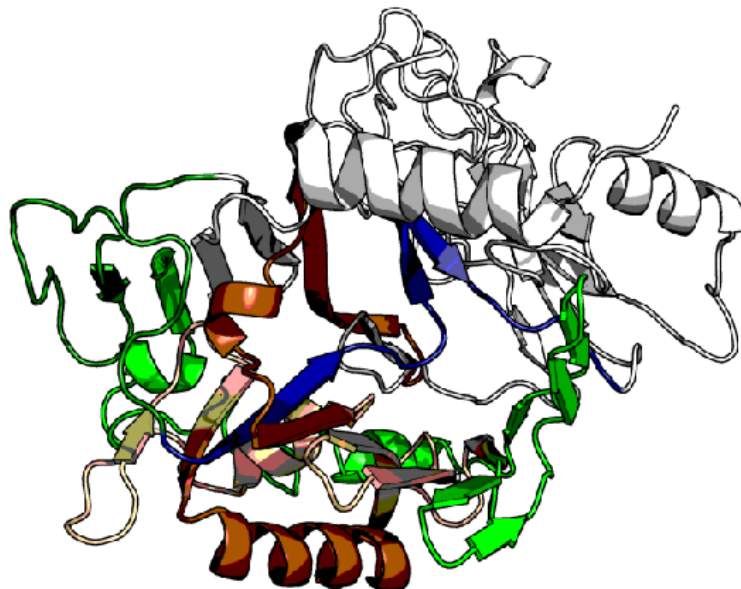


Figure 9 : Modèles de structures tertiaires de tau en solution, en épingle à cheveux (A) (adaptée de Jeganathan et al. 2006). Les séquences répétées et les parties N et C-terminales sont séparées d'une distance de 23 Å. La structure du bas (B) est une simulation de repliement obtenue par des méthodes bio-informatiques (adaptée de Popov et al. 2019), qui propose une vue beaucoup plus compactée de la protéine tau.

Enfin, la protéine tau adopte une nouvelle organisation dans le cadre de son auto-association. On distingue principalement deux types de structures de tau auto-associées : les PHF et les corps de Pick.

Agrégation en paires de filaments en hélice (PHF)

Dès lors que tau a été identifiée comme constituant majeur des PHF (Brion et al. 1985), la morphologie de ces agrégats a été étudiée par microscopie électronique (Crowther and Wischik 1985). Les PHF (*Paire de Filaments en Hélice*) sont constitués de deux filaments organisés en hélice, avec une périodicité axiale d'environ 80 nm (Figure 10) :

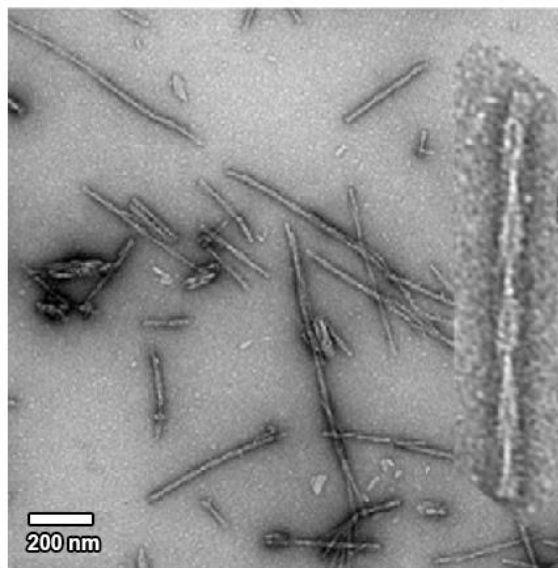


Figure 10 : Images de microscopie électronique à transmission de PHF, obtenue par coloration négative (adaptée de Pollack et al. 2019). A droite de la photographie est représenté une paire de filaments, qui adoptent une organisation hélicoïdale.

Le cœur en feuillet bêta des PHF résulte de l'empaquetage de plusieurs protéines tau entre elles (Margittai and Langen 2004, 2006). La morphologie du "fuzzy coat" s'est précisée à l'aide d'une étude utilisant la microscopie à force atomique et la microscopie électronique couplée à des billes d'or (Wegmann et al. 2013). Il est constitué d'une

première couche, composée d'acides aminés neutres ou chargés positivement, tandis que la deuxième couche est constituée d'acides aminés chargés négativement (Figure 11). La partie N-terminale contribue le plus à la charge globale de ces couches, étant donné qu'elle est chargée négativement à son extrémité, puis positivement au niveau des zones riches en proline. L'extrémité C-terminale constitue surtout la première couche, car elle est faiblement chargée.

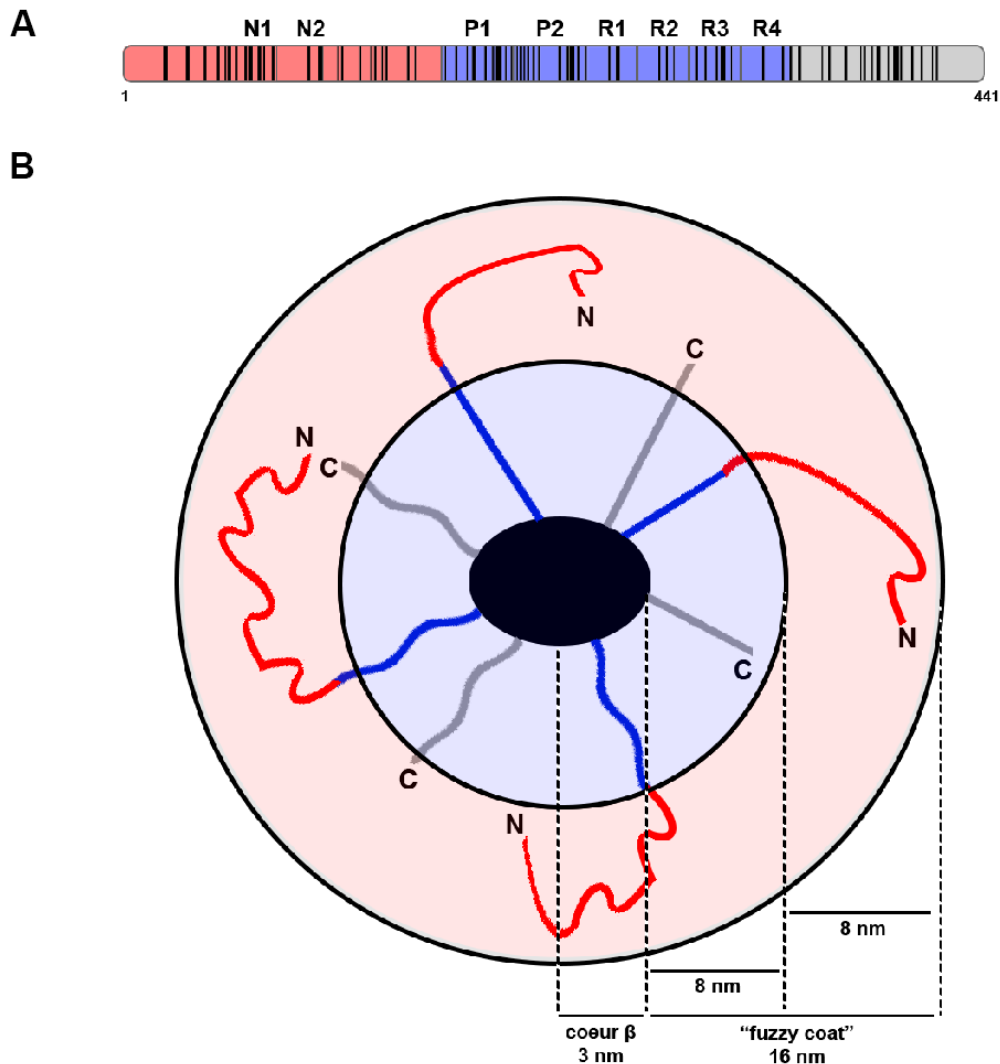


Figure 11 : Répartition des acides aminés chargés sur la séquence de tau (A) et structure quaternaire de tau en PHF (B) (adaptée de Wegmann et al. 2013). La couche interne du "fuzzy coat" est chargée positivement (bleue) à cause des charges positives des séquences répétées de tau, tandis que la couche externe est chargée négativement (rouge) à cause des acides aminés du N-terminal.

Tandis que le cœur des PHF mesure 3 nm d'épaisseur, le "fuzzy coat" s'étend sur 16 nm, et constitue donc la majorité de ces agrégats en terme de taille. Les "paquets" de protéines tau s'associent ensuite pour former des filaments. Par analogie avec d'autres structures fibrillaires similaires (Nelson and Eisenberg 2006), l'hypothèse la plus probable était que les parties N-terminale et C-terminale de tau interagissaient avec d'autres "paquets" de protéines afin de former et d'allonger le filament (E. Mandelkow et al. 2007). Enfin, il a été montré que l'assemblage des filaments en paire dépend fortement des résidus des séquences R3 et R4 de tau, et que leur substitution change la nature des agrégats obtenus *in vitro* (DeTure, Di Noto, and Purich 2002).

Une étude publiée en 2017 a étudié la structure de PHF purifiés à partir du cerveau d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (Fitzpatrick et al. 2017). Les résultats montrent que le cœur des PHF est composé des séquences R3 et R4 de tau, ainsi que de 10 résidus C-terminaux (Figure 12) :

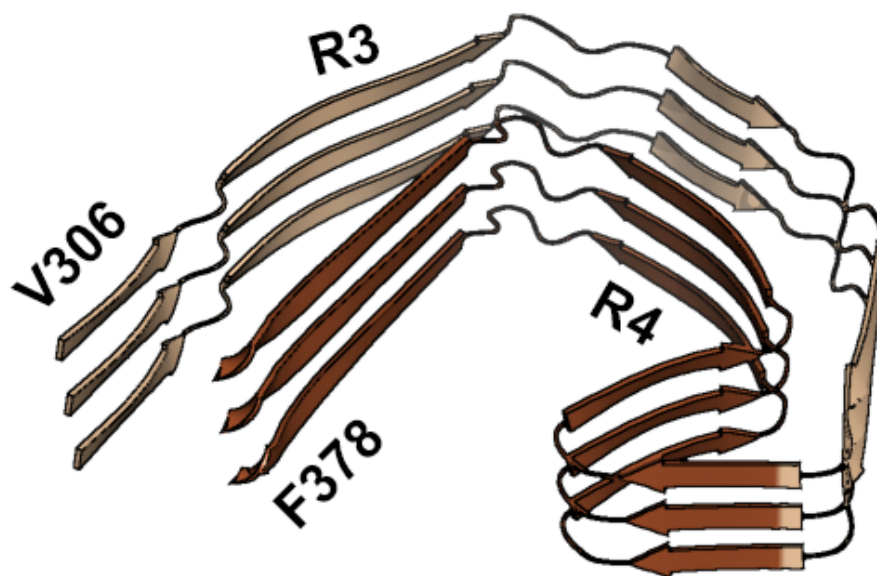


Figure 12 : Structure du cœur des PHF obtenue par cryo-EM (adaptée de Falcon et al. 2018; Fitzpatrick et al. 2017). Le cœur des PHF est composé des séquences R3 et R4 de tau, ainsi que de 10 acides aminés C-terminaux, organisés en coude.

Les auteurs ont également démontré que ces structures sont polymorphes, puisqu'elles sont formées à partir des 6 isoformes de la protéine tau, créant ainsi des zones moins bien définies au niveau des séquences R1 et R2 sur l'ensemble des PHF.

Ces résultats décrivent pour la première fois la structure des PHF par cryo-EM, et démontrent l'utilité d'une telle technique dans l'étude structurale d'agrégats de protéines associées aux maladies neurodégénératives.

L'agrégation pathologique de tau en PHF a plusieurs origines, impliquant parfois des résidus clés sur sa séquence. La lysine 280, lorsqu'elle est supprimée par mutation, favorise l'organisation du cœur des PHF, ce qui déclenche l'agrégation de la protéine (M. von Bergen et al. 2001). Les acides aminés voisins forment plus facilement un feuillet bêta, en orientant de façon plus optimale leur chaîne latérale. Les cystéines 291 et 322 de tau, localisées dans les séquences répétées R2 et R3, peuvent former des ponts disulfures afin de déclencher l'agrégation de tau (Takashima 2013; Soeda et al. 2015), bien qu'ils ne soient pas indispensables à la formation des PHF (Huvent et al. 2014).

De plus, l'équilibre des charges des acides aminés de tau semble être au cœur de ce processus. Particulièrement, l'état de phosphorylation de la protéine est crucial dans la formation de ces structures, étant donné que la protéine tau est retrouvée hyperphosphorylée dans les PHF (Biernat et al. 1992; J.-Z. Wang et al. 2013; W. Hu et al. 2016; Fichou et al. 2019). D'autres molécules telles que les polyanions comme l'héparine (Huvent et al. 2014) favorisent l'empaquetage de la protéine en linéarisant la séquence par des interactions électrostatiques. L'héparine est couramment utilisée pour induire la formation de PHF *in vitro* (Fichou et al. 2019; Moreira et al. 2019), bien que ces derniers aient des structures différentes de celles observées dans les neurones en dégénérescence (W. Zhang et al. 2019). Ils présentent des cœurs en feuillet bêta plus petits et de compositions différentes de ceux présents dans les agrégats pathologiques. Cette découverte explique les résultats de nombreuses études réalisées sur les PHF formés en présence d'héparine (M. von Bergen et al. 2000; Pérez et al. 2001; Santa-María et al. 2006; Martin von Bergen et al. 2006), qui n'étaient pas cohérents avec la structure des agrégats retrouvés dans la maladie d'Alzheimer.

L'héparine ne permet pas non plus d'obtenir *in vitro* des agrégats semblables aux corps de Pick, qui constituent un autre type de structure quaternaire de tau.

Agrégation en corps de Pick

Les corps de Pick sont des agrégats de la protéine tau retrouvés dans une pathologie neurodégénérative spécifique appelée maladie de Pick. Contrairement aux PHF qui sont constitués d'un mélange de plusieurs isoformes de tau pouvant contenir 3 ou 4 séquences répétées, les corps de Pick sont formés à partir de l'isoforme à 3 séquences répétées uniquement (Falcon et al. 2018). En 2018, une étude a révélé la structure des corps de Pick par cryo-microscopie électronique (Falcon et al. 2018) (Figure 13).

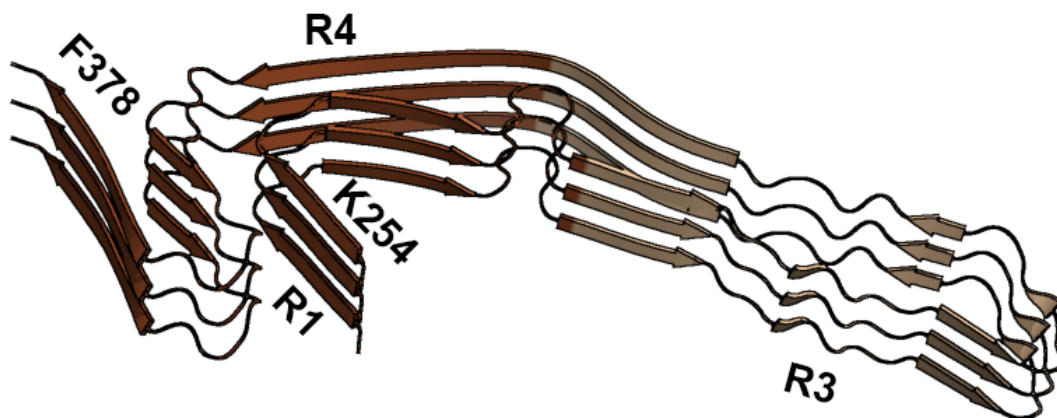


Figure 13 : Structure du cœur des corps de Pick (adaptée de Falcon et al. 2018; Fitzpatrick et al. 2017). Les corps de Pick ont un cœur formant une longue épingle, composé des séquences R1, R3 et R4.

L'absence de la séquence répétée R2 dans les corps de Pick est à l'origine des différences observées avec la structure des PHF mentionnée précédemment. Bien que les deux types d'agrégats partagent les mêmes structures secondaires locales, les boucles entre les brins diffèrent et provoquent un empilement différent dans chacun des cas. Etant donné que l'isoforme de tau contenant 3 séquences répétées est aussi un constituant des PHF, cette étude souligne l'hétérogénéité des agrégats de tau rencontrés dans les tauopathies, et suggère que des repliements alternatifs existent dans chacune d'elles.

Cependant, ces éléments de structure décrivent la protéine tau dans le cadre de pathologies neurodégénératives. Ainsi, dans un contexte physiologique, tau reste considérée comme une protéine désordonnée puisqu'elle est non-agrégée, ce qui lui permet d'assurer ses fonctions physiologiques dans les neurones.

Fonctions

Rôle de tau dans l'assemblage des microtubules

La protéine tau a plusieurs rôles au sein des neurones. Le long des axones et dans les dendrites, elle régule l'assemblage des microtubules (Figure 14), ce qui modifie l'organisation du cytosquelette (Feinstein and Wilson 2005; E.-M. Mandelkow and Mandelkow 2012). Sa liaison aux microtubules se fait via ses séquences répétées (Himmler et al. 1989), le long des microtubules, à des localisations distinctes (Breuzard et al. 2013). Selon des études de cryo-EM et de RMN, les séquences R1, R2 et R3 de tau constituent l'interface principale entre les deux protéines (Kadavath et al. 2015; Kellogg et al. 2018). Récemment, une étude de RPE, en accord avec ce modèle, a montré que l'interaction entre la protéine tau et la tubuline met en jeu les cystéines des deux protéines via un échange de leurs fonctions thiol (Martinho et al. 2018). En ce qui concerne sa partie N-terminale, il a été montré qu'elle régule l'espacement entre les microtubules *in vivo* (Chen et al. 1992; Rosenberg et al. 2008). Par ce processus de régulation de la formation des microtubules, tau est impliquée dans l'élongation et la maturation des neurones. Une étude a montré qu'un knock-out chez le rat empêchait aux neurones de former leurs dendrites et leurs axones (Caceres and Kosik 1990). A l'inverse, lorsque la protéine tau est surexprimée dans des cellules non neuronales, ces dernières peuvent développer des axones et des dendrites, ce qui montre l'implication de tau dans l'apparition de ces structures caractéristiques des neurones (Knops et al. 1991).

Cependant, les raisons de sa localisation au niveau des axones sont encore débattues. Plusieurs études proposent un modèle selon lequel tau est transporté par les microtubules grâce à des mécanismes mettant en jeu des moteurs moléculaires tels que la kinésine (Utton et al. 2005; Falzone et al. 2009; Scholz and Mandelkow 2014). D'autre part, une étude de 2011 soupçonne un tout autre modèle, selon lequel un système de filtres situé à la base de l'axone empêcherait la protéine tau de pénétrer dans le soma des neurones (Xiaoyu Li et al. 2011). Récemment, une étude montre que la localisation de tau dans les axones n'est pas due à sa fixation aux microtubules (Iwata et al. 2019). Plus étonnant, l'interaction entre les microtubules et la protéine tau favoriserait même sa localisation dans le soma et dans les dendrites. A l'heure actuelle, il n'y a donc pas de consensus sur la raison de la localisation de tau au niveau des axones.

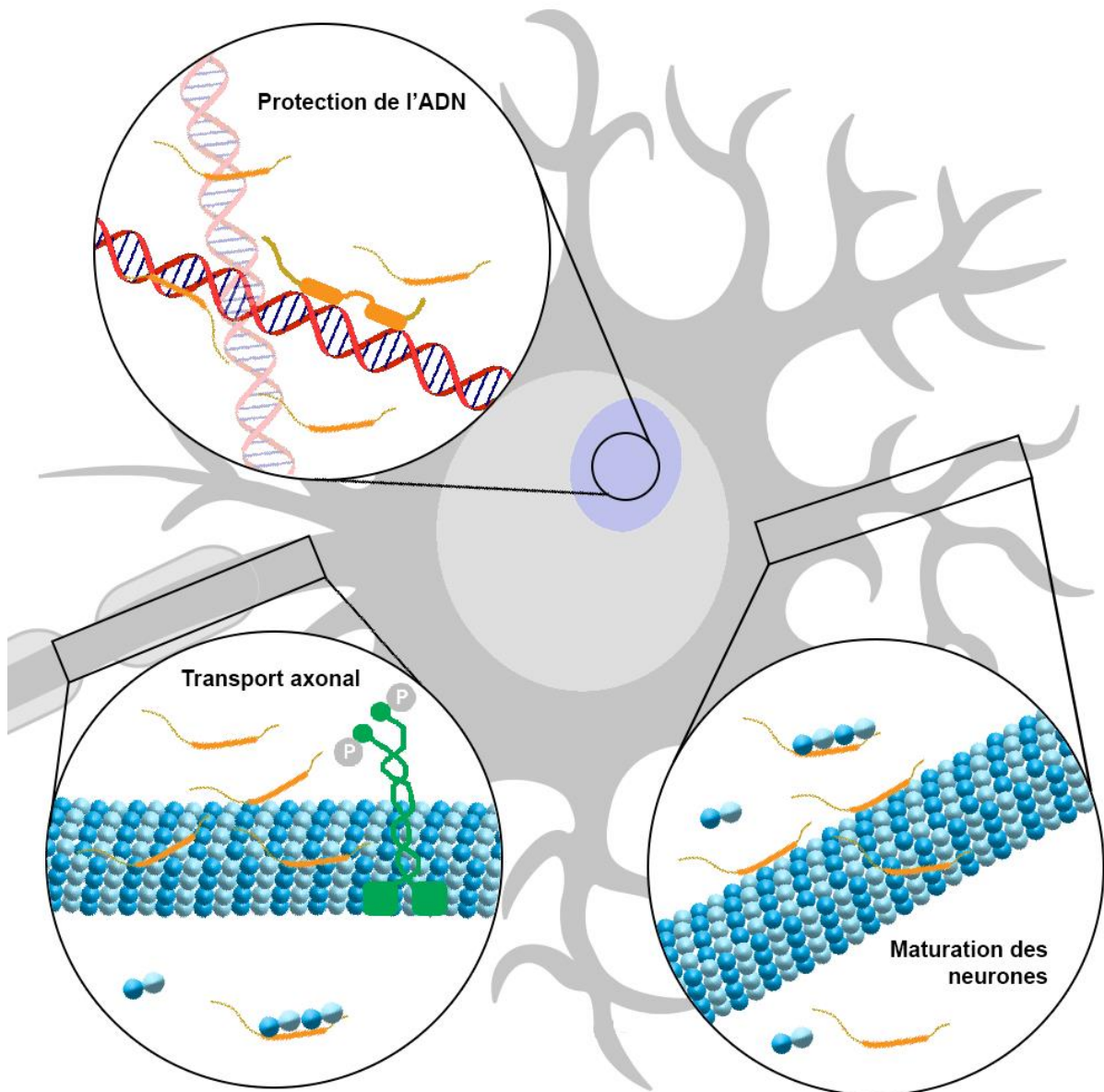


Figure 14 : Récapitulatif des fonctions de tau dans le neurone. La dynéine est représentée en vert, tandis que tau est représentée en orange. La protéine tau joue un rôle dans la maturation des neurones en favorisant l'apparition des dendrites, alors que dans les axones elle fait compétition avec la dynéine et régule le transport axonal. Tau se localise également au noyau en cas de stress cellulaire afin de protéger l'ADN.

Rôle de tau dans le transport axonal

La protéine tau est aussi impliquée dans le transport axonal (Figure 14). En se liant sur les microtubules, elle interfère avec le transport effectué par la dynéine et la kinésine en créant une compétition pour la fixation à la tubuline (Stamer et al. 2002; Dixit et al. 2008). Aussi, tau régule le transport axonal en interagissant avec des partenaires de la kinésine et de la dynéine. Elle lie la kinase GSK3 β qui phosphoryle la kinésine (Kanaan and Al 2011), et interagit avec la dynactine qui facilite la fixation de la dynéine sur les microtubules (Figure 15) (Magnani et al. 2007). De plus, il a été montré que des mutations du gène de tau chez la souris, notamment la mutation de la proline 301, influe sur le transport axonal (Ittner et al. 2008; Bull et al. 2012; Mellone et al. 2013; Rodríguez-Martín et al. 2016), ce qui met en évidence l'importance de tau dans le transport axonal *in vivo*.

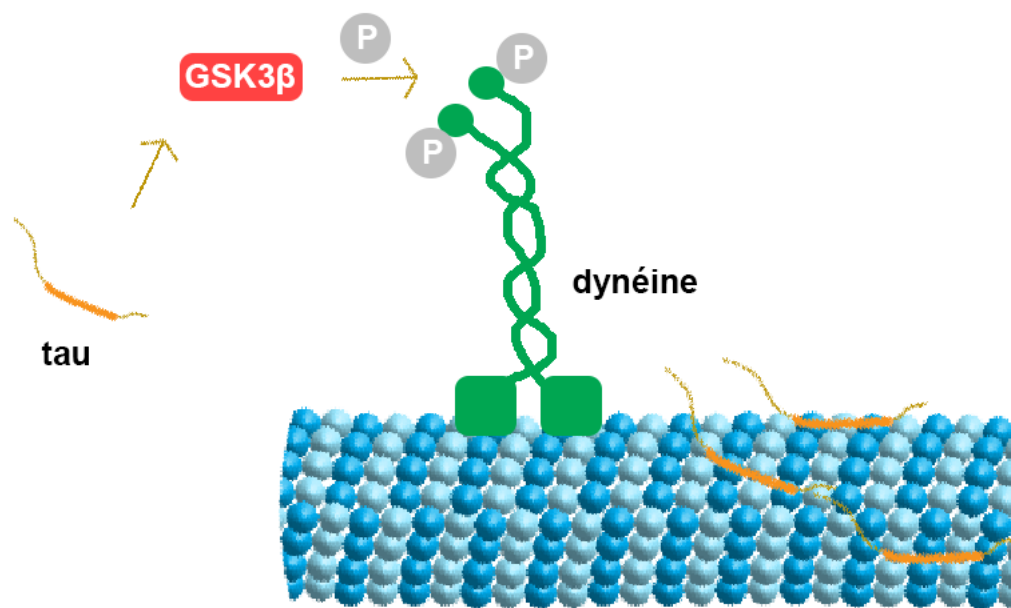


Figure 15 : Mode d'action de tau sur le transport axonal (adaptée de Combs et al. 2019). La protéine tau interagit avec GSK3 β , ce qui va indirectement favoriser la fixation de la dynéine sur les microtubules. D'autre part, la protéine tau régule également le transport axonal grâce à sa fonction de stabilisation des microtubules.

Rôle de tau dans la protection de l'ADN

Enfin, tau se localise dans le noyau des cellules neuronales et de certaines cellules non-neuronales (Figure 14) (Loomis et al. 1990). Elle protégerait l'ADN et l'ARN des dommages induits par un stress thermique ou oxydatif dans la cellule (Hua and He 2003; Wei et al. 2008; Violet et al. 2014). Dans ce contexte de stress cellulaire, elle se fixerait au niveau des séquences péri-centromériques de l'ADN afin de réguler sa compaction (Sjöberg et al. 2006).

Il a été montré que l'interaction tau-ADN est réversible, et dépend du nombre de phosphorylations sur la protéine (Lu et al. 2013; Camero, Benítez, Cuadros, et al. 2014). Tau a pour rôle d'ouvrir le double brin d'ADN, avec un mode d'action similaire à celui d'une histone, en se liant sur un simple brin (Camero, Benítez, Barrantes, et al. 2014). Concernant la spécificité de l'interaction, elle se produirait préférentiellement au niveau de courtes séquences AT-riches de l'ADN (environ 13 paires de bases) et du MTBD de la protéine tau, avec l'implication des séquences riches en prolines (Figure 16) (Wei et al. 2008) :

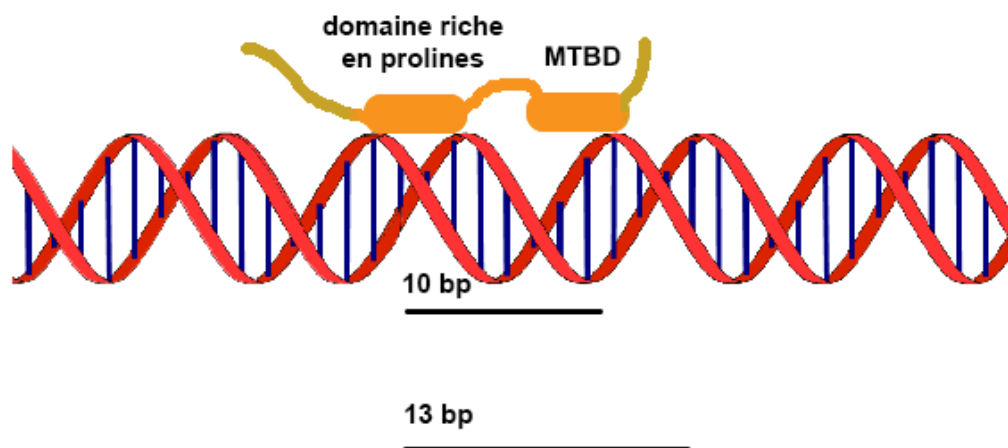


Figure 16 : Liaison de la protéine tau à l'ADN (adaptée de Wei et al. 2008). La principale interface d'interaction se trouve au niveau de la zone riche en proline, ainsi que du MTBD.

En contexte pathologique, tau perd ses fonctions physiologiques et se retrouve impliquée dans diverses maladies.

Implications pathologiques

La protéine tau dans le cancer

Etant donné que la protéine tau joue le rôle de régulateur de la polymérisation des microtubules dans la cellule, elle participe à la division cellulaire, qui est un processus crucial dans l'évolution du cancer. Si la protéine tau est exprimée dans tous les tissus cellulaires (Ingelson, Vanmechelen, and Lannfelt 1996; Vanier et al. 1998), elle est d'autant plus présente dans les cellules cancéreuses. Par exemple, dans les cellules prostatiques de carcinomes, la résistance à l'estrามustine (un agent anticancéreux) a été corrélée à une surexpression de la protéine tau (Sangrajrang et al. 1998). De façon similaires, les cellules cancéreuses mammaires (Rouzier et al. 2005; Wagner et al. 2005) et gastriques (Mimori et al. 2006) surexprimant tau résistent au traitement au paclitaxel, un agent anti-mitotique stabilisant les microtubules. Aussi, la même corrélation a été observée pour la résistance des cellules cancéreuses pancréatiques à deux agents anticancéreux dérivés de la benzoylphénylurée (Jimeno et al. 2007). L'une des explications de cet effet inhibiteur des agents anticancéreux est que la protéine tau pourrait empêcher l'interaction entre ces molécules et la tubuline en interagissant sur le même site de fixation. Les récents travaux effectués sur l'implication de la protéine tau dans le cancer se focalisent sur son rôle de biomarqueur, et visent à utiliser le niveau d'expression de tau ou encore la fréquence de ses mutations comme un outil permettant de prédire l'apparition d'un cancer (Rossi et al. 2018; Darlix et al. 2019; Schroeder et al. 2019).

En dehors du cancer, la protéine tau est très majoritairement étudiée pour son implication dans plusieurs pathologies neuronales.

Agrégation de tau et neurodégénérescence

L'agrégation de la protéine tau en NFT est associée à l'apparition de maladies neurodégénératives spécifiques, incluant notamment la maladie d'Alzheimer. Ces maladies se caractérisent par l'apparition d'agrégats de tau dans les neurones appelés noeuds neurofibrillaires (NFT), eux-mêmes constitués de protéines tau organisées en

paires de filaments en hélice (PHF). L'agrégation de la protéine tau en NFT est corrélée à une perte des fonctions physiologiques listées précédemment, ce qui entraîne différents dysfonctionnements neuronaux.

L'apparition des NFT semble conduire à une perte de fonction synaptique. Il a été montré que la formation des NFT est corrélée à une diminution de l'expression de la protéine GAP-43 (Callahan et al. 1994), qui est impliquée dans la fonction synaptique et dans la plasticité neuronale (Figure 17). Ces NFT pourraient se propager de neurone en neurone, et induire ainsi la dysfonction de nombreuses synapses distales du neurone initial (Clavaguera, Duyckaerts, and Haïk 2020). En effet, chez la souris, l'injection de corps fibrillaires de tau dans des neurones sains provoque la formation de NFT (Clavaguera et al. 2009, 2013; Michel Goedert, Clavaguera, and Tolnay 2010). Cet aspect important des tauopathies peut expliquer l'évolution de ces maladies, notamment dans le cas de la maladie d'Alzheimer (Braak and Braak 1996), où les agrégats de tau apparaissent dans un premier temps au niveau du cortex entorhinal, puis progressent jusqu'au cortex cérébral. De plus, les NFT ne provoquent pas seulement l'apparition des tauopathies, mais semblent moduler leurs phénotypes. Des formes d'agressivité dans certaines démences ont été associées à une plus grande quantité de NFT dans les neurones (Lai et al. 2010). De façon similaire, des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ayant une grande quantité de NFT ont développé une dépression comorbide (Rapp et al. 2008).

Par opposition, les NFT ont été parfois décrits comme des protecteurs de la vie neuronale. En effet, une étude de modélisation ayant généré des neurones de l'hippocampe a conclu que la durée de vie neuronale pouvait grandement s'étendre lorsqu'une grande quantité de NFT est présente (Morsch, Simon, and Coleman 1999). Cette même étude suggère que les NFT pourraient ne pas être obligatoire à la neurodégénérescence observée chez les patients d'Alzheimer. Une explication à ce résultat pourrait être la présence d'agrégats intermédiaires de tau provoquant l'apparition des tauopathies (Duff and Planel 2005). Dans ce cas-là, les NFT joueraient un rôle de séquestration de ces agrégats intermédiaires, réduisant ainsi la toxicité neuronale (Bird et al. 1999).

Au final, la balance entre les effets toxiques et le potentiel rôle protecteur des NFT est largement déficitaire, et conduit à la mort des neurones (Braak and Braak 1991; Delacourte et al. 1999). Certains facteurs ont été identifiés comme impliqués dans

l'agrégation de tau tels que l'hyperphosphorylation (J.-Z. Wang et al. 2013; W. Hu et al. 2016; Despres et al. 2017) ou des mutations de tau (M. von Bergen et al. 2001; Inouye et al. 2006).

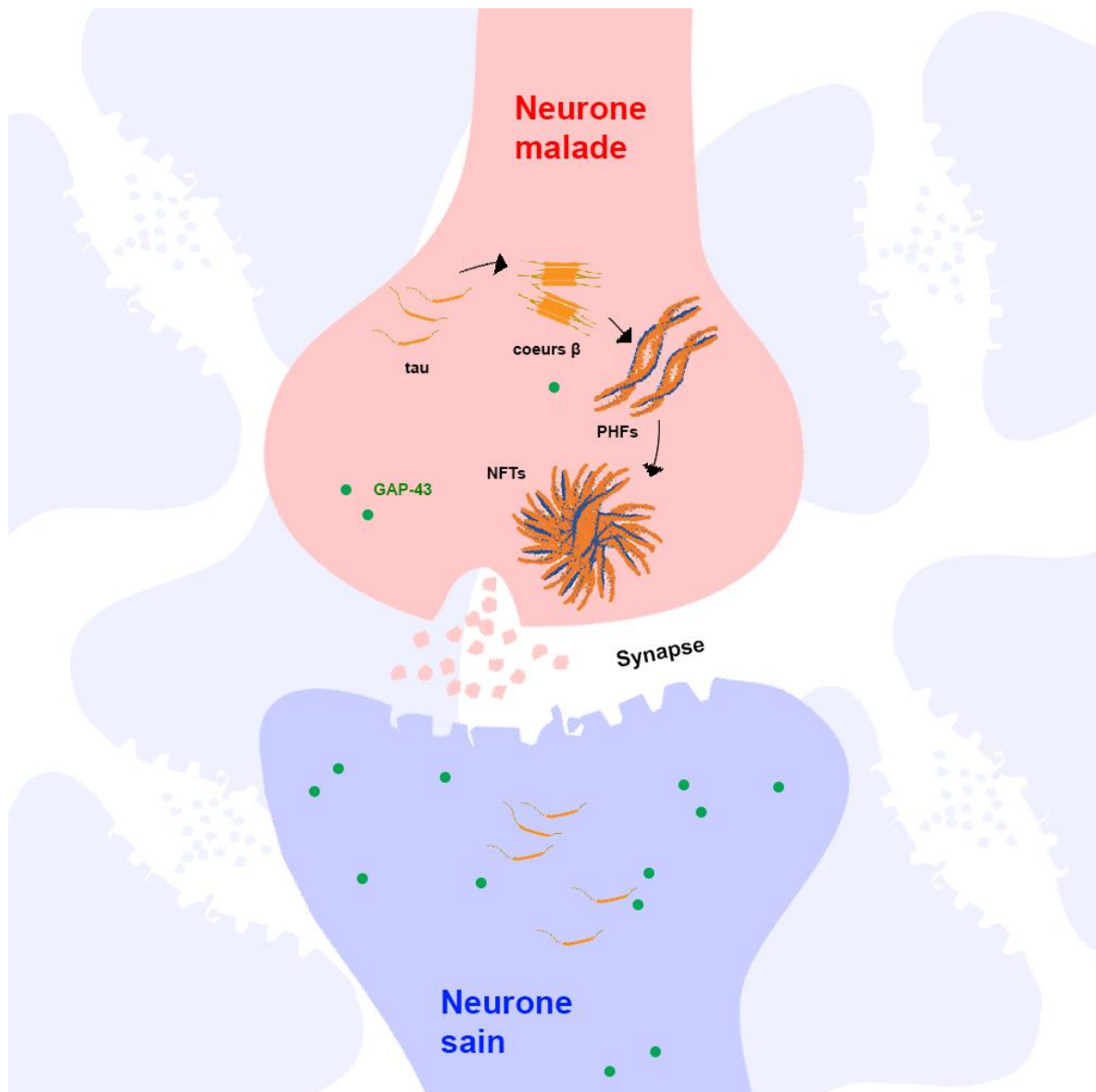


Figure 17 : Corrélation entre l'agrégation de tau et l'expression de GAP-43. Dans les neurones malades, l'agrégation de la protéine tau en PHF est corrélée à une sous-expression de GAP-43.

Depuis 1999, l'équipe "Cytosquelette et Neurophysiopathologie" de l'Institut de Neurophysiopathologie (INP) à Marseille contribue aux recherches sur la protéine tau, en

lien avec les pathologies neurodégénératives mais aussi avec le cancer. Les chercheurs de l'équipe se sont intéressés tout au long de ces 21 années aux aspects moléculaires comme aux aspects cellulaires.

Contribution du laboratoire à la recherche sur la protéine tau

Aspects moléculaires

Le premier article moléculaire de l'équipe, paru en 2002, s'est intéressé à l'interaction d'une petite partie de séquence de la protéine tau, la séquence R1, avec la tubuline (Devred et al. 2002). Cette séquence joue un rôle clé dans l'interaction tau - tubuline, car elle est capable à elle seule de se fixer à la tubuline et d'induire sa polymérisation. De plus, la séquence R1 contient un site de phosphorylation, qui est une modification post-traductionnelle associée à l'agrégation pathologique de tau. Cet article avait pour but de définir les effets de la phosphorylation sur la sérine 262 dans l'interaction d'un peptide contenant uniquement la séquence R1 avec les microtubules. Les résultats ont montré que le peptide R1 se fixe avec la même affinité aux microtubules, qu'il soit phosphorylé ou non. Cependant, des précédentes études ont montré que la phosphorylation de la sérine 262 sur la protéine tau entière provoque son détachement des microtubules (Drewes et al. 1995). En mettant ces résultats en commun, cela suggère que la phosphorylation de la sérine 262 provoque des réarrangements conformationnels au sein de la protéine, ce qui conduit à son détachement des microtubules (Figure 18) :

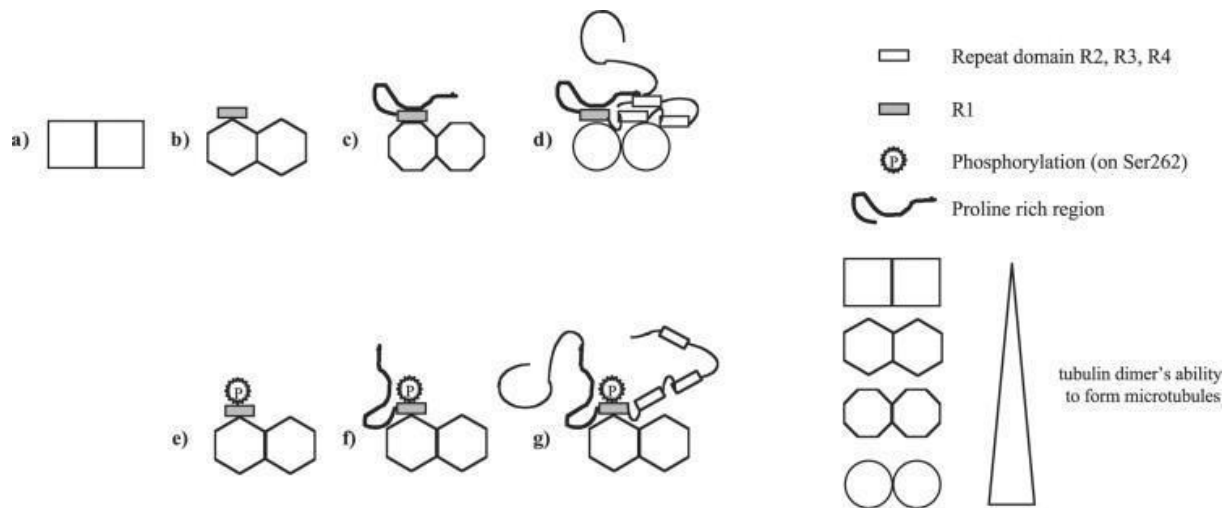


Figure 18 : Représentation schématique de la fixation de tau à la tubuline, lorsqu'elle est phosphorylée et non-phosphorylée sur la sérine 262 (Devred et al. 2002). La phosphorylation induit un changement de conformation de la protéine tau, ce qui inhibe son activité pro-polymérisante sur la tubuline.

Deux ans plus tard, l'équipe s'est focalisé sur l'interaction entre la tubuline et la protéine tau entière (Devred et al. 2004), dans des conditions de tampon où la tubuline ne polymérise pas spontanément. Cet article montre pour la première fois que la protéine tau peut agir comme un inducteur de polymérisation de la tubuline. Les polymères peuvent être soit des anneaux, soit des microtubules, en fonction de la température et de la concentration en GTP dans le milieu. De plus, l'étude du mécanisme d'interaction entre la tubuline et la protéine tau entière par cosédimentation et par dichroïsme circulaire a révélé que tau se fixe au dimère de tubuline sur deux sites distincts, sans changer sa conformation. Enfin, cet article a aussi montré, par mesures de fluorescence, que des peptides contenant les séquences C-terminales des monomères de tubuline inhibent la formation des microtubules induit par la protéine tau. Ce résultat suggère que la protéine tau interagit directement avec les parties C-terminales des monomères de tubuline.

Plusieurs années plus tard, l'interaction tau - tubuline a été étudiée par microcalorimétrie (Philipp O. Tsvetkov et al. 2012) dans les conditions précédemment définies où la tubuline ne polymérise pas spontanément, afin de s'affranchir de la chaleur dégagée lors de l'interaction entre la tubuline et ses cofacteurs. Les expériences ont été réalisées à 4 températures (10°C, 20°C, 30°C et 37°C) afin de caractériser l'interaction sur les différents polymères de tubulines (anneaux et microtubules). Les résultats ont mis en évidence deux types de sites de fixation de tau sur la tubuline, avec les mêmes

stœchiométries quelque-soit la température considérée : un premier de haute affinité avec une stœchiométrie de 0.2 (une protéine tau pour 5 dimères de tubuline), et un second de basse affinité avec une stœchiométrie de 0.8 (4 protéines tau pour 5 dimères de tubuline) (Figure 19) :

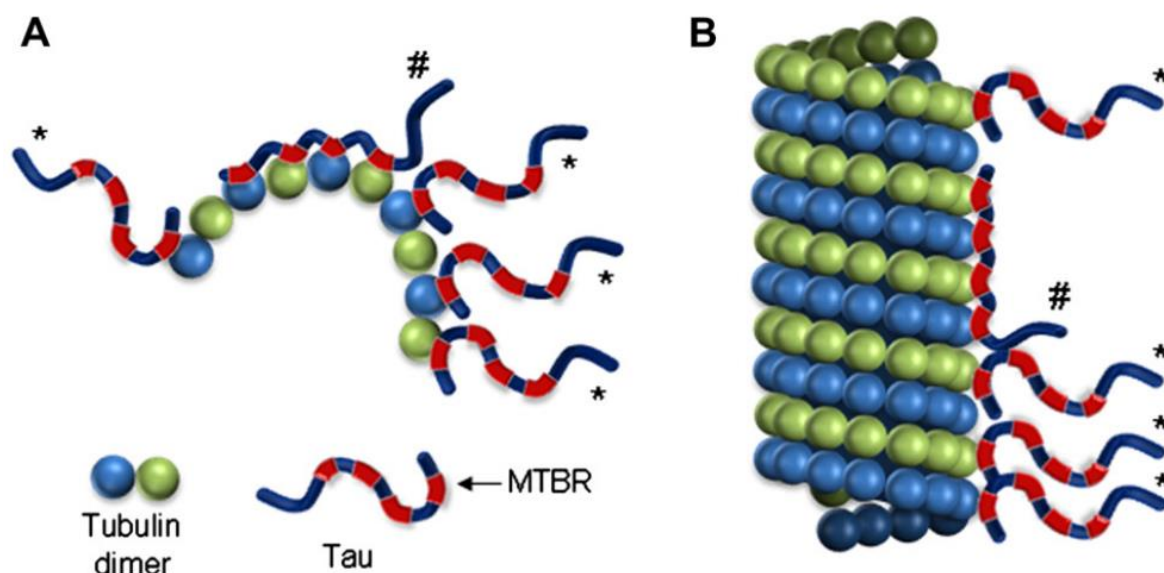


Figure 19 : Représentation schématique de la fixation de tau aux microtubules, à 10°C (A) et à 37°C (B) (Philipp O. Tsvetkov et al. 2012). Sur les microtubules et sur les protofilaments, la protéine tau adopte le même mode de fixation en interagissant avec la tubuline via ses séquences répétées, ici représentées en rouge.

Cet article a permis de proposer un modèle d'interaction de tau à la tubuline, et suggère que le mécanisme est identique quelque-soit l'état de polymérisation de la tubuline.

Deux années plus tard, l'équipe a continué de s'intéresser à cette interaction, en contribuant à une étude de liaison entre un peptide de la protéine tau (TauF4, contenant les séquences répétées R1, R2 et une partie de la séquence R3) et l'hétérodimère de tubuline (Gigant et al. 2014). En utilisant la stathmine, une protéine associée aux microtubule capable de chapoter la tubuline, les auteurs ont pu générer des formes stables de tubuline à différents états de polymérisation. Des expériences de RMN de la protéine tau en présence de tubuline ont dévoilé quels résidus sont impliqués dans l'interaction. Les résultats montrent que TauF4 est capable de se lier à l'hétérodimère de tubuline sans immobiliser sa séquence répétée R1. Lorsqu'un second hétérodimère est présent, la séquence R1 participe à l'interaction pour former un complexe longitudinal (Figure 20) :

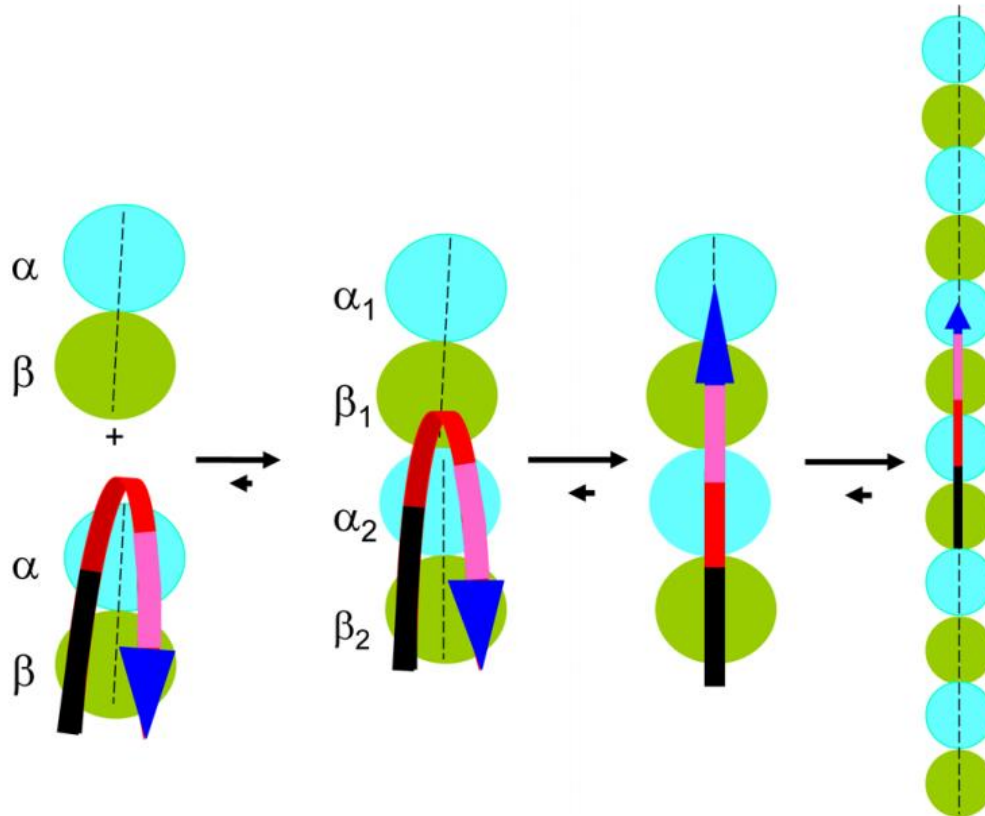


Figure 20 : Représentation schématique de la fixation du peptide TauF4 à la tubuline (Gigant et al. 2014). Lorsqu'elle est liée au protofilament, la protéine tau se déplie et interagit par ses séquences répétées R1, R2, R3 mais aussi avec une partie de sa séquence proline-riche.

Ce nouveau modèle d'interaction dissèque le mode d'action de la protéine tau au fil de l'élongation des microtubules.

Durant la même année, l'équipe a également conduit une étude de FRET afin d'obtenir de nouvelles informations concernant l'interaction protéine tau – tubuline (Di Maio et al. 2014). La protéine tau a été marquée à la rhodamine, tandis que les microtubules ont été stabilisés avec la sonde Flutax-2. L'expérience consiste à exciter le Flutax-2 afin que la sonde réémette la lumière à une longueur d'onde supérieure, qui peut être absorbée puis réémise par la rhodamine si elle se trouve à une distance suffisamment faible du Flutax-2. Ainsi, l'intensité de la fluorescence de la rhodamine permet de calculer la distance entre les deux sondes, et donc entre la protéine tau et la tubuline. Sur la base d'une précédente étude (Magnani et al. 2007) et de cet article, les auteurs suggèrent ici que la partie N-terminale de la protéine tau et l'interface des deux dimères de tubuline se

situent à 54 Å l'un par rapport à l'autre. En plus des mesures de FRET, la constante de dissociation de la protéine tau aux microtubules par titration de fluorescence a été déterminée ($1.0 \pm 0.5 \times 10^{-6}$ M), et l'implication de la partie C-terminale de la tubuline dans son interaction avec tau a été confirmée grâce à un clivage à la subtilisine.

Enfin, en 2018, l'équipe a réalisé une étude de l'interaction protéine tau - tubuline par résonance paramagnétique électronique (RPE) (Martinho et al. 2018). Cette technique permet de mesurer des distances entre des sondes moléculaires paramagnétiques, qui se fixent au niveau des résidus cystéines dans les protéines. Dans cette étude, différentes constructions de tau (incluant 1 ou 2 cystéines) ont été utilisées et marquées par des sondes MTSL et proxyl au niveau des cystéines 291 et 322. Après avoir vérifié la fonctionnalité de tau avec des tests de polymérisation de tubuline *in vitro*, les expériences de RPE ont été effectuées. Les résultats montrent que la protéine tau réalise des échanges de groupements thiols avec la tubuline par ses cystéines, et ont révélé que la séquence répétée R2 de la protéine se fixe au niveau de la sous-unité α de la tubuline, tandis que la séquence répétée R3 se lie à la sous-unité β (Figure 21) :

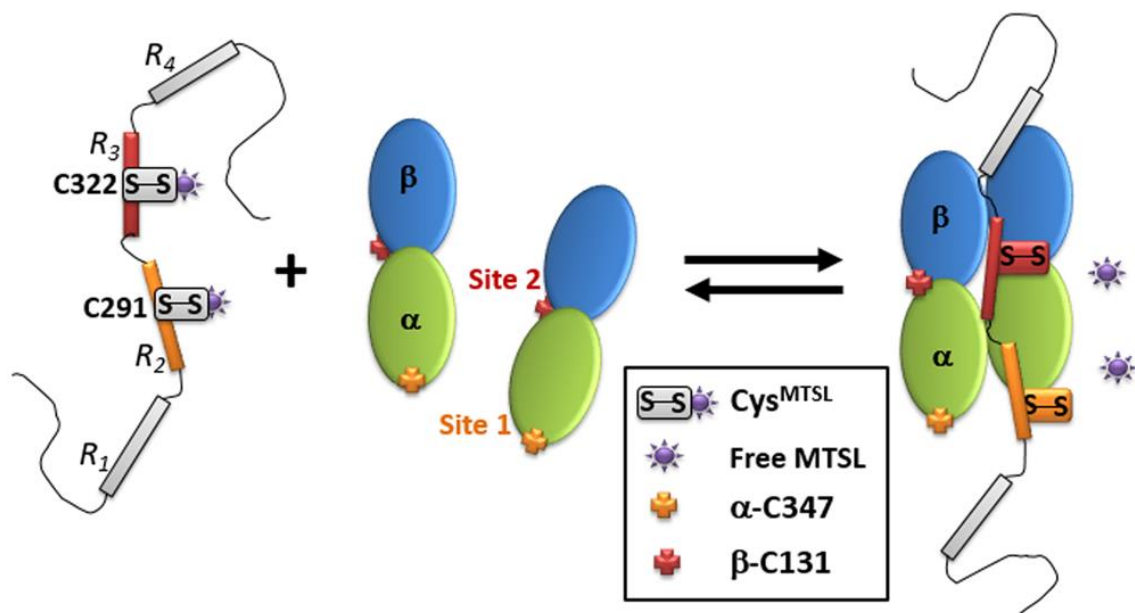


Figure 21 : Représentation schématique de l'interaction entre la protéine tau et la tubuline (Martinho et al. 2018). Les cystéines de tau échangent des groupements thiols avec celles de la tubuline lorsque les deux protéines sont à proximité, ce qui facilite leur interaction.

Ces résultats ont permis d'établir un modèle en accord avec les précédentes études issues de la littérature (Kadavath et al. 2015; Kellogg et al. 2018), et définissent mieux la localisation des sous domaines de tau lorsqu'elle se lie à la tubuline.

En parallèle à ces études moléculaires, l'équipe s'est également intéressée aux aspects cellulaires de la protéine tau, et notamment dans des lignées cellulaires issues de cancers.

Aspects cellulaires : lignées de neuroblastomes

La première étude cellulaire du laboratoire concernant tau a été publiée en 1999 (Guise et al. 1999). Dans cet article, les auteurs ont étudié l'implication de la protéine tau dans l'apoptose induite par le paclitaxel et la doxorubicine, deux agents anticancéreux, sur des lignées cellulaires de neuroblastomes. Dans un premier temps, l'effet pro-apoptotique des agents anticancéreux a été mesuré par immunofluorescence. Afin de montrer une corrélation entre l'apoptose et l'expression de la protéine tau dans la cellule, les lignées de neuroblastomes ont été lysées puis analysées par Western Blot. Les résultats ont montré qu'après 72h de traitement par ces agents anticancéreux, il y a une surexpression de la protéine tau hyperphosphorylée, ce qui suggère qu'elle est impliquée dans les processus cellulaires liées à l'apoptose des cellules de neuroblastomes.

Deux années plus tard, l'hyperphosphorylation de tau dans ces mêmes lignées cellulaires a été étudiée plus en détail (Guise et al. 2001). L'étude a tout d'abord précisé que l'ajout d'anticancéreux dans les cellules de neuroblastomes provoque une augmentation de la phosphorylation de tau, mais pas de l'expression de la forme non phosphorylée. En regardant les niveaux d'expression de plusieurs protéines, les auteurs ont étudié l'implication d'autres voies de signalisation cellulaires dans l'hyperphosphorylation de tau. L'étude montre que la caspase-3 n'est pas associée à l'hyperphosphorylation de tau dans ce contexte là, au contraire de la voie ERK. L'inhibition de cette voie de signalisation a entraîné une baisse de l'apoptose et de l'hyperphosphorylation de tau, ce qui précise la cascade de signalisation induite lors de l'action des agents anticancéreux.

Des années plus tard, en parallèle aux études moléculaires précédemment citées (Philipp O. Tsvetkov et al. 2012; Gigant et al. 2014), l'équipe s'est intéressée à l'interaction entre la protéine tau et la tubuline dans des lignées cellulaires de neuroblastomes, de carcinomes du poumon et de carcinomes colorectaux (Breuzard et al. 2013). Dans un premier temps, les auteurs ont marqué la protéine tau et la tubuline, respectivement avec la GFP et avec la protéine mCherry. Ce marquage a permis de constater que la protéine tau et la tubuline sont colocalisées de façon continue le long des microtubules. Des expériences de FRET ont ensuite révélé que bien que les deux protéines soient colocalisées de façon homogène, elles n'interagissent qu'à certains endroits ponctuels. Une mesure de FRET en temps réel montre que la protéine tau interagit avec la tubuline durant les phases de dépolymérisation des microtubules, et se détache dès lors que la tubuline repolymérise. Enfin, les auteurs ont traité les cellules avec le paclitaxel et une enzyme pouvant acétyler la tubuline, afin de mesurer les conséquences des modifications des microtubules sur son interaction avec la protéine tau dans la cellule. Les résultats montrent que le signal de FRET diminue dans ces conditions, ce qui souligne l'importance des modifications post-traductionnelles et de l'impact des agents anticancéreux dans l'interaction protéine tau - tubuline.

Plus récemment, l'équipe s'est focalisé sur le comportement de la protéine tau dans les lignées cellulaires de glioblastomes, et notamment sur son implication dans la migration cellulaire.

Aspects cellulaires : lignées de glioblastomes

En 2019, l'équipe a étudié l'implication de la protéine tau dans la migration de lignées cellulaires issues de glioblastomes (Breuzard et al. 2019). En réduisant l'expression de tau dans les cellules à l'aide d'un ARN en épingle à cheveux (shRNA), les auteurs ont mesuré les déplacements des cellules par vidéo-microscopie. Les résultats indiquent que dans les cellules sous-exprimant la protéine tau, la motilité cellulaire est réduite, ce qui montre son implication dans ce processus. L'étude a ensuite décortiqué cet effet, en divisant la cellule en 3 parties ayant chacun un mouvement distinct : l'avant, le corps, et la queue. C'est au niveau de la rétractation de la queue que la protéine tau est impliquée, puisque l'article montre une déficience dans ce processus des cellules sous-exprimant tau. Afin d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la médiation de la

migration cellulaire par la protéine tau, les auteurs ont utilisé un inhibiteur de la voie Rho-ROCK. Les expériences montrent que l'inhibiteur restaure la rétractation de la queue des cellules de glioblastomes sous-exprimant la protéine tau. Ce résultat indique que la protéine tau participe à la migration cellulaire des glioblastomes en inhibant la voie de signalisation Rho-ROCK.

En parallèle de ses recherches fondamentales, l'équipe a aussi réalisé des articles de revue et de méthodologie sur la protéine tau.

Articles de revue et de méthodologie

Depuis 2010, les chercheurs de l'équipe ont écrit plusieurs articles concernant l'étude des interactions entre la tubuline et les protéines associées aux microtubules (*Microtubules Associated Proteins*, MAP). Le premier d'entre eux (Devred et al. 2010) présente les avantages et limites des techniques d'analyse biophysique d'interactions moléculaires telles que la microcalorimétrie (ITC), l'ultracentrifugation analytique (UCA), les mesures de fluorescence ou encore la résonance magnétique nucléaire (RMN). Plus précisément, l'article se focalise sur les précautions à prendre dans le cas de l'étude des MAP et sur les spécificités liées à ces mesures. En 2013, un second article paraît (P. O. Tsvetkov et al. 2013), centré sur l'utilisation de la microcalorimétrie dans le cadre des interactions tubuline - MAP. Il explique notamment les différents problèmes techniques rencontrés lors de l'analyse de ces interactions, principalement dus aux propriétés de la tubuline. L'article propose par exemple des protocoles pour éviter des signaux de dilution parasites lors de la mesure d'interaction, et des conditions de tampon minimales dans lesquels aucun co-facteur ne vient modifier le mode d'interaction entre la tubuline et ses partenaires. La même année, un autre article de méthodologie explique comment réaliser des mesures de FRET et de FRAP dans la cellule pour caractériser les interactions entre les MAP et les microtubules (Nouar et al. 2013). Après avoir présenté ces méthodes, l'article les illustre avec des données du laboratoire concernant les interactions tau - microtubules et stathmine - microtubules. Enfin, en 2017, l'équipe a produit un article passant en revue différentes méthodes permettant d'étudier l'interaction entre la protéine tau et les microtubules au niveau cellulaire mais aussi à l'échelle moléculaire (De Bessa et al. 2017). L'article se concentre sur la cosédimentation, le FRET, ainsi que la

turbidimétrie, et explique notamment comment interpréter correctement les résultats issus de ces méthodes.

D'autre part, l'équipe a produit deux articles de revue sur la protéine tau en 2019. La première se focalise sur les aspects structuraux de la protéine, ainsi que sur les applications de ces découvertes sur le plan médical et thérapeutique (Fichou et al. 2019). Les auteurs présentent les caractéristiques des différentes formes agrégées de la protéine tau, les causes provoquant cette agrégation (notamment la phosphorylation et le zinc), et font le bilan des techniques de diagnostic concernant les pathologies liées à tau (incluant les anticorps mais aussi l'imagerie). La seconde revue parue quelques mois plus tard (Pascale Barbier et al. 2019) discute des aspects structuraux et fonctionnels de l'interaction protéine tau - tubuline. Après avoir introduit les deux protéines, l'article présente les zones impliquées dans l'interaction, ainsi que les conséquences des modifications post-traductionnelles (incluant les phosphorylations et les acétylations) et des mutations sur cette dernière. La revue souligne finalement l'importance des co-facteurs dans l'interaction protéine tau - tubuline, et l'intérêt de futures études sur le sujet.

Ces trois dernières années, une partie des études moléculaires de l'équipe se sont focalisés sur les effets du zinc sur la protéine tau, car il a été décrit comme un facteur pouvant favoriser son agrégation pathologique dans la cellule (Yunpeng Huang et al. 2014).

Le zinc

Fonctions et homéostasie du zinc

Fonctions du zinc chez l'homme

Le zinc est un oligo-élément essentiel à la vie, et est le deuxième cation le plus abondant dans les organismes vivants. Dans le corps humain, il est présent en majorité dans les muscles squelettiques (57%) et dans les os (29%), ainsi qu'en plus petites quantités dans plusieurs autres organes (6% dans la peau, 5% dans le foie, 1.5% dans le cerveau, 0.7% dans les reins et 0.4% dans le cœur) (Figure 22) (Marger, Schubert, and Bertrand 2014).

Malgré sa faible présence dans le cerveau, le zinc y joue un rôle essentiel. Des niveaux trop élevés de zinc dans le sang ont été associés à la léthargie et à des pertes de fonctions neuronales (Marger, Schubert, and Bertrand 2014). A l'inverse, de trop faibles concentrations sont corrélées à des formes de dépression (Swardfager et al. 2013). Ceci peut s'expliquer par le fait que le zinc ait été décrit comme un régulateur de nombreux canaux ioniques dans les neurones, impliqués dans l'activité synaptique. Parmi eux, on retrouve les récepteurs NMDA (Paoletti, Ascher, and Neyton 1997), les récepteurs GABA de type A (Hosie et al. 2003), ou encore les récepteurs à glycine (Trombley, Blakemore, and Hill 2011). De façon intéressante, le zinc peut moduler différemment l'activité des sous-unités des récepteurs, avec des gammes de concentrations allant du nanomolaire au millimolaire (Marger, Schubert, and Bertrand 2014), ce qui implique une fine régulation de sa concentration dans les différents compartiments neuronaux.

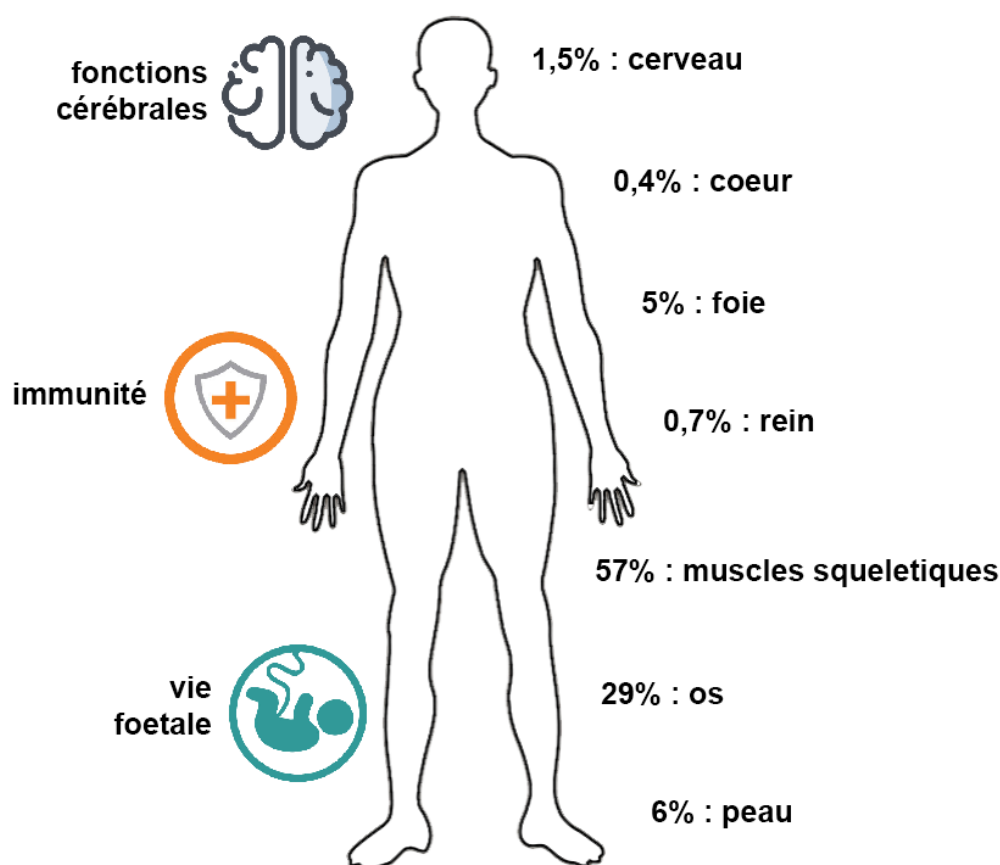


Figure 22 : Récapitulatif des localisations et fonctions du zinc chez l'homme. Bien qu'il soit peu présent dans le cerveau par rapport à sa quantité totale dans le corps, le zinc y joue un rôle essentiel.

Le zinc joue un rôle important dans le système immunitaire également (Skrajnowska and Bobrowska-Korczak 2019). Son principal rôle est de réguler la balance entre lymphocytes Th1 et Th2 (Baltaci and Mogulkoc 2012). Ces deux types de lymphocytes ciblent respectivement des pathogènes intracellulaires et extracellulaires, et doivent être présents en certaines proportions pour assurer une réponse immunitaire efficace. Une déficience en zinc perturbe cette balance, et lorsqu'un apport de zinc est fourni, elle est rétablie, ce qui montre la nécessité de maintenir des concentrations de zinc au-dessus d'un certain seuil. De plus, une carence en zinc provoque une augmentation de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Wessels et al. 2013), mais aussi une inhibition de la phagocytose ou encore de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Hasan, Rink, and Haase 2016).

Aussi, le zinc a été décrit comme un acteur de la vie fœtale (Terrin et al. 2015). En effet, des déficits de zinc chez la mère augmentent les risques de mortalité du fœtus (Hambidge, Hackshaw, and Wald 1993). Ceci peut être expliqué par le fait que le zinc régule l'expression de gènes liés à l'embryogenèse (Falchuk 1998), et donc participe au développement des organes (Record 1987). Lors de la grossesse, le fœtus reçoit le zinc de la mère, et il a été montré qu'un apport en zinc lors de la grossesse réduit les maladies infectieuses du bébé lors des 6 premiers mois (Goldenberg et al. 1995), très probablement en agissant sur le système immunitaire comme expliqué précédemment. Enfin, comme le zinc joue un rôle important dans le cerveau adulte, il est aussi important dans le développement du cerveau du fœtus (Adamo and Oteiza 2010).

Toutes les fonctions du zinc impliquent une fine régulation de son homéostasie dans la cellule, et particulièrement dans les neurones.

Maintien de l'homéostasie cellulaire du zinc dans les neurones

Le maintien des concentrations physiologiques du zinc dans les neurones est assuré par plusieurs familles de protéines. Bien qu'une grande partie du zinc soit lié aux métalloenzymes afin de permettre leur fonction, la régulation de l'homéostasie cellulaire du zinc est surtout assurée par des transporteurs, du cytosol vers l'intérieur des organelles mais aussi du cytosol vers le milieu extracellulaire (Figure 23).

La famille des protéines ZnTs est composée de plus de 100 membres, ayant des localisations et des rôles spécifiques. Le transporteur le mieux décrit de la famille est la protéine ZnT3, qui permet l'entrée du zinc dans les vésicules pré-synaptiques (Palmiter et al. 1996; McAllister and Dyck 2017). Le zinc est ensuite libéré dans la synapse, et régule son activité en agissant sur les différents canaux ioniques comme expliqué précédemment. Chez la souris, un knock-out du gène de la protéine ZnT3 entraîne un dysfonctionnement des synapses, ce qui s'explique par le fait que le zinc ne sorte pas des neurones et ne puisse pas inhiber le récepteur GABA de type A (Lopantsev et al. 2003). L'efflux du zinc à l'extérieur du neurone est assuré par la protéine ZnT1, ce qui lui permet de réduire la toxicité cellulaire (Nolte et al. 2004; Qin et al. 2009). Plusieurs autres transporteurs de la famille, moins décrits, se situent au niveau du Golgi et du lysosome (ZnT2, ZnT4, ZnT5, ZnT6 et ZnT7) (Sensi et al. 2009).

D'autres transporteurs du zinc s'ajoutent à la famille des ZnTs, afin de maintenir l'homéostasie dans les différents compartiments (Sensi et al. 2009). Les transporteurs ZIP contrôlent l'influx du zinc dans les neurones et dans les organelles. Ces transporteurs ont la particularité d'être régulés par le zinc, étant donné qu'ils sont rapidement dégradés lorsque la concentration du zinc dans les neurones augmente (Fudi Wang et al. 2004). Les métallothionéines, elles, lient le zinc dans le cytosol et le libèrent dans certaines conditions de stress cellulaire (Aizenman et al. 2000). Enfin, un canal ionique sodium-zinc pourrait jouer un rôle important dans l'efflux de zinc et dans le maintien du gradient de zinc au travers de la membrane des neurones (Ohana et al. 2004).

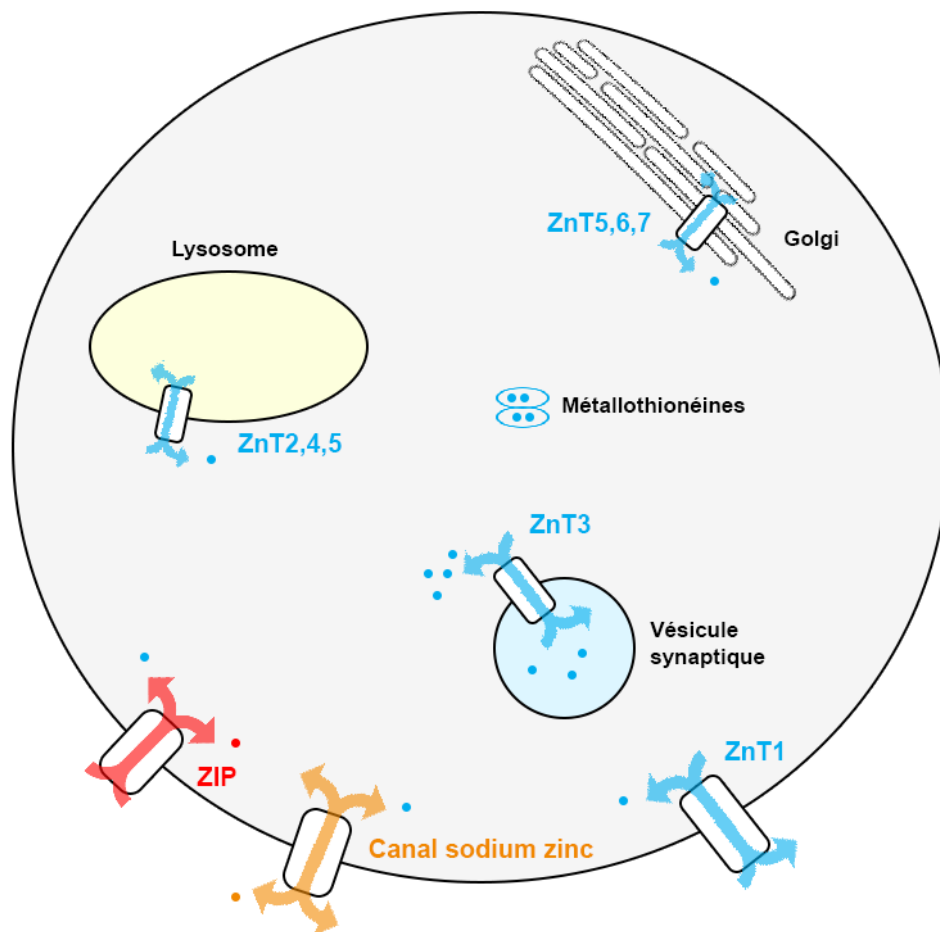


Figure 23 : Récapitulatif des localisations du zinc dans la cellule (adaptée de Sensi et al. 2009). Les canaux ioniques, les transporteurs du zinc (ZnT et ZIP) ainsi que les métallothionéines assurent l'homéostasie du zinc dans la cellule.

Lorsque cette homéostasie du zinc est perturbée, elle est souvent associée à des pathologies neurodégénératives.

Implications pathologiques du zinc chez l'homme

Parmi les pathologies liées à la dyshoméostasie du zinc, on retrouve des formes de dépression. En effet, un déficit de zinc a été constaté dans le sérum de plusieurs patients dépressifs, en comparaison à des patients sains (Maes et al. 1994). L'étude suggère que la dépression pourrait être liée à la non-activation des lymphocytes par le zinc, comme expliqué précédemment. Ainsi, des thérapies visées à soigner la dépression consistent à apporter du zinc en supplément (Nowak et al. 2003), afin d'augmenter sa concentration à son seuil physiologique. De façon similaire, des études ont suggéré que plusieurs antidépresseurs pourraient avoir des effets sur le récepteur NMDA, qui est une des cibles du zinc dans la synapse (Duman, Heninger, and Nestler 1997; Skolnick et al. 2001). Depuis, ces propriétés sont étudiées pour le développement de nouveaux antidépresseurs antagonistes de ce récepteur (Ates-Alagoz and Adejare 2013; Pochwat, Nowak, and Szewczyk 2019).

Dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA), le zinc a aussi son importance. Premièrement, il a été montré récemment que le zinc induit la formation d'agrégats de la protéine TDP-43 *in vitro* (Caragounis et al. 2010; Garnier et al. 2017), qui sont des marqueurs de la SLA (Arai et al. 2006). Deuxièmement, la superoxyde dismutase cuivre/zinc (SOD1), qui est une métalloenzyme liant le zinc, est associée à des formes familiales de la SLA lorsqu'elle est mutée (Rosen et al. 1993). Ainsi, SOD1 devient toxique pour les neurones lorsqu'elle a une affinité réduite pour le zinc. Une des explications de cette toxicité est que la mutation augmente l'affinité de SOD1 pour le cuivre, ce qui confère une activité peroxydase à l'enzyme, provoquant la mort du neurone (Mocchegiani et al. 2005). Enfin, de façon semblable aux études menées sur la dépression, un apport modéré en zinc réduit la progression de la SLA chez la souris possédant SOD1 mutée (Ermilova et al. 2005). Cependant, lorsque l'apport en zinc devient trop important, les souris meurent plus rapidement, ce qui souligne l'importance et la finesse de la régulation de l'homéostasie cellulaire du zinc dans les neurones.

La dyshoméostasie du zinc peut aussi contribuer à l'apparition de crises d'épilepsie. En effet, une déficience en zinc chez la souris a été associée à ces crises, tandis qu'un apport en zinc réduit leur fréquence (Fukahori and Itoh 1990). Plus précisément, c'est le zinc synaptique qui serait impliqué. Un knock-out du gène codant le transporteur ZnT3, impliqué dans la formation des vésicules synaptiques, a montré que l'absence de ce

transporteur augmentait fortement les risques de crises d'épilepsie (Cole et al. 2000), favorisant probablement l'accumulation du zinc dans le milieu intracellulaire (Figure 24, panel du haut). De plus, dans les pathologies entraînant ces crises, les cibles du zinc dans la synapse seraient modulées, ce qui provoquerait une réponse synaptique moins efficace. Chez les animaux épileptiques, il a été montré que les sous-unités des récepteurs GABA de type A sont présentes en proportions anormales (Goodkin et al. 2008). Étant donné que les sous-unités gamma ont une plus grande affinité pour le zinc que les sous-unités alpha (Fisher and Macdonald 1998), une modification de la composition en sous-unités de ces récepteurs entraîne un différent effet du zinc.

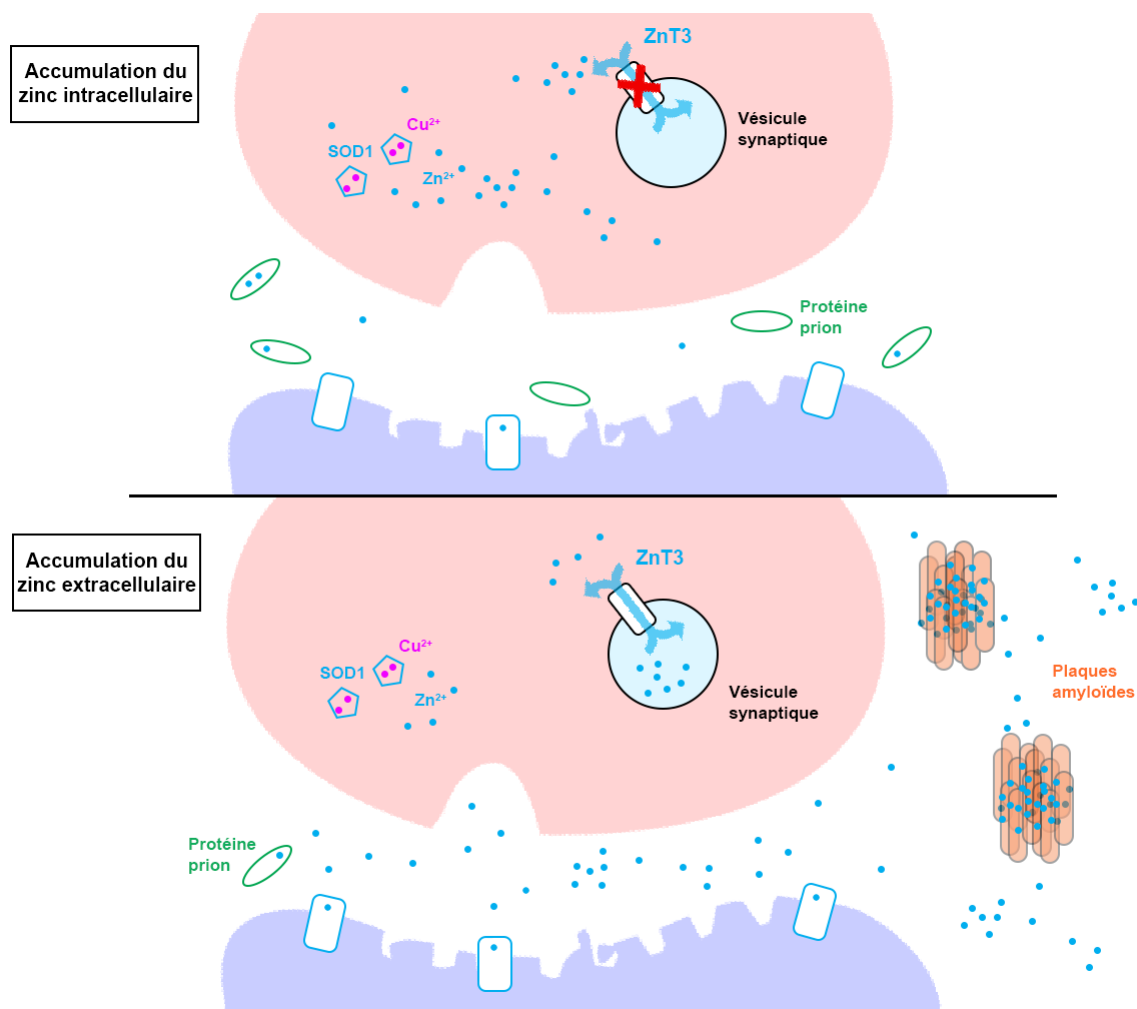


Figure 24 : Accumulation pathologique du zinc dans les milieux intracellulaire (haut) et extracellulaire (bas). En haut, le zinc s'accumule dans le milieu intracellulaire à cause de la mutation du transporteur ZnT3 qui empêchent son internalisation dans les vésicules synaptiques. En bas, la protéine prion est sous exprimée dans la fente synaptique, ce qui empêche le recyclage du zinc et favorise son accumulation dans le milieu extracellulaire.

Enfin, le zinc a été décrit comme un facteur important influençant l'apparition de la maladie d'Alzheimer. L'un des marqueurs de cette maladie est l'apparition de plaques amyloïdes dans le milieu extracellulaire, composées d'agrégats de la protéine amyloïde bêta (Figure 24, panel du bas). Il a été montré que ces plaques contiennent de grandes quantités de zinc chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lovell et al. 1998; L.-H. Zhang et al. 2008). De façon intéressante, un knock-out du gène du transporteur ZnT3 provoque une diminution de l'apparition des plaques amyloïdes (J.-Y. Lee et al. 2002), ce qui montre que le transport du zinc à travers la synapse contribue à la formation de ces plaques, et que le zinc pourrait s'accumuler à l'extérieur des neurones. De plus, des études *in vitro* ont montré que le zinc provoque l'agrégation de l'amyloïde bêta (Bush et al. 1994; Esler et al. 1996; Dong et al. 2003). La présence de grandes quantités de zinc au niveau de la synapse peut aussi s'expliquer par la présence de la protéine prion. Cette protéine peut recycler le zinc en le transportant de la fente synaptique vers l'intérieur du neurone (Watt, Whitehouse, and Hooper 2010; Watt, Griffiths, and Hooper 2013). Dans certains cas de la maladie d'Alzheimer, la protéine prion est sous exprimée, ce qui pourrait expliquer l'accumulation du zinc dans la fente synaptique et la formation de plaques amyloïdes (Whitehouse et al. 2010).

Comme pour la protéine amyloïde bêta, il a été montré que le zinc favorise l'agrégation pathologique de la protéine tau (Yunpeng Huang et al. 2014).

Le zinc et la protéine tau

Agrégation de tau en présence de zinc

Le zinc joue un rôle important dans l'agrégation de la protéine tau dans la cellule. Une étude a soulevé que l'ajout de zinc provoque l'augmentation de la mortalité cellulaire via l'agrégation de tau (Yunpeng Huang et al. 2014). Il peut agir de deux façons : en augmentant la phosphorylation de tau, ou bien en interagissant avec la protéine. Des études effectuées dans des modèles neuronaux ont confirmé cet effet pro-agrégation (J.-Y. Hu et al. 2017; Xuexia Li, Du, and Ni 2019), qui conduit à la neurodégénérescence.

En dehors du contexte cellulaire, le zinc est aussi capable d'influencer l'agrégation de la protéine tau. De faibles concentrations de zinc sont suffisantes pour accélérer l'agrégation des séquences répétées de tau, et provoquent l'apparition de structures filamenteuses (Mo et al. 2009). De façon similaire, une étude a obtenu les mêmes conclusions sur une construction de tau contenant les domaines répétés R1, R3 et R4 (Figure 25) (Jiji et al. 2017). Cependant, dans chacune de ces études, les auteurs utilisent l'héparine afin d'induire l'agrégation de tau. Le zinc agit alors comme un facteur favorisant l'agrégation, et non comme un inducteur. L'héparine est fréquemment utilisée pour générer des PHF *in vitro*, mais il a été montré récemment que les structures produites de cette façon-là ne sont pas semblables aux PHF observés chez les patients atteints d'Alzheimer (W. Zhang et al. 2019). A la vue de ces résultats, il apparaît essentiel d'étudier les effets du zinc sur la protéine tau purifiée en l'absence d'inducteur artificiel d'agrégation.

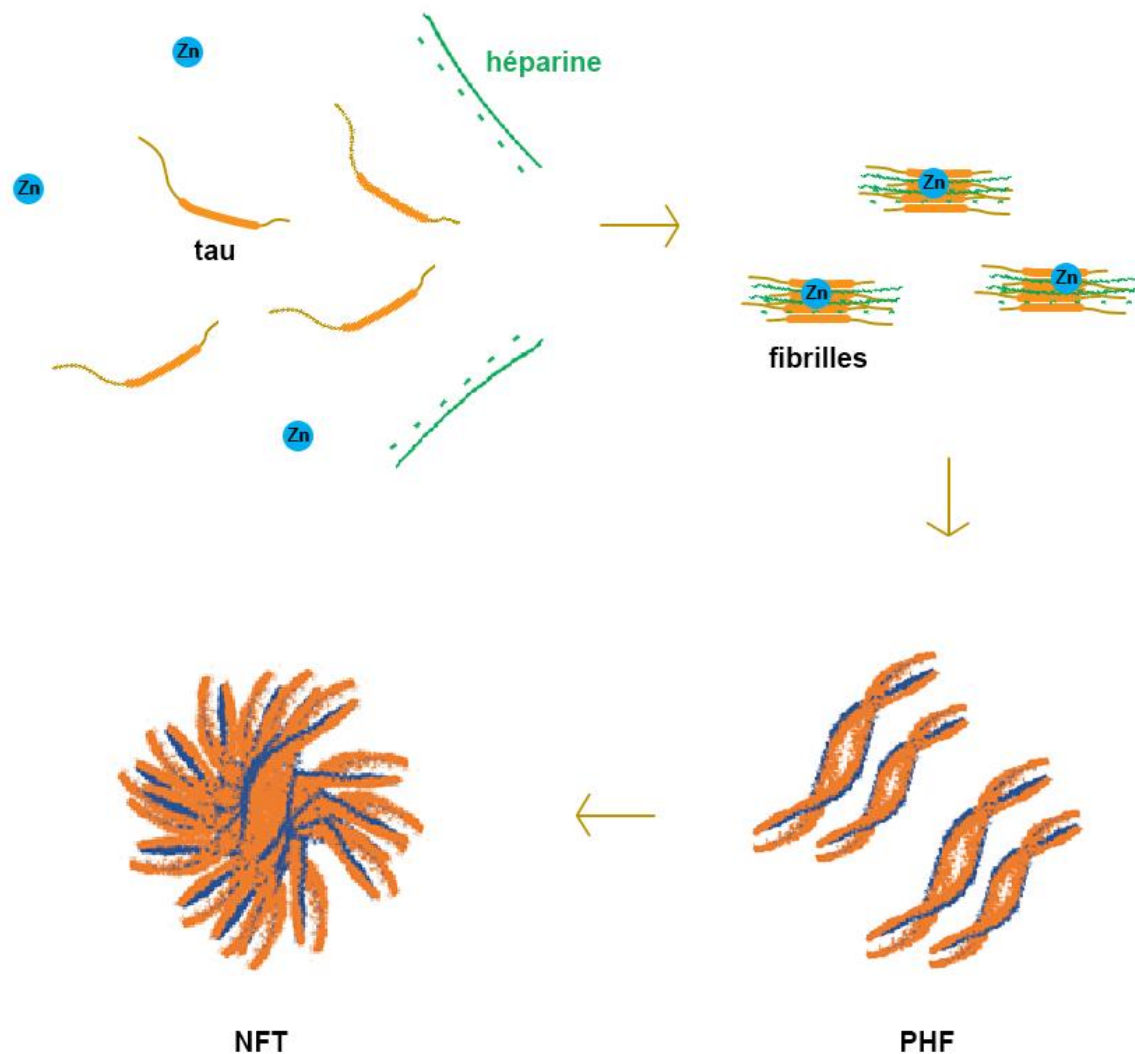


Figure 25 : Agrégation de tau en présence de zinc et d'héparine. L'héparine induit l'agrégation de la protéine tau en linéarisant sa séquence. Dans ces conditions, le zinc accélère le processus qui mène à l'apparition des PHF et des NFT.

Interaction protéine tau - zinc

En ce qui concerne l'interaction tau-zinc, les études précédemment citées ont apporté quelques éléments visant à localiser les points d'ancrages du zinc sur tau. En 2009, il a été montré que le zinc interagissait avec un peptide de tau (244-372), et que les cystéines 291 et 322 jouent un rôle important dans l'interaction (Figure 26) (Mo et al. 2009). Deux autres études, plus récentes, ont aussi mis en évidence l'implication de ces

cystéines dans l'interaction avec le zinc en utilisant la séquence répétée R3 (Xuexia Li, Du, and Ni 2019) et un peptide contenant les séquences R1, R3 et R4 (Jiji et al. 2017). De plus, les histidines des séquences répétées semblent aussi impliquées dans l'interaction, étant donné que leur substitution par des alanines diminue l'affinité entre le zinc et tau (Mo et al. 2009). Cependant, les travaux précédemment cités se sont focalisés sur l'interaction entre le zinc et des fragments de tau, ce qui limite grandement notre compréhension de ce mécanisme sur la protéine entière.

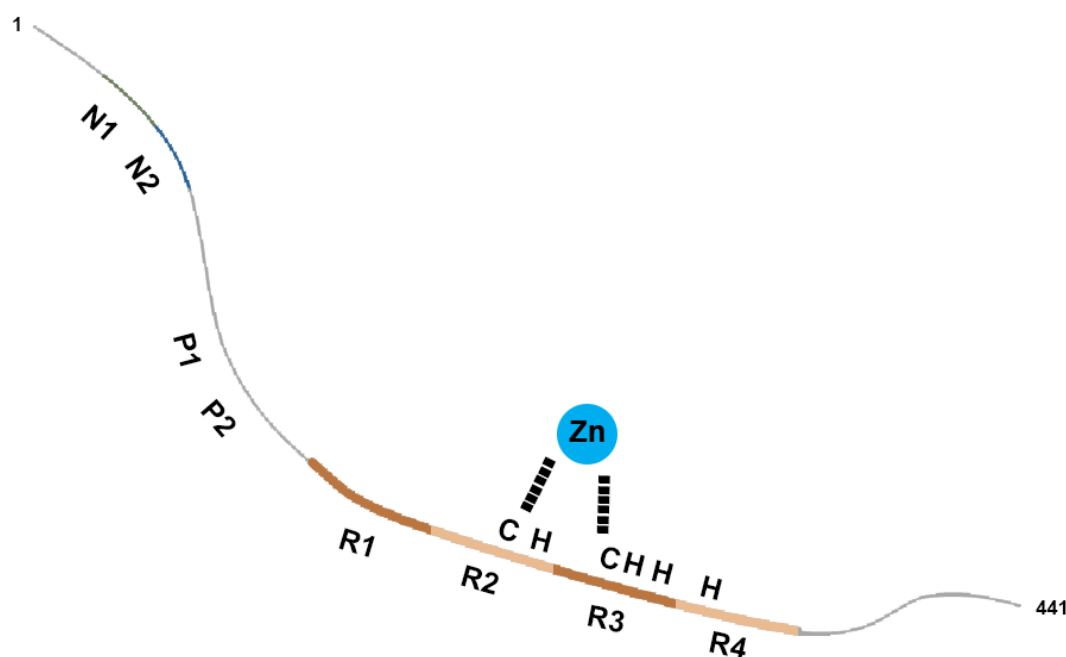


Figure 26 : Acides aminés liant le zinc sur tau. Les deux cystéines des séquences répétées ont été décrit comme des ligands du zinc (C291 et C322), tandis que les histidines des séquences répétées (H268, H299, H329, H330 et H362) jouent probablement un rôle dans l'interaction.

Nous avons donc décidé de conduire nos recherches dans le but de répondre aux nombreuses questions encore en suspens concernant l'interaction protéine tau - zinc. Pour cela, nous utilisons un panel de techniques biophysiques de référence concernant l'étude d'interactions moléculaires et d'agrégation.

Méthodes biophysiques de référence

Les études moléculaires nécessitent l'usage de techniques biophysiques spécifiques. Chacune d'elle enregistre un signal (chaleur, résonance, absorbance etc) qui rend compte d'un phénomène se produisant à l'échelle micro ou nanoscopique. Afin de comprendre les effets du zinc sur la protéine tau, nous avons utilisé des méthodes qui se focalisent sur deux aspects : d'une part l'interaction entre la protéine tau et le zinc, d'autre part l'agrégation résultant de cette interaction. Concernant les interactions, la calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC), qui est une technique que nous utilisons couramment au laboratoire, permet d'étudier les interactions en observant le changement de température de dénaturation induit par l'interaction entre deux molécules. Cependant, la protéine tau ne peut pas être étudiée par DSC car elle est thermostable et ne se dénature pas. Nous avons donc opté pour une approche par ITC et RMN, qui sont des techniques plus adaptées à l'étude d'interactions de la protéine tau. Pour les expériences d'agrégation, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation de la turbidimétrie et de la DLS afin de détecter les agrégats de tau induits par le zinc. Enfin, nous avons développé une nouvelle approche basée sur le nanoDSF Prometheus NT.Plex, un appareil qui permet d'étudier les interactions et l'agrégation au cours d'une seule et même expérience.

Etude des interactions

Microcalorimétrie à titration isotherme (ITC)

L'ITC est une technique mesurant la chaleur dégagée suite à une interaction. La partie centrale de l'appareil est composée de deux cellules : une dite de référence contenant de l'eau, et une seconde d'échantillon contenant la protéine. Ces deux compartiments sont entourés par un système de thermostat et des détecteurs de chaleur, afin de mesurer et de réguler les variations de température qui se produisent dans la cellule d'échantillon (Figure 27). D'autre part, l'appareil possède une seringue qui contient

le ligand à injecter dans la cellule d'échantillon. Dès lors, chaque injection du ligand dans le compartiment de la protéine peut provoquer un changement de chaleur si les deux molécules interagissent. Une fois que la protéine est saturée par le ligand, les injections ne provoquent qu'une variation quasi nulle de température puisqu'il n'y a plus d'interaction entre la protéine et le ligand. On observe alors ici uniquement le signal de dilution, c'est à dire la chaleur dégagée lors de la dilution du ligand dans la cellule d'échantillon.

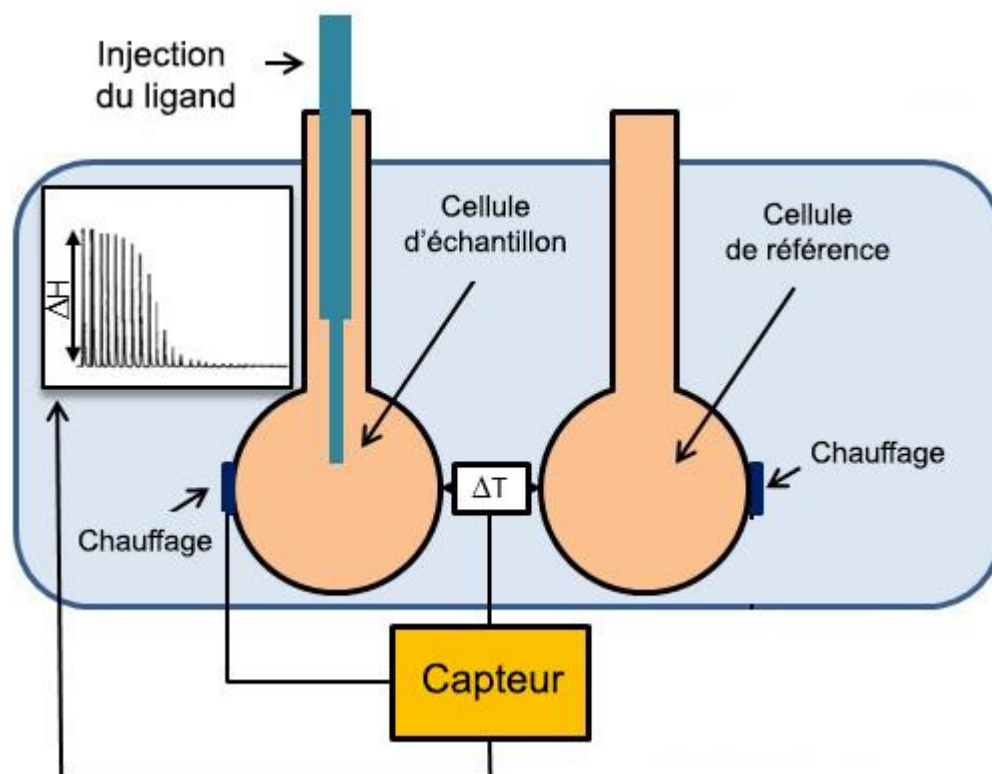


Figure 27 : Principe du microcalorimètre (adaptée du site web Purdue University).

L'appareil mesure la chaleur nécessaire à apporter pour maintenir la température à une valeur de consigne dans la cellule d'échantillon.

Cette technique permet d'obtenir tous les paramètres thermodynamiques d'une interaction, en plus de la stoechiométrie, grâce aux deux relations suivantes :

$$(1)\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$(2)\Delta G = -RT\ln(K)$$

ΔG Enthalpie libre de réaction [cal/mol]

ΔH Enthalpie de réaction [cal/mol]

T Température [K]

ΔS Entropie de réaction [cal/mol/K]

R Constante des gaz parfaits [cal/K/mol]

K Constante d'association/dissociation

A partir des valeurs d'enthalpie et d'entropie, il est possible d'obtenir des informations sur la nature des liaisons qui régissent l'interaction. Lorsque l'enthalpie contribue à la spontanéité de la réaction, c'est à dire en rendant négative l'enthalpie libre, elle rend compte d'un dégagement de chaleur ayant eu lieu durant l'interaction (par exemple, lors de la formation de liaisons faibles). Lorsque c'est l'entropie qui rend la réaction possible, cela signifie qu'il y a une augmentation du désordre moléculaire suite à la fixation du ligand sur la protéine, ce qui peut indiquer un réarrangement structural au sein de la protéine. Au laboratoire, nous étudions fréquemment l'interaction des MAP (parmi lesquelles on retrouve tau) avec la tubuline par ITC, et nous avons récemment publié un article de méthodologie pour ce type d'expérience auquel j'ai participé (Philipp O. Tsvetkov et al. 2019) (Annexe 1).

La microcalorimétrie possède cependant des limites, qui empêchent parfois d'obtenir les informations listées précédemment. Premièrement, l'enthalpie d'une réaction dépend de la température utilisée au cours de l'expérience. Ainsi, il arrive parfois qu'à une température donnée, aucun changement de chaleur dans la cellule ne soit observé. Dans certains cas, le changement de température est trop faible, et ne permet pas d'obtenir des paramètres thermodynamiques fiables. Deuxièmement, l'ITC consomme une quantité importante de protéine, autant en terme de volume (200 µL nécessaires dans la cellule sur notre modèle de microcalorimètre) que de concentration (de l'ordre de plusieurs micromolaires). Enfin, les interactions ayant une trop faible ou trop forte affinité ne seront

pas adaptées à une approche par microcalorimétrie (l'ITC peut estimer des affinités allant du millimolaire au nanomolaire).

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

En biologie, la RMN est une technique utilisée principalement pour l'étude des protéines. Elle est basée sur le fait que certains noyaux d'atomes se comportent comme des aimants sous l'effet d'un champ magnétique. En soumettant l'échantillon à un champ magnétique B_0 , ces noyaux vont réagir et s'aligner à ce champ. Un second champ magnétique B_1 est appliqué de façon perpendiculaire afin de perturber les noyaux précédemment alignés. Lorsque ce champ magnétique B_1 est arrêté, les noyaux s'alignent à nouveau avec le champ B_0 : c'est le phénomène de relaxation (Figure 28). Les expériences de RMN consistent à mesurer ces temps de relaxation afin de calculer des fréquences de résonances.

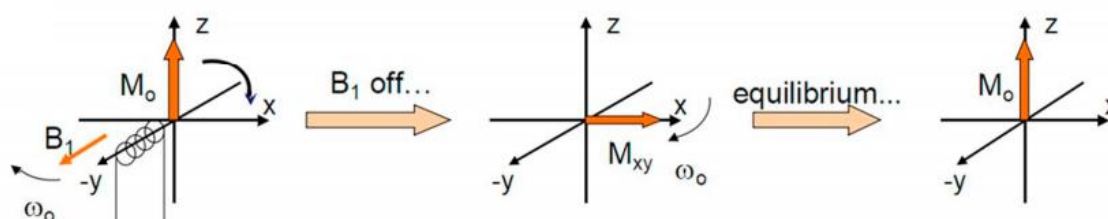


Figure 28 : Principe de relaxation en RMN (Fei Wang et al. 2020).

Les fréquences de résonance de chaque noyau dépendent fortement de la nature de l'atome ainsi que de son environnement : elles peuvent donc donner des informations structurales sur la protéine. Les expériences HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) constituent un moyen d'obtenir ces informations, en mesurant la corrélation entre deux types d'atomes. Dans le cadre des protéines, les expériences ^{15}N -HSQC sont particulièrement pertinentes car elles mesurent la corrélation entre les hydrogènes et les azotes liés de façon covalente (Figure 29), c'est-à-dire très majoritairement ceux impliqués dans les liaisons peptidiques. Les spectres obtenus contiennent donc des pics qui correspondent chacun à un acide aminé de la protéine. A condition d'avoir associé chaque pic à chaque acide aminé, ces spectres rendent compte de l'effet du ligand sur chaque acide aminé individuellement, ce qui permet de savoir où agit le ligand précisément sur la

protéine. Cette étape cruciale d'identification des pics est facilitée par l'accès à la Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB) qui répertorie les attributions précédemment publiées et que nous pouvons utiliser pour nos recherches.

^1H - ^{15}N HSQC

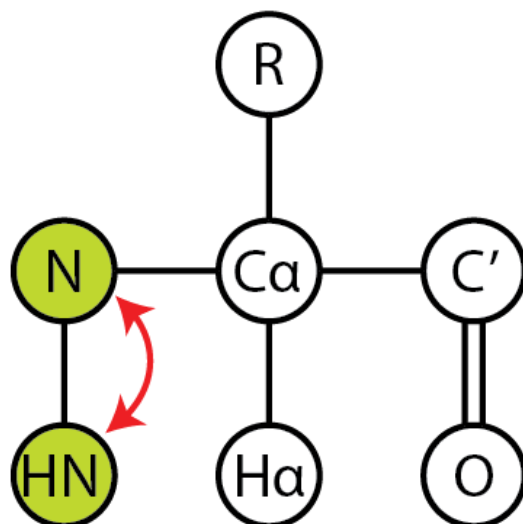


Figure 29 : Corrélation mesurée lors d'une expérience ^{15}N HSQC

(https://en.wikipedia.org/wiki/Heteronuclear_single_quantum_coherence_spectroscopy).

Dans ce type d'expérience, la résonance entre les hydrogènes et les azotes 15 est mesurée au travers des liaisons covalentes.

Néanmoins, il arrive fréquemment que les spectres HSQC ne permettent pas d'observer l'intégralité des acides aminés de la protéine, ce qui rend difficile l'identification des acides aminés interagissant avec le ligand. Par exemple, les protéines intrinsèquement désordonnées, comme la protéine tau, présentent généralement des résonances sur une gamme très réduite de fréquences, ce qui se manifeste par la présence de pics correspondant à plusieurs acides aminés. La puissance du spectromètre RMN utilisé rentre également en compte, et limite parfois l'identification de pics individuels. Aussi, les expériences HSQC en RMN sur des protéines de taille conséquente comme la protéine tau nécessitent un marquage à l'azote 15 pour obtenir un signal suffisant, ce qui implique d'avoir une stratégie de production de protéine différente. Ce point est d'autant plus limitant que la RMN demande une grande quantité de protéine (500 μL concentré à

plusieurs dizaines de micromolaires) et que les productions de protéines en milieu marqué à l'azote 15 peuvent diminuer grandement le rendement.

Etude de l'agrégation

Turbidimétrie

La turbidimétrie est une mesure d'absorbance à 350 nm, classiquement réalisée avec un spectrophotomètre, qui permet de suivre l'évolution de la turbidité, c'est à dire le caractère trouble d'une solution. Parmi les phénomènes pouvant provoquer une augmentation de la turbidité, on retrouve la formation d'agrégats protéiques.

La turbidimétrie a l'avantage de pouvoir être facilement mise en place. D'une part car les spectrophotomètres sont des machines facilement accessibles, et d'autre part car elle demande très peu de préparation au niveau de l'échantillon (pas de marquage ou d'immobilisation). Etant donné que de nombreux spectrophotomètres peuvent être équipés d'un module Peltier, la turbidimétrie permet dans ce cas-là d'étudier l'effet de la température sur l'agrégation des protéines.

Cependant, cette technique possède de nombreuses limites. La première est que certains agrégats ne provoquent pas d'augmentation de la turbidité en solution : ils ne sont donc pas détectables. Aussi, la turbidimétrie est très coûteuse en protéine et nécessite des quantités semblables à celles utilisées en RMN, c'est à dire 500 μ L concentrés à plusieurs dizaines de micromolaires. Enfin, même s'il existe plusieurs types de cuves, il est la plupart du temps impossible de faire de nombreuses mesures en parallèle car les porte-cuves se limitent en général à des faibles nombres de cuves (jusqu'à 6-8 cuves en simultané).

Dynamic Light Scattering (DLS)

La DLS est une technique basée sur la détection de la lumière diffusée par les particules en solution au cours du temps. Les particules en solution suivent un mouvement

Brownien, c'est à dire qu'elles se déplacent aléatoirement. Elles ont chacune une vitesse propre, qui dépend de leur taille : les petites molécules se déplacent plus rapidement que les grosses. La DLS mesure ces vitesses (coefficients de diffusion) et se base sur l'équation de Stoke-Einstein afin d'en déduire le rayon hydrodynamique des particules en solution :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

D Coefficient de diffusion des particules

k_B Constante de Boltzmann [m²kg/Ks²]

T Température [K]

η Viscosité [Pa.s]

R_H Rayon hydrodynamique [m]

Comme pour la turbidimétrie, elle permet de suivre l'agrégation des protéines, mais a l'avantage de donner la taille des particules analysées. La DLS permet aussi de connaître la contribution de chaque population de particules dans la diffusion totale de la solution, et d'obtenir un indicateur rendant compte de la polydispersité de l'échantillon. De plus, il est possible de réaliser les expériences à plusieurs températures, et la cuve d'analyse demande une quantité assez réduite d'échantillon (50 µL concentrés à plusieurs dizaines de micromolaires).

Les limites de la DLS se situent au niveau de la gamme des tailles des particules détectables. La technique permet de mesurer le rayon hydrodynamique de particules compris entre 0,3 nm et 10 µm. Au-delà et en dessous de ces valeurs, la DLS ne sera pas capable de déterminer la taille des particules en solution.

En résumé, toutes ces techniques sont complémentaires et apportent des avantages et informations différentes lors de leurs utilisations combinées :

	ITC	RMN	Turbidimétrie	DLS
Coût en échantillon (µL)	200	500	100	50
Etude d'interactions (signal mesuré)	Chaleur d'interaction	Changement de résonance des noyaux	*	*
Etude d'agrégation (signal mesuré)	-	-	Turbidité	Diffusion des particules

*Table 2 : Comparaison de plusieurs méthodes biophysiques permettant d'étudier les interactions et l'agrégation des protéines. * : seulement si l'interaction inhibe ou active l'agrégation.*

Cependant, dans le cas d'une étude nécessitant à la fois des tests d'interactions et d'agrégation, aucune de ces techniques ne permet à elle seule d'obtenir des résultats complets. L'utilisation de plusieurs techniques devient alors obligatoire, mais demande beaucoup d'échantillon. Nous nous sommes donc penchés sur le développement d'une nouvelle méthode pouvant fournir des informations moléculaires concernant les interactions et l'agrégation des protéines, et demandant une faible quantité d'échantillon.

nanoDSF Prometheus NT.Plex : un outil pour étudier les interactions et l'agrégation des protéines

Le nanoDSF Prometheus NT.Plex est un appareil développé par NanoTemper et commercialisé en 2016. A l'instar de la calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry, DSC), le nanoDSF Prometheus NT.Plex a été conçu pour étudier la thermostabilité des protéines, bien que les deux méthodes se différencient sur quelques points. Le premier est la nature du signal enregistré : alors que la DSC mesure l'échange de chaleur produit lors de la dénaturation, la fluorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Fluorimetry, DSF) consiste en la mesure de la fluorescence émise par les protéines. Le second point est le nombre d'échantillons en simultané : les appareils DSC ne peuvent réaliser des mesures que sur un seul échantillon à la fois, tandis que le nanoDSF Prometheus NT.Plex peut lire 24 échantillons en simultané. Aussi, les deux appareils proposent des vitesses de chauffage des échantillons différentes (jusqu'à 7°C/min pour la DSF contre 4°C/min pour la DSC). Enfin, le nanoDSF Prometheus NT.Plex demande 10 µL d'échantillon, tandis que les appareils DSC en nécessitent 200 µL à concentration égale.

Pour ces raisons, le nanoDSF Prometheus NT.Plex apparaît comme une solution économique et efficace pour l'étude des interactions protéiques, grâce au signal d'émission de fluorescence des tryptophanes. A l'instar de la DSC, le nanoDSF Prometheus NT.Plex permet de mettre en évidence les interactions en observant l'influence du ligand sur la dénaturation de la protéine. Cet appareil permet de réaliser de larges gammes de concentrations de ligand au cours d'une seule expérience (jusqu'à 24 points), là où la DSC nécessite 24 expériences indépendantes. De plus, il présente l'avantage d'enregistrer aussi le signal de turbidité des échantillons au cours du chauffage, ce qui permet de suivre leur agrégation.

Cependant, dans certains cas, le nanoDSF Prometheus NT.Plex n'est pas adapté pour détecter les interactions moléculaires. C'est le cas de l'interaction tau - zinc, puisque la protéine tau ne possède aucun tryptophane et qu'elle est thermostable. Bien que

l'interaction entre les deux molécules ne soit pas visible, l'agrégation de tau induite par le zinc est détectable grâce à la mesure de turbidité de l'appareil. Pour cette raison ainsi que pour son faible coût d'échantillon, nous avons développé son utilisation à travers l'étude d'un sujet historique du laboratoire : la polymérisation de tubuline *in vitro*.

Avant de parler de ces résultats, il est important de présenter le mode de fonctionnement du nanoDSF Prometheus NT.Plex, ainsi que ses différentes spécificités.

Principe des mesures

Mesure de fluorescence (DSF)

La DSF se base sur la fluorescence intrinsèque des protéines, c'est à dire sur la fluorescence des 3 acides aminés aromatiques : la tyrosine, la phénylalanine, et le tryptophane. C'est surtout ce dernier acide aminé qui est pertinent dans une mesure de thermostabilité, car sa fluorescence est particulièrement influencée par l'environnement. Lorsqu'une protéine est repliée, ses acides aminés hydrophobes (incluant les tryptophanes) vont avoir tendance à se regrouper afin de former un cœur hydrophobe. A l'inverse, les résidus plutôt polaires se situeront à l'extérieur de la structure, en contact avec le solvant.

Au moment de la dénaturation, les tryptophanes s'exposent au solvant et ne forment plus de cœur hydrophobe. Cette interaction a pour effet de modifier l'émission d'énergie du cycle aromatique, ce qui se traduit par un décalage de maximum d'émission de fluorescence (Figure 30) :

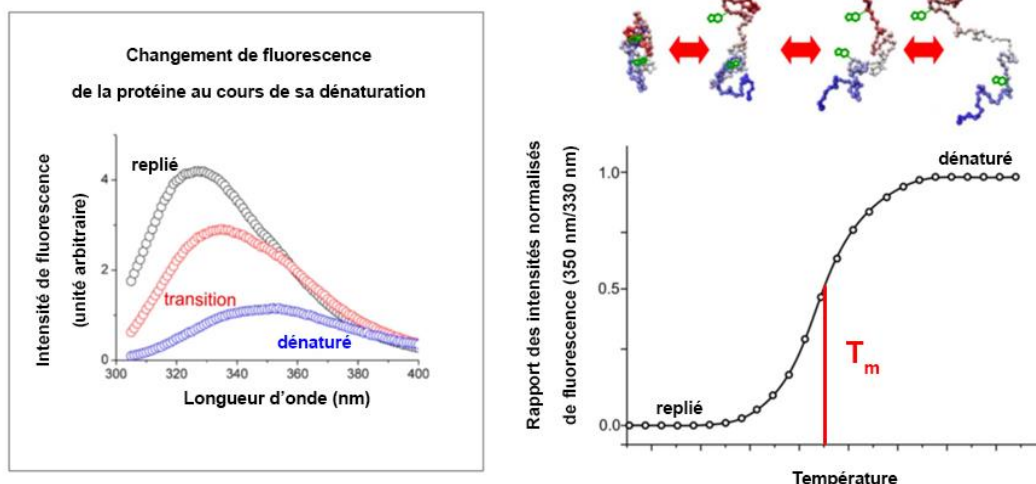


Figure 30 : Effets de la dénaturation des protéines sur l'émission de fluorescence des tryptophanes (adaptée de NanoTemper). Au cours du chauffage, la fluorescence émise des tryptophanes est modifiée du fait de leur exposition au solvant provoquée par la dénaturation de la protéine.

L'appareil émet une lumière à 290 nm afin d'exciter les tryptophanes des protéines dans les échantillons à analyser, et mesure l'émission de fluorescence à 330 nm ainsi qu'à 350 nm. Globalement, l'intensité d'émission des tryptophanes diminue à ces deux longueurs d'onde au cours de la dénaturation. Cependant, en représentant le rapport de ces intensités (350 nm/330 nm), on remarque qu'il augmente significativement pendant la dénaturation. C'est ce rapport qui est utilisé afin de suivre la dénaturation des protéines, et de déterminer la température de dénaturation de chaque échantillon (T_M).

Mesure de turbidité

En même temps que la mesure de fluorescence, le nanoDSF Prometheus NT.Plex enregistre également le signal de turbidité, c'est à dire l'absorbance à 350 nm de chaque échantillon. Pour cela, l'appareil génère une lumière à 350 nm envoyée sur chaque échantillon, qui est réfléchiée par un miroir puis captée à nouveau selon le schéma suivant (Figure 31) :

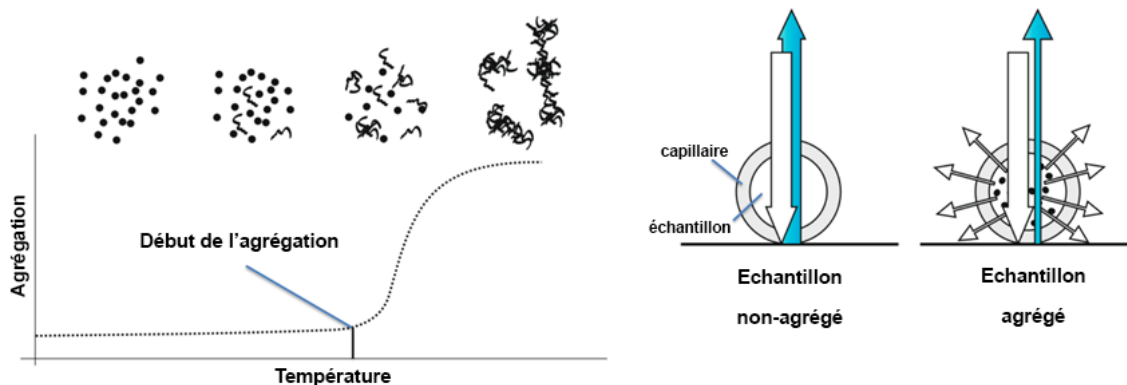


Figure 31 : Mesure de la turbidité sur le nanoDSF Prometheus NT.Plex (adaptée de NanoTemper). Après un premier passage à travers l'échantillon, un miroir permet de réfléchir la lumière afin qu'elle passe une seconde fois dans l'échantillon avant d'être mesurée par l'appareil.

De la même manière que pour une mesure de turbidité classique sur un spectrophotomètre, le signal augmente lorsque les protéines s'agrègent, ce qui permet de déterminer une température d'agrégation pour chaque échantillon.

Principe du chauffage

L'acquisition des signaux de fluorescence et de turbidité s'effectue au cours du chauffage, sur une gamme de température allant de 15°C à 95°C. Les échantillons sont contenus dans des capillaires de 10 μ L, disposés sur un peigne de 24 capillaires. Ce peigne est déposé sur une plaque chauffante et réfléchissante, qui va à la fois chauffer de façon homogène tous les capillaires au même moment, mais aussi renvoyer la lumière à 350 nm afin de récolter le signal de turbidité comme expliqué au-dessus. La mesure s'effectue en balayage comme ceci (Figure 32) :

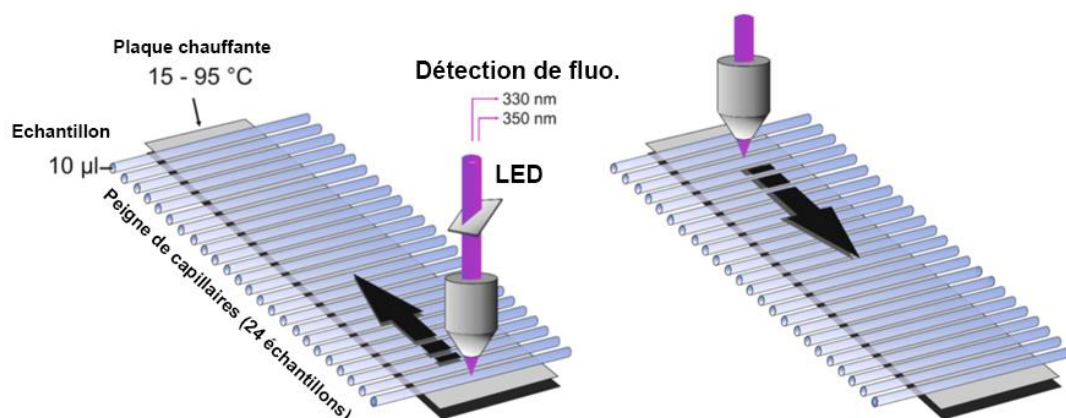


Figure 32 : Plaque chauffante et LED du nanoDSF Prometheus NT.Plex (adaptée de NanoTemper). La LED parcourt par balayage l'ensemble des capillaires du peigne contenant les échantillons, afin de les exciter à 330 nm avant de mesurer la fluorescence émise à 350 nm.

L'appareil propose deux façons de chauffer :

- Un mode “**melting**”, qui chauffe graduellement de 15°C à 95°C avec une vitesse de chauffage réglable (allant de 0,2°C/min à 7°C/min)
- Un mode “**plateau**”, que NanoTemper a ajouté à l'appareil et au logiciel à notre demande, qui permet de fixer plusieurs températures pendant un temps donné, et de passer de l'une à l'autre pendant un certain nombre de cycles.

Etant donné la multitude d'avantages offerts par le nanoDSF Prometheus NT.Plex (faible coût d'échantillon, de nombreuses mesures en simultané, une large gamme de température et deux signaux mesurés en même temps), nous avons commencé à décliner son utilisation afin de pouvoir étudier l'agrégation des protéines et leurs interactions avec d'autres molécules d'intérêt au cours d'une seule expérience. Comme premier objet d'étude, nous nous sommes focalisés sur la polymérisation de tubuline *in vitro*, qui est un sujet étudié depuis de nombreuses années, sur lequel le nanoDSF Prometheus NT.Plex apporte de nombreux avantages.

Étude de la polymérisation de tubuline avec le nanoDSF Prometheus NT.Plex

Les microtubules sont étudiés depuis de nombreuses années en raison de leur implication dans de nombreux processus cellulaires incluant la mitose, le transport axonal ou encore la motilité. Ces structures sont constituées de dimères de tubuline, qui polymérisent et dépolymérisent afin de maintenir un équilibre dans la cellule appelé "instabilité dynamique" (Figure 33) :

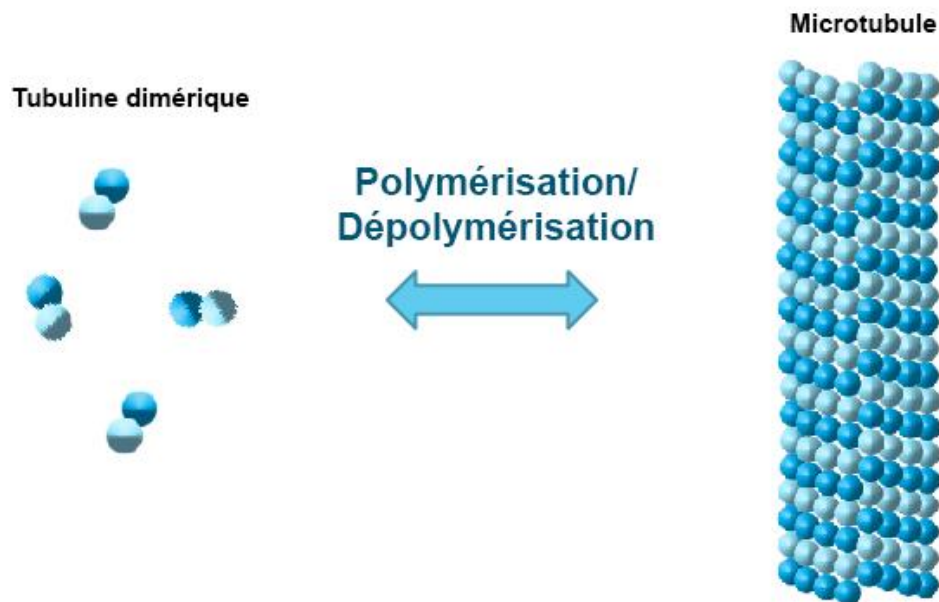


Figure 33 : Instabilité dynamique des microtubules, qui alternent entre polymérisation et dépolymérisation. La polymérisation de tubuline est régulée par de nombreuses molécules incluant des protéines in vivo, mais aussi des agents anti-cancéreux in vitro.

De nombreuses molécules peuvent perturber l'instabilité dynamique, ce qui influence l'état de polymérisation de tubuline (O'Brien et al. 1990; P. Barbier et al. 2001; Devred et al. 2004). Parmi elles, des molécules synthétiques appelées agents ciblant les microtubules (*Microtubules Targeting Agents*, MTA) sont utilisés en contexte pathologique

pour empêcher la mitose, et donc la prolifération des cellules cancéreuses. Par exemple, la vinblastine, qui appartient à la famille des *Vinca Alcaloïdes*, bloque l'hydrolyse du GTP par la tubuline, ce qui induit la dépolymérisation des microtubules (Gigant et al. 2005). Un des moyens pour tester l'efficacité de ces molécules consiste à suivre la polymérisation de tubuline *in vitro* en présence de MTA.

Dans les études réalisant ce type d'expérience, la turbidimétrie est la technique de référence pour suivre la formation des microtubules. Elle consiste en une mesure d'absorbance à 350 nm qui détecte les structures turbides en solution, incluant les microtubules (Gaskin, Cantor, and Shelanski 1974; Johnson and Borisy 1977; Correia and Williams 1983; Purich and Kristofferson 1984). Ce type d'expérience est réalisé sur un spectrophotomètre classique la plupart du temps, nécessitant l'usage de cuves UV standard avec une capacité de 500 µL. Les mesures de turbidité dans de telles conditions sont limitées par la capacité du portoir, qui permet classiquement de mesurer entre 6 et 10 échantillons en simultanée.

Au laboratoire, nous avons étudié la polymérisation de tubuline *in vitro* avec le nanoDSF Prometheus NT.Plex de NanoTemper. Dans un premier temps, nous avons reproduit les expériences classiques réalisées historiquement sur spectrophotomètre dans un des tampons les plus couramment utilisés dans la littérature : le tampon PEMGT (3.4 M glycérol, 20 mM phosphate, 0.1 mM GTP, 10 mM magnésium, 1 mM EGTA, pH 6.5). Dans un second temps, nous avons tiré parti de la large gamme de températures proposée par le nanoDSF Prometheus NT.Plex afin d'obtenir de nouvelles informations sur la polymérisation de tubuline dans ce même tampon. Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre la tubuline et les MTA dans des conditions où il n'y a pas de polymérisation ("tampon phosphate", contenant 20 mM phosphate, 0.1 mM GTP à pH 6.5), afin d'observer uniquement le phénomène de liaison entre les deux molécules. Enfin, nous avons étudié ces mêmes interactions dans le tampon PEMGT où la tubuline polymérise, et nous avons montré que nous pouvons obtenir au cours d'une même expérience à la fois des informations sur la polymérisation, mais aussi sur l'interaction entre les MTA et la tubuline. Ce travail met en évidence les avantages du nanoDSF Prometheus NT.Plex par rapport aux appareillages classiques précédemment utilisés pour l'étude de polymérisation de tubuline *in vitro*.

Polymérisation de tubuline *in vitro* : expérience classique

Tout d'abord, nous voulions nous assurer que le nanoDSF Prometheus NT.Plex nous permet de suivre la formation des microtubules dans les mêmes conditions que celles utilisées classiquement avec un spectrophotomètre. Ces conditions consistent à passer d'une température froide (15°C) à une température chaude (37°C) afin d'induire la polymérisation des microtubules, et de repasser ensuite à froid pour observer la réversibilité du phénomène. En utilisant le mode "plateau" de l'appareil, nous avons reproduit ces conditions et nous nous sommes intéressés au signal de turbidité (Figure 34) :

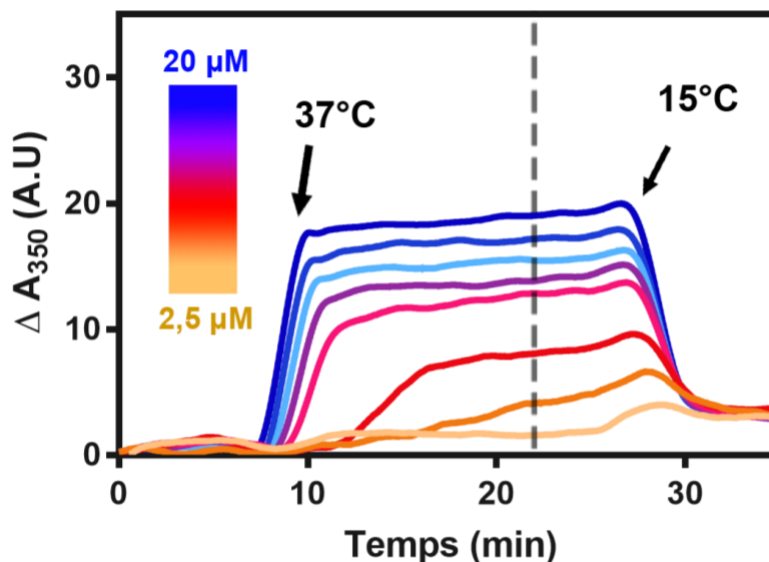


Figure 34 : Polymérisation de tubuline *in vitro* réalisée sur le nanoDSF Prometheus NT.Plex en mode "plateau", en tampon PEMGT, à plusieurs concentrations de tubuline. Le niveau de polymérisation augmente en même temps que la concentration de tubuline car plus de microtubules sont formés.

Pour les concentrations supérieures à 2,5 μM , nous observons une augmentation de la turbidité lorsque la température passe à 37°C, et une baisse lorsque l'appareil repasse à froid, ce qui traduit la polymérisation puis la dépolymérisation de microtubules en solution. Lorsque la tubuline est trop faiblement concentrée (notamment à 2,5 μM et à 5 μM), les microtubules ne se forment pas, ou nécessitent un temps de plateau plus long pour apparaître, comme observé par spectrophotométrie classique (H W Detrich, M A

Jordan, L Wilson and R C William Jr 1985). Ce type d'expérience permet de calculer la concentration critique (C_R) à laquelle se forment les microtubules, en représentant le niveau d'absorbance atteint au plateau en fonction de la concentration en tubuline et en calculant l'abscisse à l'origine par régression linéaire (Figure 35) :

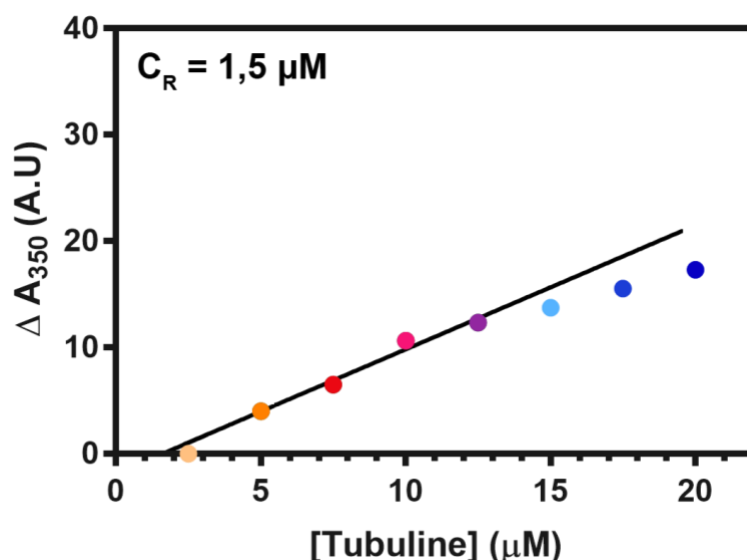


Figure 35 : Détermination de la concentration critique (C_R) de formation des microtubules en mode "plateau". La concentration critique est la concentration minimum pour laquelle la tubuline polymérise forme des microtubules.

La C_R obtenue ici ($1,5 \mu\text{M}$) est plus basse que celle obtenue précédemment dans le même tampon par spectrophotométrie classique ($6 \mu\text{M}$) (Devred et al. 2002). Cette différence peut s'expliquer par l'utilisation des capillaires, dans lesquels les microtubules s'organisent et sédimentent probablement différemment par rapport à des cuves classiques et deviennent ainsi plus facilement détectables. Cette première expérience montre que la polymérisation de tubuline peut être suivie par nanoDSF Prometheus NT.Plex, qui présentant l'avantage de consommer 10 fois moins de protéine et de pouvoir mesurer plus d'échantillons en parallèle. En plus de cela, l'appareil propose un mode "melting", qui permet de suivre la polymérisation non plus à deux températures (15°C et 37°C), mais sur une gamme de température large (de 15°C à 95°C).

Polymérisation de tubuline *in vitro* : expérience en mode “melting”

Après avoir reproduit l'expérience classique de polymérisation de tubuline *in vitro* par nanoDSF Prometheus NT.Plex grâce au mode “plateau”, nous voulions tirer parti de son autre mode de mesure, le mode “melting”, afin d'obtenir de nouvelles informations. Nous avons donc réalisé la même gamme de concentrations de tubuline, mais en chauffant cette fois-ci graduellement de 15°C à 95°C (Figure 36) :

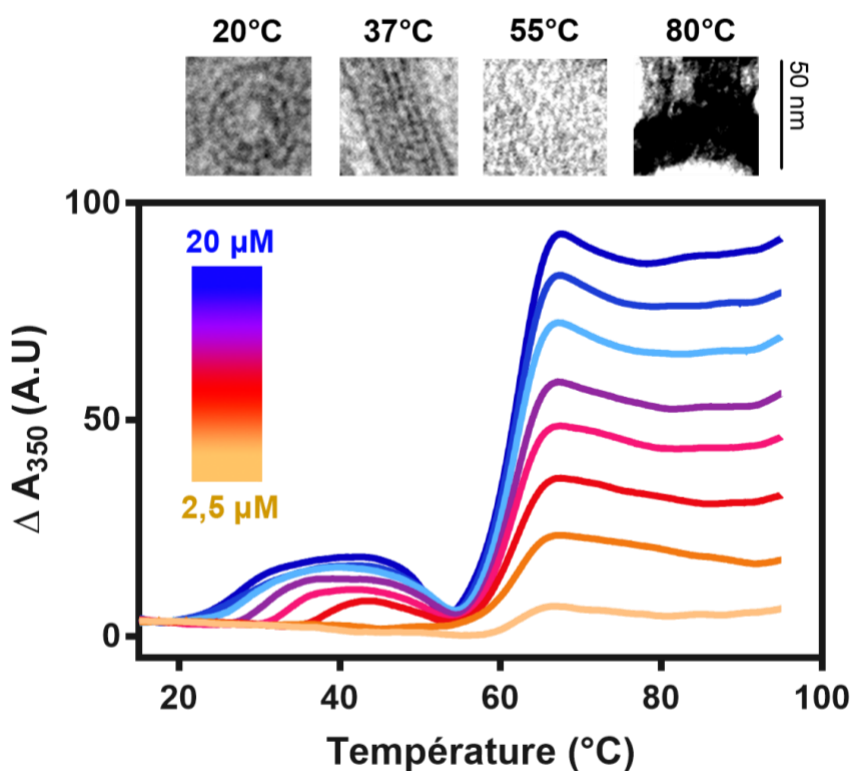


Figure 36 : Signal de turbidité d'échantillons de tubuline au cours du chauffage en tampon PEMGT (mode “melting”), à 1°C/min. Les espèces en solution ont été observées par microscopie électronique à 4 températures (images du haut). A 20°C, les anneaux de tubuline ne sont pas visibles par turbidimétrie. Dès 25°C, la tubuline polymérise en microtubule, ce qui se traduit par une augmentation de la turbidité. A 50°C, les microtubules dépolymérise indépendamment de la concentration en tubuline. Aux alentours de 60°C, la tubuline s'agrège, ce qui provoque une augmentation du signal de turbidité.

On remarque que la turbidité augmente et diminue alternativement sur la gamme de température, ce qui suggère que la tubuline est présente en différents états de polymérisation entre 15°C et 95°C (Figure 36). Afin de confirmer la présence de ces espèces polymérisées, nous avons réalisé des grilles de microscopie électronique à plusieurs températures (Figure 35, images du haut) sur l'échantillon le plus concentré en tubuline (20 μ M de tubuline colorée avec de l'acétate d'uranyle), pour expliquer le signal de turbidité obtenu le long de la gamme de température balayée par le nanoDSF Prometheus NT.Plex. A 20°C, la tubuline polymérise en anneaux dans ce tampon comme précédemment décrit (Devred et al. 2004). Cependant, étant donné que les anneaux de tubuline ne sont pas turbides, ils ne sont pas détectables par turbidimétrie. Aux alentours de 37°C, la tubuline polymérise en microtubules, qui sont des espèces facilement observables par microscopie électronique. En regardant la turbidité des échantillons, on remarque que la polymérisation commence dès 25°C pour les plus fortes concentrations en tubuline, tandis que les faibles concentrations polymérisent à des températures plus élevées (jusqu'à 37°C pour 7,5 μ M de tubuline). Lorsque la température atteint 55°C, le signal de turbidité baisse, pour les faibles (2,5 μ M) et fortes concentrations (20 μ M) de tubuline. Ce résultat suggère que les microtubules dépolymérisent à cette température, ce que nous avons confirmé par microscopie électronique puisque nous n'observons aucune structure polymérisée de tubuline sur les grilles. Enfin, aux alentours de 60°C, la turbidité augmente drastiquement pour tous les échantillons. La grille de microscopie électronique réalisée à 80°C indique que cette hausse est due à l'apparition d'agrégats de tubuline dans les échantillons. Comme précédemment montré, il est aussi possible de déterminer la concentration critique à partir de laquelle la tubuline polymérise en microtubules, en prenant la valeur de turbidité maximale entre 15°C et 50°C pour chaque concentration en tubuline (Figure 37) :

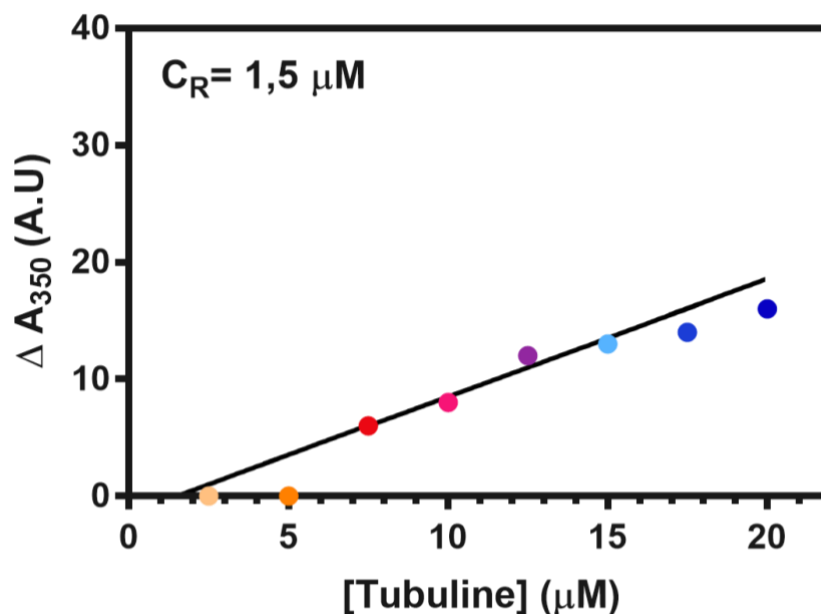


Figure 37 : Détermination de la concentration critique (C_R) de formation des microtubules en mode “melting”. La concentration critique est la concentration minimum pour laquelle la tubuline polymérise forme des microtubules. La valeur obtenue en mode “melting” est identique à celle obtenue en mode “plateau”.

Cette valeur est égale à celle précédemment calculée en mode “plateau” ($C_R = 1,5 \mu M$), ce qui souligne le fait que le mode “melting” peut être utilisé directement, sans réaliser au préalable une expérience de polymérisation classique, pour calculer ce type de paramètres.

En plus du signal de turbidité, le nanoDSF Prometheus NT.Plex permet de suivre l'évolution des ratios de fluorescence de chaque échantillon au cours du chauffage. Ce graphique apporte aussi des informations sur l'état de polymérisation de la tubuline au cours du chauffage (Figure 38) :

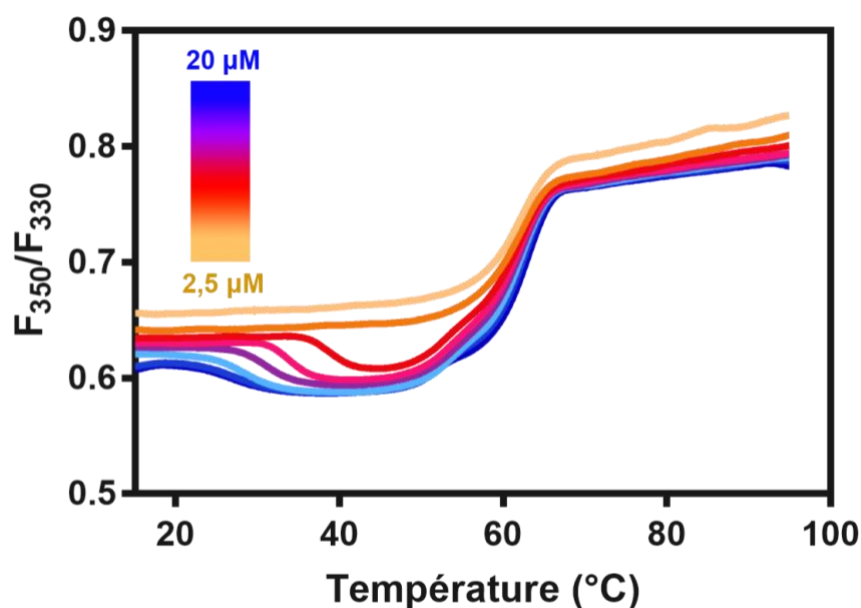


Figure 38 : Ratios de fluorescence d'échantillons de tubuline au cours du chauffage en tampon PEMGT (mode "melting"), à 1°C/min. Les ratios de fluorescence baissent dès 25°C à cause de la polymérisation de la tubuline en microtubules. Aux alentours de 60°C, la tubuline se dénature, ce qui provoque une augmentation des ratios de fluorescence.

On remarque que lors de la polymérisation de tubuline (aux alentours de 30°C), les ratios de fluorescence baissent (Figure 38) en même temps que la turbidité augmente (Figure 36). Cette baisse s'explique par le fait que dans le tampon PEMGT, le glycérol favorise la polymérisation en s'incorporant au sein des microtubules. Le glycérol modifie fortement l'environnement des tryptophanes de la tubuline, ce qui provoque un changement d'émission de fluorescence (notamment à 350 nm). Vers 60°C, la tubuline est dénaturée et ses tryptophanes s'exposent au solvant, ce qui a pour effet d'augmenter la valeur des ratios de fluorescence. En comparant les graphiques représentant la turbidité (Figure 36) et les ratios de fluorescence (Figure 38) au cours du chauffage, on remarque que les deux signaux augmentent simultanément aux alentours de 60°C, ce qui suggère que l'agrégation de la tubuline se produit en même temps que sa dénaturation.

En résumé, le mode "melting" du nanoDSF Prometheus NT.Plex donne beaucoup d'informations sur les échantillons grâce à sa large gamme de températures. Le signal de turbidité permet de suivre la polymérisation/dépolymérisation de la tubuline en microtubules ainsi que son agrégation, tandis que les ratios de fluorescence renseignent

sur le mécanisme de polymérisation ainsi que sur la dénaturation de tubuline. Considérant son faible coût en échantillon et le grand nombre de conditions en simultanée, le nanoDSF Prometheus NT.Plex rend l'étude de la polymérisation de tubuline plus facile et plus complète par rapport à un spectrophotomètre classique. Un autre avantage du mode "melting" est qu'il permet de mettre en évidence des interactions moléculaires, notamment entre la tubuline et les MTA.

Etude des interactions tubuline - MTA

Comme expliqué précédemment, le nanoDSF Prometheus NT.Plex permet de suivre l'évolution des ratios de fluorescence au cours du chauffage. Lorsqu'un MTA est ajouté à un échantillon de tubuline, il est possible que la courbe des ratios de fluorescence soit modifiée de deux façons (Figure 39) :

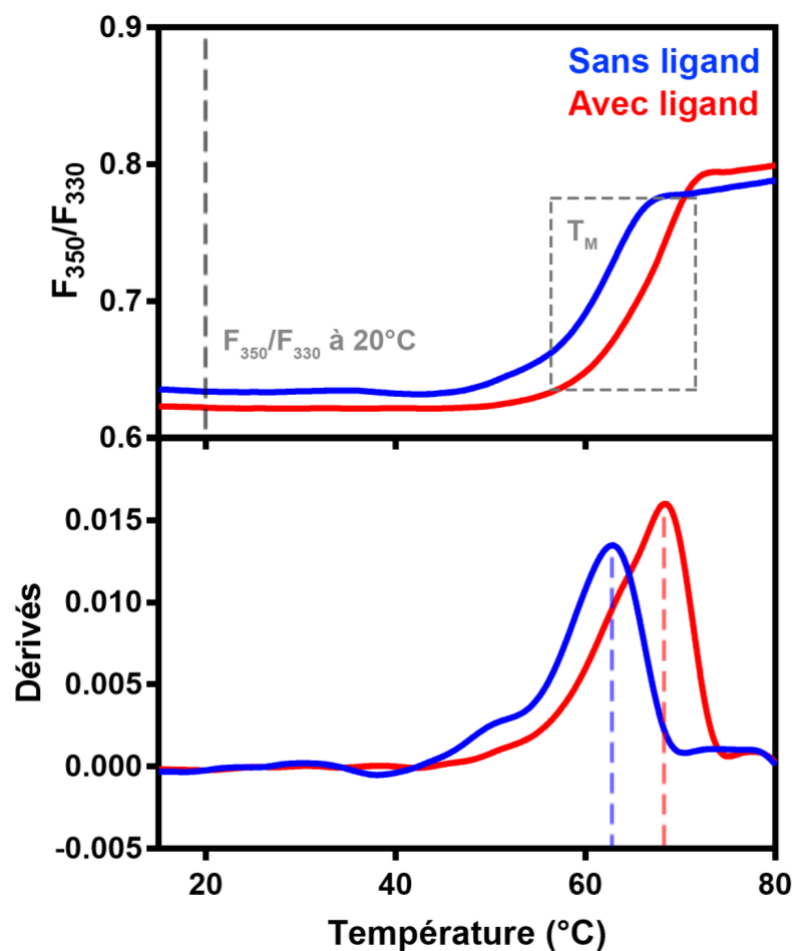


Figure 39 : Ratios de fluorescence d'échantillons de tubuline en absence et en présence de ligand (mode "melting") (haut) ; Dérivés des ratios de fluorescence des mêmes échantillons (bas). La fluorescence de la tubuline à température fixe peut être modifiée suite à l'ajout du ligand, ainsi que sa température de dénaturation.

- La fixation du ligand peut influencer la valeur des ratios de fluorescence à différentes températures (comme indiqué ici à 20°C), car le ligand peut modifier l'environnement des tryptophanes de la tubuline.
- Le ligand peut influencer la température de dénaturation de la tubuline (T_M) en stabilisant ou en déstabilisant la protéine. Ici, l'interaction est stabilisatrice (Figure 38) puis qu'elle décale la température de dénaturation vers une valeur plus élevée. La représentation des dérivés des ratios de fluorescence (graphe du bas) permet de visualiser et d'extraire plus facilement les valeurs de T_M .

Ainsi, il est possible de réaliser des gammes de concentrations de MTA à concentration de tubuline fixe, afin d'observer une saturation de l'un ou de ces deux signaux et de calculer une constante d'association apparente via les ratios de fluorescence (K^{App}_R) ou via l'extraction des températures de dénaturations (K^{App}_{TM}). Nous avons étudié l'interaction de la vinblastine avec la tubuline, dans un tampon où la tubuline ne polymérise pas au cours du chauffage, afin d'observer uniquement le signal de l'interaction (tampon phosphate) (Figure 40) :

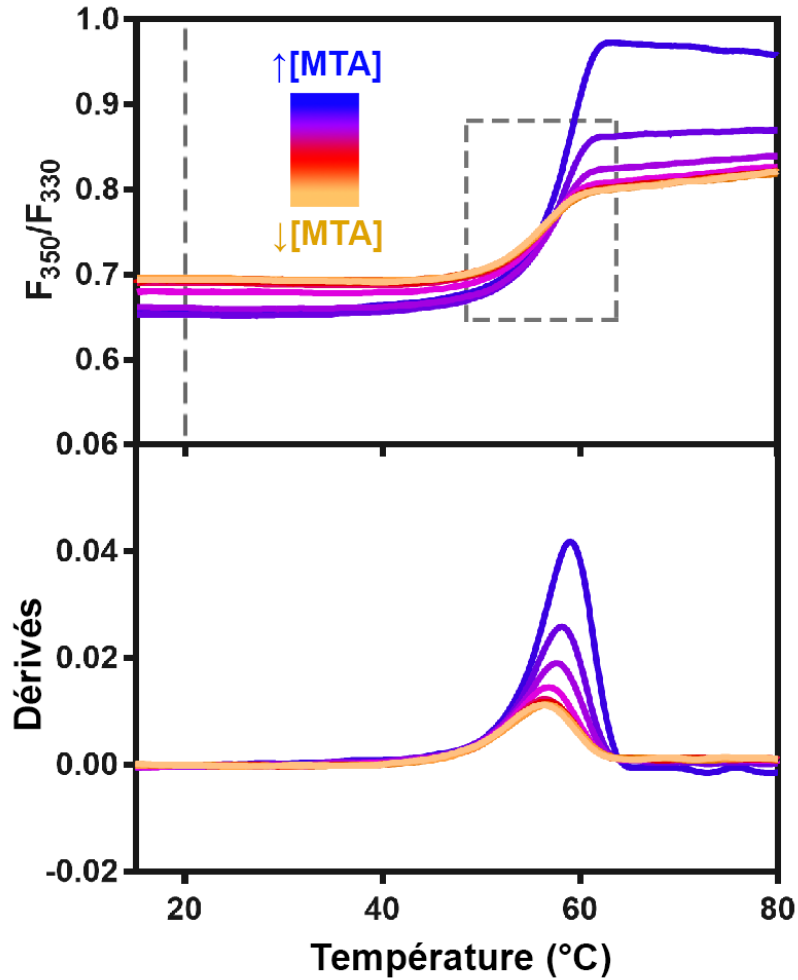


Figure 40 : Ratios de fluorescence d'échantillons de tubuline en présence de vinblastine (mode "melting") (haut) ; Dérivés des ratios de fluorescence des mêmes échantillons (bas). La vinblastine provoque un décalage de température de dénaturation de la tubuline ainsi qu'un changement de son ratio de fluorescence à 20°C.

On observe une modification des ratios de fluorescence induit par l'ajout de vinblastine, ainsi qu'une modification de T_M . On peut donc tracer la variation de ces deux valeurs en fonction de la concentration de vinblastine afin de calculer les constantes d'affinités apparentes de l'interaction par les deux méthodes, en utilisant les équations précédemment décrites (Vivoli et al. 2014) (Figure 41) :

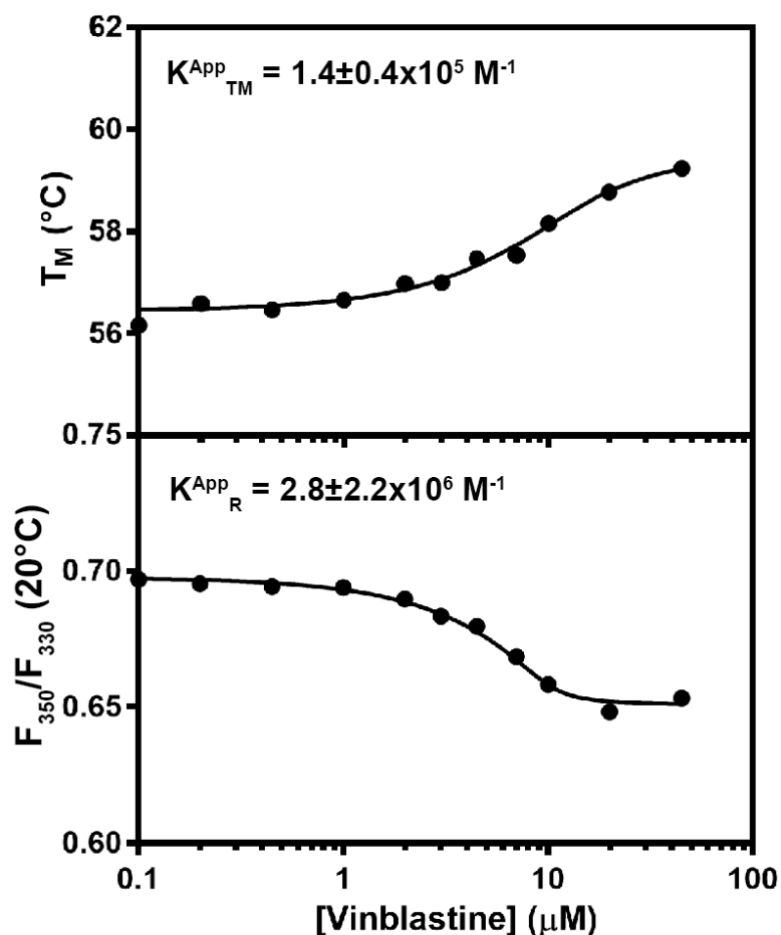


Figure 41 : Evolution des températures de dénaturation de la tubuline en fonction de la concentration en vinblastine en tampon phosphate (haut) ; Evolution des ratios de fluorescence à 20°C en fonction de la concentration en vinblastine en tampon phosphate (bas). Les deux méthodes permettent de déterminer des constantes d'affinité apparentes entre la tubuline et la vinblastine.

Afin de comparer les constantes obtenues par ces deux méthodes avec une méthode de référence, nous avons réalisé en parallèle une expérience d'ITC dans les mêmes conditions de tampon (Figure 42) :

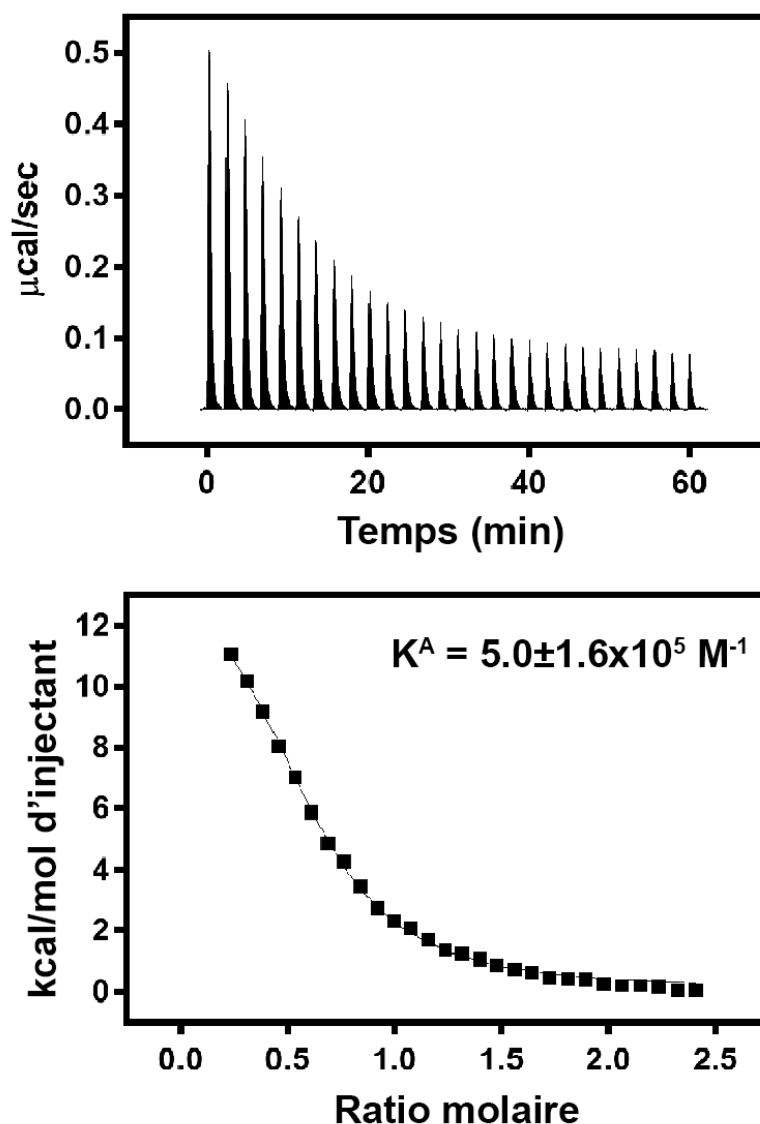


Figure 42 : Expérience d'ITC entre la vinblastine (seringue) et la tubuline (cellule) réalisée en tampon phosphate à 10°C. L'expérience révèle un dégagement de chaleur rendant compte de l'interaction, et permettant de calculer une constante d'affinité entre la tubuline et la vinblastine.

La constante d'affinité obtenue par ITC ($K_A = 5.0 \pm 1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) est très proche de celle obtenue grâce à l'extraction des T_M ($K^{\text{App}}_{TM} = 1.4 \pm 0.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), mais plus éloignée de celle obtenue grâce aux ratios de fluorescence ($K^{\text{App}}_R = 2.8 \pm 2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Cependant, étant donné que la vinblastine fluoresce, les constantes déterminées par ITC et par l'extraction des T_M sont plus fiables car elles ne dépendent pas de l'augmentation de la fluorescence induite par l'ajout de vinblastine. Afin d'étendre ces résultats à plusieurs

classes de MTA, nous avons réalisé le même type d'expérience dans le tampon phosphate avec le paclitaxel, la colchicine et le mébendazole (Table 3 et Annexe 2) :

Tampon NaPi	Vinblastine	Paclitaxel	Colchicine	Mébendazole
F_{350}/F_{330} à 20°C (K^{App_R}), M^{-1}	$2.8 \pm 2.2 \times 10^6$	Pas de signal	$1.2 \pm 0.5 \times 10^5$	Pas de saturation
Extraction des T_M ($K^{App_{TM}}$), M^{-1}	$1.4 \pm 0.4 \times 10^5$	Pas de signal	$3.2 \pm 0.6 \times 10^4$	$6.5 \pm 2.2 \times 10^4$
ITC (K_A), M^{-1}	$5.0 \pm 1.6 \times 10^5$	Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal

Table 3 : Constantes d'affinité des interactions tubuline - MTA estimées par DSF et ITC, dans le tampon phosphate. Chaque constante a été calculée comme précédemment décrit (Vivoli et al. 2014), sur la base d'un modèle d'interaction à un site ($n = 1$).

Ces résultats montrent, avec les exemples de la colchicine et du mébendazole, que la DSF permet de détecter des interactions non visibles par ITC. Le paclitaxel, dans ces conditions, n'interagit pas avec la tubuline car il a besoin de magnésium pour se lier (Parness and Horwitz 1981). Maintenant que nous avons montré que le nanoDSF Prometheus NT.Plex permet d'étudier les interactions, nous avons voulu observer au cours d'une même expérience les effets des MTA sur la polymérisation de tubuline mais aussi leur interaction avec la tubuline, en réalisant le même type d'expérience que ci-dessus mais dans le tampon précédemment utilisé pour étudier la polymérisation de tubuline, le tampon PEMGT.

Etude de la polymérisation de tubuline et de ses interactions avec les MTA au cours d'une seule expérience

Afin d'observer l'effet de la vinblastine sur la polymérisation de la tubuline, nous nous sommes placés dans des conditions où la tubuline polymérise sans ajout d'autre molécule, c'est à dire à 20 μM dans du tampon PEMGT. Nous avons ensuite réalisé une gamme de concentrations de vinblastine, afin d'observer son effet sur la polymérisation de tubuline (Figure 43) :

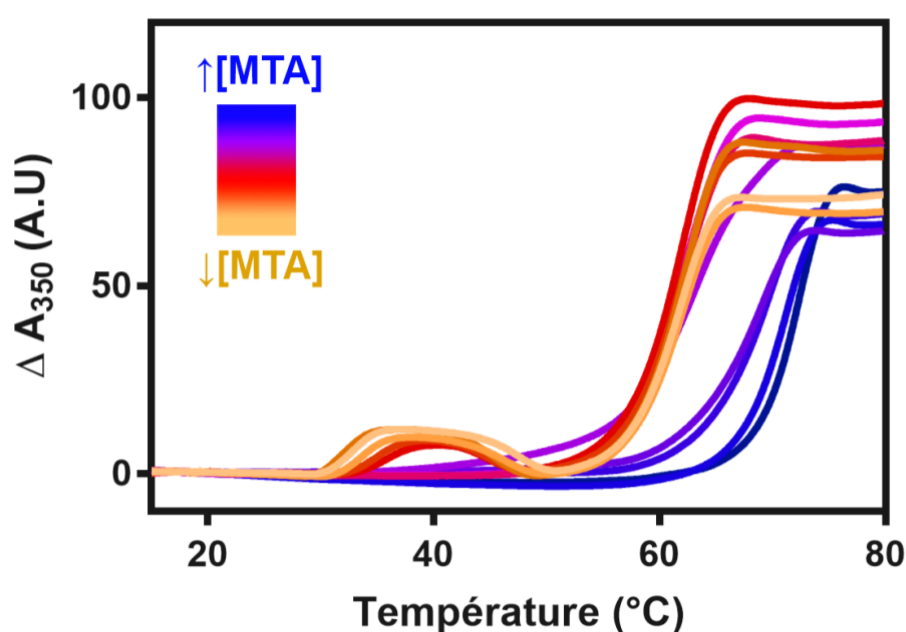


Figure 43 : Signal de turbidité d'échantillons de tubuline en présence de vinblastine au cours du chauffage (mode "melting"), à 1°C/min. L'expérience permet de suivre la polymérisation de tubuline au cours du chauffage, et d'observer l'effet d'inhibition de la vinblastine (ici aux alentours de 30°C).

Aux alentours de 30 degrés, comme précédemment montré, on observe une augmentation de la turbidité, qui correspond à la polymérisation de tubuline. Lorsque la concentration en vinblastine augmente, on constate une diminution de la turbidité (Figure 42), ce qui indique une inhibition de la polymérisation par la vinblastine. Dans le même temps, on constate que l'agrégation de la tubuline, qui se produit vers 60°C, est retardée

par l'ajout de la vinblastine, jusqu'à une température avoisinant les 70°C. La représentation des ratios de fluorescence en fonction de la température donne des informations supplémentaires sur l'effet de la vinblastine sur la tubuline (Figure 44) :

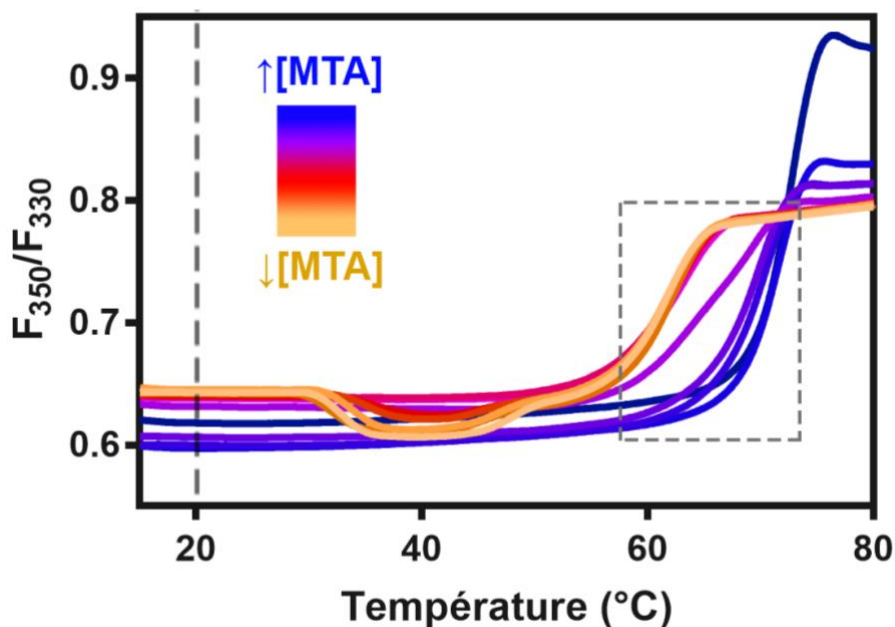


Figure 44 : Ratios de fluorescence d'échantillons de tubuline en présence de vinblastine au cours du chauffage (mode "melting"), à 1°C/min. L'ajout de la vinblastine a perturbé le signal de fluorescence à 20°C, ainsi que la température de dénaturation de la tubuline.

Nous pouvons extraire trois informations importantes de ce graphique. La première, c'est que l'ajout de vinblastine à la tubuline modifie l'émission de fluorescence des tryptophanes de la tubuline, ce qui montre que la vinblastine induit un changement de leur environnement. La seconde information est que la baisse des ratios de fluorescence caractéristique de la polymérisation de tubuline vers 30°C disparaît après l'ajout de la vinblastine, ce qui confirme l'inhibition de la polymérisation précédemment observée par turbidité. Enfin, la dénaturation de la tubuline est retardée par l'ajout de la vinblastine, ce qui indique que la vinblastine interagit avec la tubuline et la stabilise. Comme précédemment montré, nous pouvons représenter d'évolution des T_M et des ratios de fluorescence à 20°C en fonction de la concentration en vinblastine afin d'étudier l'interaction entre la vinblastine et la tubuline (Figure 45) :

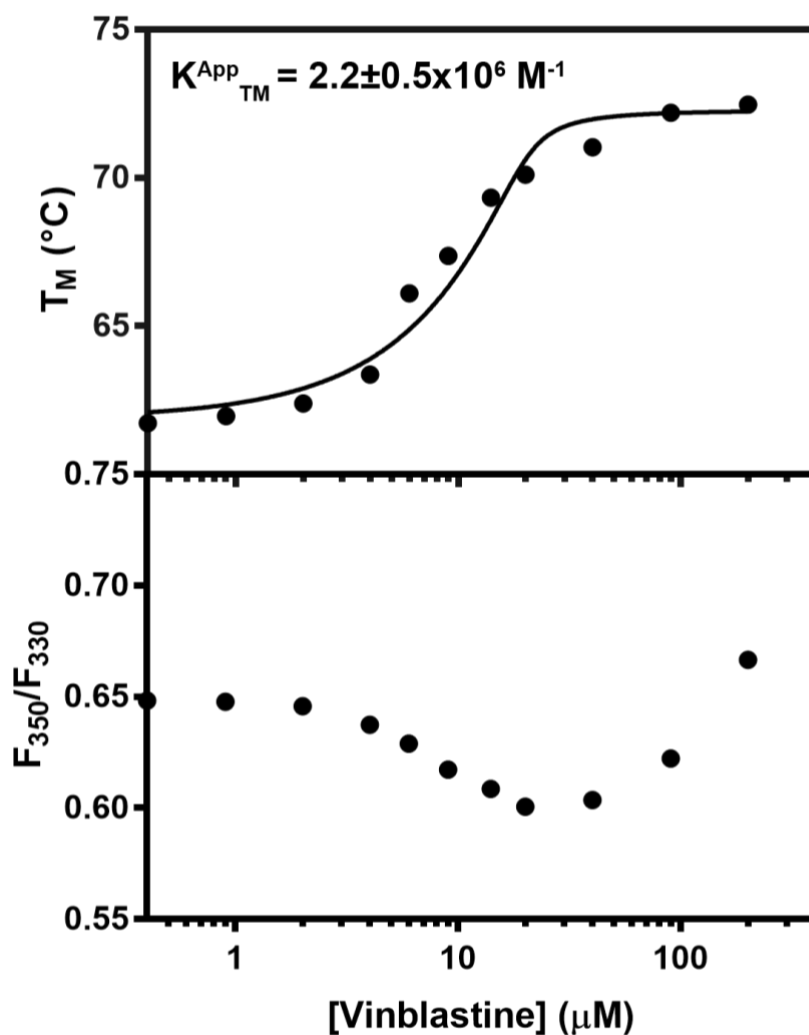


Figure 45 : Evolution des températures de dénaturation de la tubuline en fonction de la concentration en vinblastine en tampon PEMGT (haut) ; Evolution des ratios de fluorescence à 20°C en fonction de la concentration en vinblastine en tampon PEMGT (bas). Ici, seule la méthode des T_m permet de déterminer une constante d'affinité, car la fluorescence de la vinblastine empêche le signal de fluorescence de saturer.

Ici, seule l'extraction des T_M nous a permis de calculer une constante d'affinité apparente ($K^{\text{App}}_{\text{TM}} = 2.2 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), car la fluorescence de la vinblastine à forte concentration dans ce tampon a empêché d'observer correctement la saturation des sites de liaisons à la vinblastine sur la tubuline. L'expérience d'ITC dans ce tampon n'a révélé aucun dégagement de chaleur, ce qui met en évidence l'intérêt de l'utilisation de la DSF pour la détection d'interactions. De la même façon que dans le tampon phosphate, nous avons réalisé les expériences dans le tampon PEMGT pour 4 classes de MTA, afin

d'observer leur effet sur la polymérisation de tubuline mais aussi leur interaction (Table 4 et Annexe 3) :

Tampon PEMGT	Vinblastine	Paclitaxel	Colchicine	Mébendazole
Effet sur la polymérisation	Inhibition	Activation	Inhibition	Inhibition
F_{350}/F_{330} à 20°C (K^{App}_R), M^{-1}	Pas de saturation	Pas de signal	$1.1 \pm 0.5 \times 10^3$	$2.0 \pm 0.5 \times 10^4$
Extraction des T_M (K^{App}_{TM}), M^{-1}	$2.2 \pm 0.5 \times 10^6$	$4.2 \pm 1.2 \times 10^5$	Pas de signal	Pas de signal
ITC (K_A), M^{-1}	Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal	Pas de signal

Table 4 : Effets sur la polymérisation des MTA et constantes d'affinité des interactions tubuline - MTA estimées par DSF et ITC, dans le tampon PEMGT. Chaque constante a été calculée comme précédemment décrit (Vivoli et al. 2014), sur la base d'un modèle d'interaction à un site ($n = 1$).

Conclusion

En résumé, le nanoDSF Prometheus NT.Plex, en couplant des mesures de turbidité et de DSF, donne beaucoup d'informations sur les échantillons analysés. Dans le cadre de l'étude de la polymérisation de la tubuline, nous avons montré qu'il était possible de reproduire avec cet appareil les expériences classiques réalisées sur spectrophotomètre, en utilisant 10 fois moins de volume et avec plus de conditions en simultané. De plus, le mode "melting" du nanoDSF Prometheus NT.Plex permet d'obtenir de nouvelles informations concernant la polymérisation, notamment grâce à la large gamme de températures balayée et grâce aux mesures de fluorescence. Nous nous

sommes aussi intéressés aux interactions entre la tubuline et les MTA par DSF, ce qui a permis de calculer des constantes d'affinité apparentes de deux façons différentes, et de détecter des interactions non détectables par ITC. Enfin, au cours d'une seule et même expérience, nous avons pu suivre les effets des MTA sur la polymérisation de tubuline ainsi que leur interaction avec la tubuline. Ces résultats soulignent les avantages du nanoDSF Prometheus NT.Plex pour l'étude de la polymérisation de tubuline et de ses interactions. Grâce à ses nombreux échantillons mesurés en simultanément et son suivi de la turbidité et de la fluorescence au cours d'une même expérience, cette méthode permet d'étudier la polymérisation / l'agrégation des protéines, ainsi que leurs interactions avec différentes molécules cibles de façon peu coûteuse (10 µL par capillaire) (Table 5) :

	ITC	RMN	Turbidimétrie	DLS	nanoDSF Prometheus NT.Plex
Coût en échantillon (µL)	200	500	100	50	10
Etude d'interactions (signal mesuré)	Chaleur d'interaction	Changement de résonance des noyaux	*	*	X
Etude d'agrégation (signal mesuré)	-	-	Turbidité	Diffusion des particules	X

*Table 5 : Comparatif de différentes méthodes biophysiques classiques avec le nanoDSF Prometheus NT.Plex. * : seulement si l'interaction inhibe ou active l'agrégation.*

Cas de l'interaction protéine tau – zinc

Comme expliqué précédemment, bien que le nanoDSF Prometheus NT.Plex permette d'étudier les interactions moléculaires dans la majorité des cas, certaines posent problème, comme l'interaction protéine tau – zinc.

Le premier problème rencontré lors de l'étude de cette interaction par DSF est dû au faible nombre d'acides aminés aromatiques présents sur la séquence de la protéine tau. Sur 441 résidus, elle ne contient aucun tryptophane, seulement 5 tyrosines et 6 phénylalanines. De ce fait, elle est difficile à détecter lors de la mesure.

Le second problème est que la protéine tau est une protéine thermostable, qui ne possède pas de structure bien définie. Ainsi, au cours du chauffage, il n'y a pas de changement d'environnement des acides aminés hydrophobes dû à la dénaturation. De plus, étant donné qu'elle n'a aucun tryptophane pour "sonder" l'environnement, le ratio de fluorescence 350 nm / 330 nm n'est pas influencé au cours du chauffage. Son partenaire, le zinc, n'est pas détectable non plus par DSF puisque c'est un ion.

Pour ces raisons, il est impossible d'étudier l'interaction protéine tau – zinc par DSF. Nous pouvons cependant tirer parti des avantages du nanoDSF Prometheus NT.Plex concernant sa mesure de turbidité au cours du chauffage ainsi que son faible volume d'échantillon pour réaliser les tests d'agrégation de la protéine tau en présence de zinc.

Objectifs de thèse

Le premier objectif de ma thèse est d'étudier les effets du zinc sur la protéine en l'absence de tout autre inducteur d'agrégation. Les études précédemment parues ont décrit le zinc comme un facteur favorisant l'agrégation en présence d'héparine (Mo et al. 2009; Yunpeng Huang et al. 2014; Jiji et al. 2017) ou de rouge Congo (J.-Y. Hu et al. 2017), mais le potentiel effet inducteur d'agrégation du zinc n'a jamais été démontré. Nous avons donc dans un premier temps suivi l'agrégation de la protéine tau en présence de zinc uniquement, et étudié les structures agrégées au moyen de différentes techniques biophysiques (DLS, turbidimétrie, microscopie électronique).

Le second objectif de ma thèse consiste en l'étude moléculaire de l'interaction protéine tau – zinc. Après notre premier article focalisé sur l'agrégation de la protéine tau induite par le zinc, nous avons décidé d'étudier plus en détail le mécanisme à l'origine de l'agrégation. Entre temps, deux études ont apporté des éléments supplémentaires dans la compréhension de l'interaction protéine tau – zinc, et notamment concernant la localisation des sites de liaison. Il a été montré que la séquence répétée R3 seule pouvait interagir avec le zinc (Xuexia Li, Du, and Ni 2019), qui inclut notamment la cystéine 322 ayant déjà été décrite comme importante dans l'interaction (Mo et al. 2009; Yunpeng Huang et al. 2014; J.-Y. Hu et al. 2017). De plus, des expériences de spectrométrie de masse (Moreira et al. 2019) ont montré que plusieurs atomes de zinc pouvaient se fixer sur la protéine, et ont suggéré que les atomes se liant avec une basse affinité seraient responsables de l'agrégation comme nous l'avions précédemment supposé (Roman et al. 2019). L'hypothèse soutenue par cette étude est que les sites de liaison du zinc responsables de l'agrégation de tau se localisent dans les parties N et C-terminales de la protéine. Le but de ce second travail a donc été de localiser ces sites d'interaction par RMN, et de décrire le schéma de fixation du zinc sur la protéine tau par ITC, afin de mieux comprendre les interactions à l'origine de l'agrégation.

Résultats

Le zinc induit l'agrégation de la protéine tau de façon réversible et température-dépendante

Dans ce premier article, en utilisant plusieurs techniques biophysiques au sein de notre laboratoire (turbidimétrie, microscopie électronique à transmission, fluorescence de la thioflavine), nous avons découvert que le zinc provoque la formation d'agrégats de tau ayant des propriétés totalement différentes de celles des PHF. Ces agrégats induits par le zinc sont sensibles aux variations de température, et se dissocient à froid. De plus, l'ajout d'un agent chélateur du zinc (comme par exemple l'EDTA) provoque aussi leur dissociation. Les expériences de microscopie électronique à transmission et de fluorescence de thioflavine montrent que ces agrégats ne contiennent pas de cœur en feuillet bêta, et qu'ils sont d'une taille conséquente (jusqu'à plusieurs micromètres). Pour comprendre le mécanisme à l'origine de cette agrégation, nous avons étudié pour la première fois l'interaction protéine tau – zinc avec l'isoforme 2N4R de la protéine par ITC. Cette expérience a révélé la présence de deux types de sites de liaison du zinc sur la protéine tau, ayant des affinités distinctes (haute et basse affinité). Des mesures de DLS réalisées à la plateforme Protein Expression Facility du CNRS à Marseille ont révélé que la fixation du zinc provoque une légère compaction de la protéine à faible concentration, avant d'induire son agrégation à plus forte concentration. Ce résultat suggère que les sites de basses affinités sont responsables de l'agrégation de la protéine induite par le zinc.

Cet article constitue la première description de l'agrégation de la protéine tau induite par le zinc, qui se distingue de l'agrégation pathologique de la protéine tau en PHF. Ma contribution à ces travaux a consisté essentiellement à la réalisation des expériences de microscopie électronique, ainsi qu'à la relecture de l'article.



Zinc Induces Temperature-Dependent Reversible Self-Assembly of Tau

Andrei Roman, François Devred, Deborah Byrne, Romain La Rocca, Natalia Ninkina, Vincent Peyrot, Philipp Tsvetkov, Andrei Yu. Roman

► To cite this version:

Andrei Roman, François Devred, Deborah Byrne, Romain La Rocca, Natalia Ninkina, et al.. Zinc Induces Temperature-Dependent Reversible Self-Assembly of Tau. *Journal of Molecular Biology, Elsevier*, 2018, 10.1016/j.jmb.2018.12.008 . hal-01981683v2

HAL Id: hal-01981683

<https://hal-amu.archives-ouvertes.fr/hal-01981683v2>

Submitted on 5 Feb 2019

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution| 4.0 International License



Zinc Induces Temperature-Dependent Reversible Self-Assembly of Tau

Andrei Yu. Roman¹, François Devred², Deborah Byrne³, Romain La Rocca², Natalia N. Ninkina⁴, Vincent Peyrot² and Philipp O. Tsvetkov²

¹ - Aix-Marseille Univ, Inserm, CRO2 UMR_S 911, Faculté de Pharmacie, Marseille, France

² - Aix-Marseille Univ, CNRS, INP, Inst Neurophysiopathol, Fac Pharm, Marseille, France

³ - Institut de Microbiologie de la Méditerranée, CNRS, FR3479, Aix-Marseille Univ, Marseille, France

⁴ - School of Biosciences, Cardiff University, Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX, UK

Correspondence to François Devred and Natalia N. Ninkina: andrei.roman@etu.univ-amu.fr, francois.devred@univ-amu.fr, byrne@imm.cnrs.fr, ninkinan@cardiff.ac.uk, vincent.peyrot@univ-amu.fr, philipp.tsvetkov@univ-amu.fr
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.008>

Edited by Louise C. Serpell

Abstract

Tau is an intrinsically disordered microtubule-associated protein that is implicated in several neurodegenerative disorders called tauopathies. In these diseases, Tau is found in the form of intracellular inclusions that consist of aggregated paired helical filaments (PHFs) in neurons. Given the importance of this irreversible PHF formation in neurodegenerative disease, Tau aggregation has been extensively studied. Several different factors, such as mutations or post translational modifications, have been shown to influence the formation of late-stage non-reversible Tau aggregates. It was recently shown that zinc ions accelerated heparin-induced oligomerization of Tau constructs. Indeed, *in vitro* studies of PHFs have usually been performed in the presence of additional co-factors, such as heparin, in order to accelerate their formation. Using turbidimetry, we investigated the impact of zinc ions on Tau in the absence of heparin and found that zinc is able to induce a temperature-dependent reversible oligomerization of Tau. The obtained oligomers were not amyloid-like and dissociated instantly following zinc chelation or a temperature decrease. Finally, a combination of isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering experiments showed zinc binding to a high-affinity binding site and three low-affinity sites on Tau, accompanied by a change in Tau folding. Altogether, our findings stress the importance of zinc in Tau oligomerization. This newly identified Zn-induced oligomerization mechanism may be a part of a pathway different of and concurrent to Tau aggregation cascade leading to PHF formation.

© 2018 Published by Elsevier Ltd.

Introduction

Microtubule (MT)-associated protein Tau is known to play a vital role in cytoskeleton regulation by binding tubulin and thus controlling essential MT functions, from the necessary dynamic instability in dividing cells to axonal stability in neurons [1,2]. Tau is also associated with a number of neurodegenerative diseases (NDs) including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Pick's disease, frontotemporal lobar degeneration, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy, where it forms intracellular aggregates [3–6]. These aggregates would spread in the brain through prion-like

propagation [3,7]. In the case of AD, Tau is believed to be the main factor underlying the development and progression of the pathology [8]. Different types of inclusions made of abnormal forms of Tau are found in different areas of the nervous system mostly in neuronal cells and, in some cases, in glial cells. The most common form of inclusions is called neurofibrillary tangles. They are found in AD, PD and in other tauopathies and consist of stacked paired helical filaments (PHFs) of hyper-phosphorylated Tau molecules [9]. In some diseases, Tau-mediated neuronal death can occur even in the absence of tangle formation [10], and it often aggregates with other teammates such as amyloid- β or α -synuclein [11,12].

Despite the extensive study of Tau aggregation over the last two decades, the exact causes of this process as well as its molecular mechanism are still not completely elucidated. PHF remains the most studied form of Tau aggregates. Among the endogenous factors that have been shown or suggested to favor Tau aggregation are post-translational modifications (in particular hyper-phosphorylation), mutations and the presence of zinc ions [13–16]. Interestingly, zinc ions were found to play a critical role in the development of several different NDs including AD and PD. Zinc can bind not only to a number of prone-to-aggregate proteins implicated in neurodegeneration (such as amyloid- β [17], FUS/TLS [18], α -synuclein [19], TDP-43 [20,21], etc.) and favor their aggregation, but also induce aggregation of stable proteins [22].

The potential impact of zinc ions on Tau aggregation/oligomerization was first discovered in 2009 [23]. It was shown that low micromolar concentrations of zinc are able to accelerate the fibrillization of the 244- to 372-aa fragment of human Tau40 (hTau40), which consists of the four MTBR binding repeats R1, R2, R3 and R4 [23]. Similar results have been recently obtained on this same fragment lacking R3 repeat [24]. Nevertheless, both studies were carried out in the presence of heparin, which induces Tau fibrillization into thioflavin T (ThT)-positive PHFs. Recently, it was demonstrated that zinc not only accelerates aggregation of a pathological mutant Δ K280 of hTau40 induced by Congo red *in vitro*, but also significantly increases its toxicity in neuronal cells [25]. This study also demonstrated the importance of Cys-291 and Cys-322 residues both for zinc binding and Tau aggregation [23,25]. While using non-physiological specific inducers of Tau aggregation such as heparin or Congo red is the most common way to induce PHFs structure and test inhibitors, it might not be the most pertinent model to study PHF formation itself, especially in the early stages where the process has already been hypothesized to be reversible [26]. Also, it should be noted that in these studies the pathological aggregation in the presence of zinc were demonstrated for Tau mutants and fragments that could have higher propensity to aggregate in comparison with wild type human full-length Tau (hTau40).

Here, we have investigated aggregation of full-length human hTau40 isoform in the absence of heparin but in the presence of zinc ions under a wide range of temperature conditions using turbidimetry, isothermal titration calorimetry (ITC), dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy. We found that, contrary to its aggregation in the presence of heparin or with other inducers such as arachidonic acid or congo red [25,27,28], self-assembly of Tau is a reversible process that depends on temperature and is induced by zinc ions. Moreover, our findings point to an important role of low-affinity auxiliary zinc-binding sites in this process.

Results

Zinc ions induce Tau oligomerization

Turbidimetry was used to monitor the impact of zinc on Tau self-assembly in the absence of heparin at different temperatures. The absorbance (ΔA 350 nm) of 30 μ M Tau samples at different ZnCl_2 concentrations (from 0 to 240 μ M) in 50 mM Tris buffer and 1 mM TCEP at pH 7.5 was measured over a wide range of temperatures from 15 to 95 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 1a). In the absence of zinc ions as well as in the presence of low ZnCl_2 concentrations (15 μ M), Tau protein did not demonstrate any propensity to aggregate. Increasing zinc concentration, starting from a Zn/Tau molar ratio of 1, led to a pronounced rise in the turbidity upon sample heating, which could indicate the formation of large oligomers of Tau. We found that Tau protein started to form oligomers at lower temperatures when higher zinc concentrations were used. Indeed, a 2-fold excess zinc induced Tau

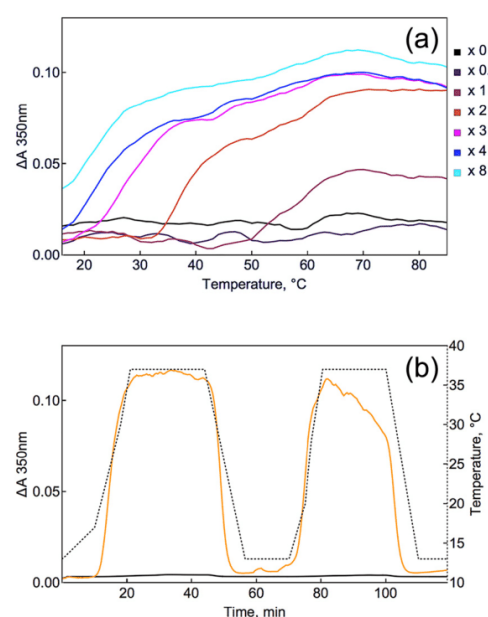


Fig. 1. (a) Temperature dependence of 30 μ M tau samples turbidity in the absence of ZnCl_2 (black curve) and in the presence of 0.5-, 1-, 2-, 3-, 4- and 8-fold molar excess of ZnCl_2 (see color legend on the right) in 50 mM Tris buffer and 1 mM TCEP at pH 7.5 obtained using Prometheus NT.Plex instrument. (b) Reversible aggregation of tau (30 μ M) followed by turbidimetry in the presence of 4-fold molar excess of ZnCl_2 (yellow curve); control tau sample in the absence of zinc (black curve); variation of temperature during experiment (black dotted line). Measurements were carried out using PerkinElmer spectrophotometer Lambda 800.

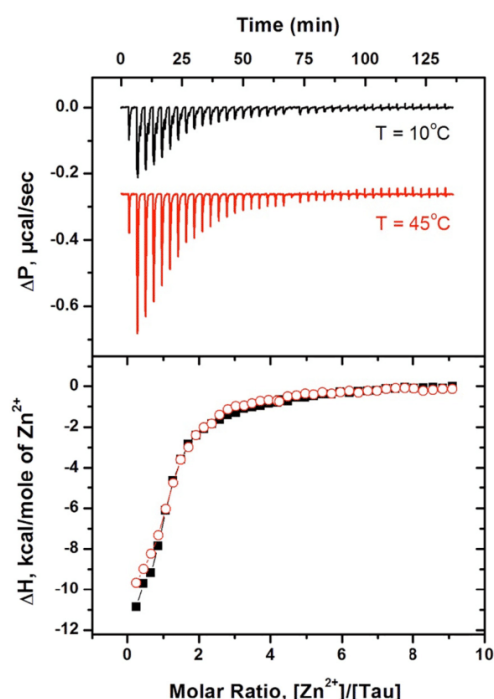


Fig. 2. Typical ITC titration curves (top panel) and binding isotherms (bottom panel) for zinc at 10 °C (black) and at 45 °C (red) interactions with 30 μ M of tau in 50 mM Tris and 1 mM TCEP at pH 7.5.

assembly at near physiological temperatures, while in the presence of an 8-fold zinc excess, Tau was already partially assembled at 15 °C. In parallel, to investigate the reversibility of this observed assembly, Tau sample was heated to 37 °C and cooled down to 13 °C in the presence of 4-fold zinc excess (120 μ M of ZnCl_2). Each time, absorbance increased upon heating and dropped after cooling demonstrating near 100% reversibility of the oligomerization (Fig. 1b).

Thermodynamics of Tau–zinc interaction

To verify if Tau oligomerization is directly linked to zinc binding, we investigated Tau–zinc interaction using ITC at different temperatures. In the turbidimetry experiments, at low temperatures, we observed Tau aggregation only at high zinc concentrations (above 120 μ M), but at high temperatures, Tau aggregation started at an equimolar zinc concentration. ITC titration of 30 μ M Tau solution by zinc at 10 and 45 °C did not reveal significant differences in thermodynamic parameters of Tau–zinc interaction (Fig. 2), indicating that zinc binds to tau just as well at 10 °C than at 45 °C. In both cases, fitting the binding isotherms using a two-sets-of-sites model revealed the existence of one high-affinity site for zinc ($N = 1.0 \pm 0.1$; $K_a = 2.0 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) and three low-affinity sites ($N = 3.2 \pm 0.3$; $K_a = 5.9 \pm 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). The high-affinity site was enthalpy driven but entropy unfavorable ($\Delta H = -12.1 \pm 0.2 \text{ kcal M}^{-1}$; $\Delta S = -13.8 \text{ cal M}^{-1} \text{ K}^{-1}$) probably due to partial folding of initially unstructured Tau molecule. Meanwhile, the three low-affinity sites were both enthalpy and entropy favorable ($\Delta H = -1.8 \pm 0.3 \text{ kcal M}^{-1}$; $\Delta S = 15.4 \text{ cal M}^{-1} \text{ K}^{-1}$) pointing to the burying of hydrophobic surfaces upon interactions during Tau aggregation.

Characterization of Tau oligomers

To characterize the oligomers of Tau that form in the presence of zinc ions, we used DLS, transmission electron microscopy and ThT assay. DLS analysis of 30 μ M Tau solution showed that, in the absence of zinc, at 10 °C, Tau is mostly represented in solution as a species with a median hydrodynamic diameter of $9.6 \pm 1.4 \text{ nm}$ by mass (Dv50; Table 1). Given that Tau is an intrinsically disordered protein, this size would correspond to the unfolded monomer [29]. Heating up to 40 °C did not reveal significant conformational changes of the monomeric state of Tau (Table 1), in agreement with our turbidimetry data.

Table 1. Characteristics of Tau polymers in presence of different zinc concentrations by DLS

T, °C	[ZnCl ₂], μ M	Z-average, nm	Pdi	Dv50, nm	Di50, nm
10	0	14.3 ± 0.7	0.31 ± 0.02	9.6 ± 1.4	13.7 ± 1.1
40	0	20.0 ± 2.1	0.50 ± 0.07	12.2 ± 0.6	13.0 ± 0.5
40	30	55.1 ± 63.7	0.30 ± 0.13	10.5 ± 0.4	12.2 ± 0.2
40	60	193.3 ± 46.1	0.21 ± 0.02	11.4 ± 0.2	11.4 ± 0.2
40	90	3158.0 ± 1462.0	0.99 ± 0.02	8.8 ± 1.1	8.9 ± 1.2
40	120	$99,000.0 \pm 20,000.0$	OR	OR	OR
10 ^a	120	26.0 ± 9.6	0.27 ± 0.08	11.3 ± 2.5	13.2 ± 0.3
40	90 ^b	55.2 ± 30.2	0.41 ± 0.05	11.3 ± 0.3	12.2 ± 0.4

Z-average, mean intensity size (diameter) of sample; Pdi, polydispersity index; Dv50, volume-based diameter median; Di50, intensity-based diameter median in nm; OR, out of range.

^a Sample cooled from 40 to 10 °C.

^b 2 mM EDTA added.

To investigate the impact of zinc ions on the oligomeric state of Tau, 30 μM of Tau was titrated with up to a 4-fold molar excess of zinc at 40 $^{\circ}\text{C}$ and analyzed by DLS (Fig. 3a–c). Within this range of zinc concentration, the main Tau species represented by mass had diameters ranging from 10 to 12 nm. Furthermore, below the molar ratio Zn/Tau of 2.3,

the polydispersity index (Pdi) remained low, while Z-average (mean particle size) gradually increased (Fig. 3c; Table 1). Above this Zn/Tau ratio, Z-average started to increase together with the polydispersity indicating protein aggregation (Fig. 3c). Further increases in zinc concentration, up to excess of 4, led to a complete disappearance of low size

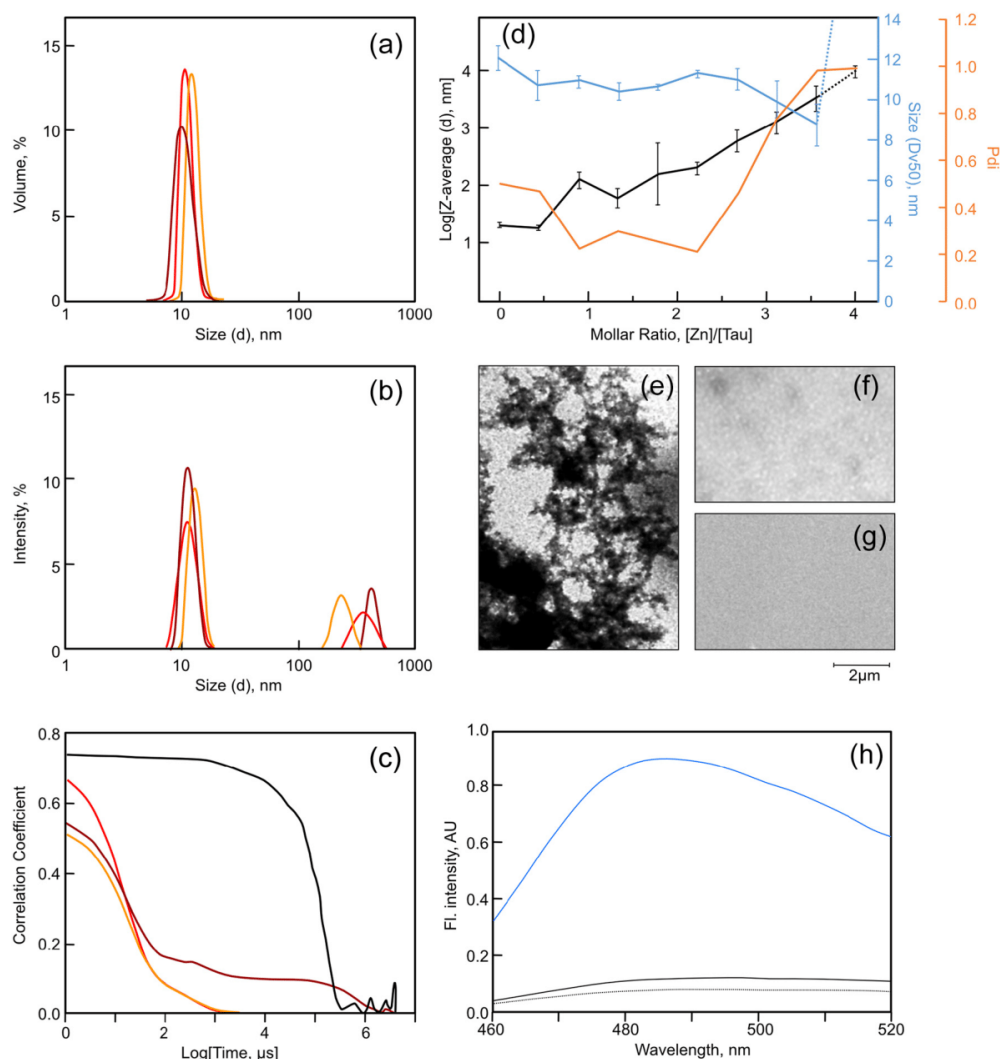


Fig. 3. Size distribution by volume (a) and by intensity (b) of 30 μM tau in the absence of zinc (orange curve) and in the presence of 30 and 60 μM zinc (in red and burgundy respectively) at 40 $^{\circ}\text{C}$. (c) Correlation coefficient *versus* time in μs for Tau 30 μM in the presence of 0, 10, 60 and 100 μM ZnCl₂ (shown in colors orange, red, burgundy and black, respectively). (d) Median volume-based diameter (DV50) in nm (blue), Pdi (orange) and Z-average mean intensity size in (black) for different zinc/Tau molar ratio, with Tau 30 μM . (e) and (f) Representative electron micrographs of negatively stained Tau aggregates at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the presence and in the absence of zinc ions respectively. (g) Representative electron micrographs of negatively stained sample of Tau in the presence cooled down from 37 to 10 $^{\circ}\text{C}$. (h) Fluorescence spectra of ThT at 60 μM in buffer (dotted curve), in the presence of zinc-induced Tau aggregates (black curve) and in the presence of heparin-induced Tau aggregates (blue line) used as positive control.

species (Fig. 3a, b) and the formation of oligomers too large to be properly monitored by DLS. Further investigation of formed structures by electron microscopy revealed the existence of large ($>10\ \mu\text{m}$) aggregates (Fig. 3e), which are in a good agreement with our DLS experiment. Indeed, as shown in the correlograms (Fig. 3d), as the concentration of zinc increases, the decay time increases, which indicates an increase in Tau size. Characterization of Tau oligomerization using ThT assay (Fig. 3g) did not reveal the presence of amyloid-like structures.

When the temperature was then decreased from 40 to 10 °C, we observed the reappearance of low-size species with a $Dv50$ of $11.3 \pm 2.5\ \text{nm}$ in the presence of 120 μM zinc (Table 1), which indicates that the oligomerization induced by zinc at 40 °C is reversible. Moreover, chelation of zinc ions with high excess of EDTA (2 mM) at 40 °C also led to complete dissociation of aggregates, which returned to the same size distribution as it was before addition of zinc ions (Table 1). We have thus shown that reducing temperature can reverse the effect of zinc oligomerization of Tau and that removal of zinc at high temperatures can also reverse the oligomerization of Tau.

Discussion

Zinc, which plays an important role in many physiological processes, has been implicated in the molecular mechanisms of many NDs by favoring aggregation of proteins such as amyloid beta, FUS, TDP-43 [21,30]. Recent *in vitro* studies showed that zinc could also impact Tau aggregation into PHF, a hallmark of several tauopathies. Nevertheless, the conclusions from these studies were limited by the fact that the oligomerization of Tau into PHFs was induced by heparin.

Here, for the first time, we demonstrated that the presence of the zinc ions combined with increased temperature is sufficient to induce a fast oligomerization of Tau, and that it is reversible. Indeed, we have found that in the presence of equimolar zinc concentration, Tau oligomerizes at 50 °C, while the increase of molar ratio of Zn/Tau to 2 decreases the temperature of oligomerization to 32 °C (Fig. 1), thus potentially impacting physiological function of Tau. Similar interplay between ions and temperature of polymerization has already been observed in other important physiological systems such as Mg^{2+} /tubulin wherein tubulin polymerization depends both on temperature and Mg^{2+} concentration [31].

Characterization of Zn/Tau binding by ITC at different temperatures allowed us to demonstrate that the thermodynamics of the interaction is the same whether Tau oligomerizes or not. Indeed, the binding isotherms registered at 10 °C (where oligomerization is only triggered by high zinc concentrations) and

45 °C (where oligomerization starts at the beginning of titration) are almost identical. At both temperatures, ITC demonstrates the existence of two types of sites, one site with a high affinity ($K_a = 2.0 \pm 0.5 \times 10^6\ \text{M}^{-1}$) and three sites with a low affinity ($K_a = 5.9 \pm 1.7 \times 10^4\ \text{M}^{-1}$), which could have different functions. DLS showed that upon saturation of the high-affinity site, the hydrodynamic diameter of Tau species dropped from 12.2 to 10.8 nm and remained stable at $10.5 \pm 0.22\ \text{nm}$ until a molar ratio Zn/Tau of 2.3 (Fig. 3b). This suggests a partial folding of Tau with an increase in homogeneity as shown by the PDI. This is also in agreement with the unfavorable entropy of zinc binding found by ITC for this site. This first high-affinity site corresponds to the one localized in the R2–R3 Tau region in which zinc is chelated by two Cys and two His amino acids, as previously proposed [23,25]. Such binding would be accompanied by the folding of Tau in R2–R3 as a hairpin, which is in good agreement with our DLS data that showed a compaction of the molecule. The three low-affinity sites may be responsible for the oligomerization process. Indeed, at 40 °C, we start to detect oligomerization by DLS at Zn/Tau around 2, when zinc starts to bind to these low-affinity sites, as it can be seen from ITC titration curve (Fig. 2). Interestingly, the hydrodynamic size of Tau monomer species continues to decrease (down to $8.9 \pm 1.2\ \text{nm}$) as zinc binds to auxiliary sites, pointing to a further Tau folding (Fig. 3c). This leads us to propose that zinc binding to both types of sites induces a structural change that may have a consequence on Tau physiological functions.

It should be stressed that, contrary to heparin-induced fibrillization of Tau in most PHF models, zinc-induced oligomerization of Tau is a reversible process with fast kinetics. Indeed, chelation of zinc ions using EDTA, or a decrease of temperature instantly led to dissociation of oligomers. Contrary to ThT-positive irreversible aggregates formed in the presence of heparin, oligomers induced by zinc ions were not only reversible but also ThT-negative which indicates that the oligomers in the absence of heparin formed are not amyloid like. Most of the previous studies of Tau self-association *in vitro* were carried out in the presence of agents such as heparin or arachidonic acid [27,28] and led to generation of irreversible structures. It has been hypothesized, and widely accepted, that irreversible Tau aggregation leading to PHFs found in neurons of patients affected with ND would be preceded by a stage of reversible Tau multimers formation [26]. In our study, for the first time, we were able to reproduce a reversible oligomerization of Tau proteins in the presence of Zn without any additional non-physiological additives. Thus, our experimental conditions could constitute a useful model to study Tau multimerization *in vitro*.

The reversibility of Tau structures observed in our experiments also allows us to hypothesize that

oligomers could be induced in cells by zinc signals under physiological conditions and play a role in Tau regulation, modulating its numerous functions [1]. For example, zinc was found to be involved in regulation of Tau interaction with DNA [32]. More generally, zinc is abundantly present in the brain where it plays an important role in axonal and synaptic transmission [33,34]. It is highly concentrated in the synaptic vesicles of several types of neurons [35]. The majority of zinc ions in cell are bound to metalloproteins, which have metal binding affinities in the nM and even in pM range. The physiological concentration of free Zn^{2+} in cells is considered to be between around 1 and 10 nM [36,37], which locally would be sufficient to bind to Tau and modulate its activity. Thus, the observed binding constants that we determined are consistent with the possible physiological role of Zn in Tau regulation.

Conclusion

In conclusion, we demonstrated for the first time that zinc can induce a reversible polymerization of Tau. This process could have a significant function

in the brain and nervous system where zinc is known to be abundant. Our data, which demonstrate that zinc favors Tau self-assembly at near physiological temperatures, support the idea that zinc could be implicated both in the pathological aggregation of Tau and in tau regulation. As summarized in Fig. 4, while the right part depicts the irreversible cascade leading to the formation of neurofibrillary tangles, the left part depicts a pathway that would ultimately lead to the formation of reversible granular aggregates of Tau, which could have a sequestration purpose. Since tau phosphorylation is known to have physiological and pathological consequences [38], impact of tau phosphorylation on this pathway will need to be addressed. We have also shown the existence of two types of sites (one main and three auxiliary ones) that gradually modulate Tau structure enabling zinc to be a subtle modulator of Tau activity. In order to understand how zinc ions can impact physiological Tau oligomerization, it will be important to identify the specific amino acids responsible for binding of those auxiliary zinc ions and the structure of such oligomers. Likewise, confirming that this reversible oligomerization of Tau is part of a concurrent pathway will have important consequences in ND research.

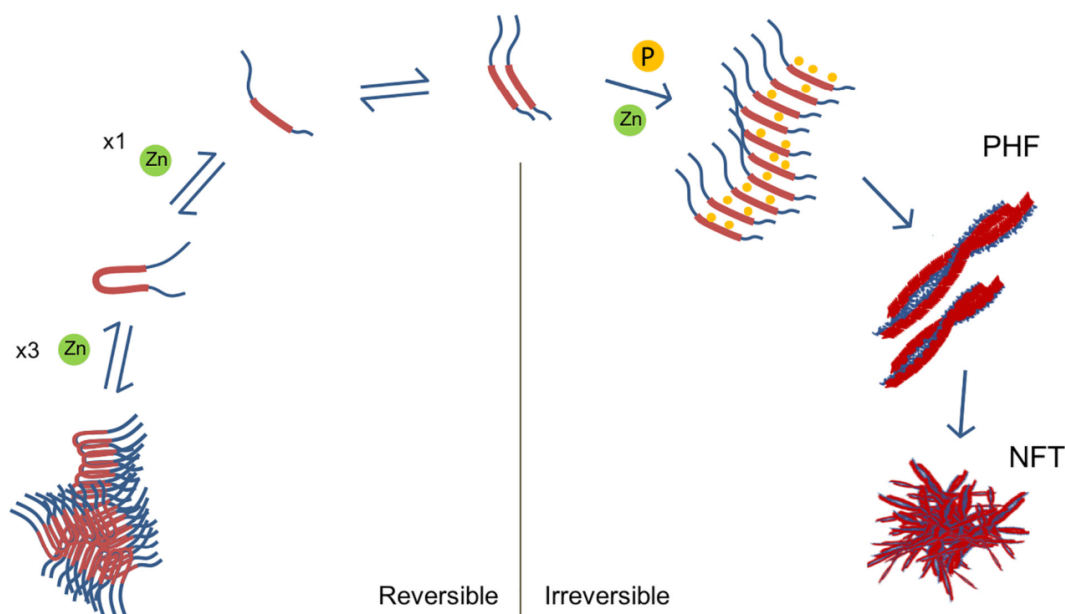


Fig. 4. Model. The right part of the scheme corresponds to the pathway leading to PHFs and neurofibrillary tangle formation. This pathway is globally irreversible and favored by post-translational modifications such as (hyper) phosphorylation of Tau and Zn^{2+} . The left part of the scheme summarizes our findings: in the presence of low Zn^{2+} concentrations, Tau undergoes compaction; in the presence of high Zn^{2+} concentrations, it leads to the formation of granular Tau oligomers. This pathway is fully reversible.

Materials and Methods

Protein purification

Human Tau (hTau40) was expressed in *Escherichia coli* and purified as described previously [39]. Tau could thus be directly resuspended before use in the appropriate buffer. Protein was passed through the Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Scientific) to equilibration in Tris 50 mM and TCEP 1 mM (pH 7.5) buffer before being used for experiments. TCEP was used to maintain Tau in a reduced state. Its concentration was measured at 280 nm using extinction a coefficient of $7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [31].

ITC

Binding of zinc to Tau was analyzed by ITC using MicroCal iTC200 as described previously [40,41]. Experiments were performed at 10 and 45 °C and in 50 mM Tris buffer in the presence of 1 mM TCEP at pH 7.5. Tau concentration in the calorimetric cell was 30 μM , whereas the ZnCl_2 concentration in the syringe was 600 μM . Tau was titrated by repeated injections of 2 μL aliquots of zinc solution. At the end of titration, the cell contained the mixture of zinc and Tau with the molar ratio equal to 4:1. The syringe was refilled with the same zinc solution without cell refilling, and the titration was continued until the final ratio of 8:1. Each resulting titration peak was integrated and plotted as a function of the Tau/tubulin molar ratio. The baseline was measured by injecting ZnCl_2 into the protein-free buffer solution. Data were analyzed using Origin software and were fitted with a “two set of sites” model via a non-linear least squares minimization method and led to the determination of affinity constants (K_a) and enthalpy changes (ΔH). Thermodynamic values are an average of at least three different experiments.

Turbidimetry

Tau polymerization was monitored by turbidimetry (A 350 nm) using a PerkinElmer spectrophotometer Lambda 800 (PerkinElmer) and a Prometheus NT. Plex (Nanotemper) instrument equipped with absorbance module with a heating rate of 1 K/min. Purified Tau (30 μM) was equilibrated in 50 mM Tris and 1 mM TCEP (pH 7.5) buffer in the absence or in the presence of zinc and incubated at 5 °C. Polymerization was initiated by temperature increase to 40 °C and reversed by cooling sample to 13 °C.

DLS

DLS experiments were carried out to determine the hydrodynamic diameter of Tau in the presence and absence of zinc using a Zetasizer Nano ZS

(Malvern Instruments) with a scattering angle of 173°. Particles in solution are in constant random motion and the intensity of their scattered light fluctuates with time. To determine the hydrodynamic diameter (D_h), the provided software uses the Stokes–Einstein relation to obtain the intensity averaged size distribution from the raw correlation data. The correlogram displays much information about the sample. The time at which the correlation starts to decay is an indication of the mean size of the sample. Smaller samples fluctuate quicker than larger samples in solution. The steeper the exponential decay, the more monodisperse (single population) the sample, and the more the decay is extended the greater the sample polydispersity (several populations) which is indicated by the Pdi. To analyze Tau, DLS was performed at temperatures ranging from 10 to 40 °C. For each assay, three measurements were performed; each one consisting in 10–15 runs of 10 s. Tau was analyzed at 30 μM in 50 mM Tris and 1 mM TCEP (pH 7.5) following centrifugation for 15 min at 14,000 rpm at 6 °C. The overall thermostability and aggregation of Tau was tested in the absence and presence of 10–120 μM of ZnCl_2 . To determine the hydrodynamic diameter (D_h), the viscosity and refractive index values of the dispersion medium were used in the Stokes–Einstein equation. In our case, we used a viscosity of 1.3198 cP and a refractive index of 1.331 (at 10 °C). Results were displayed as volume and intensity size distributions including the overall mean size (Z-average) using the Zetasizer software 7.12 with a detailed high-resolution spectrum of 300 classes. All experiments were performed at least in triplicates.

Fluorescence ThT assay

ThT assay, which is a common marker of amyloid fibrils, was performed as described before [42] with some modifications. Briefly, samples of 30 μM Tau alone or Tau with 8-fold excess of ZnCl_2 were mixed with ThT. Fluorescence spectra were acquired in 0.2 (excitation direction) $\times$ 1 cm (emission) cells (Hellma) thermostated at $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ without pre-incubation. Excitation was at 440 nm and emission spectra were recorded from 460 to 520 nm with slit widths of 15/15 nm using a PerkinElmer LS 55 fluorescence spectrometer operating at a PM of 800 V.

Transmission electron microscopy

Four microliters of incubated Tau samples (30 μM) was placed on carbon-coated copper grids (300 mesh) for 1 min. After blotting, grids were washed with distilled water and blotted again, and negatively stained for 30 s with 2% (wt/vol) uranyl acetate as previously described [21]. The grids were then dried and observed with a JEOL 2200FS transmission electron microscope (Tokyo, Japan) operating at

200 kV. Images were recorded using a 4k × 4k slow-scan CCD camera (Gatan, Inc., Pleasanton, USA).

CRedit authorship contribution statement

Andrei Yu. Roman: Formal analysis. **François Devred:** Conceptualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - review & editing. **Deborah Byrne:** Methodology, Writing - review & editing. **Romain La Rocca:** Formal analysis. **Natalia N. Ninkina:** Writing - review & editing. **Vincent Peyrot:** Writing - review & editing. **Philipp O. Tsvetkov:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Acknowledgments

Microcalorimetry and turbidimetry experiments were performed in Timone Microcalorimetry Platform, PINT, Marseille, France. This study is a part of PhD research of A.Y.R. funded by “Doctoral scholarships Metchnikov” from the French embassy in Moscow. We are grateful to Prof. Rosalind John for reading the manuscript and for valuable comments.

Ethics Approval and Consent to Participate: Not applicable.

Consent for Publication: Not applicable.

Availability of Data and Materials: All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Funding: A.Y.R. was funded by a Metchnikov grant from the French Embassy of Moscow.

Authors Contributions: A.Y.R. purified the recombinant protein and performed all experiments; F.D. supervised the experiments and wrote the manuscript; D.B. performed DLS data analysis and wrote the manuscript; R.L.R. performed experiments; V.P. and N.N.N. supervised the research; P.O.T. designed the research, performed data analysis and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Received 5 June 2018;

Received in revised form 14 December 2018;

Accepted 14 December 2018

Available online xxxx

Keywords:

Tau;
zinc;
aggregation self-assembly

Abbreviations used:

MT, microtubule; ND, neurodegenerative diseases; AD, Alzheimer's disease; PD, Parkinson's disease; PHF, paired helical filaments; ThT, thioflavin T; ITC, isothermal titration calorimetry; DLS, dynamic light scattering.

References

- [1] I. Sotiropoulos, M.C. Galas, J.M. Silva, E. Skoulakis, S. Wegmann, M.B. Maina, et al., Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein, *Acta Neuropathol. Commun.* 5 (2017) 91.
- [2] Y. Wang, E. Mandelkow, Tau in physiology and pathology, *Nat. Rev. Neurosci.* 17 (2016) 5–21.
- [3] M. Goedert, M.G. Spillantini, Propagation of Tau aggregates, *Mol. Brain* 10 (2017) 18.
- [4] M. Goedert, A. Klug, R.A. Crowther, Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.* 9 (2006) 195–207.
- [5] S.M. Ward, D.S. Himmelstein, J.K. Lancia, L.I. Binder, Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease, *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 667–671.
- [6] T.A. Shelkova, A.A. Kulikova, F.O. Tsvetkov, O. Peters, S.O. Bachurin, V.L. Bukhman, et al., Proteinopathies—forms of neurodegenerative disorders with protein aggregation-based pathology, *Mol. Biol. (Mosk)* 46 (2012) 402–415.
- [7] A. Mudher, M. Colin, S. Dujardin, M. Medina, I. Dewachter, S.M. Alavi Naini, et al., What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol. Commun.* 5 (2017) 99.
- [8] F. Kametani, M. Hasegawa, Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.* 12 (2018) 25.
- [9] A. Ochalek, B. Mihalik, H.X. Avci, A. Chandrasekaran, A. Teglas, I. Bock, et al., Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation, *Alzheimers Res. Ther.* 9 (2017) 90.
- [10] T.F. Gendron, L. Petrucelli, The role of tau in neurodegeneration, *Mol. Neurodegener.* 4 (2009) 13.
- [11] J.E. Gerson, K.M. Farmer, N. Henson, D.L. Castillo-Carranza, M. Carretero Murillo, U. Sengupta, et al., Tau oligomers mediate alpha-synuclein toxicity and can be targeted by immunotherapy, *Mol. Neurodegener.* 13 (2018) 13.
- [12] S. Moussaud, D.R. Jones, E.L. Moussaud-Lamodièrre, M. Delenclos, O.A. Ross, P.J. McLean, Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration? *Mol. Neurodegener.* 9 (2014) 43.
- [13] A.C. Kim, S. Lim, Y.K. Kim, Metal ion effects on Aβeta and tau aggregation, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018).
- [14] T. Kimura, G. Sharma, K. Ishiguro, S.I. Hisanaga, Phospho-tau bar code: analysis of phosphoisotypes of tau and its application to tauopathy, *Front. Neurosci.* 12 (2018) 44.
- [15] M. Inoue, S. Kaida, S. Nakano, C. Annoni, E. Nakata, T. Konno, et al., Phosphorylation regulates fibrillation of an aggregation core peptide in the second repeat of microtubule-binding domain of human tau, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6471–6480.
- [16] S.L. Forrest, J.J. Kril, C.H. Stevens, J.B. Kwok, M. Hallupp, W.S. Kim, et al., Retiring the term FTDP-17 as MAPT mutations are genetic forms of sporadic frontotemporal tauopathies, *Brain* 141 (2018) 521–534.

- [17] S.A. Kozin, A.A. Kulikova, A.N. Istrate, P.O. Tsvetkov, S.S. Zhokhov, Y.V. Mezentshev, et al., The English (H6R) familial Alzheimer's disease mutation facilitates zinc-induced dimerization of the amyloid-beta metal-binding domain, *Metallomics* 7 (2015) 422–425.
- [18] A.D. Efimova, R.K. Ovchinnikov, A.Y. Roman, A.V. Maltsev, V.V. Grigoriev, E.A. Kovrazhkina, et al., The FUS protein: physiological functions and a role in amyotrophic lateral sclerosis, *Mol. Biol. (Mosk)* 51 (2017) 387–399.
- [19] A.A. Valiente-Gabioud, V. Torres-Monserrat, L. Molina-Rubino, A. Binolfi, C. Griesinger, C.O. Fernandez, Structural basis behind the interaction of Zn(2+) with the protein alpha-synuclein and the Abeta peptide: a comparative analysis, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 334–341.
- [20] A. Caragounis, K.A. Price, C.P. Soon, G. Filiz, C.L. Masters, Q.X. Li, et al., Zinc induces depletion and aggregation of endogenous TDP-43, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1152–1161.
- [21] C. Garnier, F. Devred, D. Byrne, R. Puppo, A.Y. Roman, S. Malesinski, et al., Zinc binding to RNA recognition motif of TDP-43 induces the formation of amyloid-like aggregates, *Sci. Rep.* 7 (2017) 6812.
- [22] P.O. Tsvetkov, A.Y. Roman, V.E. Baksheeva, A.A. Nazipova, M.P. Shevel'yova, V.I. Vladimirov, et al., Functional status of neuronal calcium sensor-1 is modulated by zinc binding, *Front. Mol. Neurosci.* 11 (2018).
- [23] Z.Y. Mo, Y.Z. Zhu, H.L. Zhu, J.B. Fan, J. Chen, Y. Liang, Low micromolar zinc accelerates the fibrillization of human tau via bridging of Cys-291 and Cys-322, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 34648–34657.
- [24] A.C. Jiji, A. Arshad, S.R. Dhanya, P.S. Shabana, C.K. Mehjabin, V. Vijayan, Zn(2+) interrupts R4-R3 association leading to accelerated aggregation of tau protein, *Chemistry* 23 (2017) 16976–16979.
- [25] J.Y. Hu, D.L. Zhang, X.L. Liu, X.S. Li, X.Q. Cheng, J. Chen, et al., Pathological concentration of zinc dramatically accelerates abnormal aggregation of full-length human Tau and thereby significantly increases Tau toxicity in neuronal cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (2017) 414–427.
- [26] T. Arendt, J. Stieler, A.M. Strijkstra, R.A. Hut, J. Rudiger, E.A. Van der Zee, et al., Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals, *J. Neurosci.* 23 (2003) 6972–6981.
- [27] M.E. King, T.C. Gamblin, J. Kuret, L.I. Binder, Differential assembly of human tau isoforms in the presence of arachidonic acid, *J. Neurochem.* 74 (2000) 1749–1757.
- [28] Y. Mutreja, T.C. Gamblin, Optimization of in vitro conditions to study the arachidonic acid induction of 4R isoforms of the microtubule-associated protein tau, *Methods Cell Biol.* 141 (2017) 65–88.
- [29] Z. Yu, J.C. Reid, Y.P. Yang, Utilizing dynamic light scattering as a process analytical technology for protein folding and aggregation monitoring in vaccine manufacturing, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 4284–4290.
- [30] H. Kozłowski, M. Luczkowski, M. Remelli, D. Valensin, Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases), *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 2129–2141.
- [31] F. Devred, P. Barbier, S. Douillard, O. Monasterio, J.M. Andreu, V. Peyrot, Tau induces ring and microtubule formation from alphabeta-tubulin dimers under nonassembly conditions, *Biochemistry* 43 (2004) 10520–10531.
- [32] K. Asadollahi, G. Riazi, A. Rabbani Chadegani, S. Rafiee, DNA-binding mode transition of tau in the presence of zinc ions, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2017) 1–9.
- [33] A. Takeda, Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain, *Biometals* 14 (2001) 343–351.
- [34] S.D. Gower-Winter, C.W. Levenson, Zinc in the central nervous system: from molecules to behavior, *Biofactors* 38 (2012) 186–193.
- [35] P. Paoletti, A.M. Vergnano, B. Barbour, M. Casado, Zinc at glutamatergic synapses, *Neuroscience* 158 (2009) 126–136.
- [36] D.J. Eide, Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc, *Biochim. Biophys. Acta* 2006 (1763) 711–722.
- [37] X.Y. Sun, Y.P. Wei, Y. Xiong, X.C. Wang, A.J. Xie, X.L. Wang, et al., Synaptic released zinc promotes tau hyperphosphorylation by inhibition of protein phosphatase 2A (PP2A), *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 11174–11182.
- [38] W.H. Stoothoff, G.V. Johnson, Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences, *Biochim. Biophys. Acta* 2005 (1739) 280–297.
- [39] T. De Bessa, G. Breuzard, D. Allegro, F. Devred, V. Peyrot, P. Barbier, Tau interaction with tubulin and microtubules: from purified proteins to cells, *Methods Mol. Biol.* 1523 (2017) 61–85.
- [40] P.O. Tsvetkov, P. Barbier, G. Breuzard, V. Peyrot, F. Devred, Microtubule-associated proteins and tubulin interaction by isothermal titration calorimetry, *Methods Cell Biol.* 115 (2013) 283–302.
- [41] P.O. Tsvetkov, A.A. Makarov, S. Malesinski, V. Peyrot, F. Devred, New insights into tau-microtubules interaction revealed by isothermal titration calorimetry, *Biochimie* 94 (2012) 916–919.
- [42] D. Sui, M. Liu, M.H. Kuo, In vitro aggregation assays using hyperphosphorylated tau protein, *J. Vis. Exp.* 95 (2015), e51537. <https://doi.org/10.3791/51537>.

Le zinc interagit avec la protéine tau via 3 sites et induit son agrégation réversible

La seconde partie de ma thèse a consisté à localiser les sites d'interaction du zinc sur la protéine tau. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'ITC, de DLS et de turbidimétrie dans notre laboratoire en utilisant plusieurs constructions de la protéine tau, ainsi que des expériences de RMN en collaboration avec la plateforme du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires (LISM, UMR 7255) à Marseille. Nos résultats montrent que le zinc se fixe de façon séquentielle dans un premier temps au niveau des séquences répétées de la protéine (H299, C322, H329 et H330), puis dans un second temps dans sa partie C-terminale (H362, H374, H388 et H407). Enfin, un troisième site de liaison se localise dans la partie N-terminale de la protéine (H14, H32, H94 et H121), mais se comporte de façon indépendante vis-à-vis du schéma de fixation précédemment cité. Ces résultats ont permis de modéliser la structure de ces trois sites par des simulations Monte Carlo réalisées par le département de Bio-ingénierie et de Bio-informatique de l'Université de Moscou. Les expériences de DLS et de turbidimétrie ont révélé que ce second site est responsable de l'agrégation de tau induite par le zinc, notamment via les résidus H388 et H407.

Cette étude complète notre premier article, en définissant précisément le mécanisme moléculaire à l'origine de l'agrégation de tau induite par le zinc, et en identifiant des acides aminés clés impliqués dans ce processus.

Identification of Zinc-binding sites of tau

(under revision, Journal of Molecular Biology)

Romain La Rocca¹, Philipp O. Tsvetkov^{1,2*}, Andrey V. Golovin^{3,4,5}, Géraldine Ferracci², Diane Allegro¹, Pascale Barbier¹, Soazig Malesinski¹, Françoise Guerlesquin⁶, François Devred^{1,2*}.

¹Aix-Marseille Univ, CNRS, UMR 7051, INP, Inst Neurophysiopathol, Fac Médecine, Marseille, France;

²Aix-Marseille Univ, CNRS, PINT, Plateforme INteractome Timone, Fac Médecine, Marseille, France;

³Bioengineering and Bioinformatics Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, 119992 Moscow, Russian Federation;

⁴ Institute of Molecular Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Moscow, 119992, Russia;

⁵ National Research University HSE, Myasnitskaya Str. 20, Moscow, 101000, Russia;

⁶ Aix-Marseille Univ, CNRS, UMR 7255, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille, France.

* Corresponding authors: francois.devred@univ-amu.fr ; philipp.tsvetkov@univ-amu.fr

Authors e-mail: RLR: romain.la-rocca@univ-amu.fr; POT: philipp.tsvetkov@univ-amu.fr;

AVG: golovin.andrey@gmail.com; GF: geraldine.ferracci@univ-amu.fr; DA :

diane.allegro@univ-amu.fr; PB: pascale.barbier@univ-amu.fr; SM :

soazig.malesinski@univ-amu.fr; FG: guerlesquin@imm.cnrs.fr; FD:

francois.devred@univ-amu.fr

Abstract

Tau protein has been extensively studied due to its key roles in microtubular cytoskeleton regulation and in the formation of irreversible aggregates found in many neurodegenerative processes. It has been previously shown that zinc participates in regulation and aggregation of tau. However, the molecular mechanisms of zinc binding to tau and the location of zinc binding sites on tau protein are not yet known. Using ITC and NMR of tau and its mutants we identified three zinc binding sites located in the N-terminus, the repeats domain and the C-terminus of tau. We found that the N-terminal site is independent, while a low-affinity zinc-binding site in the C-terminus forms only after zinc binding to the high-affinity site in the repeats domain. Using molecular simulations we calculated the structure of each site in complex with zinc. The turbidity assays showed that the C-terminal site plays the major role in zinc-induced tau aggregation. In particular, the mutations of histidines 388 or 407 abolished zinc-induced aggregation. Based on our results, we propose a model of zinc-induced temperature-dependent reversible aggregation of tau, allowing a better understanding of both the physiological and pathological processes associated with tau-zinc interaction.

Keywords: Tau aggregation, zinc, binding sites, NMR, calorimetry

Abbreviations: AD: Alzheimer's Disease; PD: Parkinson's Disease; PHFs: Paired Helical Filaments; ITC: Isothermal Titration Calorimetry; NMR: Nuclear Magnetic Resonance; HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation; BMRB: Biological Magnetic Resonance Bank; WT: wild type; HA: high affinity; LA: low affinity; DLS: dynamic light scattering; TCI : Triple Resonance Probe; TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine;

Introduction

Microtubule-associated protein tau plays a central role in cytoskeleton dynamicity via its regulatory activity on microtubule dynamics, which impacts microtubule functions in various processes such as cell division and axonal stability in neurons [1,2]. Tau has also been shown to be associated with a number of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and frontotemporal lobar degeneration [3–5]. In these Tauopathies, tau forms neurofibrillary tangles, which consist of stacked paired helical filaments (PHFs) of hyper-phosphorylated tau molecules [6]. Among the endogenous factors that have been shown to favor tau aggregation, zinc seems to play an important role, similarly to its role in aggregation of other proteins implicated in neurodegeneration. Indeed, zinc has been identified as a factor favoring the aggregation of amyloid- β [7], FUS/TLS [8], TDP-43 [9,10] and tau [11]. Zinc has been shown to increase the toxicity of tau in cells [12] mainly through an interaction with tau. More recently, this effect was confirmed in neurons where zinc induces cell death through the acceleration of tau aggregation [13,14]. Several works proved that zinc can also accelerate aggregation of purified tau constructs [11,15,16], thus confirming the direct effect of zinc on tau. In addition, zinc has been recently shown to induce the formation of reversible aggregation of tau [17,18], and to promote liquid-liquid phase separation (LLPS) of tau [19,20] which could either be part of the early stages of pathological aggregation or a physiological concurrent pathway.

Despite the importance of zinc binding to tau, the exact binding sites are not currently known. Two reports have already addressed this question and implicated seven residues located in the R2-R3 repeat region of tau (C291, C322, H268, H299, H329, H330, and H362) [11,13]. More precisely, the cysteines located in the repeated regions of tau (C291 and C322) were identified as the core of the interaction between a tau peptide (244-372) and zinc (Figure 1). Two other studies highlighted the binding of zinc in the repeated

regions using the R3 repeat only [14] and a tau construct lacking the R2 repeat [15]. Two other recent studies conducted by ITC and mass spectrometry suggested presence of additional lower-affinity sites on tau [16,17]. We have recently proposed that these sites are responsible for the self-assembly of tau [17]. However, the exact nature and location of these elusive sites remained unknown.

In this work we used a combination of NMR, ITC, turbidimetry and DLS assays to identify and characterize the zinc binding sites on tau protein. We pinpoint the zinc-binding residues in the high affinity binding site in the R2R3 region and uncover the existence of two novel lower affinity binding sites in N and C terminal parts of tau. We also provide insights into the sequential mechanism of zinc binding to tau and highlight the importance of the C-terminal region in this reversible tau aggregation.

Results

Localization of zinc-binding sites

Many studies have concluded that the amino acids responsible for zinc binding to tau are located in the R2R3 repeat region of tau [11,12,14,15]. More recently it was suggested that additional sites would exist most likely located outside of this repeat region [16,17]. In order to identify the zinc binding sites on tau protein, we performed ¹⁵N-HSQC NMR on tau first in the absence and then in the presence of zinc. Since the amino acid assignment is not complete for full length tau [21], based on the existing attributions, we conducted two separate sets of NMR experiments, first on the peptide pR2R3, to identify the amino acids implicated in zinc binding in the repeat region, and on full-length tau, to identify the amino acids implicated in zinc binding outside of the repeat region (Figure S1).

Identification of zinc binding residues in R2R3 region of tau

To first explore the R2R3 repeat domain of tau, we recorded the ^{15}N -HSQC spectrum at ^{15}N -natural abundance on pR2R3 peptide (pR2R3, Figure 1) in the absence of zinc (Figure 2A, orange peaks). Using the assignment already published for this region (BMRB entry 19253, [22]), we identified cross-peaks corresponding to all Cys and His residues in this region (C291, H299, C322, H329 and H330). It should be noted that the cross-peak corresponding to C291 was split, suggesting the existence of two possible conformations for this residue.

In the presence of zinc (Figure 2A, blue peaks), only the cross-peaks corresponding to H299, C322, H329 and H330 were shifted, indicating that these four residues of the R2R3 region bind to zinc. Interestingly, the addition of zinc only slightly influenced the splitting of C291 cross peak thus possibly favoring one of the two conformations, but not contributing to zinc binding.

Identification of zinc binding residues in N- and C-terminal regions of tau

To explore the N and C-terminal regions of tau, first we recorded the ^{15}N -HSQC spectrum of full-length tau (Figure 1, tau-WT) in the absence of zinc (Figure 2B, orange peaks). Using the previously published amino-acid assignment map (BMRB entry 17920, [21]), we identified the cross-peaks corresponding to H14, H32, H94 and H121 in the N-terminal region. Since none of the four C-terminal histidines are assigned in this map, we generated single amino-acids mutants for each of the four histidines (Figure 1, tau-H362A, tau-H374A, tau-H388A, and tau-H407A) and recorded ^{15}N -HSQC spectra of these mutants (Figure S2, orange peaks), thus identifying the cross-peaks corresponding to H362, H374, H388 and H407 on the full-length tau spectrum (Figure 2B, orange peaks).

In order to confirm that all the cross peaks we identified as histidines in the N-terminal region are indeed histidines, ^{15}N -HSQC spectrum of full-length tau was recorded at two different pH (pH 6.1 and pH 6.7) to bring the pH closer to the pKa of histidine. Indeed the

cross-peaks corresponding to putative histidine shifted between the two conditions (Figure 2C, green and red peaks).

Having now identified all the histidines in the C-terminal and N-terminal regions, we performed NMR on full-length tau in the presence of zinc (Figure 2B, blue peaks). The addition of zinc induced a shift of cross-peaks of H14, H32, H94, H121, H362, H374, H388 and H407, which indicated that these residues participate in the chelation of zinc. As expected, cross-peaks corresponding to amino-acids in the proximity of these histidines were also shifted (Figure S3). Considering the localization of the histidines we identified, our results let us hypothesize the existence of two additional binding sites : one binding site in C-terminal (H362, H374, H388 and H407) and one binding site in N-terminal (H14, H32, H94, H121)

Zinc binding sites in N- and C-terminal regions are independent

In order to demonstrate that the eight identified histidines form two separate independent sites at the N-terminal and in C-terminal of tau, we performed NMR on one of the C-terminal mutated form of tau (Figure 1, tau-H374A) in the presence of zinc (Figure 2D). Upon mutating this amino acid, the cross peaks corresponding to the other three histidine residues located at the C-terminus did not shift anymore after adding zinc. However, this mutation in the C-terminal did not have any impact on zinc-dependent shifting of the cross-peaks corresponding to the histidines in the N-terminal region (H14, H32, H94 and H121). This indicated the existence of two independent zinc binding sites, one in the C-terminal and one in the N-terminal region.

In summary, NMR experiments revealed the presence of three zinc-binding sites in tau, involving histidine and cysteine residues, with one site located in the R2R3 region, and two independent N-terminal and C-terminal sites.

Modelisation of zinc binding sites of tau

NMR data allowed us to modelize the three sites identified in our study with a molecular simulation using three small tau peptides encompassing each zinc binding site. N-terminal site was modeled using Tau peptide (13-122) (Figure 3A), R2R3 site was modeled using Tau peptide (298-331) (Figure 3B), and the C-terminal site was modeled using Tau peptide (361-408) (Figure 3C). In all three cases molecular modelisation revealed that the presence of zinc induced a more condensed conformation of tau by bringing together amino acids that would otherwise be distant. This compaction may result in a more globular shape of tau, which is in agreement with previous published DLS data [17].

Sequential binding of zinc to tau

To investigate the thermodynamics of zinc binding to tau protein we studied its interaction with wild type tau and its mutants using isothermal titration calorimetry. First, the heat exchange upon zinc binding to tau-WT was measured at 10°C (Figure 4). The obtained data could be fitted by two models : a two-sets-of-sites model with a stoichiometry of 3 and a two-sites sequential-binding model (Table 1). With a two-sets-of-sites model, we obtained one high affinity binding site ($K_a = 2.1 \pm 0.7 \times 10^6$) and two low affinity ones ($K_a = 5.0 \pm 1.6 \times 10^4$), while with a two-sites sequential-binding model we obtained one high affinity binding site ($K_a = 1.3 \pm 0.2 \times 10^6$) and one low affinity site ($K_a = 2.7 \pm 0.3 \times 10^4$). In both models, there was a high-affinity site with a favorable enthalpy and an unfavorable entropy, while the low-affinity site(s) are both enthalpy and entropy favorable (Table 1). Two-sites sequential binding model fitted well, while NMR data revealed three binding sites. This would not be contradictory with the fact we found three sites by NMR, if one of the low affinity sites has a $\Delta H=0$ and thus is not visible by ITC.

Since ITC of tau-WT does not allow us to distinguish between the 2 models, we generated two constructs : one missing all eight zinc binding residues in C- and N- terminal regions

(Figure 1, tau-HA) and one missing all four zinc binding in the R2R3 region (Figure 1, tau-LA). Then, ITC of zinc binding to tau-HA (Figure 4, orange curve) resulted in a calorimetric curve that could now be fitted directly with a one-set-of-site model with stoichiometry of 0.8 ± 0.1 , an affinity constant of $1.7 \pm 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, an enthalpy $\Delta H_1 = -7.4 \pm 0.3 \text{ kcal/mol}$ and an entropy $\Delta S_1 = -2.31 \text{ cal/mol/deg}$ (Table 1). Thus, the absence of low-affinity zinc binding sites in this mutant indicated that the high affinity site was located in the R2R3 region, which is consistent with previously published data [11,13–15]. Moreover, ITC titration by zinc of tau-LA in which all cysteines and histidines located in the R2R3 region are mutated (Figure 1, tau-LA) was not accompanied by any heat exchange (Figure 4, brown curve), which indicated that no zinc binding to tau can be detected by ITC in the absence of prior zinc binding in the R2R3 region of tau. At last, SPR experiments on tau-WT, tau-LA and tau-HA in the presence of zinc (Figure S4) confirmed the existence of at least one low-affinity binding of zinc on tau-WT.

Thus, our results with tau mutants allowed distinguishing between the two models proposed after Tau-WT experiments, favoring a sequential binding.

Tau aggregation is triggered by zinc binding to C-terminal low affinity site

In order to determine the role of the zinc-binding sites in the reversible aggregation of tau, we used turbidimetry assays that allow following the reversible aggregation of tau upon heating [17]. The sample containing tau-WT and zinc was heated from 15°C to 40°C while measuring the turbidity at 350 nm (Figure 5A, blue curve). In these conditions, the turbidity increased at 20°C, indicating that zinc was able to trigger the temperature reversible aggregation of tau described recently [17]. DLS experiments revealed the absence of the monomeric peak with the formation of particles that are out of the range of DLS detection (Figure S5A, blue curve), and a slow decay time of the correlation coefficient in the presence of zinc (Figure S5B, blue curve). This indicates that zinc induces the formation

of large particles in solution, in line with the results obtained by turbidimetry. The control experiments without zinc showed no increase in turbidimetry upon heating (Figure 5A, blue dotted curve). Moreover, DLS experiments revealed a size-by-volume peak corresponding to the monomeric state of tau (Figure S5A, blue dotted curve) and a fast decay time in DLS correlogram (Figure S5B, blue dotted curve), confirming that the aggregation observed for tau-WT was zinc-dependent .

When the same experiments were performed with tau-LA (mutant lacking the high affinity R2R3 binding site) no turbidity increase was observed (Figure 5A, brown curves). Moreover, a size-by-volume peak corresponding to the monomeric state of tau (Figure S5A, brown curves) and a late decay time of the DLS correlation function (Figure S5B, brown curves) were observed both with or without zinc. Thus, absence of zinc binding to the R2R3 region prevented zinc-dependent aggregation of tau.

Turbidimetry experiments with tau-HA (mutant of the N-terminal and C-terminal histidines of tau), showed no increase of the turbidity signal upon heating (Figure 5A, oranges curves). In addition, zinc did not trigger the formation of tau polymers as shown in volume size distribution (Figure S5A, orange curves) or late decay time of the DLS correlogram (Figure S5B, oranges curves), even though this tau-HA mutant binds zinc as shown by our ITC experiments. These findings show that zinc binding to R2R3 is not sufficient to induce the reversible zinc-dependent aggregation of tau and that the reversible aggregation is triggered by zinc binding to a low affinity site.

To determine which low affinity site plays a major role in zinc induced aggregation, we studied this process using four single C-terminal histidine mutants (tau-H362A, tau-H374A, tau-H388A, and tau-H407A) in the presence of zinc ions (Figure 5B).

While tau-H362A aggregated just as much as WT-tau, tau-H374A exhibits a lower propensity to aggregate, and the two remaining mutants, tau-H388A and tau-H407A,

showed a complete absence of aggregation. Thus, perturbation of aggregation upon mutating these amino acids indicates that low affinity binding site in the C-terminal part of tau plays a major role in zinc induced temperature dependent tau aggregation.

Discussion

Despite the clinical importance of tau protein and the recent discovery of zinc ions influencing the aggregation and self-assembly of tau, the number of tau-zinc interaction sites is still under debate [16,17]. In this study we identify 12 zinc-binding amino acids corresponding to three zinc-binding sites (one in R2R3 region, one in N-terminal and one in C-terminal part). Our findings are consistent with the fact that zinc is mainly tetra-coordinated in proteins by Cys and His amino-acids [23,24]. Among the six amino acids that have been previously suggested to participate in zinc-binding to the R2R3 region of tau [11,13–15], we finally pinpoint in this study the 4 amino acids (H299, C322, H329 and H330) constituting the main zinc-binding site in tau. In addition, we now describe two novel lower affinity zinc binding sites in the C-terminal and N-terminal regions of tau.

Our results show that the zinc binding to tau is sequential and that the low affinity binding sites in the C-terminal and N-terminal regions of tau are independent from one another. Thus, it is likely that the zinc sequential binding scheme involves only two sites - one higher affinity site in the R2R3 region and one additional site, most likely located in the C-terminal region given its proximity to R2R3 repeat. Our findings suggest that the N-terminal region contains the third independent site which does not release any heat upon the binding of zinc, explaining the absence of signal with ITC. Thus, the low affinity parameters determined by our ITC experiments correspond to zinc binding to the C-terminal site. Favorable entropy ($\Delta S > 0$) observed upon zinc binding to C-terminal region implies formation of hydrophobic contacts. Indeed, mutating this site resulted in the perturbation of tau aggregation in the presence of zinc, as shown by our turbidimetry assays. More

precisely, mutation of histidine 388 or 407 to alanine completely abolished zinc-induced aggregation, emphasising the crucial role of these histidines in this process.

To summarize these findings, the following model can be proposed (Figure 6). The first zinc ion binds to the high affinity site (C291, H299, H329 and H330) in the R2R3 region and induces local folding of tau revealing the low-affinity zinc binding site in the C-terminal site (Figure 6A). Further increase in zinc concentration results in zinc binding to both low-affinity sites (Figure 6B), leading to the reversible aggregation of tau (Figure 6C). Decrease in zinc concentration results in disassembly of tau aggregates (Figure 6D).

The reversible aggregation of tau, which is different from the classical tau aggregation into PHFs (paired helical filaments) observed *in vitro*, is still very little understood. Both PHFs and reversible aggregates have different morphology and size: while tau forms nanometer-scaled filaments containing beta sheets in PHFs [25,26], the reversible aggregates in the presence of zinc are ThT negative and can be bigger than 10 μm [17]. Moreover, in contrast to the PHF formation, the zinc-induced aggregation of tau is a reversible and a temperature-dependent process. Finally, in contrast to PHF formation, zinc-induced reversible aggregation of tau can be observed without any artificial inducer of aggregation, such as heparin, thus probably corresponding to a more biologically relevant process.

Our discovery of several zinc binding sites with different affinity points to the fact that zinc concentration in the cellular environment could influence tau function *in vivo* in both healthy and pathological contexts. In Alzheimer's Disease (AD) for example, intraneuronal levels of zinc in cortical cells of patients have been shown to be increased in comparison to healthy cells [27]. Similarly, high concentrations of zinc were found inside the somata and dendrites of AD neurons [28]. This accumulation may be linked to the functionality of zinc-bound proteins, which can be impaired due to alteration of neuronal metabolism in pathology [29–31]. In this case, it is possible that the reversible aggregation of tau occurs

in neurons as a protective mechanism. Importance of zinc binding to tau has also been evoked in a physiological context, when the zinc concentrations are lower [17]. In healthy neuronal cells, while tau concentration is around 2 μ M, zinc is concentrated at nanomolar levels [32]. Even if it is not sufficient to induce the reversible aggregation of tau, zinc could possibly bind to tau through the high-affinity R2R3 site with a 1:1 stoichiometry. This may regulate tau activity by triggering its compaction at specific subcellular structures where tau is known to play a role, such as microtubules or nucleus [2]. Indeed, the high-affinity R2R3 site overlaps with the microtubule-binding site on tau protein [33,34]. Thus, zinc binding to tau may have physiological implications with low-intraneuronal concentrations of zinc, while possibly affecting the pathological aggregation found in tauopathies at high zinc concentration.

In conclusion, we identify zinc binding sites of tau protein and provide a model describing sequential binding of zinc ions inducing reversible aggregation of tau. We also found two histidines in the C-terminal binding site that are responsible for zinc-induced aggregation and that should be investigated for their role in tau pathological aggregation. Overall, the molecular basis of the tau-zinc interaction provided in our study will help understanding the zinc-related tau aggregation processes in both physiological and pathological conditions, thus paving the way for designing potential therapies for tauopathies.

Material and Methods

Peptide synthesis: Synthetic pR2R3 peptide was purchased from GeneCust.

Protein expression and purification: The full-length tau and histidine mutants were expressed from a pET-3d vector introduced into Escherichia coli BL21(DE3). After 3 h of induction with 0.5 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), cells were

centrifuged and the pellets were resuspended into a lysis buffer as previously described [35]. Lysis was pursued using three runs of French press at 4 tones, and non-thermostable proteins were precipitated at 95°C for 11 minutes. Then, the lysate was centrifuged at 30 000 g for 30 min at 4°C, and the supernatant was injected onto a HiTrap SP Sepharose HP cation exchange column pre-equilibrated with a 50 mM MES pH 6.5 buffer. Tau was eluted with a 50 mM MES NaCl 0.5 M pH 6.5 buffer at 1 mL/min, dialysed three times against 2 L of water at 4°C for 2 h, and dry-lyophilized. For ^{15}N labeled-tau, cells were grown on LB medium, centrifuged and the pellet was solubilized in M9 medium containing ^{15}N ammonium chloride. Prior to use, each tau sample was airfuged at 25 psi and dosed at 280 nm with an extinction coefficient of $7700 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ by spectrophotometry as previously described [35].

Isothermal Titration Calorimetry: Binding of zinc to tau was analyzed by ITC using a MicroCal iTC200 instrument at 10°C in a 50 mM Tris buffer, in the presence of 1 mM TCEP, pH 7.5. Tau concentrations in the calorimetric cell were 50 μM , whereas zinc concentration was 1 mM in the syringe. Data were analyzed as previously described [36,37] using the MicroCal Origin software and were fitted with a “one-set-of-sites” for tau-HA, while tau-WT required a “sequential-binding-sites” analysis (number of sites fixed as 2).

Turbidity assays: Zinc-induced self-assembly of tau was monitored with NanoTemper Prometheus NT.Plex instrument equipped with an turbidity module at 350 nm as previously described [17], using high-sensitivity capillaries. Each capillary contained 30 μM of tau and 120 μM of zinc, except for the control samples which contain only 30 μM of tau. Excitation power was set at 60%, and samples were heated from 15°C to 40°C at 1°C/min. All of the turbidity assays were conducted three independent times individually.

Dynamic Light Scattering: The self-assembly of tau induced by zinc was monitored using Zetasizer Nano ZS from Malvern Instruments as previously described [17]. The cuvette

contained 50 μ L of 30 μ M of tau with or without 120 μ M of zinc in a 50 mM Tris buffer, in the presence of 1 mM TCEP, pH 7.5. For each tau construct, three recordings were performed at 40°C, consisting in 10 - 15 runs for each assay.

NMR spectroscopy: NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer 600 MHz equipped with a TCI cryoprobe. NMR experiments (15 N-HSQC) were performed at 280°K (7°C) on 50 μ M for 15 N-labeled tau samples and 1 mM for pR2R3 peptide. For the pH variations experiments, tau was resuspended into a sodium phosphate buffer at pH 6.1 and 6.7 respectively. For zinc titrations, the buffer was 20 mM MES, 100 mM NaCl, pH 6.5. Using previous chemical shift assignments, we identified the cross-peaks corresponding to the N-terminal and C-terminal extremities in the full-length tau (BMRB entry 17920, [21]) and repeated region in the pR2R3 spectrum (BMRB entry 19253, [22]). H362, H374, H388 and H407 were assigned on the tau-WT spectrum by using mutants of tau. Data was processed and analyzed with TopSpin software from Bruker.

Molecular simulations: The Rosetta *de novo* structure prediction method with Monte-Carlo approach was utilized for structure prediction for tau fragments with zinc coordination restraints [38]. Fragment library was built with Robetta web server [39] for the whole tau protein isoform htau40 (UniProt identifier : P10636-8). This fragment library was adopted to three selected regions of tau. Simulations were started from an extended chain and then subjected to *ab initio* folding protocol with zinc coordination restraints with scoring function ref2015 [40]. Zinc incorporation was done as it was described in the original report [41] with distance and angle restraints to supposed coordination sphere. All backbone and sidechain torsions and zinc rigid-body degrees of freedom were optimized simultaneously in the all-atom refinement stage according to the original report [41]. For each of three Tau region, 45,000 models were generated and the first 100 models were selected for further analysis. The top model was chosen based on the pair score.

Surface Plasmon Resonance: SPR experiments were carried out at 15 °C in a Biacore T200 instrument (Cytiva) using the CMD500m sensor chip (Xantec, Dusseldorf, Germany). Tau-WT, tau-HA or tau-LA were amine coupled in separate flow cells at pH 5.5, according to manufacturer's instruction and using 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 as running buffer. Due to the low MW of ZnCl_2 and CaCl_2 ions in comparison to MW of tau proteins, high density levels of proteins were immobilized on the sensor chip (approximately 4000 - 8000 RU that corresponds to 87 - 175 fmol/mm²). A control flow cell without protein was used as reference to subtract unspecific binding of ions to the chip surface. The four flow cells were connected and running buffer was exchanged with 50 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 7.5. ZnCl_2 and CaCl_2 ions were serially diluted in running buffer (0.3 - 160 μM) and injected 2 min at 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ over experimental and reference flow cells. Blank run injections of running buffer were performed in the same conditions. Double-subtracted sensorgrams were used to determine the equilibrium response expressed in RU (Resonance Units), for each concentration. Complete and spontaneous dissociation allowed analysis without regeneration. The K_D value for ZnCl_2 ions to the immobilized tau protein were calculated by plotting saturation binding curves using BiaEvaluation software version 2.0 (Cytiva).

Acknowledgements: Microcalorimetry, SPR and turbidimetry experiments were performed in Plateforme Interactome NeuroTimone (PINT) of INP, Marseille, France. NMR experiments were conducted in the NMR platform of IMM, Marseille, France. Molecular modelization at shared research facilities of HPC computing resources at Lomonosov Moscow State University. We would like to thank Provence-Alpes-Côte d'Azur Région, and indirectly the Cancéropôle Provence-Alpes- Côte d'Azur, for their support, as well as Isabelle Landrieu for sharing unpublished NMR data with us.

References

- [1] I. Sotiropoulos, M.-C. Galas, J.M. Silva, E. Skoulakis, S. Wegmann, M.B. Maina, D. Blum, C.L. Sayas, E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, M.G. Spillantini, N. Sousa, J. Avila, M. Medina, A. Mudher, L. Buee, Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein, *Acta Neuropathol Commun.* 5 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0489-6>.
- [2] Y. Wang, E. Mandelkow, Tau in physiology and pathology, *Nat. Rev. Neurosci.* 17 (2016) 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>.
- [3] M. Goedert, M.G. Spillantini, Propagation of Tau aggregates, *Mol. Brain.* 10 (2017) 18. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0298-7>.
- [4] M. Goedert, A. Klug, R.A. Crowther, Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease, *J. Alzheimers. Dis.* 9 (2006) 195–207. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-9s323>.
- [5] S.M. Ward, D.S. Himmelstein, J.K. Lancia, L.I. Binder, Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease, *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2012) 667–671. <https://doi.org/10.1042/BST20120134>.
- [6] A. Ochalek, B. Mihalik, H.X. Avci, A. Chandrasekaran, A. Téglási, I. Bock, M.L. Giudice, Z. Tancos, K. Molnár, L. László, J.E. Nielsen, B. Holst, K. Freude, P. Hyttel, J. Kobolák, A. Dinnyés, Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation, *Alzheimers. Res. Ther.* 9 (2017) 90. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0317-z>.
- [7] W.P. Esler, E.R. Stimson, J.M. Jennings, J.R. Ghilardi, P.W. Mantyh, J.E. Maggio, Zinc-induced aggregation of human and rat beta-amyloid peptides in vitro, *J. Neurochem.* 66 (1996) 723–732. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66020723.x>.
- [8] A.D. Efimova, R.K. Ovchinnikov, A.Y. Roman, A.V. Maltsev, V.V. Grigoriev, E.A. Kovrazhkina, V.I. Skvortsova, [The FUS protein: Physiological functions and a role in amyotrophic lateral sclerosis], *Mol. Biol. (Mosk.)* 51 (2017) 387–399. <https://doi.org/10.7868/S0026898417020094>.
- [9] A. Caragounis, K.A. Price, C.P.W. Soon, G. Filiz, C.L. Masters, Q.-X. Li, P.J. Crouch, A.R. White, Zinc induces depletion and aggregation of endogenous TDP-43, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1152–1161. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.035>.
- [10] C. Garnier, F. Devred, D. Byrne, R. Puppo, A.Y. Roman, S. Malesinski, A.V. Golovin, R. Lebrun, N.N. Ninkina, P.O. Tsvetkov, Zinc binding to RNA recognition motif of TDP-43 induces the formation of amyloid-like aggregates, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07215-7>.
- [11] Z.-Y. Mo, Y.-Z. Zhu, H.-L. Zhu, J.-B. Fan, J. Chen, Y. Liang, Low Micromolar Zinc Accelerates the Fibrillization of Human Tau via Bridging of Cys-291 and Cys-322, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 34648–34657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058883>.
- [12] Y. Huang, Z. Wu, Y. Cao, M. Lang, B. Lu, B. Zhou, Zinc Binding Directly Regulates Tau Toxicity Independent of Tau Hyperphosphorylation, *Cell Rep.* 8 (2014) 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.047>.
- [13] J.-Y. Hu, D.-L. Zhang, X.-L. Liu, X.-S. Li, X.-Q. Cheng, J. Chen, H.-N. Du, Y. Liang, Pathological concentration of zinc dramatically accelerates abnormal aggregation of full-length human Tau and thereby significantly increases Tau toxicity in neuronal cells, *Biochim. Biophys. Acta.* 1863 (2017) 414–427. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.022>.

- [14] X. Li, X. Du, J. Ni, Zn²⁺ Aggravates Tau Aggregation and Neurotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20030487>.
- [15] A.C. Jiji, A. Arshad, S.R. Dhanya, P.S. Shabana, C.K. Mehjabin, V. Vijayan, Zn²⁺ Interrupts R4-R3 Association Leading to Accelerated Aggregation of Tau Protein, *Chemistry – A European Journal*. 23 (2017) 16976–16979. <https://doi.org/10.1002/chem.201704555>.
- [16] G.G. Moreira, J.S. Cristóvão, V.M. Torres, A.P. Carapeto, M.S. Rodrigues, I. Landrieu, C. Cordeiro, C.M. Gomes, Zinc Binding to Tau Influences Aggregation Kinetics and Oligomer Distribution, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5979. <https://doi.org/10.3390/ijms20235979>.
- [17] A.Y. Roman, F. Devred, D. Byrne, R. La Rocca, N.N. Ninkina, V. Peyrot, P.O. Tsvetkov, Zinc Induces Temperature-Dependent Reversible Self-Assembly of Tau, *J. Mol. Biol.* 431 (2019) 687–695. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.008>.
- [18] Y. Fichou, Y.K. Al-Hilaly, F. Devred, C. Smet-Nocca, P.O. Tsvetkov, J. Verelst, J. Winderickx, N. Geukens, E. Vanmechelen, A. Perrotin, L. Serpell, B.J. Hanseeuw, M. Medina, L. Buée, I. Landrieu, The elusive tau molecular structures: can we translate the recent breakthroughs into new targets for intervention?, *Acta Neuropathol Commun.* 7 (2019) 31. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0682-x>.
- [19] S. Wegmann, B. Eftekharzadeh, K. Tepper, K.M. Zoltowska, R.E. Bennett, S. Dujardin, P.R. Laskowski, D. MacKenzie, T. Kamath, C. Commins, C. Vanderburg, A.D. Roe, Z. Fan, A.M. Molliex, A. Hernandez-Vega, D. Muller, A.A. Hyman, E. Mandelkow, J.P. Taylor, B.T. Hyman, Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation, *EMBO J.* 37 (2018). <https://doi.org/10.15252/embj.201798049>.
- [20] V. Singh, L. Xu, S. Boyko, K. Surewicz, W.K. Surewicz, Zinc promotes liquid-liquid phase separation of tau protein, *J. Biol. Chem.* (2020). <https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.013166>.
- [21] S. Bibow, M.D. Mukrasch, S. Chinnathambi, J. Biernat, C. Griesinger, E. Mandelkow, M. Zweckstetter, The dynamic structure of filamentous tau, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 50 (2011) 11520–11524. <https://doi.org/10.1002/anie.201105493>.
- [22] P. Barré, D. Eliezer, Structural transitions in tau k18 on micelle binding suggest a hierarchy in the efficacy of individual microtubule-binding repeats in filament nucleation, *Protein Sci.* 22 (2013) 1037–1048. <https://doi.org/10.1002/pro.2290>.
- [23] S.F. Sousa, A.B. Lopes, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, The Zinc proteome: a tale of stability and functionality, *Dalton Trans.* (2009) 7946–7956. <https://doi.org/10.1039/b904404c>.
- [24] M. Laitaoja, J. Valjakka, J. Jänis, Zinc Coordination Spheres in Protein Structures, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 10983–10991. <https://doi.org/10.1021/ic401072d>.
- [25] M. Margittai, R. Langen, Template-assisted filament growth by parallel stacking of tau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 10278–10283. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401911101>.
- [26] M. Margittai, R. Langen, Side chain-dependent stacking modulates tau filament structure, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 37820–37827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605336200>.
- [27] D. Religa, D. Strozyk, R.A. Cherny, I. Volitakis, V. Haroutunian, B. Winblad, J. Naslund, A.I. Bush, Elevated cortical zinc in Alzheimer disease, *Neurology*. 67 (2006) 69–75. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000223644.08653.b5>.
- [28] S.W. Suh, K.B. Jensen, M.S. Jensen, D.S. Silva, P.J. Kesslak, G. Danscher, C.J. Frederickson, Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains, *Brain Res.* 852 (2000) 274–278. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02096-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02096-x).
- [29] J.L. Smith, S. Xiong, M.A. Lovell, 4-Hydroxynonenal disrupts zinc export in primary

- rat cortical cells, *Neurotoxicology*. 27 (2006) 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.05.009>.
- [30] S.L. Sensi, P. Paoletti, A.I. Bush, I. Sekler, Zinc in the physiology and pathology of the CNS, *Nat. Rev. Neurosci.* 10 (2009) 780–791. <https://doi.org/10.1038/nrn2734>.
- [31] T. Po, R. Ay, B. Ve, N. Aa, S. Mp, V. Vi, B. Mf, Z. Dv, Z.A.A. Jr, D. F, G. Av, P. Se, Z. Ey, Functional Status of Neuronal Calcium Sensor-1 Is Modulated by Zinc Binding, *Front. Mol. Neurosci.* 11 (2018) 459–459. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00459>.
- [32] J.H. Weiss, S.L. Sensi, J.Y. Koh, Zn(2+): a novel ionic mediator of neural injury in brain disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 395–401.
[https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01541-8](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01541-8).
- [33] G. Lee, R.L. Neve, K.S. Kosik, The microtubule binding domain of tau protein, *Neuron*. 2 (1989) 1615–1624. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90050-0).
- [34] P. Barbier, O. Zejneli, M. Martinho, A. Lasorsa, V. Belle, C. Smet-Nocca, P.O. Tsvetkov, F. Devred, I. Landrieu, Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects, *Front. Aging Neurosci.* 11 (2019).
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>.
- [35] T. De Bessa, G. Breuzard, D. Allegro, F. Devred, V. Peyrot, P. Barbier, Tau Interaction with Tubulin and Microtubules: From Purified Proteins to Cells, in: C. Smet-Nocca (Ed.), *Tau Protein: Methods and Protocols*, Springer, New York, NY, 2017: pp. 61–85. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6598-4_4.
- [36] A.Y. Roman, F. Devred, V.M. Lobatchov, A.A. Makarov, V. Peyrot, A.A. Kubatiev, P.O. Tsvetkov, Sequential binding of calcium ions to the B-repeat domain of SdrD from *Staphylococcus aureus*, *Can. J. Microbiol.* 62 (2016) 123–129.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0580>.
- [37] P.O. Tsvetkov, A.A. Makarov, S. Malesinski, V. Peyrot, F. Devred, New insights into tau–microtubules interaction revealed by isothermal titration calorimetry, *Biochimie*. 94 (2012) 916–919. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.011>.
- [38] K.T. Simons, C. Kooperberg, E. Huang, D. Baker, Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions, *J. Mol. Biol.* 268 (1997) 209–225.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0959>.
- [39] Y. Song, F. DiMaio, R.Y.-R. Wang, D. Kim, C. Miles, T. Brunette, J. Thompson, D. Baker, High-resolution comparative modeling with RosettaCM, *Structure*. 21 (2013) 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.005>.
- [40] H. Park, P. Bradley, P. Greisen Jr, Y. Liu, V.K. Mulligan, D.E. Kim, D. Baker, F. DiMaio, Simultaneous Optimization of Biomolecular Energy Functions on Features from Small Molecules and Macromolecules, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 6201–6212. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00819>.
- [41] C. Wang, R. Vernon, O. Lange, M. Tyka, D. Baker, Prediction of structures of zinc-binding proteins through explicit modeling of metal coordination geometry, *Protein Sci.* 19 (2010) 494–506. <https://doi.org/10.1002/pro.327>.

	Model	n	K_A (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/deg)
tau-WT	Two sets of sites	3*	$2.1 \pm 0.7 \times 10^6$	-1.1 ± 0.2	-6.9
			$5.0 \pm 1.6 \times 10^4$	-2.1 ± 0.2	14.1
	Sequential binding sites	2*	$1.3 \pm 0.2 \times 10^6$	-9.6 ± 0.1	-5.7
			$2.7 \pm 0.3 \times 10^4$	-5.0 ± 0.2	2.5
tau-HA	One set of site	0.8 ± 0.1	$1.7 \pm 0.2 \times 10^5$	-7.4 ± 0.3	-2.3
tau-LA	-	-	-	-	-

Table 1: Binding models and corresponding thermodynamical parameters for ITC experiments of tau and tau constructs. * For tau-WT, stoichiometries (n) were fixed, while others were determined by fitting. Tau-LA titration did not release any heat.

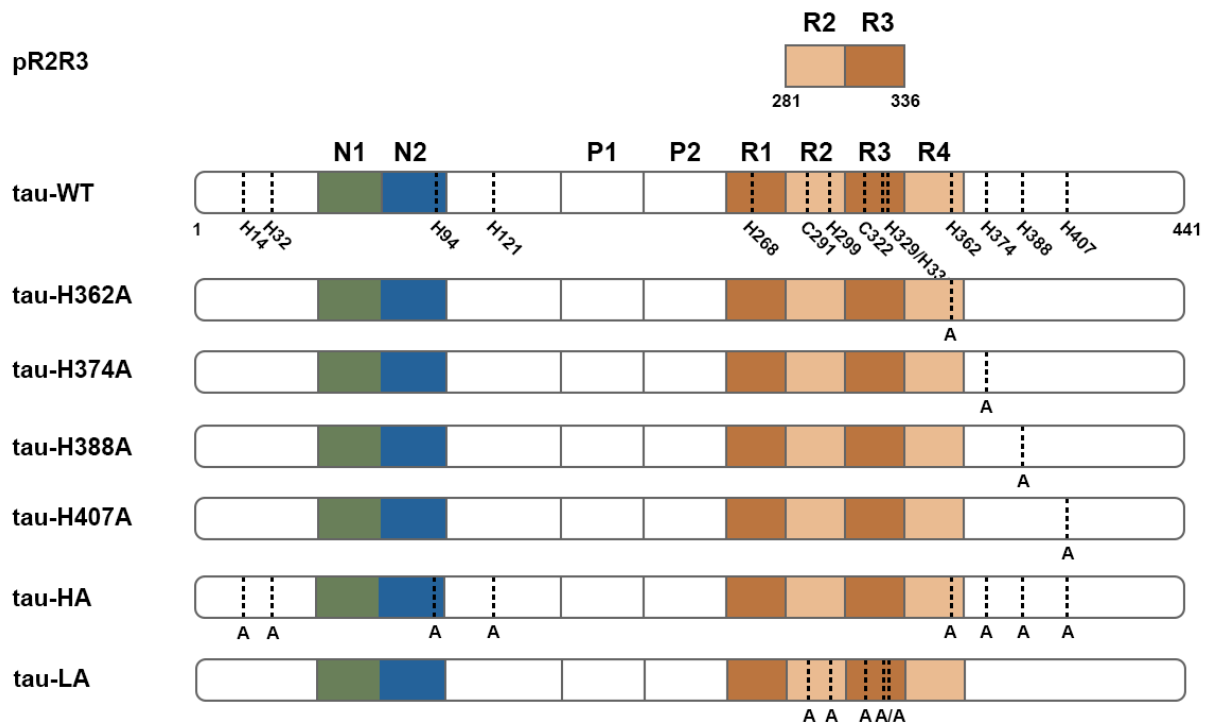


Figure 1: pR2R3 peptide and tau sequences of mutants (HA : High Affinity ; LA : Low Affinity). Cysteines and histidines are represented on the tau-WT sequence, and alanines mutations for each mutant are shown below histidines and cysteines positions.

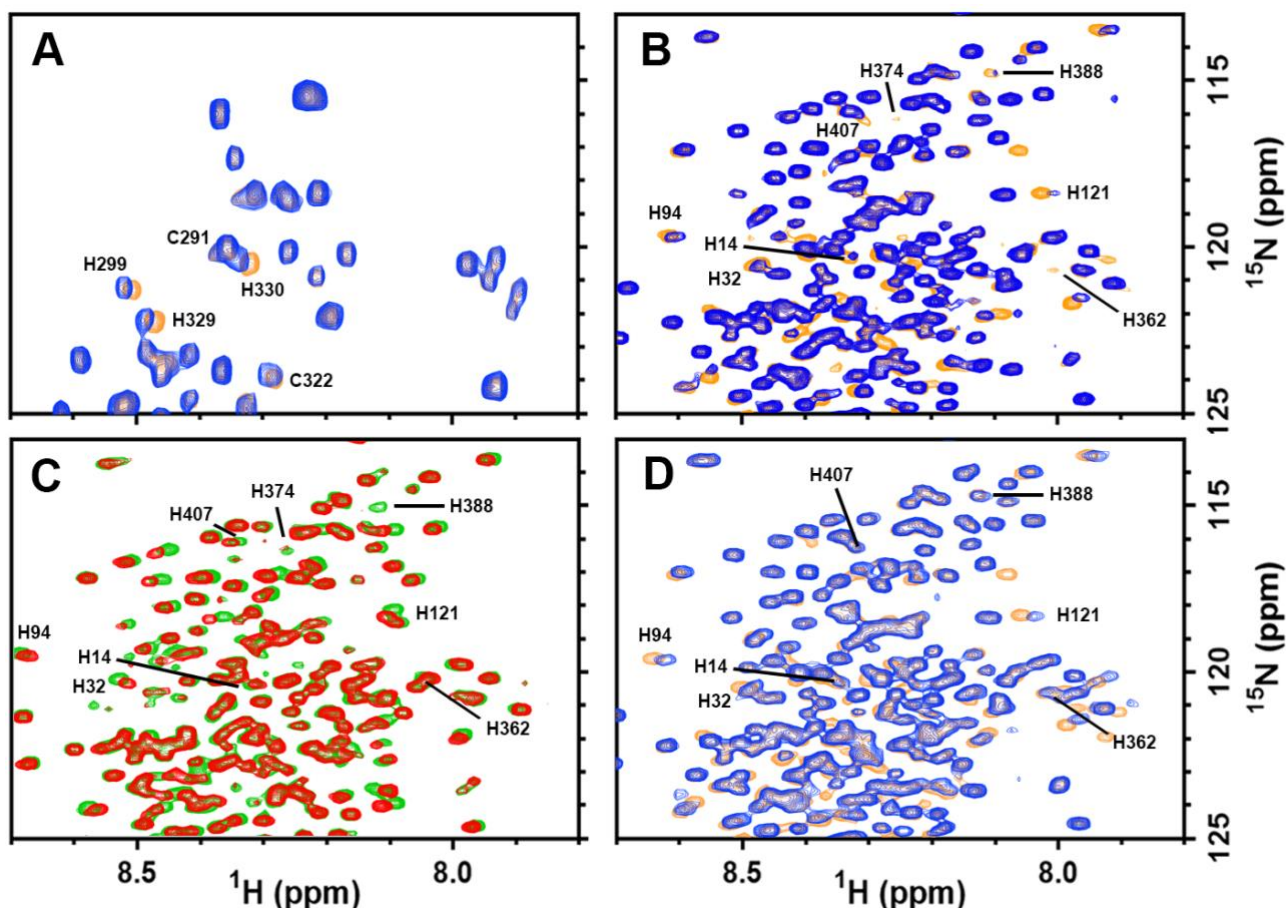


Figure 2: ^{15}N HSQC spectra of tau constructs. A: ^{15}N HSQC spectrum of 1 mM unlabeled pR2R3 at natural abundance in the absence (orange peaks) or in the presence of 3 mM zinc (blue peaks). B: ^{15}N HSQC spectrum of 50 μM ^{15}N -labeled tau-WT in the absence (orange peaks) or in the presence of 300 μM zinc (blue peaks). C: ^{15}N HSQC spectrum of 50 μM ^{15}N -labeled tau-WT at pH 6.1 (green peaks) and 6.7 (red peaks). D: ^{15}N HSQC spectrum of tau-H374A in the absence (orange peaks) or in the presence of zinc (blue peaks). All the experiments were done at 7°C to avoid aggregation in 20 mM MES 100 mM NaCl pH 6.5 unless otherwise stated.

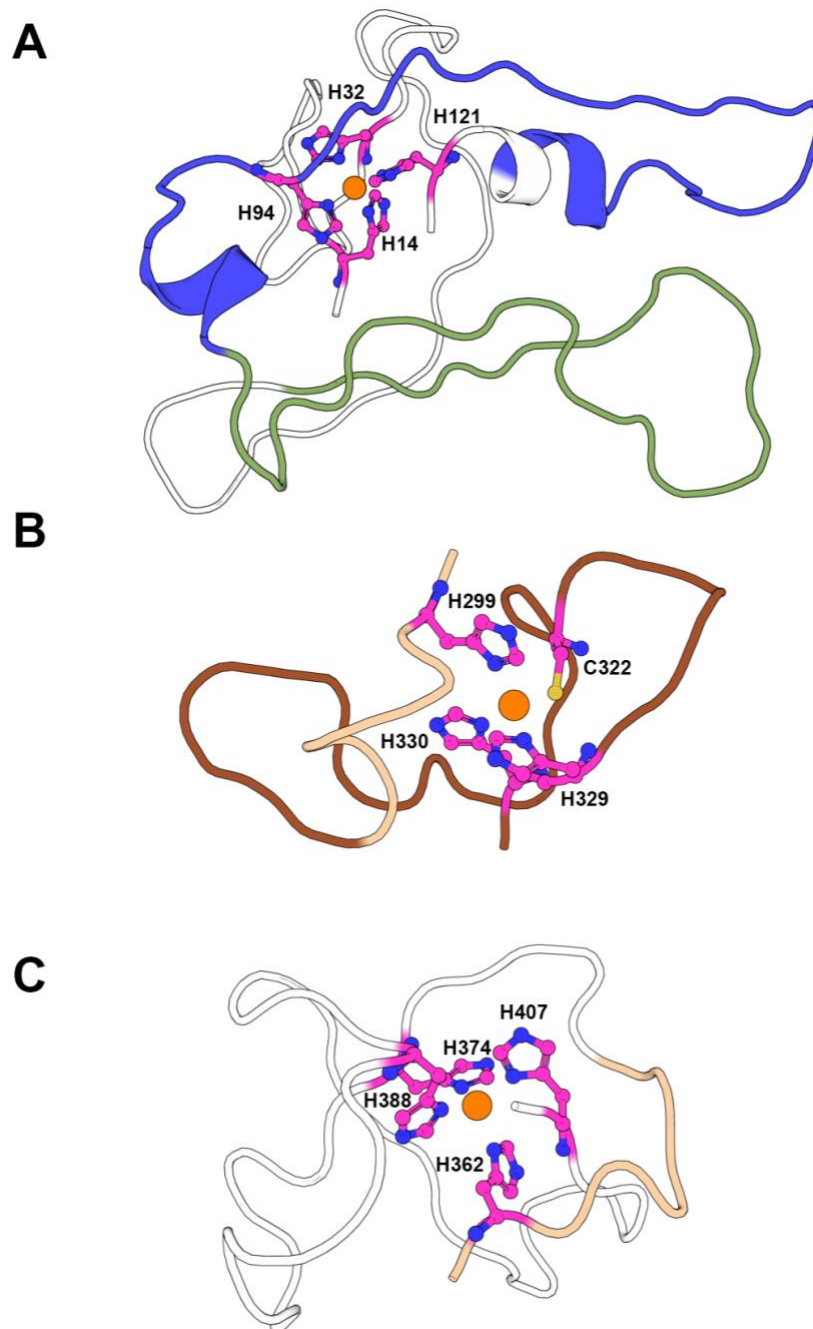


Figure 3: 3D models of the zinc-binding sites on tau. A: N-terminal (13-122), B: R2R3 (298-331) and C: C-terminal (361-408) regions of tau in the presence of zinc (orange sphere).

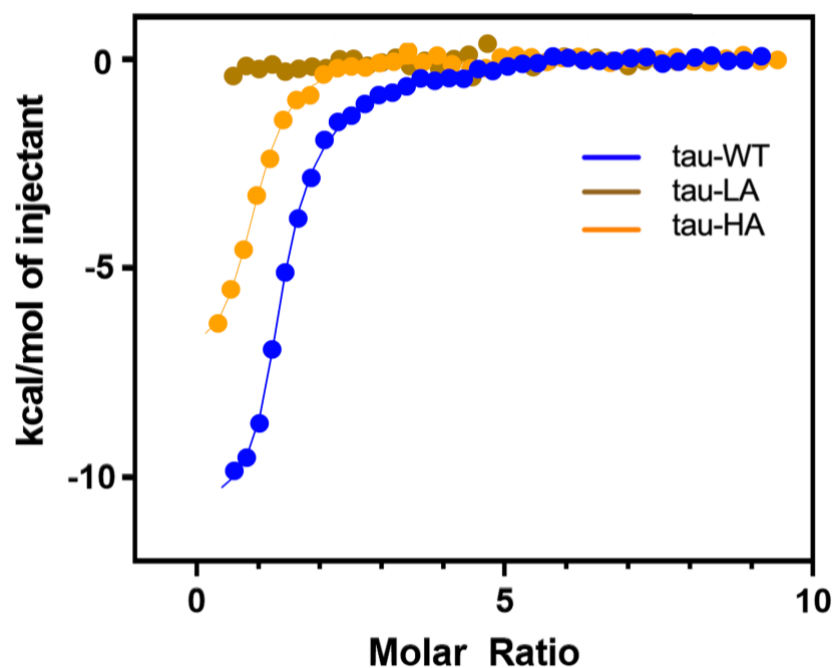


Figure 4: ITC curves of tau-zinc interactions. 50 μ M of tau-WT (blue), tau-HA (orange), and tau-LA (brown) were titrated by zinc at 10°C in Tris 50 mM TCEP 1 mM pH 7.5 buffer. Data were fitted with corresponding models (Table 1) except for tau-LA, where zinc did not interact. For tau-WT, the fitting shown here corresponds to a sequential model with 2 sites.

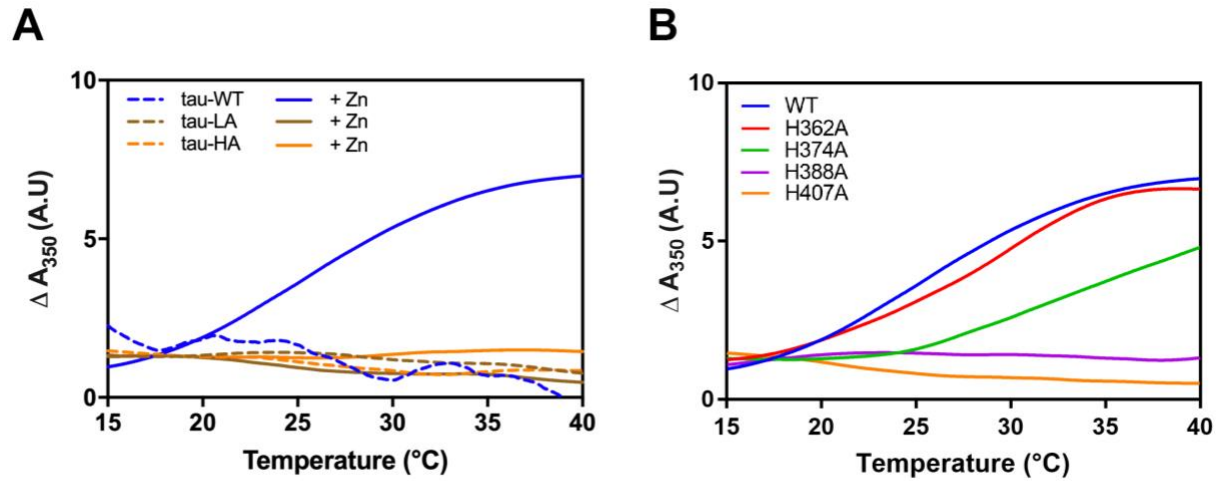


Figure 5: Turbidity assays of tau mutants in the presence of zinc. A: Turbidity assays of 30 μ M of tau-WT, tau-LA and tau-HA in the absence (dotted lines) and in the presence (solid lines) of 120 μ M of zinc. B: Turbidity assays of 30 μ M of tau-WT, tau-H362A, tau-H374A, tau-H388A, tau-H407A in the presence of 120 μ M of zinc. All the samples were heated from 15°C to 40°C while measuring the turbidity at 350 nm.

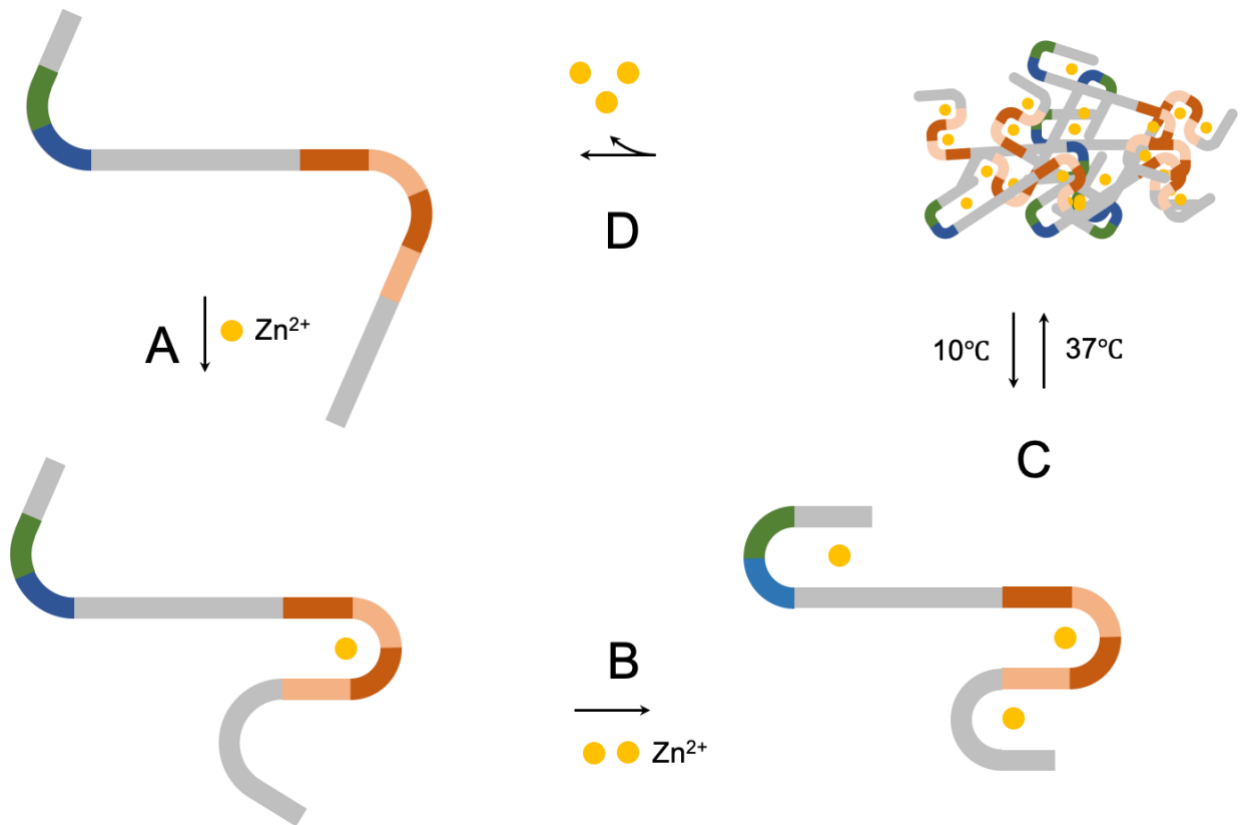


Figure 6. The schematic representation of sequential zinc binding to tau. A : in the presence of limited amount of zinc it binds to the high affinity R2R3 binding site, which then induces the formation of the low affinity C-terminal binding site B : in the presence of higher concentration of zinc, both N-terminal and C-terminal low affinity sites bind zinc. C : increasing temperature to 37°C induces the formation of amorphous aggregates. Steps B and C can be separated in vitro by performing step B at low temperature, but in vivo at 37°C those two steps would be simultaneous thus indistinguishable. D : removing zinc induces the disassembly of the aggregate.

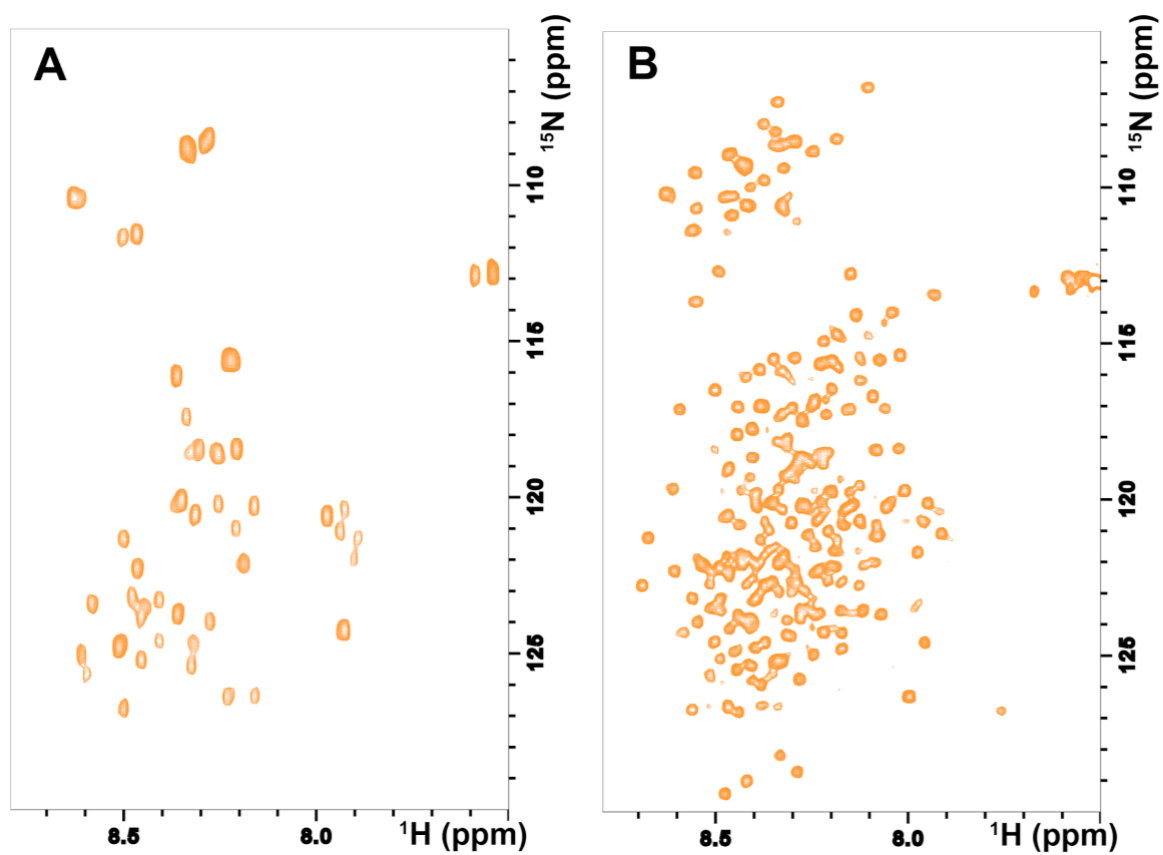


Figure S1 : ^{15}N HSQC NMR spectra of pR2R3 peptide (A) and tau-WT (B). Both of the spectra were recorded at 7°C in 20 mM MES 100 mM NaCl at pH 6.5.

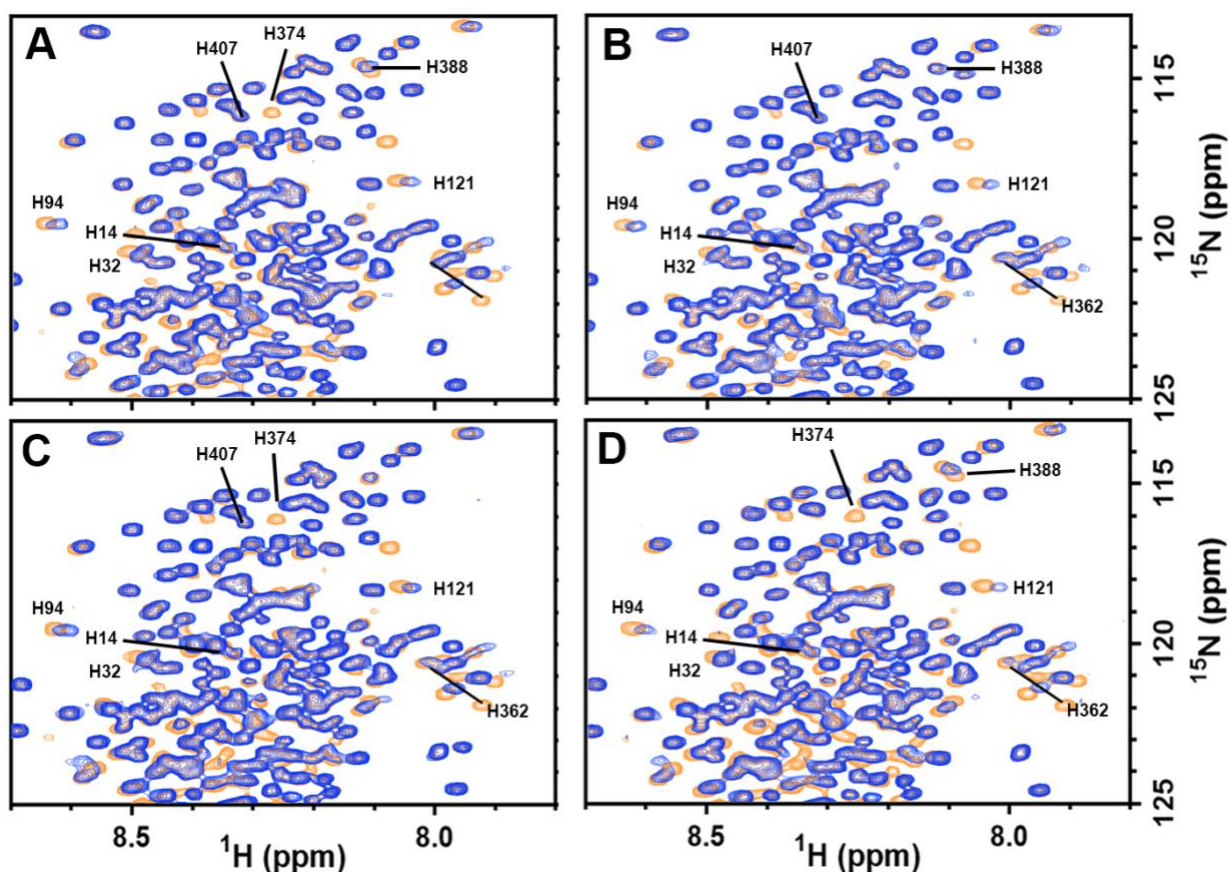


Figure S2: ^{15}N HSQC spectra of tau histidines mutants. ^{15}N HSQC spectra of tau-H362A (A), tau-H374A (B) (replicate of Figure 2D), tau-H388A (C), and tau-H407A (D) in the absence (orange) or in the presence of zinc (blue). 50 μM of ^{15}N -labeled tau-H362A, tau-H374A, tau-H388A and tau-H407A were titrated with 300 μM of zinc at 7°C. N-terminal and C-terminal histidines are shown in cyan. All of the N-terminal histidines (H14, H32, H94 and H121) were not affected by any mutation in all spectra, as they were still shifted upon the addition of zinc. C-terminal histidines were affected differently for each mutant, underlying two independent sites at the N-terminal and C-terminal regions of tau.

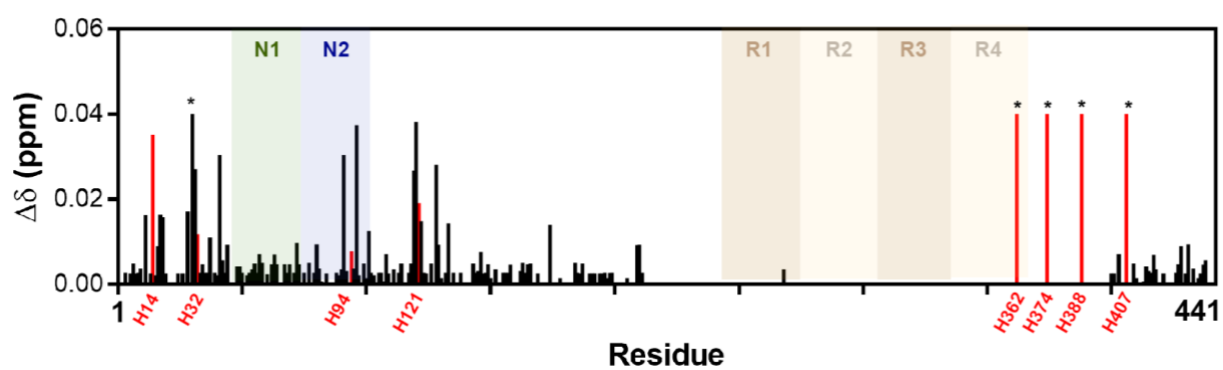


Figure S3: Shifts of each tau-WT assigned peak in the spectrum upon the addition of zinc. The residues annotated with * did not shift but disappeared from the spectrum upon the addition of zinc, thus indicating a high perturbation.

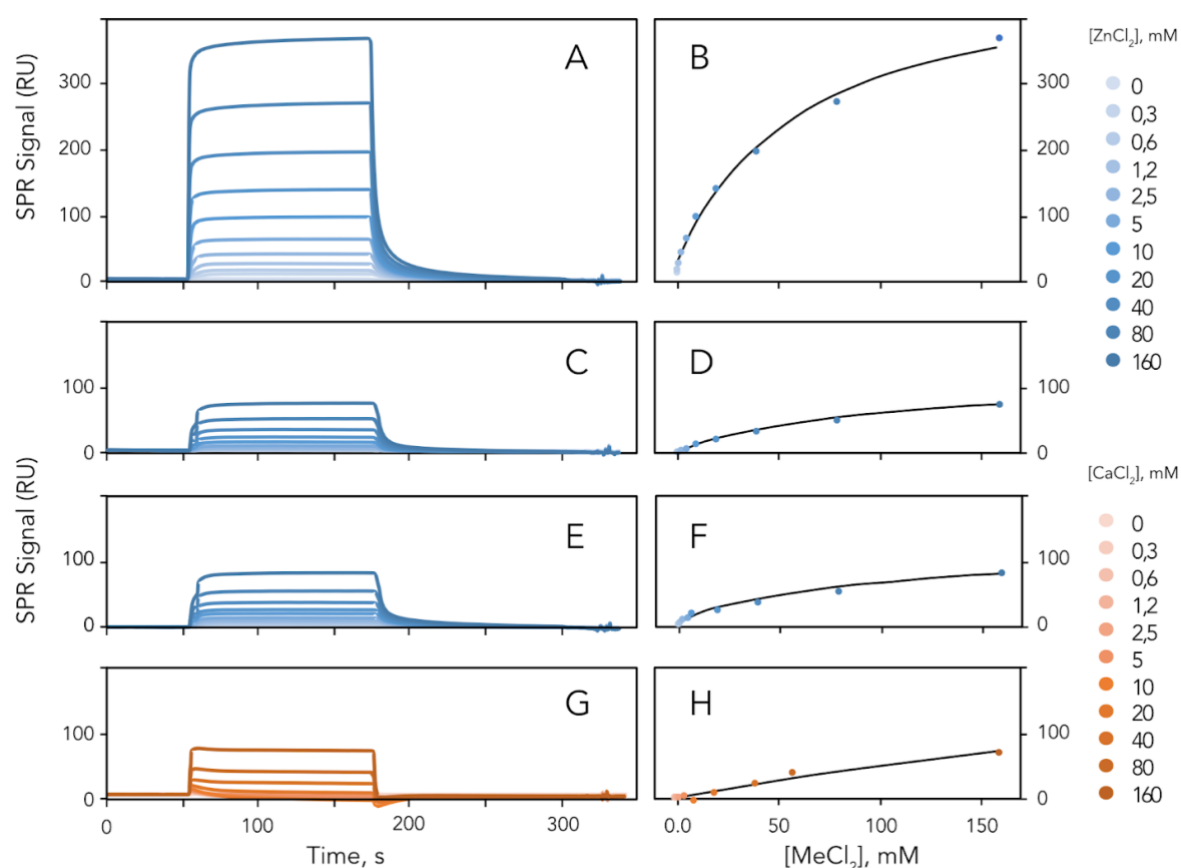


Figure S4: SPR measurements of ZnCl₂ binding to Tau. ZnCl₂ or CaCl₂ solutions (0.3 – 160 μ M) were injected 120 s at 30 μ L/min over immobilized Tau proteins. Typical superposed sensorgrams obtained over tau-WT (A), tau-LA (C) tau-HA (E) with ZnCl₂ and tau-WT with CaCl₂ (G) are displayed. Zinc induces a significant increase of the signal for tau-WT (A). This signal is much higher than expected (theoretical R_{max} = 11.5 RU for one binding site), probably due to conformational change of tau-WT in presence of ZnCl₂. A much lower effect is observed with tau-LA (C) and tau-HA (E), where signals are comparable to the ones obtained with calcium that constitute negative controls (G). Saturation curves are associated with corresponding tau-WT (B), tau-LA (D), tau-HA (F) with ZnCl₂ and tau-WT with CaCl₂ (H). Fitting of the saturation curve (B) using one to one model gave a $K_D = 1.52 \pm 0.76 \times 10^{-4}$ M. Figures are representative of three independent experiments.

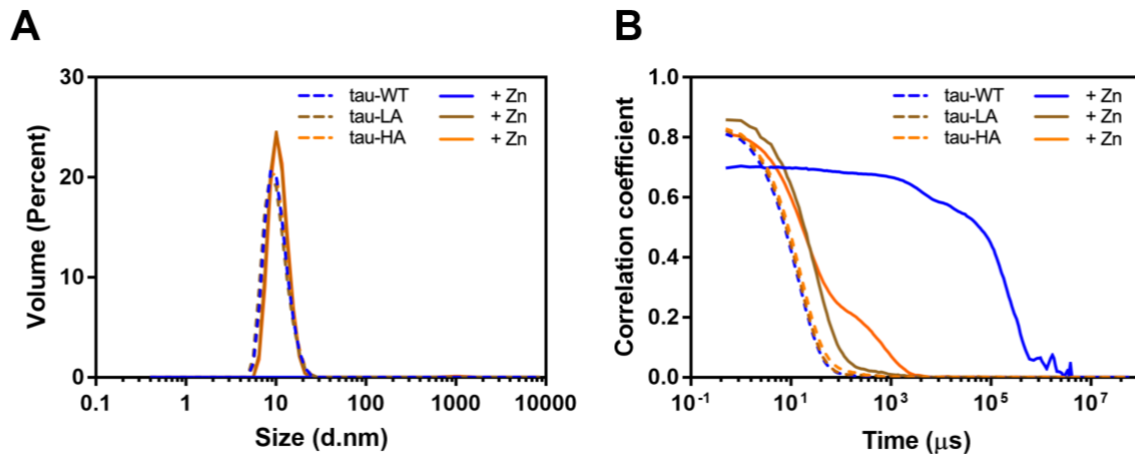


Figure S5: DLS measurements of tau-WT, tau-LA and tau-HA with zinc. A: DLS volume size distribution of 30 μM of tau-WT, tau-LA and tau-HA in the absence (dotted lines) and in the presence (solid lines) of 120 μM of zinc. B: DLS correlation curves of 30 μM of tau-WT, tau-LA and tau-HA in the absence (dotted lines) and in the presence (solid lines) of 120 μM of zinc. All of the DLS measurements were performed at 40°C. In the presence of zinc, tau-WT aggregates into particles which are out of the range of DLS measurement (A, blue solid line) and show a long decay time of correlation function (B, blue solid line), which indicates that zinc induces the aggregation of tau-WT. In contrast, tau-LA and tau-HA form particles of size around 10 nm (A, brown and orange solid lines), and display a fast decay time of correlation function (B, brown and orange solid lines), which indicates that zinc does not trigger the aggregation of these mutants. All of the constructions in the absence of zinc were not aggregated (A and B, dotted lines).

Discussion

Caractéristiques physiques des agrégats tau-zinc et mécanisme moléculaire

Caractéristiques physiques des agrégats

Le zinc induit la formation d'agrégats réversibles de tau ayant des caractéristiques bien différentes de celles observées dans les PHF, agrégats pathologiques de tau.

Premièrement, les agrégats de tau induits par le zinc ont une forme amorphe, encore peu caractérisée (Roman et al. 2019; Moreira et al. 2019), tandis que les PHF présentent une organisation hélicoïdale comme expliqué précédemment. Deuxièmement, les agrégats de tau induits par le zinc mesurent plusieurs micromètres (Roman et al. 2019), contre quelques nanomètres pour les PHF (Pollack et al. 2019). Troisièmement, alors que les PHF sont thioflavine-T-positifs, ce qui indique la présence de feuillets bêta au sein de ces structures, les agrégats de tau induits par le zinc réagissent négativement à ce même test (Roman et al. 2019). Enfin, contrairement aux PHF, les agrégats induits par le zinc sont sensibles à la température et se dissocient à froid, en plus de disparaître après l'ajout d'un chélateur du zinc comme l'EDTA (Roman et al. 2019), ce qui rend plus difficile leur caractérisation.

Ces nombreuses différences laissent penser que le mécanisme de formation des agrégats des PHF et de ceux induits par le zinc est différent. Notre étude sur les sites de liaison du zinc sur la protéine tau et les données de la littérature nous ont permis de proposer un modèle du mécanisme moléculaire à l'origine de l'agrégation de tau induite par le zinc.

Mécanisme moléculaire à l'origine de l'agrégation

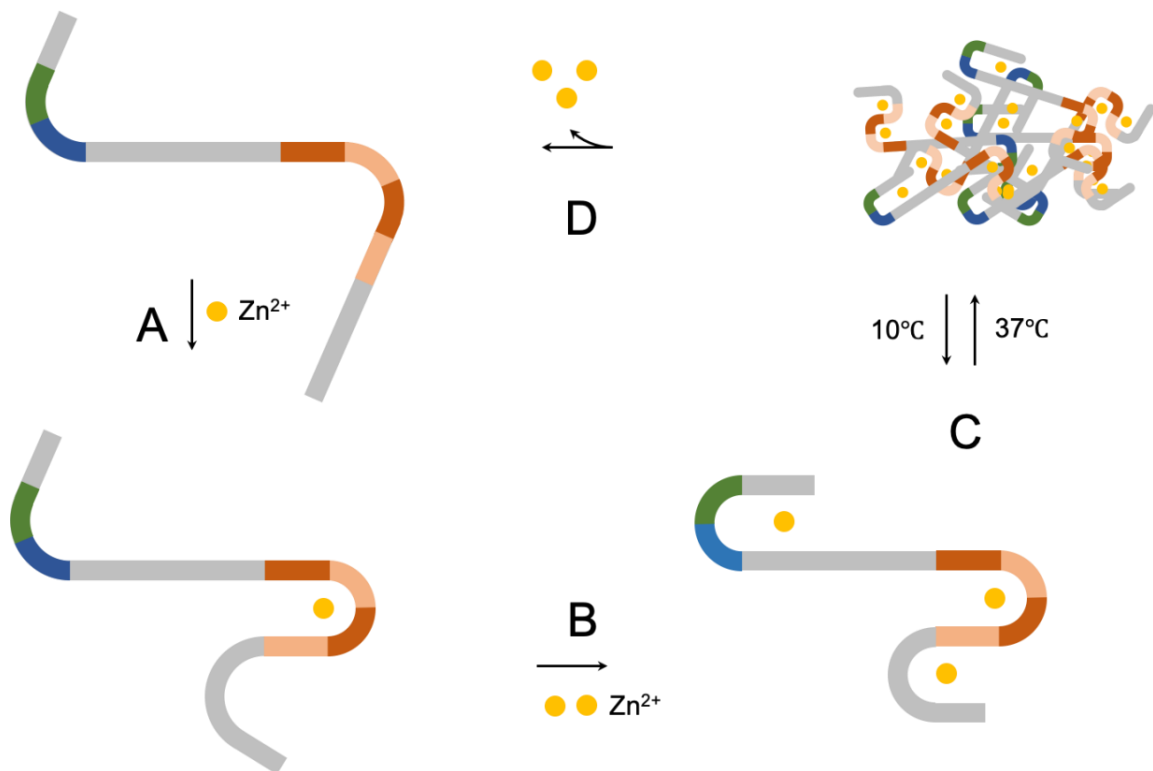


Figure 46 : Schéma récapitulatif du mécanisme de formation des agrégats de tau induits par le zinc. Un premier ion zinc se fixe au niveau des séquences répétées de la protéine tau, ce qui induit un changement de conformation en partie C-terminale. Dans un second temps, un second ion zinc peut interagir avec ce nouveau site C-terminal, et induire l'agrégation de la protéine tau. En parallèle à ce schéma de fixation séquentiel, un troisième site en N-terminal chélate un troisième ion zinc de façon indépendante.

Le zinc se lie à la protéine tau au niveau des séquences répétées dans un premier temps (Figure 46). Plus précisément, le zinc provoque une légère compaction de la protéine tau suite à sa coordination par 4 résidus des séquences R2 et R3 : les histidines 299, 329, 330, et la cystéine 322 (Figure 46a). L'implication de la cystéine 291 n'est pas encore bien connue dans ce mécanisme. Des études ont montré que la mutation de ce résidu provoque une baisse d'affinité de l'interaction tau-zinc (Mo et al. 2009), alors que notre récente étude montre que l'environnement de ce résidu n'est pas modifié suite à l'ajout du zinc sur la protéine tau. En revanche, nos données de RMN ont montré qu'il existait deux configurations pour la cystéine 291, et que le zinc pouvait favoriser une

conformation plutôt qu'une autre. Ainsi, la cystéine 291 pourrait participer à l'interaction en maintenant la structure de la protéine dans un état plus affin pour le zinc, sans pour autant le lier directement.

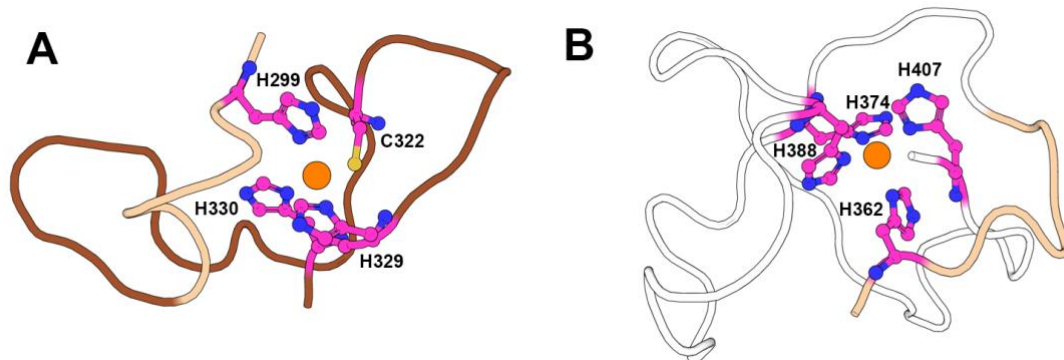


Figure 47 : Modèle des sites de fixation du zinc sur la protéine tau, dans les séquences répétées (A) et dans la partie C-terminale (B). Ces deux sites montrent une compaction de la protéine tau suite à l'ajout du zinc.

Deux études ont supposé que dans un second temps, le zinc se fixerait à l'extérieur des séquences répétées, et induirait l'agrégation de la protéine tau (Roman et al. 2019; Moreira et al. 2019). Nous avons confirmé cette hypothèse en localisant un second site de fixation de plus basse affinité dans la partie C-terminale de tau. Ce site est composé des histidines 362, 374, 388 et 407 (Figure 47b), et est responsable de l'agrégation induite par le zinc. Plus précisément, les histidines 388 et 407 sont cruciales pour induire cette agrégation. Ces résultats sont cohérents avec une précédente étude, qui a suggéré que le zinc inhibe une interaction entre les séquences répétées R3 et R4, ce qui mène à l'auto-association de tau (Jiji et al. 2017).

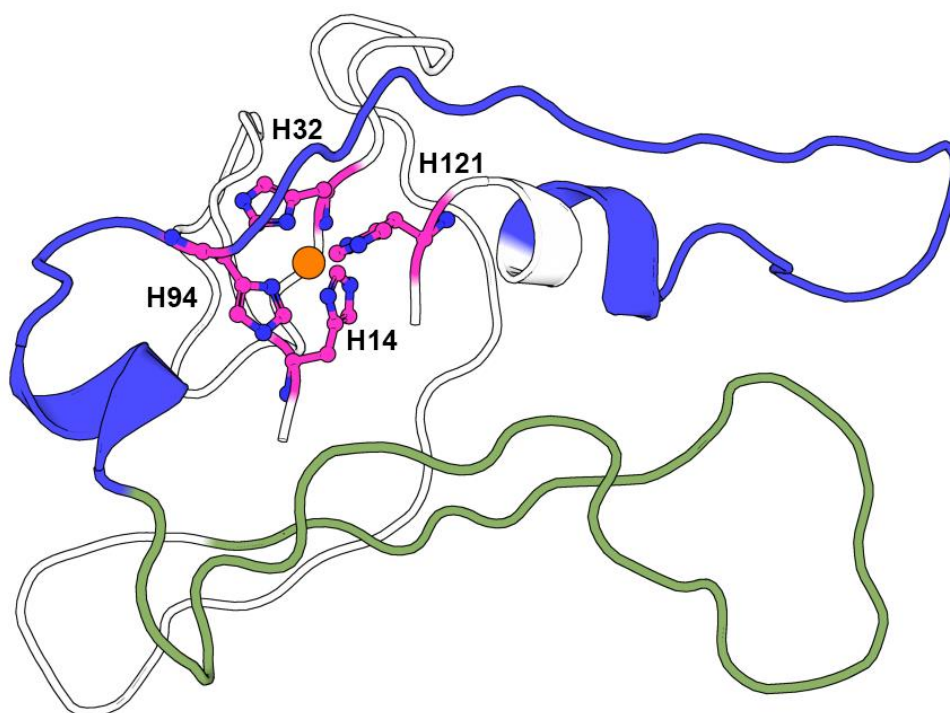


Figure 48 : Modèle du site de fixation du zinc sur la protéine tau dans la partie N-terminale (site indépendant).

Enfin, un troisième site de fixation du zinc a été identifié dans notre étude (Figure 48). Situé dans la partie N-terminale de la protéine, il est indépendant du schéma de fixation séquentiel précédemment identifié, et est constitué des histidines 14, 32, 94 et 121. Cependant, son implication dans l'agrégation de tau n'est pas encore connue.

Pour valider ce modèle, il serait pertinent de réaliser différentes expériences de turbidimétrie avec des mutants individuels des histidines N-terminales. Ces résultats permettraient de s'assurer que le zinc qui se fixe dans la partie N-terminale n'est pas impliqué dans le processus d'agrégation. Aussi, étant donné que l'interaction du zinc avec ce site n'est pas détectable par ITC car elle ne produit pas de chaleur, une autre méthode d'analyse d'interaction, comme la MST, pourrait nous confirmer l'indépendance de ce site dans la liaison du zinc à la protéine tau, et ainsi appuyer le schéma séquentiel que nous avons mis en évidence. Concernant la stœchiométrie de l'interaction, des méthodes complémentaires pourraient soutenir nos données d'ITC et de RMN. Par exemple, il est possible de doser le zinc des agrégats par spectrométrie de masse (ICP-MS), ou bien d'étudier l'interaction par ultracentrifugation analytique sur des mutants alanine des sites de liaison du zinc de la protéine tau.

Étant donné le caractère réversible de cette agrégation et les différences mécanistiques observées par rapport à l'agrégation pathologique en PHF, il est possible que les agrégats induits par le zinc participent à un mécanisme physiologique dans la cellule.

Rôle physiologique

A ce jour, aucune étude n'a décrit le rôle de l'interaction tau-zinc dans la cellule. En conditions physiologiques, dans le cytosol des neurones, la concentration du zinc est infime (de l'ordre de quelques nanomolaires seulement), tandis que la protéine tau est concentrée à environ 2 μ M dans ce même compartiment (Weiss, Sensi, and Koh 2000). A ce ratio molaire là, il est très peu probable que le site de basse affinité en C-terminal soit occupé, et donc que la protéine tau s'agrège. Cependant, il est possible que la protéine tau puisse lier le zinc au niveau de son site situé dans les séquences répétées (qui a une plus haute affinité). Dans ce cas-là, tau pourrait agir comme une métalloprotéine, et lier le zinc de façon temporaire afin de le stocker. De plus, deux des principales molécules interagissant avec tau, à savoir l'ADN et la tubuline, lient toutes deux le zinc (Eagle, Zombola, and Himes 1983) : tau pourrait alors agir comme un transporteur. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que l'affinité du site de liaison en N-terminal de la protéine est inconnue. Ainsi, si cette affinité est suffisamment grande, le zinc pourrait se lier à deux endroits sur la protéine tau, et être relargué indépendamment soit au niveau du N-terminal de la protéine, soit au niveau des séquences répétées.

D'autre part, dès lors que le zinc se lie aux séquences répétées de tau, il induit une compaction de la protéine (Roman et al. 2019). Cette compaction pourrait réguler les fonctions physiologiques de tau en augmentant ou diminuant l'affinité de la protéine tau pour ses cibles. Étant donné que la compaction s'effectue au niveau des séquences répétées, et que ces mêmes séquences interagissent avec la tubuline (G. Lee, Neve, and Kosik 1989), il est très probable que la protéine tau se lie différemment à la tubuline lorsqu'elle est complexée avec le zinc. Aussi, ces séquences répétées ainsi que le domaine proline riche sont impliqués dans la liaison à l'ADN (Wei et al. 2008). La compaction de tau pourrait également modifier sa fonction en influant sur sa localisation

dans la cellule, l'empêchant par exemple d'atteindre le noyau ou les microtubules des axones en modifiant sa diffusion.

Dans un contexte physiologique, la régulation de tau par le zinc s'effectuerait de façon très modérée en raison des faibles concentrations de zinc mises en jeu. A l'inverse, en contexte pathologique, la liaison tau-zinc pourrait avoir une plus grande importance du fait de la dyshoméostasie du zinc.

Implications pathologiques

Agrégats réversibles de tau en conditions pathologiques

Dans les neurones, certains compartiments cellulaires contiennent de grandes quantités de zinc. En particulier, les vésicules synaptiques et les synapses glutamatergiques peuvent contenir jusqu'à 1 mM de zinc (Frederickson et al. 2000). Lorsque l'homéostasie du zinc est perturbée, notamment par des mutations de transporteurs du zinc, ces grandes quantités de zinc ne se situent plus dans ces compartiments mais dans le cytosol ou dans les synapses des neurones. Le transporteur ZnT3 notamment est crucial, car il est chargé d'importer le zinc dans les vésicules à partir du cytosol. Il a été montré que sa mutation pouvait être à l'origine de plusieurs dysfonctions neuronales (Cole et al. 2000; J.-Y. Lee et al. 2002; Adlard et al. 2010). De même, le zinc peut s'accumuler au niveau des synapses à de fortes concentrations, à cause par exemple de la moindre présence de la protéine prion dans ces synapses (Whitehouse et al. 2010). A de tels niveaux de zinc, en présence de tau, les agrégats réversibles de la protéine pourraient se former.

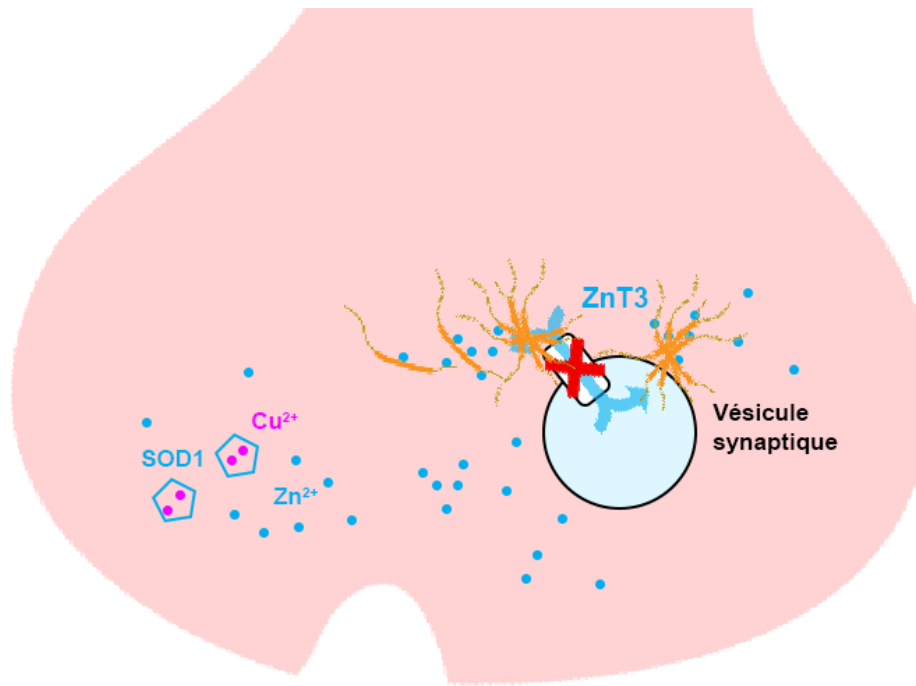


Figure 49 : Proposition de mode d'action de tau en présence de fortes concentrations de zinc dans les neurones. La protéine tau est fixée sous forme agrégée sur les vésicules synaptiques, ce qui retarde leur libération et donc la réponse synaptique.

Une récente étude a montré qu'en conditions pathologiques, la protéine tau se localise au niveau des zones pré et post-synaptiques des neurones (L. Zhou et al. 2017). Plus précisément, elle se dissocie des microtubules et s'associe avec les vésicules synaptiques. Cette association conduit à une déficience pré-synaptique, car les vésicules synaptiques sont relargués moins rapidement dans la synapse. Les auteurs montrent que l'association entre la protéine tau et les vésicules synaptiques s'effectue au niveau de la partie N-terminale de la protéine. Considérant les fortes concentrations de zinc dans ce contexte, il est possible que tau s'agrège à cause du zinc cytosolique et s'associe aux vésicules synaptiques sous forme agrégée (Figure 49). Une autre étude suggère que tau pourrait s'accumuler sous forme phosphorylée au niveau des synapses (Tai et al. 2012), où là aussi les concentrations de zinc sont anormalement élevées dans les pathologies neurodégénératives (Lovell et al. 1998; L.-H. Zhang et al. 2008).

Le rôle de ces agrégats dans un tel contexte peut être multiple, comme par exemple favoriser la formation d'agrégats pathologiques de tau.

Contribution à la formation des PHF

Comme expliqué précédemment, le mécanisme de formation des agrégats réversibles de tau induits par le zinc est différent de celui des PHF. Cependant, les deux phénomènes pourraient être liés.

La grande majorité des études portant sur les effets du zinc sur l'agrégation de la protéine tau ont été réalisées en présence d'un autre inducteur d'agrégation, principalement l'héparine ou le rouge Congo (Mo et al. 2009; Lira-De León et al. 2013; Jiji et al. 2017; Moreira et al. 2019). Dans ces conditions, le zinc n'est pas un inducteur d'agrégation mais un facteur influençant l'apparition des PHF, avec des cinétiques de formation beaucoup plus rapides (Moreira et al. 2019). Cependant, le mécanisme menant à l'apparition de ces structures en présence de zinc pourrait être différent de celui connu sans zinc. Une récente étude (Moreira et al. 2019) suppose que dans ces conditions, le zinc pourrait accélérer l'agrégation pathologique en formant des agrégats réversibles qui serviraient de *nucleus* pour la formation des PHF (Figure 50). Néanmoins, ce modèle a ses limites puisque l'héparine induit la formation d'agrégats de tau qui ne correspondent ni aux PHF observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ni aux corps de Pick observés dans la maladie de Pick (W. Zhang et al. 2019).

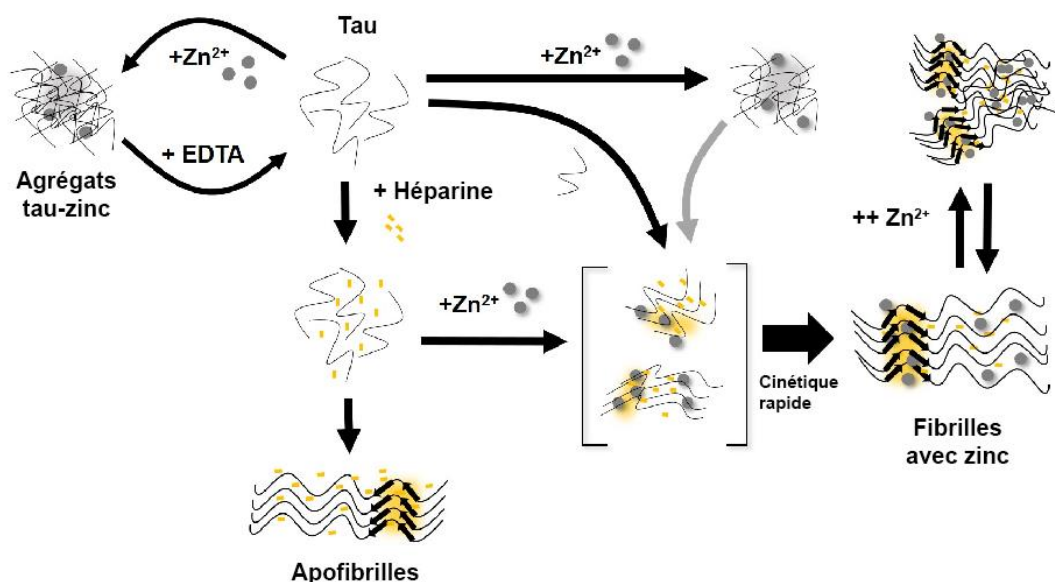


Figure 50 : Interconnections entre les agrégats de tau induits par le zinc et les fibrilles pathologiques (adaptée de Moreira et al. 2019). Les agrégats de tau induits en présence de zinc peuvent servir de *nucleus* à l'agrégation pathologique de tau.

Une des hypothèses pouvant mieux expliquer le rôle du zinc dans la formation des PHF *in vivo* concerne la phosphorylation de la protéine tau. Étant donné l'importance de cette modification post-traductionnelle dans la maladie d'Alzheimer (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas 2015; Šimić et al. 2016), plusieurs études se sont intéressées à l'influence du zinc sur le niveau de phosphorylation de tau (Kim et al. 2011; F. Zhou et al. 2012; Yunpeng Huang et al. 2014). Il a été montré que le zinc provoque l'hyperphosphorylation de tau dans des lignées cellulaires humaines de neuroblastomes au niveau de l'épitope sérine 262 / 356 (F. Zhou et al. 2012) et de la sérine 214 (Kim et al. 2011). Si le zinc pourrait directement réguler les kinases phosphorylant tau, il est aussi possible que le zinc se lie à tau et augmente son affinité pour les kinases en la compactant.

Enfin, depuis quelques années, il a été montré que la protéine tau est sujette au phénomène de séparation de phase liquide-liquide (*Liquid Liquid Phase Separation*, LLPS) (Wegmann et al. 2018), qui apporte de nouveaux éléments sur la compréhension de l'agrégation pathologique de tau, mais aussi sur son agrégation réversible induite par le zinc.

Similarités avec le phénomène LLPS

En 2015 et 2016, deux études ont révélé que les protéines FUS et TDP-43, toutes deux impliquées dans des maladies neurodégénératives, peuvent former des organelles intracellulaires sans membrane (Patel et al. 2015; Conicella et al. 2016). Ce phénomène atypique est appelé LLPS (Brangwynne, Tompa, and Pappu 2015), et sous cette forme, les protéines restent actives dans des conditions physiologiques. Ces gouttelettes permettent de créer des micro-environnements dans la cellule afin de fournir, dans certains contextes, une grande quantité de protéines.

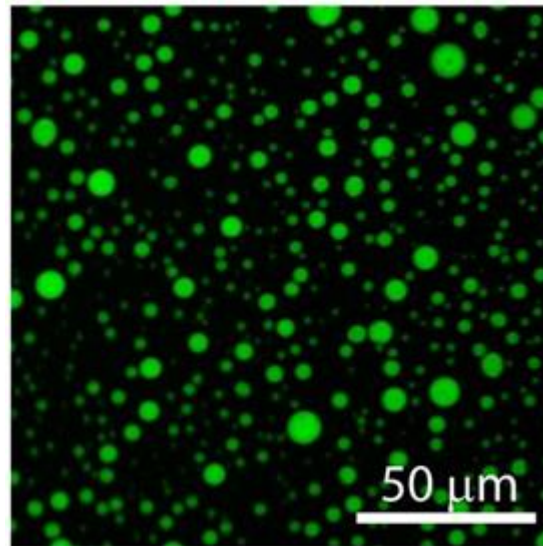


Figure 51 : Image de microscopie confocale de la protéine tau organisée en LLPS en présence d'ARN (X. Zhang et al. 2017). Les LLPS de tau sont des structures réversibles et dépendantes du zinc, ce qui pourrait être une conséquence macroscopique de l'interaction protéine tau – zinc.

En 2017 et 2018, il a été montré que la protéine tau forme également ces gouttelettes dans la cellule, et notamment dans les neurones (X. Zhang et al. 2017; Wegmann et al. 2018). Comme précédemment montré pour FUS et TDP-43 (Patel et al. 2015; Conicella et al. 2016), la formation de gouttelettes de tau est en lien avec son agrégation, étant donné que des structures thioflavine-T-positives apparaissent après plusieurs jours d'incubation *in vitro* (Wegmann et al. 2018). La LLPS de la protéine tau est observée à la fois en présence d'un inducteur polyanionique comme l'ARN (Figure 51), mais aussi avec la seule présence d'agents mimant la viscosité intracellulaire (Wegmann et al. 2018). Récemment, une étude a révélé que le zinc favorise la LLPS de la protéine tau (Singh et al. 2020), en la rendant possible même à de faibles concentrations de protéine, ce qui amène à comparer ce phénomène avec l'agrégation réversible de tau que nous avons récemment décrite (Roman et al. 2019).

Il existe plusieurs éléments qui peuvent laisser penser que le mécanisme d'agrégation réversible de tau pourrait être à l'origine de son organisation en gouttelettes. Premièrement, les deux processus sont réversibles, ce qui les différencie de l'agrégation pathologique en PHF. Deuxièmement, le zinc peut induire à lui seul la formation d'agrégats réversibles de tau mais aussi de gouttelettes, en l'absence de tout autre composé

induisant l'agrégation de tau (héparine, ARN, ou tout autre polyanions) et en l'absence d'agents mimant la viscosité intracellulaire (Singh et al. 2020). Les auteurs ont cependant utilisé de fortes concentrations en sels, ce qui, compte tenu de l'importance des effets de charges dans l'agrégation de la protéine tau (Jho et al. 2010; Y. Wang and Mandelkow 2016), pourrait expliquer le fait que nous n'avons pas observé de telles structures dans notre cas. Enfin, les agrégats réversibles de tau comme les gouttelettes formées en présence de zinc nécessitent la présence des parties flanquantes de la protéine tau, mais aussi d'une cystéine des séquences répétées (Singh et al. 2020). Ces similarités indiquent que l'agrégation réversible de tau induite par le zinc pourrait être une explication moléculaire du phénomène LLPS plus macroscopique, précédemment décrit comme jouant un rôle important dans les maladies neurodégénératives (Patel et al. 2015; Murakami et al. 2015; Conicella et al. 2016; K.-H. Lee et al. 2016; Wegmann et al. 2018).

Que l'organisation en gouttelettes de tau soit associée ou pas à son agrégation réversible induite par le zinc, notre proposition d'un modèle de l'interaction protéine tau - zinc pose les bases moléculaires pour de futures études visant à empêcher l'apparition de pathologies neurodégénératives liées à tau et au zinc.

Intérêt thérapeutique

Avant d'envisager une stratégie thérapeutique, il est essentiel de clarifier le rôle de l'agrégation de tau induite par le zinc dans la cellule, et de connaître mieux ses implications physiologiques et pathologiques. Ainsi, il apparaît important d'étudier dans un premier temps la fonctionnalité de la protéine tau *in vitro* lorsqu'elle est liée au zinc (par exemple sa liaison à la tubuline et sa capacité à former des microtubules), et de voir l'impact de l'ajout du zinc sur tau dans des modèles cellulaires et neuronaux, mais aussi *in vivo*. De plus, un certain nombre d'expériences peuvent être conduites pour pouvoir éclaircir le lien entre ces agrégats réversibles induits par le zinc et les PHF. Par exemple, en purifiant des PHF à partir de cerveaux de patients ou d'animaux malades, une mesure de la quantité de zinc dans les PHF par spectrométrie de masse indiquerait si le zinc constitue ces agrégats pathologiques. En purifiant les agrégats tau - zinc et en les injectant dans des modèles cellulaires ou animaux, il est possible qu'ils induisent la formation de PHF au bout d'un certain temps, ce qui montrerait qu'ils peuvent être à l'origine du processus

d'agrégation pathologique. Dans le cas où leur implication pathologique est avérée, notre étude pose les bases moléculaires de l'interaction tau - zinc, ce qui pourra aider à développer une approche thérapeutique.

Un des points soulevés par notre étude est l'importance de la partie C-terminale de tau dans son agrégation induite par le zinc. Plus précisément, les mutations en alanines des histidines localisées au bout de la queue C-terminale (H388 et H407) inhibent le processus d'agrégation. Ce résultat met en évidence une petite partie de séquence sur la protéine, qui pourrait être ciblée par de potentiels inhibiteurs afin d'empêcher l'agrégation induite par le zinc. Le développement de tels inhibiteurs est d'autant plus envisageable que nous avons modélisé la structure tridimensionnelle du site de liaison dans la partie C-terminale (Figure 52) :

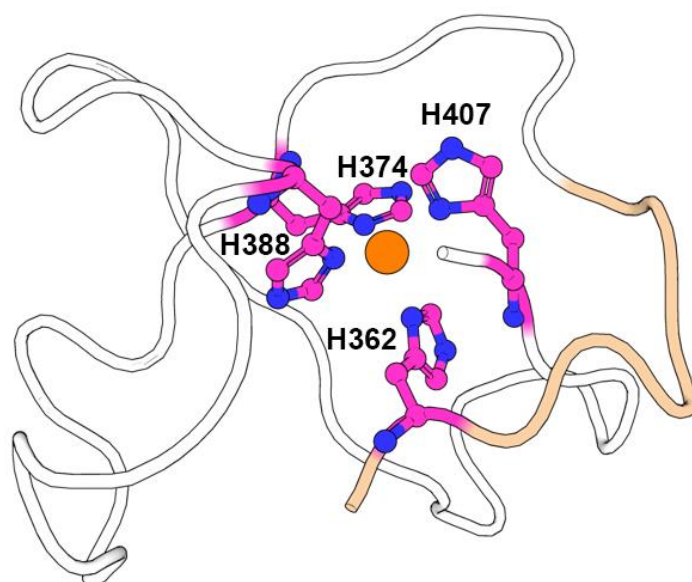


Figure 52 : Modèle du site de liaison du zinc sur la partie C-terminale de la protéine tau. Ce site est responsable de l'agrégation réversible de tau induit par le zinc, et pourrait constituer une cible d'intérêt pour de futurs médicaments.

Cette structure donne une idée de la taille ainsi que de la forme du futur inhibiteur, mais aussi des éventuelles fonctions chimiques qu'il devra contenir pour interagir avec les chaînes latérales des acides aminés de tau et pour se fixer avec une bonne efficacité sur la protéine. Tau reste cependant très flexible, ce qui devrait la rendre sensible à un grand nombre de molécules, même avec une faible spécificité d'interaction. La contrepartie à

cette particularité structurale est que l'inhibiteur risque de cibler d'autres protéines dans la cellule, et d'induire une cytotoxicité importante. Ce point est d'autant plus crucial que de nombreuses pathologies sont associées à des déficiences en zinc, comme la dépression ou les crises d'épilepsie (Fukahori and Itoh 1990). Une autre façon d'empêcher plus spécifiquement cette agrégation consisterait à cibler l'épitope de la partie C-terminale en présence de zinc par un anticorps inhibiteur d'agrégation, qui serait développé sur la base du modèle tridimensionnel du site de liaison au zinc de la partie C-terminale. Une telle molécule pourrait empêcher la formation d'agrégats de tau dans les neurones, et par conséquent freiner l'apparition des nombreuses pathologies neurodégénératives associées à cette protéine.

Conclusion

Durant ma thèse, je me suis d'abord intéressé à la tubuline et à l'utilisation du nanoDSF Prometheus NT.Plex pour l'étude de polymérisation des microtubules. Pendant ma première année principalement, je me suis focalisé sur cette méthode biophysique, son principe, et j'ai détourné son utilisation en mettant au point des expériences qui n'avaient pas été réalisées jusqu'à maintenant avec ce type d'appareil. A cette occasion, j'ai beaucoup appris en ce qui concerne l'analyse des données et l'interprétation des résultats. J'ai été amené à échanger avec NanoTemper (qui a développé la machine) afin de trouver des explications aux très nombreuses courbes complexes que le nanoDSF Prometheus NT.Plex produisait en peu de temps. C'est aussi durant cette partie où j'ai beaucoup purifié et équilibré la tubuline. Sa préparation passe par plusieurs étapes rarement rencontrées en biochimie, incluant notamment la récupération et le broyage de cervelles d'agneaux. En étudiant la polymérisation de tubuline avec le nanoDSF Prometheus NT.Plex, j'ai réalisé que chaque sujet avait ses spécificités, et que dans certains cas il n'est pas possible de compter sur les savoirs généraux acquis en cours.

Durant la seconde moitié de ma thèse, j'ai étudié la protéine tau et le zinc, et j'ai su plus facilement orienter mes choix et mes expériences qu'au début de ma thèse. La situation était alors inverse, puisque j'utilisais des techniques biophysiques de référence et un protocole de purification que je maîtrise bien, mais dans le cadre de recherches sur un sujet fondamental qui n'avait pas été beaucoup étudié jusqu'à maintenant. J'ai acquis de bonnes compétences en biochimie et en biophysique notamment grâce à la mise à disposition des appareils de microcalorimétrie de la plateforme PINT. Travailler au quotidien avec de tels équipements a été un vrai plaisir et une chance dans ma jeune carrière de chercheur. Cette partie de ma thèse a aussi été l'occasion pour moi de faire des manipulations à l'extérieur du laboratoire grâce aux expériences de RMN réalisées au LISM, et de partager mes ressentis avec d'autres chercheurs au quotidien.

Ces 3 ans se sont concrétisés par la production de mes deux principaux articles (l'un en révision à Journal of Molecular Biology, l'autre actuellement en cours de rédaction), mais aussi par deux autres publications sur lesquelles j'ai pu apporter mon aide en parallèle à mes projets principaux (Roman et al. 2019; Philipp O. Tsvetkov et al. 2019).

Références

- Adamo, Ana M., and Patricia I. Oteiza. 2010. "Zinc Deficiency and Neurodevelopment: The Case of Neurons." *BioFactors* 36 (2): 117–24.
- Adlard, Paul A., Jacqui M. Parncutt, David I. Finkelstein, and Ashley I. Bush. 2010. "Cognitive Loss in Zinc Transporter-3 Knock-out Mice: A Phenocopy for the Synaptic and Memory Deficits of Alzheimer's Disease?" *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (5): 1631–36.
- Aizenman, E., A. K. Stout, K. A. Hartnett, K. E. Dineley, B. McLaughlin, and I. J. Reynolds. 2000. "Induction of Neuronal Apoptosis by Thiol Oxidation: Putative Role of Intracellular Zinc Release." *Journal of Neurochemistry* 75 (5): 1878–88.
- Alavi Naini, Seyedeh Maryam, and Nadia Soussi-Yanicostas. 2015. "Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies?" *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/151979>.
- Alzheimer, Alois. 1907. "Über Eine Eigenartige Erkrankung Der Hirnrinde [About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex]."
- Amadoro, G., V. Latina, V. Corsetti, and P. Calissano. 2020. "N-Terminal Tau Truncation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease (AD): Developing a Novel Diagnostic and Therapeutic Approach." *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease* 1866 (3): 165584.
- Andronesi, Ovidiu C., Martin von Bergen, Jacek Biernat, Karsten Seidel, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Marc Baldus. 2008. "Characterization of Alzheimer's-like Paired Helical Filaments from the Core Domain of Tau Protein Using Solid-State NMR Spectroscopy." *Journal of the American Chemical Society* 130 (18): 5922–28.

- Arai, Tetsuaki, Masato Hasegawa, Haruhiko Akiyama, Kenji Ikeda, Takashi Nonaka, Hiroshi Mori, David Mann, et al. 2006. "TDP-43 Is a Component of Ubiquitin-Positive Tau-Negative Inclusions in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351 (3): 602–11.
- Ates-Alagoz, Zeynep, and Adeboye Adejare. 2013. "NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression." *Pharmaceuticals* 6 (4): 480–99.
- Baltaci, Abdulkirim Kasim, and Rasim Mogulkoc. 2012. "Leptin and Zinc Relation: In Regulation of Food Intake and Immunity." *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16 (Suppl 3): S611-616.
- Barbier, P., C. Gregoire, F. Devred, M. Sarrazin, and V. Peyrot. 2001. "In Vitro Effect of Cryptophycin 52 on Microtubule Assembly and Tubulin: Molecular Modeling of the Mechanism of Action of a New Antimitotic Drug." *Biochemistry* 40 (45): 13510–19.
- Barbier, Pascale, Orgeta Zejneli, Marlène Martinho, Alessia Lasorsa, Valérie Belle, Caroline Smet-Nocca, Philipp O. Tsvetkov, François Devred, and Isabelle Landrieu. 2019. "Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects." *Frontiers in Aging Neuroscience* 11 (August). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>.
- Barghorn, Stefan, Peter Davies, and Eckhard Mandelkow. 2004. "Tau Paired Helical Filaments from Alzheimer's Disease Brain and Assembled in Vitro Are Based on β -Structure in the Core Domain." *Biochemistry* 43 (6): 1694–1703.
- Bayer, Thomas A. 2015. "Proteinopathies, a Core Concept for Understanding and Ultimately Treating Degenerative Disorders?" *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 25 (5): 713–24.
- Behnke, O., and A. Forer. 1966. "Intranuclear Microtubules." *Science* 153 (3743): 1536–37.
- Bergen, M. von, S. Barghorn, L. Li, A. Marx, J. Biernat, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2001. "Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote

- Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local Beta-Structure.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 48165–74.
- Bergen, M. von, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2000. “Assembly of Tau Protein into Alzheimer Paired Helical Filaments Depends on a Local Sequence Motif ((306)VQIVYK(311)) Forming Beta Structure.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10): 5129–34.
- Bergen, Martin von, Stefan Barghorn, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow. 2005. “Tau Aggregation Is Driven by a Transition from Random Coil to Beta Sheet Structure.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1739 (2–3): 158–66.
- Bergen, Martin von, Stefan Barghorn, Shirley A. Müller, Marcus Pickhardt, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, Peter Davies, Ueli Aepli, and Eckhard Mandelkow. 2006. “The Core of Tau-Paired Helical Filaments Studied by Scanning Transmission Electron Microscopy and Limited Proteolysis.” *Biochemistry* 45 (20): 6446–57.
- Biernat, J., E. M. Mandelkow, C. Schröter, B. Lichtenberg-Kraag, B. Steiner, B. Berling, H. Meyer, et al. 1992. “The Switch of Tau Protein to an Alzheimer-like State Includes the Phosphorylation of Two Serine-Proline Motifs Upstream of the Microtubule Binding Region.” *The EMBO Journal* 11 (4): 1593–97.
- Bird, T. D., D. Nochlin, P. Poorkaj, M. Cherrier, J. Kaye, H. Payami, E. Peskind, et al. 1999. “A Clinical Pathological Comparison of Three Families with Frontotemporal Dementia and Identical Mutations in the Tau Gene (P301L).” *Brain: A Journal of Neurology* 122 (Pt 4) (April): 741–56.
- Bitan, Gal. 2019. “Disease-Modifying Therapy for Proteinopathies: Can the Exception Become the Rule?” *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 168: 277.
- Borisy, G. G., and J. B. Olmsted. 1972. “Nucleated Assembly of Microtubules in Porcine Brain Extracts.” *Science* 177 (4055): 1196–97.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. “Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes.” *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239–59.

- . 1996. “Evolution of the Neuropathology of Alzheimer’s Disease.” *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum* 165: 3–12.
- Brangwynne, Clifford P., Peter Tompa, and Rohit V. Pappu. 2015. “Polymer Physics of Intracellular Phase Transitions.” *Nature Physics* 11 (11): 899–904.
- Breuzard, Gilles, Pierre Hubert, Roqiya Nouar, Tiphany De Bessa, François Devred, Pascale Barbier, James N. Sturgis, and Vincent Peyrot. 2013. “Molecular Mechanisms of Tau Binding to Microtubules and Its Role in Microtubule Dynamics in Live Cells.” *Journal of Cell Science* 126 (Pt 13): 2810–19.
- Breuzard, Gilles, Alessandra Pagano, Sonia Bastonero, Soazig Malesinski, Fabrice Parat, Pascale Barbier, Vincent Peyrot, and Hervé Kovacic. 2019. “Tau Regulates the Microtubule-Dependent Migration of Glioblastoma Cells via the Rho-ROCK Signaling Pathway.” *Journal of Cell Science* 132 (3). <https://doi.org/10.1242/jcs.222851>.
- Brion, Jean Pierre, Heloísa Passareiro, Jacques Nunez, and Jacqueline Flament Durand. 1985. “Mise En Évidence Immunologique de La Protéine Tau Au Niveau Des Lésions de Dégénérescence Neurofibrillaire de La Maladie d’Alzheimer,” January. <https://doi.org/null>.
- Buée, Luc, Thierry Bussière, Valérie Buée-Scherrer, André Delacourte, and Patrick R. Hof. 2000. “Tau Protein Isoforms, Phosphorylation and Role in Neurodegenerative Disorders” These Authors Contributed Equally to This Work.” *Brain Research Reviews* 33 (1): 95–130.
- Bull, Natalie D., Alessandra Guidi, Michel Goedert, Keith R. Martin, and Maria Grazia Spillantini. 2012. “Reduced Axonal Transport and Increased Excitotoxic Retinal Ganglion Cell Degeneration in Mice Transgenic for Human Mutant P301S Tau.” *PloS One* 7 (4): e34724.
- Bush, A. I., W. H. Pettingell, G. Multhaup, M. d Paradis, J. P. Vonsattel, J. F. Gusella, K. Beyreuther, C. L. Masters, and R. E. Tanzi. 1994. “Rapid Induction of Alzheimer A Beta Amyloid Formation by Zinc.” *Science* 265 (5177): 1464–67.
- Caceres, A., and K. S. Kosik. 1990. “Inhibition of Neurite Polarity by Tau Antisense Oligonucleotides in Primary Cerebellar Neurons.” *Nature* 343 (6257): 461–63.

- Callahan, L. M., D. J. Selski, M. R. Martzen, J. E. Cheetham, and P. D. Coleman. 1994. "Preliminary Evidence: Decreased GAP-43 Message in Tangle-Bearing Neurons Relative to Adjacent Tangle-Free Neurons in Alzheimer's Disease Parahippocampal Gyrus." *Neurobiology of Aging* 15 (3): 381–86.
- Camero, Sergio, María J. Benítez, Alejandro Barrantes, José M. Ayuso, Raquel Cuadros, Jesús Avila, and Juan S. Jiménez. 2014. "Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features Which Are Similar to Those Found in Histone-DNA Complex." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 39 (3): 649–60.
- Camero, Sergio, María J. Benítez, Raquel Cuadros, Félix Hernández, Jesús Avila, and Juan S. Jiménez. 2014. "Thermodynamics of the Interaction between Alzheimer's Disease Related Tau Protein and DNA." *PloS One* 9 (8): e104690.
- Caragounis, Aphrodite, Katherine Ann Price, Cynthia P. W. Soon, Gulay Filiz, Colin L. Masters, Qiao-Xin Li, Peter J. Crouch, and Anthony R. White. 2010. "Zinc Induces Depletion and Aggregation of Endogenous TDP-43." *Free Radical Biology & Medicine* 48 (9): 1152–61.
- Charafeddine, Rabab A., Wilian A. Cortopassi, Parnian Lak, Ruensern Tan, Richard J. McKenney, Matthew P. Jacobson, Diane L. Barber, and Torsten Wittmann. 2019. "Tau Repeat Regions Contain Conserved Histidine Residues That Modulate Microtubule-Binding in Response to Changes in PH." *The Journal of Biological Chemistry*, April, jbc.RA118.007004.
- Chen, J., Y. Kanai, N. J. Cowan, and N. Hirokawa. 1992. "Projection Domains of MAP2 and Tau Determine Spacings between Microtubules in Dendrites and Axons." *Nature* 360 (6405): 674–77.
- Clavaguera, Florence, Hiroyasu Akatsu, Graham Fraser, R. Anthony Crowther, Stephan Frank, Jürgen Hench, Alphonse Probst, et al. 2013. "Brain Homogenates from Human Tauopathies Induce Tau Inclusions in Mouse Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (23): 9535–40.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. "Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain." *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13.

- Clavaguera, Florence, Charles Duyckaerts, and Stéphane Haïk. 2020. "Prion-like Properties of Tau Assemblies." *Current Opinion in Neurobiology* 61 (April): 49–57.
- Cleveland, Don W., Shu-Ying Hwo, and Marc W. Kirschner. 1977. "Physical and Chemical Properties of Purified Tau Factor and the Role of Tau in Microtubule Assembly." *Journal of Molecular Biology* 116 (2): 227–47.
- Cole, T. B., C. A. Robbins, H. J. Wenzel, P. A. Schwartzkroin, and R. D. Palmiter. 2000. "Seizures and Neuronal Damage in Mice Lacking Vesicular Zinc." *Epilepsy Research* 39 (2): 153–69.
- Combs, Benjamin, Rebecca L. Mueller, Gerardo Morfini, Scott T. Brady, and Nicholas M. Kanaan. 2019. "Tau and Axonal Transport Misregulation in Tauopathies." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1184: 81–95.
- Conicella, Alexander E., Gül H. Zerze, Jeetain Mittal, and Nicolas L. Fawzi. 2016. "ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low Complexity C-Terminal Domain." *Structure* 24 (9): 1537–49.
- Correia, J. J., and R. C. Williams. 1983. "Mechanisms of Assembly and Disassembly of Microtubules." *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 12: 211–35.
- Crowther, R. A., and C. M. Wischik. 1985. "Image Reconstruction of the Alzheimer Paired Helical Filament." *The EMBO Journal* 4 (13B): 3661–65.
- Daebel, Venita, Subashchandrabose Chinnathambi, Jacek Biernat, Martin Schwalbe, Birgit Habenstein, Antoine Loquet, Elias Akoury, et al. 2012. " β -Sheet Core of Tau Paired Helical Filaments Revealed by Solid-State NMR." *Journal of the American Chemical Society* 134 (34): 13982–89.
- Dai, Chun-Ling, Xia Chen, Syed Faraz Kazim, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2015. "Passive Immunization Targeting the N-Terminal Projection Domain of Tau Decreases Tau Pathology and Improves Cognition in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease and Tauopathies." *Journal of Neural Transmission* 122 (4): 607–17.
- Dan, Ayaho, Muneaki Takahashi, Masami Masuda-Suzukake, Fuyuki Kametani, Takashi Nonaka, Hiromi Kondo, Haruhiko Akiyama, et al. 2013. "Extensive Deamidation at

- Asparagine Residue 279 Accounts for Weak Immunoreactivity of Tau with RD4 Antibody in Alzheimer's Disease Brain." *Acta Neuropathol Commun* 1 (August): 54.
- Darlix, Amélie, Christophe Hirtz, Simon Thezenas, Aleksandra Maceski, Audrey Gabelle, Evelyne Lopez-Crapez, Hélène De Forges, et al. 2019. "The Prognostic Value of the Tau Protein Serum Level in Metastatic Breast Cancer Patients and Its Correlation with Brain Metastases." *BMC Cancer* 19 (1): 110.
- De Bessa, Tiphany, Gilles Breuzard, Diane Allegro, François Devred, Vincent Peyrot, and Pascale Barbier. 2017. "Tau Interaction with Tubulin and Microtubules: From Purified Proteins to Cells." *Methods in Molecular Biology* 1523: 61–85.
- Delacourte, A., J. P. David, N. Sergeant, L. Buée, A. Wattez, P. Vermersch, F. Ghzali, et al. 1999. "The Biochemical Pathway of Neurofibrillary Degeneration in Aging and Alzheimer's Disease." *Neurology* 52 (6): 1158–65.
- Despres, Clément, Cillian Byrne, Haoling Qi, François-Xavier Cantrelle, Isabelle Huvent, Béatrice Chambraud, Etienne-Emile Baulieu, et al. 2017. "Identification of the Tau Phosphorylation Pattern That Drives Its Aggregation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (34): 9080–85.
- DeTure, Michael A., Luca Di Noto, and Daniel L. Purich. 2002. "In Vitro Assembly of Alzheimer-like Filaments. How a Small Cluster of Charged Residues in Tau and MAP2 Controls Filament Morphology." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (38): 34755–59.
- Devred, François, Pascale Barbier, Soazig Douillard, Octavio Monasterio, José Manuel Andreu, and Vincent Peyrot. 2004. "Tau Induces Ring and Microtubule Formation from A β -Tubulin Dimers under Nonassembly Conditions." *Biochemistry* 43 (32): 10520–31.
- Devred, François, Pascale Barbier, Daniel Lafitte, Isabelle Landrieu, Guy Lippens, and Vincent Peyrot. 2010. "Chapter 23 - Microtubule and MAPs: Thermodynamics of Complex Formation by AUC, ITC, Fluorescence, and NMR." In *Methods in Cell Biology*, edited by Leslie Wilson and John J. Correia, 95:449–80. Academic Press.

- Devred, François, Soazig Douillard, Claudette Briand, and Vincent Peyrot. 2002. "First Tau Repeat Domain Binding to Growing and Taxol-Stabilized Microtubules, and Serine 262 Residue Phosphorylation." *FEBS Letters* 523 (1–3): 247–51.
- Di Maïo, Isabelle L., Pascale Barbier, Diane Allegro, Cédric Brault, and Vincent Peyrot. 2014. "Quantitative Analysis of Tau-Microtubule Interaction Using FRET." *International Journal of Molecular Sciences* 15 (8): 14697–714.
- Diella, Francesca, Niall Haslam, Claudia Chica, Aidan Budd, Sushama Michael, Nigel P. Brown, Gilles Trave, and Toby J. Gibson. 2008. "Understanding Eukaryotic Linear Motifs and Their Role in Cell Signaling and Regulation." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (May): 6580–6603.
- Dixit, Ram, Jennifer L. Ross, Yale E. Goldman, and Erika L. F. Holzbaur. 2008. "Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau." *Science* 319 (5866): 1086–89.
- Dong, Jian, Craig S. Atwood, Vernon E. Anderson, Sandra L. Siedlak, Mark A. Smith, George Perry, and Paul R. Carey. 2003. "Metal Binding and Oxidation of Amyloid-Beta within Isolated Senile Plaque Cores: Raman Microscopic Evidence." *Biochemistry* 42 (10): 2768–73.
- Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. "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." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7679–88.
- Duan, Aranda R., Erin M. Jonasson, Emily O. Alberico, Chunlei Li, Jared P. Scripture, Rachel A. Miller, Mark S. Alber, and Holly V. Goodson. 2017. "Interactions between Tau and Different Conformations of Tubulin: Implications for Tau Function and Mechanism." *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.018>.
- Duff, Karen, and Emmanuel Planet. 2005. "Untangling Memory Deficits." *Nature Medicine* 11 (8): 826–27.

- Dugger, Brittany N., Charisse M. Whiteside, Chera L. Maarouf, Douglas G. Walker, Thomas G. Beach, Lucia I. Sue, Angelica Garcia, et al. 2016. "The Presence of Select Tau Species in Human Peripheral Tissues and Their Relation to Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 51 (2): 345–56.
- Duman, R. S., G. R. Heninger, and E. J. Nestler. 1997. "A Molecular and Cellular Theory of Depression." *Archives of General Psychiatry* 54 (7): 597–606.
- Eagle, G. R., R. R. Zombola, and R. H. Himes. 1983. "Tubulin-Zinc Interactions: Binding and Polymerization Studies." *Biochemistry* 22 (1): 221–28.
- Eliezer, David, Patrick Barré, Muris Kobaslija, Dylan Chan, Xiaohua Li, and Lauren Heend. 2005. "Residual Structure in the Repeat Domain of Tau: Echoes of Microtubule Binding and Paired Helical Filament Formation." *Biochemistry* 44 (3): 1026–36.
- Erickson, H. P. 1974. "Assembly of Microtubules from Preformed, Ring-Shaped Protofilaments and 6-S Tubulin." *Journal of Supramolecular Structure* 2 (2–4): 393–411.
- Ermilova, Irina P., Vladimir B. Ermilov, Mark Levy, Emily Ho, Cliff Pereira, and Joseph S. Beckman. 2005. "Protection by Dietary Zinc in ALS Mutant G93A SOD Transgenic Mice." *Neuroscience Letters* 379 (1): 42–46.
- Esler, W. P., E. R. Stimson, J. M. Jennings, J. R. Ghilardi, P. W. Mantyh, and J. E. Maggio. 1996. "Zinc-Induced Aggregation of Human and Rat Beta-Amyloid Peptides in Vitro." *Journal of Neurochemistry* 66 (2): 723–32.
- Falchuk, K. H. 1998. "The Molecular Basis for the Role of Zinc in Developmental Biology." *Molecular and Cellular Biochemistry* 188 (1–2): 41–48.
- Falcon, Benjamin, Wenjuan Zhang, Alexey G. Murzin, Garib Murshudov, Holly J. Garringer, Ruben Vidal, R. Anthony Crowther, Bernardino Ghetti, Sjors H. W. Scheres, and Michel Goedert. 2018. "Structures of Filaments from Pick's Disease Reveal a Novel Tau Protein Fold." *Nature* 561 (7721): 137–40.
- Falzone, Tomás L., Gorazd B. Stokin, Concepción Lillo, Elizabeth M. Rodrigues, Eileen L. Westerman, David S. Williams, and Lawrence S. B. Goldstein. 2009. "Axonal Stress Kinase Activation and Tau Misbehavior Induced by Kinesin-1 Transport

- Defects.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (18): 5758–67.
- Feinstein, Stuart C., and Leslie Wilson. 2005. “Inability of Tau to Properly Regulate Neuronal Microtubule Dynamics: A Loss-of-Function Mechanism by Which Tau Might Mediate Neuronal Cell Death.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1739 (2–3): 268–79.
- Fichou, Yann, Youssra K. Al-Hilaly, François Devred, Caroline Smet-Nocca, Philipp O. Tsvetkov, Joke Verelst, Joris Winderickx, et al. 2019. “The Elusive Tau Molecular Structures: Can We Translate the Recent Breakthroughs into New Targets for Intervention?” *Acta Neuropathol Commun* 7 (March). <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0682-x>.
- Finkiewicz, L. 1967. “[Microtubules, a newly discovered component of cell cytoplasm].” *Folia morphologica* 26 (4): 539–44.
- Fisher, J. L., and R. L. Macdonald. 1998. “The Role of an Alpha Subtype M2-M3 His in Regulating Inhibition of GABAA Receptor Current by Zinc and Other Divalent Cations.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (8): 2944–53.
- Fitzpatrick, Anthony W. P., Benjamin Falcon, Shaoda He, Alexey G. Murzin, Garib Murshudov, Holly J. Garringer, R. Anthony Crowther, Bernardino Ghetti, Michel Goedert, and Sjors H. W. Scheres. 2017. “Cryo-EM Structures of Tau Filaments from Alzheimer’s Disease Brain.” *Nature* 547 (7662): 185–90.
- Frederickson, C. J., S. W. Suh, D. Silva, C. J. Frederickson, and R. B. Thompson. 2000. “Importance of Zinc in the Central Nervous System: The Zinc-Containing Neuron.” *The Journal of Nutrition* 130 (5S Suppl): 1471S-83S.
- Fukahori, Motofumi, and Masatoshi Itoh. 1990. “Effects of Dietary Zinc Status on Seizure Susceptibility and Hippocampal Zinc Content in TheEl (Epilepsy) Mouse.” *Brain Research* 529 (1): 16–22.
- Garnier, Cyrille, François Devred, Deborah Byrne, Rémy Puppo, Andrei Yu Roman, Soazig Malesinski, Andrey V. Golovin, Régine Lebrun, Natalia N. Ninkina, and

- Philipp O. Tsvetkov. 2017. "Zinc Binding to RNA Recognition Motif of TDP-43 Induces the Formation of Amyloid-like Aggregates." *Scientific Reports* 7 (1): 1–10.
- Gaskin, Felicia, Charles R. Cantor, and Michael L. Shelanski. 1974. "Turbidimetric Studies of the in Vitro Assembly and Disassembly of Porcine Neurotubules." *Journal of Molecular Biology* 89 (4): 737–55.
- Gentry, Erik G., Benjamin W. Henderson, Andrew E. Arrant, Marla Gearing, Yangbo Feng, Nicole C. Riddle, and Jeremy H. Herskowitz. 2016. "Rho Kinase Inhibition as a Therapeutic for Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (4): 1316–23.
- Giannetti, A. M., G. Lindwall, M. F. Chau, M. J. Radeke, S. C. Feinstein, and L. A. Kohlstaedt. 2000. "Fibers of Tau Fragments, but Not Full Length Tau, Exhibit a Cross Beta-Structure: Implications for the Formation of Paired Helical Filaments." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 9 (12): 2427–35.
- Gigant, Benoît, Isabelle Landrieu, Caroline Fauquant, Pascale Barbier, Isabelle Huvent, Jean-Michel Wieruszeski, Marcel Knossow, and Guy Lippens. 2014. "Mechanism of Tau-Promoted Microtubule Assembly As Probed by NMR Spectroscopy." *Journal of the American Chemical Society* 136 (36): 12615–23.
- Gigant, Benoît, Chunguang Wang, Raimond B. G. Ravelli, Fanny Roussi, Michel O. Steinmetz, Patrick A. Curmi, André Sobel, and Marcel Knossow. 2005. "Structural Basis for the Regulation of Tubulin by Vinblastine." *Nature* 435 (7041): 519–22.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R. A. Crowther. 1989. "Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease." *Neuron* 3 (4): 519–26.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich, and R. A. Crowther. 1989. "Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding an Isoform of Microtubule-Associated Protein Tau Containing Four Tandem Repeats: Differential Expression of Tau Protein MRNAs in Human Brain." *The EMBO Journal* 8 (2): 393–99.

- Goedert, M., C. M. Wischik, R. A. Crowther, J. E. Walker, and A. Klug. 1988. "Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding a Core Protein of the Paired Helical Filament of Alzheimer Disease: Identification as the Microtubule-Associated Protein Tau." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (11): 4051–55.
- Goedert, Michel, Florence Clavaguera, and Markus Tolnay. 2010. "The Propagation of Prion-like Protein Inclusions in Neurodegenerative Diseases." *Trends in Neurosciences* 33 (7): 317–25.
- Goldenberg, R. L., T. Tamura, Y. Neggers, R. L. Copper, K. E. Johnston, M. B. DuBard, and J. C. Hauth. 1995. "The Effect of Zinc Supplementation on Pregnancy Outcome." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 274 (6): 463–68.
- Goodkin, Howard P., Suchitra Joshi, Zakaria Mtchedlishvili, Jasmit Brar, and Jaideep Kapur. 2008. "Subunit-Specific Trafficking of GABAA Receptors during Status Epilepticus." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28 (10): 2527–38.
- Gorantla, Nalini Vijay, Puneet Khandelwal, Pankaj Poddar, and Subashchandrabose Chinnathambi. 2017. "Global Conformation of Tau Protein Mapped by Raman Spectroscopy." In *Tau Protein: Methods and Protocols*, edited by Caroline Smet-Nocca, 21–31. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer.
- Gorsky, Marianna Karina, Sylvie Burnouf, Jacqueline Dols, Eckhard Mandelkow, and Linda Partridge. 2016. "Acetylation Mimic of Lysine 280 Exacerbates Human Tau Neurotoxicity in Vivo." *Scientific Reports* 6 (March): 22685.
- Goux, Warren J. 2002. "The Conformations of Filamentous and Soluble Tau Associated with Alzheimer Paired Helical Filaments." *Biochemistry* 41 (46): 13798–806.
- Goux, Warren J., Lauren Kopplin, Anh D. Nguyen, Kathryn Leak, Marni Rutkowsky, Vasanthi D. Shanmuganandam, Deepak Sharma, Hideyo Inouye, and Daniel A. Kirschner. 2004. "The Formation of Straight and Twisted Filaments from Short Tau Peptides." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 26868–75.

- Guise, S., D. Braguer, G. Carles, A. Delacourte, and C. Briand. 2001. "Hyperphosphorylation of Tau Is Mediated by ERK Activation during Anticancer Drug-Induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells." *Journal of Neuroscience Research*. 3.0.CO;2-T">[https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20010201\)63:3<257::AID-JNR1019>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20010201)63:3<257::AID-JNR1019>3.0.CO;2-T).
- Guise, S., D. Braguer, M. Remacle-Bonnet, G. Pommier, and C. Briand. 1999. "Tau Protein Is Involved in the Apoptotic Process Induced by Anti-Microtubule Agents on Neuroblastoma Cells." *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 4 (1): 47–58.
- H W Detrich, M A Jordan, L Wilson and R C William Jr. 1985. "Mechanism of Microtubule Assembly. Changes in Polymer Structure and Organization during Assembly of Sea Urchin Egg Tubulin." <https://www.jbc.org/content/260/16/9479.abstract>.
- Hambidge, M., A. Hackshaw, and N. Wald. 1993. "Neural Tube Defects and Serum Zinc." *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 100 (8): 746–49.
- Hasan, Rafah, Lothar Rink, and Hajo Haase. 2016. "Chelation of Free Zn²⁺ Impairs Chemotaxis, Phagocytosis, Oxidative Burst, Degranulation, and Cytokine Production by Neutrophil Granulocytes." *Biological Trace Element Research* 171 (1): 79–88.
- Haynes, Chad, Christopher J. Oldfield, Fei Ji, Niels Klitgord, Michael E. Cusick, Predrag Radivojac, Vladimir N. Uversky, Marc Vidal, and Lilia M. Iakoucheva. 2006. "Intrinsic Disorder Is a Common Feature of Hub Proteins from Four Eukaryotic Interactomes." *PLoS Computational Biology* 2 (8): e100.
- Himmler, A., D. Drechsel, M. W. Kirschner, and D. W. Martin. 1989. "Tau Consists of a Set of Proteins with Repeated C-Terminal Microtubule-Binding Domains and Variable N-Terminal Domains." *Molecular and Cellular Biology* 9 (4): 1381–88.
- Hosie, Alastair M., Emma L. Dunne, Robert J. Harvey, and Trevor G. Smart. 2003. "Zinc-Mediated Inhibition of GABA A Receptors: Discrete Binding Sites Underlie Subtype Specificity." *Nature Neuroscience* 6 (4): 362–69.
- Hu, Ji-Ying, De-Lin Zhang, Xiao-Ling Liu, Xue-Shou Li, Xiao-Qing Cheng, Jie Chen, Hai-Ning Du, and Yi Liang. 2017. "Pathological Concentration of Zinc Dramatically

- Accelerates Abnormal Aggregation of Full-Length Human Tau and Thereby Significantly Increases Tau Toxicity in Neuronal Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1863 (2): 414–27.
- Hu, Wen, Xinhua Zhang, Yunn Chyn Tung, Shutao Xie, Fei Liu, and Khalid Iqbal. 2016. “Hyperphosphorylation Determines Both the Spread and the Morphology of Tau Pathology.” *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 12 (10): 1066–77.
- Hua, Qian, and Rong-Qiao He. 2003. “Tau Could Protect DNA Double Helix Structure.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1645 (2): 205–11.
- Huang, Yongqi, and Zhirong Liu. 2009. “Kinetic Advantage of Intrinsically Disordered Proteins in Coupled Folding-Binding Process: A Critical Assessment of the ‘Fly-Casting’ Mechanism.” *Journal of Molecular Biology* 393 (5): 1143–59.
- Huang, Yunpeng, Zhihao Wu, Yu Cao, Minglin Lang, Bingwei Lu, and Bing Zhou. 2014. “Zinc Binding Directly Regulates Tau Toxicity Independent of Tau Hyperphosphorylation.” *Cell Reports* 8 (3): 831–42.
- Huvent, Isabelle, Amina Kamah, François-Xavier Cantrelle, Nicolas Barois, Christian Slomianny, Caroline Smet-Nocca, Isabelle Landrieu, and Guy Lippens. 2014. “A Functional Fragment of Tau Forms Fibers without the Need for an Intermolecular Cysteine Bridge.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 445 (2): 299–303.
- Ingelson, M., E. Vanmechelen, and L. Lannfelt. 1996. “Microtubule-Associated Protein Tau in Human Fibroblasts with the Swedish Alzheimer Mutation.” *Neuroscience Letters* 220 (1): 9–12.
- Inouye, Hideyo, Deepak Sharma, Warren J. Goux, and Daniel A. Kirschner. 2006. “Structure of Core Domain of Fibril-Forming PHF/Tau Fragments.” *Biophysical Journal* 90 (5): 1774–89.
- Ittner, Lars M., Yazı D. Ke, Thomas Fath, Nicole Schonrock, Peter Gunning, and Jürgen Gotz. 2008. “P2-129: Parkinsonism and Memory Impairment in Tau Transgenic Mice with Axonal Transport Defects.” *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 4 (4): T408–T408.

- Iwata, Minori, Shoji Watanabe, Ayaka Yamane, Tomohiro Miyasaka, and Hiroaki Misonou. 2019. "Regulatory Mechanisms for the Axonal Localization of Tau Protein in Neurons." *Molecular Biology of the Cell* 30 (19): 2441–57.
- Jeganathan, Sadasivam, Martin von Bergen, Henrik Bråttås, Heinz-Jürgen Steinhoff, and Eckhard Mandelkow. 2006. "Global Hairpin Folding of Tau in Solution." *Biochemistry* 45 (7): 2283–93.
- Jho, Y. S., E. B. Zhulina, M. W. Kim, and P. A. Pincus. 2010. "Monte Carlo Simulations of Tau Proteins: Effect of Phosphorylation." *Biophysical Journal* 99 (8): 2387–97.
- Jiji, A. C., A. Arshad, S. R. Dhanya, P. S. Shabana, C. K. Mehjabin, and Vinesh Vijayan. 2017. "Zn²⁺ Interrupts R4-R3 Association Leading to Accelerated Aggregation of Tau Protein." *Chemistry – A European Journal* 23 (67): 16976–79.
- Jimeno, Antonio, Gurulingappa Hallur, Audrey Chan, Xiangfeng Zhang, George Cusatis, Fonda Chan, Preeti Shah, et al. 2007. "Development of Two Novel Benzoylphenylurea Sulfur Analogues and Evidence That the Microtubule-Associated Protein Tau Is Predictive of Their Activity in Pancreatic Cancer." *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (5): 1509–16.
- Johnson, Kenneth A., and Gary G. Borisy. 1977. "Kinetic Analysis of Microtubule Self-Assembly in Vitro." *Journal of Molecular Biology* 117 (1): 1–31.
- Kadavath, Harindranath, Romina V. Hofele, Jacek Biernat, Satish Kumar, Katharina Tepper, Henning Urlaub, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2015. "Tau Stabilizes Microtubules by Binding at the Interface between Tubulin Heterodimers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (24): 7501–6.
- Kanaan, and Kanaan N. M. Al et. 2011. "Pathogenic Forms of Tau Inhibit Kinesin-Dependent Axonal Transport through a Mechanism Involving Activation of Axonal Phosphotransferases." - PubMed - NCBI." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21734277>.
- Kannan, Srinivasaraghavan, David P. Lane, and Chandra S. Verma. 2016. "Long Range Recognition and Selection in IDPs: The Interactions of the C-Terminus of P53." *Scientific Reports* 6 (March): 23750.

- Kellogg, Elizabeth H., Nisreen M. A. Hejab, Simon Poepsel, Kenneth H. Downing, Frank DiMaio, and Eva Nogales. 2018. "Near-Atomic Model of Microtubule-Tau Interactions." *Science* 360 (6394): 1242–46.
- Kidd, M. 1963. "Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease." *Nature* 197 (January): 192–93.
- Kim, Insook, Eun Ji Park, Jeho Seo, Suk Jin Ko, Jinu Lee, and Chul Hoon Kim. 2011. "Zinc Stimulates Tau S214 Phosphorylation by the Activation of Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase-Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway." *Neuroreport* 22 (16): 839–44.
- Kirkpatrick, J. B. 1969. "Microtubules in Brain Homogenates." *Science* 163 (3863): 187–88.
- Kirschner, D. A., C. Abraham, and D. J. Selkoe. 1986. "X-Ray Diffraction from Intraneuronal Paired Helical Filaments and Extraneuronal Amyloid Fibers in Alzheimer Disease Indicates Cross-Beta Conformation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (2): 503–7.
- Kirschner, M. W., and R. C. Williams. 1974. "The Mechanism of Microtubule Assembly in Vitro." *Journal of Supramolecular Structure* 2 (2–4): 412–28.
- Kirschner, M. W., R. C. Williams, M. Weingarten, and J. C. Gerhart. 1974. "Microtubules from Mammalian Brain: Some Properties of Their Depolymerization Products and a Proposed Mechanism of Assembly and Disassembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (4): 1159–63.
- Knops, Kosik, Lee, and Pardee. 1991. "Overexpression of Tau in a Nonneuronal Cell Induces Long Cellular Processes." *The Journal of Cell Biology* 114 (4): 725–33.
- Kosik, K. S., N. W. Kowall, and A. McKee. 1989. "Along the Way to a Neurofibrillary Tangle: A Look at the Structure of Tau." *Annals of Medicine* 21 (2): 109–12.
- Lai, Mitchell K. P., Christopher P. Chen, Tony Hope, and Margaret M. Esiri. 2010. "Hippocampal Neurofibrillary Tangle Changes and Aggressive Behaviour in Dementia." *Neuroreport* 21 (17): 1111–15.

- Lee, G., R. L. Neve, and K. S. Kosik. 1989. "The Microtubule Binding Domain of Tau Protein." *Neuron* 2 (6): 1615–24.
- Lee, Joo-Yong, Toby B. Cole, Richard D. Palmiter, Sang Won Suh, and Jae-Young Koh. 2002. "Contribution by Synaptic Zinc to the Gender-Disparate Plaque Formation in Human Swedish Mutant APP Transgenic Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11): 7705–10.
- Lee, Kyung-Ha, Peipei Zhang, Hong Joo Kim, Diana M. Mitrea, Mohona Sarkar, Brian D. Freibaum, Jaclyn Cika, et al. 2016. "C9orf72 Dipeptide Repeats Impair the Assembly, Dynamics, and Function of Membrane-Less Organelles." *Cell* 167 (3): 774-788.e17.
- Lee, Robin van der, Marija Buljan, Benjamin Lang, Robert J. Weatheritt, Gary W. Daughdrill, A. Keith Dunker, Monika Fuxreiter, et al. 2014. "Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins." *Chemical Reviews* 114 (13): 6589–6631.
- Li, Xiao-Han, Jacob A. Culver, and Elizabeth Rhoades. 2015. "Tau Binds to Multiple Tubulin Dimers with Helical Structure." *Journal of the American Chemical Society* 137 (29): 9218–21.
- Li, Xiaoyu, Yatender Kumar, Hans Zempel, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, and Eckhard Mandelkow. 2011. "Novel Diffusion Barrier for Axonal Retention of Tau in Neurons and Its Failure in Neurodegeneration." *The EMBO Journal* 30 (23): 4825–37.
- Li, Xuexia, Xiubo Du, and Jiazuan Ni. 2019. "Zn²⁺ Aggravates Tau Aggregation and Neurotoxicity." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030487>.
- Lippens, Guy, Isabelle Landrieu, Caroline Smet, Isabelle Huvent, Neha S. Gandhi, Benoît Gigant, Clément Despres, Haoling Qi, and Juan Lopez. 2016. "NMR Meets Tau: Insights into Its Function and Pathology." *Biomolecules* 6 (2). <https://doi.org/10.3390/biom6020028>.
- Lippens, Guy, Jean-Michel Wieruszeski, Arnaud Leroy, Caroline Smet, Alain Sillen, Luc Buée, and Isabelle Landrieu. 2004. "Proline-Directed Random-Coil Chemical Shift

- Values as a Tool for the NMR Assignment of the Tau Phosphorylation Sites.” *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 5 (1): 73–78.
- Lira-De León, Karla I., Ponciano García-Gutiérrez, Iris N. Serratos, Marianela Palomera-Cárdenas, María Del P. Figueroa-Corona, Victoria Campos-Peña, and Marco A. Meraz-Ríos. 2013. “Molecular Mechanism of Tau Aggregation Induced by Anionic and Cationic Dyes.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 35 (2): 319–34.
- Loomis, P. A., T. H. Howard, R. P. Castleberry, and L. I. Binder. 1990. “Identification of Nuclear Tau Isoforms in Human Neuroblastoma Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (21): 8422–26.
- Lopantsev, V., H. J. Wenzel, T. B. Cole, R. D. Palmiter, and P. A. Schwartzkroin. 2003. “Lack of Vesicular Zinc in Mossy Fibers Does Not Affect Synaptic Excitability of CA3 Pyramidal Cells in Zinc Transporter 3 Knockout Mice.” *Neuroscience* 116 (1): 237–48.
- Lovell, M. A., J. D. Robertson, W. J. Teesdale, J. L. Campbell, and W. R. Markesbery. 1998. “Copper, Iron and Zinc in Alzheimer’s Disease Senile Plaques.” *Journal of the Neurological Sciences* 158 (1): 47–52.
- Lu, Yang, Hai-Jin He, Jun Zhou, Jun-Ye Miao, Jing Lu, Ying-Ge He, Rong Pan, Yan Wei, Ying Liu, and Rong-Qiao He. 2013. “Hyperphosphorylation Results in Tau Dysfunction in DNA Folding and Protection.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 37 (3): 551–63.
- Maes, M., P. C. D’Haese, S. Scharpé, P. D’Hondt, P. Cosyns, and M. E. De Broe. 1994. “Hypozincemia in Depression.” *Journal of Affective Disorders* 31 (2): 135–40.
- Magnani, Enrico, Juan Fan, Laura Gasparini, Matthew Golding, Meredith Williams, Giampietro Schiavo, Michel Goedert, Linda A. Amos, and Maria Grazia Spillantini. 2007. “Interaction of Tau Protein with the Dynactin Complex.” *The EMBO Journal* 26 (21): 4546–54.
- Mandelkow, Eckhard, Martin Von Bergen, Jacek Biernat, and Eva-Maria Mandelkow. 2007. “Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer’s Disease.” *Brain Pathology* 17 (1): 83–90.

- Mandelkow, Eva-Maria, and Eckhard Mandelkow. 2012. "Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>.
- Marger, L., C. R. Schubert, and D. Bertrand. 2014. "Zinc: An Underappreciated Modulatory Factor of Brain Function." *Biochemical Pharmacology* 91 (4): 426–35.
- Margittai, Martin, and Ralf Langen. 2004. "Template-Assisted Filament Growth by Parallel Stacking of Tau." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (28): 10278–83.
- . 2006. "Side Chain-Dependent Stacking Modulates Tau Filament Structure." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (49): 37820–27.
- Martin, Latypova, and Terro. 2011. "Post-Translational Modifications of Tau Protein: Implications for Alzheimer's Disease." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215781>.
- Martinho, Marlène, Diane Allegro, Isabelle Huvent, Charlotte Chabaud, Emilien Etienne, Hervé Kovacic, Bruno Guigliarelli, et al. 2018. "Two Tau Binding Sites on Tubulin Revealed by Thiol-Disulfide Exchanges." *Scientific Reports* 8 (1): 13846.
- McAllister, Brendan B., and Richard H. Dyck. 2017. "Zinc Transporter 3 (ZnT3) and Vesicular Zinc in Central Nervous System Function." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 80 (September): 329–50.
- Mellone, Manuela, Dimitra Kestoras, Melissa R. Andrews, Elisa Dassie, R. Anthony Crowther, Gorazd B. Stokin, Jon Tinsley, et al. 2013. "Tau Pathology Is Present in Vivo and Develops in Vitro in Sensory Neurons from Human P301S Tau Transgenic Mice: A System for Screening Drugs against Tauopathies." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (46): 18175–89.
- Mészáros, Bálint, István Simon, and Zsuzsanna Dosztányi. 2011. "The Expanding View of Protein-Protein Interactions: Complexes Involving Intrinsically Disordered Proteins." *Physical Biology* 8 (3): 035003.
- Mimori, K., N. Sadanaga, Y. Yoshikawa, K. Ishikawa, M. Hashimoto, F. Tanaka, A. Sasaki, H. Inoue, K. Sugimachi, and M. Mori. 2006. "Reduced Tau Expression in Gastric

- Cancer Can Identify Candidates for Successful Paclitaxel Treatment.” *British Journal of Cancer* 94 (12): 1894–97.
- Min, Sang-Won, Xu Chen, Tara E. Tracy, Yaqiao Li, Yungui Zhou, Chao Wang, Kotaro Shirakawa, et al. 2015. “Critical Role of Acetylation in Tau-Mediated Neurodegeneration and Cognitive Deficits.” *Nature Medicine* 21 (10): 1154–62.
- Mo, Zhong-Ying, Ying-Zhu Zhu, Hai-Li Zhu, Jun-Bao Fan, Jie Chen, and Yi Liang. 2009. “Low Micromolar Zinc Accelerates the Fibrillization of Human Tau via Bridging of Cys-291 and Cys-322.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (50): 34648–57.
- Mocchegiani, Eugenio, Carlo Bertoni-Freddari, Fiorella Marcellini, and Marco Malavolta. 2005. “Brain, Aging and Neurodegeneration: Role of Zinc Ion Availability.” *Progress in Neurobiology* 75 (6): 367–90.
- Mollica, Luca, Luiza M. Bessa, Xavier Hanouille, Malene Ringkjøbing Jensen, Martin Blackledge, and Robert Schneider. 2016. “Binding Mechanisms of Intrinsically Disordered Proteins: Theory, Simulation, and Experiment.” *Frontiers in Molecular Biosciences* 3 (September): 52.
- Moreira, Guilherme G., Joana S. Cristóvão, Vukosava M. Torres, Ana P. Carapeto, Mário S. Rodrigues, Isabelle Landrieu, Carlos Cordeiro, and Cláudio M. Gomes. 2019. “Zinc Binding to Tau Influences Aggregation Kinetics and Oligomer Distribution.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (23): 5979.
- Morris, Meaghan, Giselle M. Knudsen, Sumihiro Maeda, Jonathan C. Trinidad, Alexandra Ioanoviciu, Alma L. Burlingame, and Lennart Mucke. 2015. “Tau Post-Translational Modifications in Wild-Type and Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice.” *Nature Neuroscience* 18 (8): 1183–89.
- Morsch, R., W. Simon, and P. D. Coleman. 1999. “Neurons May Live for Decades with Neurofibrillary Tangles.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58 (2): 188–97.
- Moussaud, Simon, Daryl R. Jones, Elisabeth L. Moussaud-Lamodièrre, Marion Delenclos, Owen A. Ross, and Pamela J. McLean. 2014. “Alpha-Synuclein and Tau: Teammates in Neurodegeneration?” *Molecular Neurodegeneration* 9 (October). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-43>.

- Mukrasch, Marco D., Stefan Bibow, Jegannath Korukottu, Sadasivam Jeganathan, Jacek Biernat, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. "Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution." *PLoS Biology* 7 (2): e1000034.
- Mukrasch, Marco D., Jacek Biernat, Martin von Bergen, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2005. "Sites of Tau Important for Aggregation Populate β -Structure and Bind to Microtubules and Polyanions." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (26): 24978–86.
- Murakami, Tetsuro, Seema Qamar, Julie Qiaojin Lin, Gabriele S. Kaminski Schierle, Eric Rees, Akinori Miyashita, Ana R. Costa, et al. 2015. "ALS/FTD Mutation-Induced Phase Transition of FUS Liquid Droplets and Reversible Hydrogels into Irreversible Hydrogels Impairs RNP Granule Function." *Neuron* 88 (4): 678–90.
- Mylonas, Efstratios, Antje Hascher, Pau Bernadó, Martin Blackledge, Eckhard Mandelkow, and Dmitri I. Svergun. 2008. "Domain Conformation of Tau Protein Studied by Solution Small-Angle X-Ray Scattering." *Biochemistry* 47 (39): 10345–53.
- Nath, Abhinav, Maria Sammalkorpi, David C. DeWitt, Adam J. Trexler, Shana Elbaum-Garfinkle, Corey S. O'Hern, and Elizabeth Rhoades. 2012. "The Conformational Ensembles of α -Synuclein and Tau: Combining Single-Molecule FRET and Simulations." *Biophysical Journal* 103 (9): 1940–49.
- Nelson, Rebecca, and David Eisenberg. 2006. "Recent Atomic Models of Amyloid Fibril Structure." *Current Opinion in Structural Biology* 16 (2): 260–65.
- Nolte, Christiane, Ariel Gore, Israel Sekler, Wolfgang Kresse, Michal Hershfinkel, Anja Hoffmann, Helmut Kettenmann, and Arie Moran. 2004. "ZnT-1 Expression in Astroglial Cells Protects against Zinc Toxicity and Slows the Accumulation of Intracellular Zinc." *Glia* 48 (2): 145–55.
- Nouar, Roqiya, François Devred, Gilles Breuzard, and Vincent Peyrot. 2013. "FRET and FRAP Imaging: Approaches to Characterise Tau and Stathmin Interactions with Microtubules in Cells." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 105 (4): 149–61.

- Nowak, Gabriel, Marcin Siwek, Dominika Dudek, Andrzej Zieba, and Andrzej Pilc. 2003. "Effect of Zinc Supplementation on Antidepressant Therapy in Unipolar Depression: A Preliminary Placebo-Controlled Study." *Polish Journal of Pharmacology* 55 (6): 1143–47.
- O'Brien, E. T., E. D. Salmon, R. A. Walker, and H. P. Erickson. 1990. "Effects of Magnesium on the Dynamic Instability of Individual Microtubules." *Biochemistry* 29 (28): 6648–56.
- Ohana, Ehud, Dror Segal, Raz Palty, Dien Ton-That, Arie Moran, Stefano L. Sensi, John H. Weiss, Michal Hershfinkel, and Israel Sekler. 2004. "A Sodium Zinc Exchange Mechanism Is Mediating Extrusion of Zinc in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4278–84.
- Palmiter, R. D., T. B. Cole, C. J. Quaife, and S. D. Findley. 1996. "ZnT-3, a Putative Transporter of Zinc into Synaptic Vesicles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (25): 14934–39.
- Paoletti, P., P. Ascher, and J. Neyton. 1997. "High-Affinity Zinc Inhibition of NMDA NR1-NR2A Receptors." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (15): 5711–25.
- Parness, J., and S. B. Horwitz. 1981. "Taxol Binds to Polymerized Tubulin in Vitro." *The Journal of Cell Biology* 91 (2 Pt 1): 479–87.
- Patel, Avinash, Hyun O. Lee, Louise Jawerth, Shovamayee Maharana, Marcus Jahnel, Marco Y. Hein, Stoyno Stoykov, et al. 2015. "A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation." *Cell* 162 (5): 1066–77.
- Pejaver, Vikas, Wei-Lun Hsu, Fuxiao Xin, A. Keith Dunker, Vladimir N. Uversky, and Predrag Radivojac. 2014. "The Structural and Functional Signatures of Proteins That Undergo Multiple Events of Post-Translational Modification." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 23 (8): 1077–93.
- Pérez, M., M. Arrasate, E. Montejó De Garcini, V. Muñoz, and J. Avila. 2001. "In Vitro Assembly of Tau Protein: Mapping the Regions Involved in Filament Formation." *Biochemistry* 40 (20): 5983–91.

- Pochwat, Bartłomiej, Gabriel Nowak, and Bernadeta Szewczyk. 2019. "An Update on NMDA Antagonists in Depression." *Expert Review of Neurotherapeutics* 19 (11): 1055–67.
- Pollack, Saskia J., Devkee M. Vadukul, Francesca Citossi, J. Rickard, M. Simpson, John M. D. Storey, C. Harrington, C. Wischik, and L. Serpell. 2019. "Alzheimer ' s Disease like Paired Helical Filament Assembly from Truncated Tau Protein Is Independent of Disulphide Cross Linking." <https://www.semanticscholar.org/paper/556b4e472ea08a2a07e76fcef47eb7c4876e8d4f>.
- Popov, Konstantin I., Karl A. T. Makepeace, Evgeniy V. Petrotchenko, Nikolay V. Dokholyan, and Christoph H. Borchers. 2019. "Insight into the Structure of the 'Unstructured' Tau Protein." *Structure* 27 (11): 1710-1715.e4.
- Porter, K. 1966. *Principles of Biomolecular Organization*, Ed. Wolsenholme, G. E. (Little Brown, Boston), 308–45.
- Purich, D. L., and D. Kristofferson. 1984. "Microtubule Assembly: A Review of Progress, Principles, and Perspectives." *Advances in Protein Chemistry* 36: 133–212.
- Qin, Yan, Dustin Thomas, Charles P. Fontaine, and Robert A. Colvin. 2009. "Silencing of ZnT1 Reduces Zn²⁺ Efflux in Cultured Cortical Neurons." *Neuroscience Letters* 450 (2): 206–10.
- Rapp, Michael A., Michal Schnaider-Beeri, Dushyant P. Purohit, Daniel P. Perl, Vahram Haroutunian, and Mary Sano. 2008. "Increased Neurofibrillary Tangles in Patients with Alzheimer Disease with Comorbid Depression." *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 16 (2): 168–74.
- Record, I. R. 1987. "Zinc Deficiency and the Developing Embryo." *Neurotoxicology* 8 (3): 369–78.
- Rodríguez-Martín, Teresa, Amy M. Pooler, Dawn H. W. Lau, Gábor M. Mórotz, Kurt J. De Vos, Jonathan Gilley, Michael P. Coleman, and Diane P. Hanger. 2016. "Reduced Number of Axonal Mitochondria and Tau Hypophosphorylation in Mouse P301L Tau Knockin Neurons." *Neurobiology of Disease* 85 (January): 1–10.

- Roman, Andrei Yu, François Devred, Deborah Byrne, Romain La Rocca, Natalia N. Ninkina, Vincent Peyrot, and Philipp O. Tsvetkov. 2019. "Zinc Induces Temperature-Dependent Reversible Self-Assembly of Tau." *Journal of Molecular Biology* 431 (4): 687–95.
- Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, and H. X. Deng. 1993. "Mutations in Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature* 362 (6415): 59–62.
- Rosenberg, Kenneth J., Jennifer L. Ross, H. Eric Feinstein, Stuart C. Feinstein, and Jacob Israelachvili. 2008. "Complementary Dimerization of Microtubule-Associated Tau Protein: Implications for Microtubule Bundling and Tau-Mediated Pathogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (21): 7445–50.
- Rossi, Giacomina, Veronica Redaelli, Paolo Contiero, Sabrina Fabiano, Giovanna Tagliabue, Paola Perego, Luisa Benussi, et al. 2018. "Tau Mutations Serve as a Novel Risk Factor for Cancer." *Cancer Research* 78 (13): 3731–39.
- Rouzier, Roman, Radhika Rajan, Peter Wagner, Kenneth R. Hess, David L. Gold, James Stec, Mark Ayers, et al. 2005. "Microtubule-Associated Protein Tau: A Marker of Paclitaxel Sensitivity in Breast Cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (23): 8315–20.
- Sadqi, Mourad, Felix Hernández, Unmei Pan, Mar Pérez, Michael D. Schaeberle, Jesús Avila, and Victor Muñoz. 2002. "Alpha-Helix Structure in Alzheimer's Disease Aggregates of Tau-Protein." *Biochemistry* 41 (22): 7150–55.
- Sangrajrang, S., P. Denoulet, G. Millot, R. Tatoud, M. P. Podgorniak, K. D. Tew, F. Calvo, and A. Fellous. 1998. "Estramustine Resistance Correlates with Tau Over-Expression in Human Prostatic Carcinoma Cells." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 77 (4): 626–31.
- Santa-María, Ismael, Mar Pérez, Félix Hernández, Victor Muñoz, Francisco J. Moreno, and Jesús Avila. 2006. "In Vitro Tau Fibrillization: Mapping Protein Regions." *Biochimica et Biophysica Acta* 1762 (7): 683–92.

- Schmitt, F., and F. Samson. 1968. *Neurosciences Research Program Bulletin*, no. 6: 113–219.
- Schoenfeld, T. A., and R. A. Obar. 1994. "Diverse Distribution and Function of Fibrous Microtubule-Associated Proteins in the Nervous System." *International Review of Cytology* 151: 67–137.
- Scholz, Tim, and Eckhard Mandelkow. 2014. "Transport and Diffusion of Tau Protein in Neurons." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 (16): 3139–50.
- Schroeder, Cornelia, Jan Grell, Claudia Hube-Magg, Martina Kluth, Dagmar Lang, Ronald Simon, Doris Höflmayer, et al. 2019. "Aberrant Expression of the Microtubule-Associated Protein Tau Is an Independent Prognostic Feature in Prostate Cancer." *BMC Cancer* 19 (1): 193.
- Schweers, O., E. Schönbrunn-Hanebeck, A. Marx, and E. Mandelkow. 1994. "Structural Studies of Tau Protein and Alzheimer Paired Helical Filaments Show No Evidence for Beta-Structure." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (39): 24290–97.
- Sensi, Stefano L., Pierre Paoletti, Ashley I. Bush, and Israel Sekler. 2009. "Zinc in the Physiology and Pathology of the CNS." *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (11): 780–91.
- Seouyoung, Jung Hoon, Jun Hyoung, and Min Jae. 2018. "Degradation or Aggregation: The Ramifications of Post-Translational Modifications on Tau." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6033068/>.
- Shoemaker, B. A., J. J. Portman, and P. G. Wolynes. 2000. "Speeding Molecular Recognition by Using the Folding Funnel: The Fly-Casting Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (16): 8868–73.
- Sillen, Alain, Arnaud Leroy, Jean-Michel Wieruszeski, Anne Loyens, Jean-Claude Beauvillain, Luc Buée, Isabelle Landrieu, and Guy Lippens. 2005. "Regions of Tau Implicated in the Paired Helical Fragment Core as Defined by NMR." *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 6 (10): 1849–56.
- Šimić, Goran, Mirjana Babić Leko, Selina Wray, Charles Harrington, Ivana Delalle, Nataša Jovanov-Milošević, Danira Bažadona, et al. 2016. "Tau Protein

- Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies." *Biomolecules* 6 (1): 6.
- Singh, Virender, Ling Xu, Solomiia Boyko, Krystyna Surewicz, and Witold K. Surewicz. 2020. "Zinc Promotes Liquid-Liquid Phase Separation of Tau Protein." *The Journal of Biological Chemistry*, March. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.013166>.
- Sjöberg, Marcela K., Elena Shestakova, Zeyni Mansuroglu, Ricardo B. Maccioni, and Eliette Bonnefoy. 2006. "Tau Protein Binds to Pericentromeric DNA: A Putative Role for Nuclear Tau in Nucleolar Organization." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 10): 2025–34.
- Skolnick, P., B. Legutko, X. Li, and F. P. Bymaster. 2001. "Current Perspectives on the Development of Non-Biogenic Amine-Based Antidepressants." *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 43 (5): 411–23.
- Skrajnowska, Dorota, and Barbara Bobrowska-Korczak. 2019. "Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms." *Nutrients* 11 (10). <https://doi.org/10.3390/nu11102273>.
- Smet, Caroline, Arnaud Leroy, Alain Sillen, Jean-Michel Wieruszeski, Isabelle Landrieu, and Guy Lippens. 2004. "Accepting Its Random Coil Nature Allows a Partial NMR Assignment of the Neuronal Tau Protein." *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 5 (12): 1639–46.
- Soeda, Yoshiyuki, Misato Yoshikawa, Osborne F. X. Almeida, Akio Sumioka, Sumihiro Maeda, Hiroyuki Osada, Yasumitsu Kondoh, et al. 2015. "Toxic Tau Oligomer Formation Blocked by Capping of Cysteine Residues with 1,2-Dihydroxybenzene Groups." *Nature Communications* 6 (December): 10216.
- Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow, and E-M Mandelkow. 2002. "Tau Blocks Traffic of Organelles, Neurofilaments, and APP Vesicles in Neurons and Enhances Oxidative Stress." *The Journal of Cell Biology* 156 (6): 1051–63.
- Stoothoff, and Johnson. 2005. "Tau Phosphorylation: Physiological and Pathological Consequences."

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443904001097?via%3Dihub#fig2>.

- Swardfager, Walter, Nathan Herrmann, Graham Mazereeuw, Kyle Goldberger, Tetsuhiro Harimoto, and Krista L. Lanctôt. 2013. "Zinc in Depression: A Meta-Analysis." *Biological Psychiatry* 74 (12): 872–78.
- Tai, Hwan-Ching, Alberto Serrano-Pozo, Tadafumi Hashimoto, Matthew P. Frosch, Tara L. Spires-Jones, and Bradley T. Hyman. 2012. "The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is Associated with Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System." *The American Journal of Pathology* 181 (4): 1426–35.
- Takashima, Akihiko. 2013. "Tauopathies and Tau Oligomers." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 37 (3): 565–68.
- Terrin, Gianluca, Roberto Berni Canani, Maria Di Chiara, Andrea Pietravalle, Vincenzo Aleandri, Francesca Conte, and Mario De Curtis. 2015. "Zinc in Early Life: A Key Element in the Fetus and Preterm Neonate." *Nutrients* 7 (12): 10427–46.
- Terry, R. D. 1963. "THE FINE STRUCTURE OF NEUROFIBRILLARY TANGLES IN ALZHEIMER'S DISEASE." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 22 (October): 629–42.
- Tompa, Peter, and Monika Fuxreiter. 2008. "Fuzzy Complexes: Polymorphism and Structural Disorder in Protein-Protein Interactions." *Trends in Biochemical Sciences* 33 (1): 2–8.
- Trizac, Emmanuel, Yaakov Levy, and Peter G. Wolynes. 2010. "Capillarity Theory for the Fly-Casting Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (7): 2746–50.
- Trombley, Paul Q., Laura J. Blakemore, and Brook J. Hill. 2011. "Zinc Modulation of Glycine Receptors." *Neuroscience* 186 (July): 32–38.
- Tsvetkov, P. O., P. Barbier, G. Breuzard, V. Peyrot, and F. Devred. 2013. "Microtubule-Associated Proteins and Tubulin Interaction by Isothermal Titration Calorimetry." *Methods in Cell Biology* 115: 283–302.

- Tsvetkov, Philipp O., Romain La Rocca, Soazig Malesinski, and François Devred. 2019. "Characterization of Microtubule-Associated Proteins (MAPs) and Tubulin Interactions by Isothermal Titration Calorimetry (ITC)." *Methods in Molecular Biology* 1964: 151–65.
- Tsvetkov, Philipp O., Alexander A. Makarov, Soazig Malesinski, Vincent Peyrot, and François Devred. 2012. "New Insights into Tau–Microtubules Interaction Revealed by Isothermal Titration Calorimetry." *Biochimie* 94 (3): 916–19.
- Tucker, R. P. 1990. "The Roles of Microtubule-Associated Proteins in Brain Morphogenesis: A Review." *Brain Research. Brain Research Reviews* 15 (2): 101–20.
- Utton, Michelle A., Wendy J. Noble, Josephine E. Hill, Brian H. Anderton, and Diane P. Hanger. 2005. "Molecular Motors Implicated in the Axonal Transport of Tau and Alpha-Synuclein." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 20): 4645–54.
- Uversky, Vladimir N. 2015. "Intrinsically Disordered Proteins and Their (Disordered) Proteomes in Neurodegenerative Disorders." *Frontiers in Aging Neuroscience* 7 (March): 18.
- Vanier, M. T., P. Neuville, L. Michalik, and J. F. Launay. 1998. "Expression of Specific Tau Exons in Normal and Tumoral Pancreatic Acinar Cells." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 10) (May): 1419–32.
- Violet, Marie, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Raphaëlle Caillierez, Smail Talahari, et al. 2014. "A Major Role for Tau in Neuronal DNA and RNA Protection in Vivo under Physiological and Hyperthermic Conditions." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 84.
- Vivoli, Mirella, Halina R. Novak, Jennifer A. Littlechild, and Nicholas J. Harmer. 2014. "Determination of Protein-Ligand Interactions Using Differential Scanning Fluorimetry." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 91 (September). <https://doi.org/10.3791/51809>.
- Wagner, P., B. Wang, E. Clark, H. Lee, R. Rouzier, and L. Pusztai. 2005. "Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: A Novel Mediator of Paclitaxel Sensitivity in Vitro and in Vivo." *Cell Cycle* 4 (9): 1149–52.

- Wang, Fei, Ping Cao, Yixian Wang, Ruiqing Hao, Jingjing Meng, and Junlong Shang. 2020. "Combined Effects of Cyclic Load and Temperature Fluctuation on the Mechanical Behavior of Porous Sandstones." *Engineering Geology* 266 (March): 105466.
- Wang, Fudi, Jodi Dufner-Beattie, Byung-Eun Kim, Michael J. Petris, Glen Andrews, and David J. Eide. 2004. "Zinc-Stimulated Endocytosis Controls Activity of the Mouse ZIP1 and ZIP3 Zinc Uptake Transporters." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 24631–39.
- Wang, Jian-Zhi, Yi-Yuan Xia, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2013. "Abnormal Hyperphosphorylation of Tau: Sites, Regulation, and Molecular Mechanism of Neurofibrillary Degeneration." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 33 Suppl 1: S123-139.
- Wang, Yipeng, and Eckhard Mandelkow. 2016. "Tau in Physiology and Pathology." *Nature Reviews. Neuroscience* 17 (1): 5–21.
- Watt, Nicole T., Heledd H. Griffiths, and Nigel M. Hooper. 2013. "Neuronal Zinc Regulation and the Prion Protein." *Prion* 7 (3): 203–8.
- Watt, Nicole T., Isobel J. Whitehouse, and Nigel M. Hooper. 2010. "The Role of Zinc in Alzheimer's Disease." *International Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.4061/2011/971021>.
- Weber, K., R. Pollack, and T. Bibring. 1975. "Antibody against Tuberlin: The Specific Visualization of Cytoplasmic Microtubules in Tissue Culture Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (2): 459–63.
- Wegmann, Susanne, Bahareh Eftekharzadeh, Katharina Tepper, Katarzyna M. Zoltowska, Rachel E. Bennett, Simon Dujardin, Pawel R. Laskowski, et al. 2018. "Tau Protein Liquid-Liquid Phase Separation Can Initiate Tau Aggregation." *The EMBO Journal* 37 (7). <https://doi.org/10.15252/emboj.201798049>.
- Wegmann, Susanne, Izhar D. Medalsy, Eckhard Mandelkow, and Daniel J. Müller. 2013. "The Fuzzy Coat of Pathological Human Tau Fibrils Is a Two-Layered Polyelectrolyte Brush." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4): E313–21.

- Wei, Yan, Mei-Hua Qu, Xing-Sheng Wang, Lan Chen, Dong-Liang Wang, Ying Liu, Qian Hua, and Rong-Qiao He. 2008. "Binding to the Minor Groove of the Double-Strand, Tau Protein Prevents DNA from Damage by Peroxidation." *PloS One* 3 (7): e2600.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. "A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858–62.
- Weingarten, M. D., M. M. Suter, D. R. Littman, and M. W. Kirschner. 1974. "Properties of the Depolymerization Products of Microtubules from Mammalian Brain." *Biochemistry* 13 (27): 5529–37.
- Weiss, J. H., S. L. Sensi, and J. Y. Koh. 2000. "Zn(2+): A Novel Ionic Mediator of Neural Injury in Brain Disease." *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (10): 395–401.
- Wessels, Inga, Hajo Haase, Gabriela Engelhardt, Lothar Rink, and Peter Uciechowski. 2013. "Zinc Deficiency Induces Production of the Proinflammatory Cytokines IL-1 β and TNF α in Promyeloid Cells via Epigenetic and Redox-Dependent Mechanisms." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (1): 289–97.
- Whitehouse, Isobel J., Carolyn Jackson, Anthony J. Turner, and Nigel M. Hooper. 2010. "Prion Protein Is Reduced in Aging and in Sporadic but Not in Familial Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 22 (3): 1023–31.
- Wolfe, S. L. 1965. "ISOLATED MICROTUBULES." *The Journal of Cell Biology* 25 (May): 408–13.
- Woody, R. W., D. C. Clark, G. C. Roberts, S. R. Martin, and P. M. Bayley. 1983. "Molecular Flexibility in Microtubule Proteins: Proton Nuclear Magnetic Resonance Characterization." *Biochemistry* 22 (9): 2186–92.
- Xia, Yuxing, Zachary A. Sorrentino, Justin D. Kim, Kevin H. Strang, Cara J. Riffe, and Benoit I. Giasson. 2019. "Impaired Tau-Microtubule Interactions Are Prevalent among Pathogenic Tau Variants Arising from Missense Mutations." *The Journal of Biological Chemistry*, October, jbc.RA119.010178.
- Zhang, Li-Hong, Xin Wang, Meredin Stoltenberg, Gorm Danscher, Liping Huang, and Zhan-You Wang. 2008. "Abundant Expression of Zinc Transporters in the Amyloid Plaques of Alzheimer's Disease Brain." *Brain Research Bulletin* 77 (1): 55–60.

- Zhang, Wenjuan, Benjamin Falcon, Alexey G. Murzin, Juan Fan, R. Anthony Crowther, Michel Goedert, and Sjors H. W. Scheres. 2019. "Heparin-Induced Tau Filaments Are Polymorphic and Differ from Those in Alzheimer's and Pick's Diseases." *ELife* 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.43584>.
- Zhang, Xuemei, Yanxian Lin, Neil A. Eschmann, Hongjun Zhou, Jennifer N. Rauch, Israel Hernandez, Elmer Guzman, Kenneth S. Kosik, and Songi Han. 2017. "RNA Stores Tau Reversibly in Complex Coacervates." *PLoS Biology* 15 (7): e2002183.
- Zhang, Zhentao, Mingke Song, Xia Liu, Seong Su Kang, Il-Sun Kwon, Duc M. Duong, Nicholas T. Seyfried, et al. 2014. "Cleavage of Tau by Asparagine Endopeptidase Mediates the Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease." *Nature Medicine* 20 (11): 1254–62.
- Zhou, Futao, Shuangrong Chen, Jinping Xiong, Yinghui Li, and Lina Qu. 2012. "Luteolin Reduces Zinc-Induced Tau Phosphorylation at Ser262/356 in an ROS-Dependent Manner in SH-SY5Y Cells." *Biological Trace Element Research* 149 (2): 273–79.
- Zhou, Lujia, Joseph McInnes, Keimpe Wierda, Matthew Holt, Abigail G. Herrmann, Rosemary J. Jackson, Yu-Chun Wang, et al. 2017. "Tau Association with Synaptic Vesicles Causes Presynaptic Dysfunction." *Nature Communications* 8 (May): 15295.

Annexe 1 : Caractérisation des interactions MAP-tubuline par ITC



Characterization of Microtubule-Associated Proteins (MAPs) and Tubulin Interactions by Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Philipp Tsvetkov, Romain La Rocca, Soazig Malesinski, François Devred

► To cite this version:

Philipp Tsvetkov, Romain La Rocca, Soazig Malesinski, François Devred. Characterization of Microtubule-Associated Proteins (MAPs) and Tubulin Interactions by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). *Microcalorimetry of Biological Molecules: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2019, 978-1-4939-9178-5. 10.1007/978-1-4939-9179-2_12. hal-02088551

HAL Id: hal-02088551

<https://hal-amu.archives-ouvertes.fr/hal-02088551>

Submitted on 3 Apr 2019

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

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



Chapter 12

Characterization of Microtubule-Associated Proteins (MAPs) and Tubulin Interactions by Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

Philipp O. Tsvetkov, Romain La Rocca, Soazig Malesinski, and François Devred

Abstract

Microtubules are highly dynamic structures which play a central role in many cellular processes such as cell division, intracellular transport, and migration. Their dynamics is tightly regulated by stabilizing and destabilizing microtubule-associated proteins (MAPs), such as tau and stathmin. Many approaches have been developed to study interactions between tubulin and MAPs. However, isothermal titration calorimetry (ITC) is the only direct thermodynamic method that enables a full thermodynamic characterization of the interaction after a single titration experiment. We provide here the protocols to apply ITC to tubulin interaction with either stathmin or tau, which will help to avoid the common pitfalls in this very powerful and sensitive method.

Key words Tubulin, Microtubule, Isothermal titration calorimetry, Stathmin, Tau

1 Introduction

Microtubules are highly dynamic structures [1] that play an important role in many vital cell processes such as division, migration, intracellular transport, and architecture. Their dynamicity is tightly regulated by microtubule-associated proteins (MAPs), which can be separated into stabilizing and destabilizing MAPs, such as tau protein and stathmin, respectively (Fig. 1). When dephosphorylated, both tau and stathmin bind tubulin and/or microtubules and detach upon phosphorylation [2, 3]. Interactions between these MAPs and tubulin have been intensively studied using many biochemical and biophysical methods [4–6], yet for tau, which is probably the most studied MAP, the community has not reached a unifying model [7–9].

Microtubules and their dynamics are also the target of exogenous microtubule-targeting agents (MTAs) that are part of the

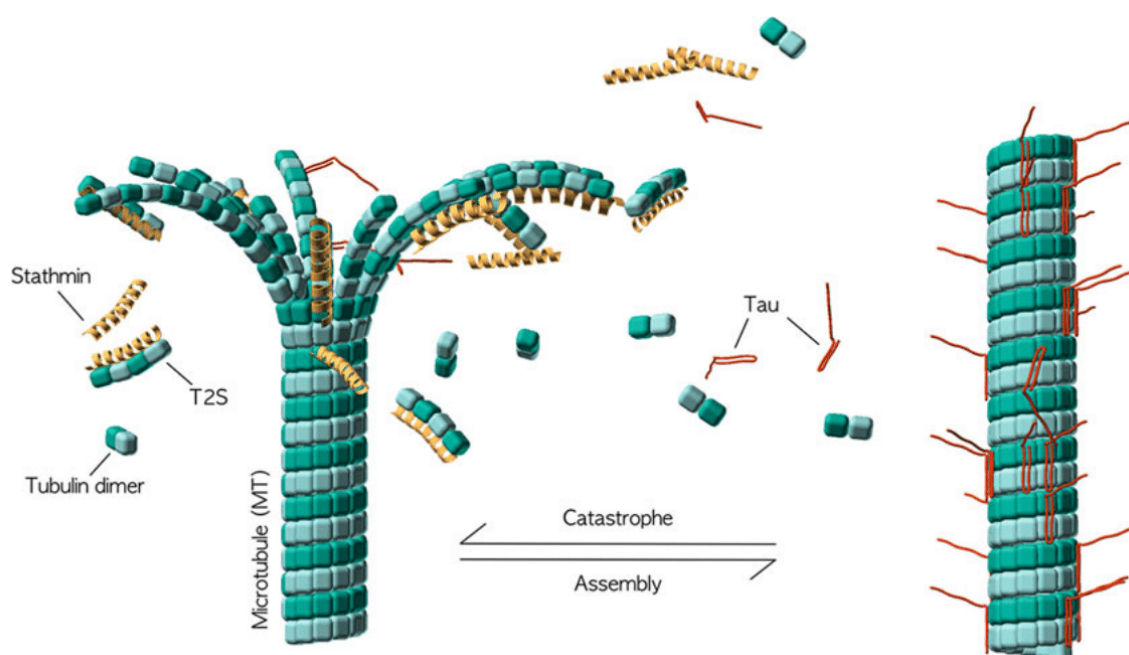


Fig. 1 MAP-tubulin interactions and their consequences on tubulin self-assembly and catastrophe. This scheme represents tubulin self-assembly in a classical polymerization buffer (in which tubulin spontaneously polymerizes into MT at 37 °C). MTs depolymerize in the presence of stathmin, and tubulin and stathmin form T2S complex, whereas MTs are stabilized in the presence of tau

main anticancer arsenal. Indeed, using MTAs that stabilize microtubules (taxanes) or MTAs that induce microtubule depolymerization (vinca alkaloids) usually alters microtubule dynamics and leads to mitotic block and cell death [10, 11]. In this context, MTA binding to tubulin has also been extensively studied using a wide variety of methods [12]. Characterizing this interaction is an essential step to test whether a suspected novel anticancer agent is an MTA [13–15].

Isothermal titration calorimetry (ITC) is a powerful method to study directly the thermodynamics of MTA or MAP interaction with tubulin. It was first used to give a full thermodynamics characterization of stathmin-tubulin interaction [16] and later to describe the impact of the phosphorylation of the four individual serine residues of stathmin on its structure and on its interaction with tubulin [17]. It was also used to show by which molecular mechanism overexpression of stathmin could potentiate the anti-cancer activity of vinca alkaloids and decrease the activity of taxanes [13–15] opening new perspectives to cancer therapies.

ITC was also used to study tau binding to tubulin [9]. While it turned out to be more complex in terms of finding the appropriate model to fit the obtained calorimetric data, it did nevertheless showed that tau was binding in a similar fashion to tubulin rings which are formed at 20 °C [18] and to microtubules.

We have previously described the important steps and precautions take into consideration as well as pitfalls to avoid when studying tubulin binding by ITC [19, 20]. Here we describe the detailed protocols to characterize MAP-tubulin interaction by ITC, for tau and stathmin.

2 Materials

Prepare all solutions using ultrapure water and analytical grade reagents.

2.1 Tubulin Purification

The detailed protocol of tubulin purification from bovine brain was described earlier [21].

2.2 Tau Purification

The detailed protocol of recombinant human tau purification was described earlier [21].

2.3 Stathmin Purification

2.3.1 Reagents and Buffers

1. Transformed bacteria *Escherichia coli* BL21DE3 with pET11c plasmid containing stathmin cDNA.
2. Luria Broth (LB) Miller medium (200 mL). Weigh 5 g medium in a 200 mL glass beaker and add ultrapure water. Adjust volume to 200 mL in a graduated flask and transfer in a glass bottle for sterilization. Store at 4 °C.
3. Luria Broth (LB) buffered medium (1 L). Weigh 25 g medium in a 1 L glass beaker and add ultrapure water. Adjust volume to 1 L in a graduated flask and transfer in a bottle for sterilization. Store at 4 °C.
4. Ampicillin 100 mg mL⁻¹. Weigh 1 g ampicillin in 15 mL tube, and add ultrapure water. Adjust volume to 10 mL in a graduated flask. Make 1 mL aliquots, and store them at -20 °C.
5. 1 M Isopropyl-beta-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Weigh 2.4 g in a 15 mL tube and add ultrapure water. Adjust volume to 10 mL in a graduated flask. Make 1 mL aliquots and store them at -20 °C.
6. Lysis buffer (100 mL): 20 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA, 8 mM Triton X-100. Weigh 0.5 g Triton and 0.32 g Tris-HCl. Mix in a 100 mL glass beaker with 95 mL of ultrapure water. Adjust volume to 100 mL in a graduated flask. Make 10 mL aliquots, and store them at -20 °C.
7. Ion-exchange activation buffer (500 mL): 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7.8. Dissolve 1.6 g Tris-HCl and 29 g NaCl in 450 mL of ultrapure water in a 500 mL glass beaker. Adjust pH to 7.8 with NaOH, and complete volume to 500 mL in a graduated flask. Store at 4 °C.

8. Ion-exchange equilibration buffer (500 mL): 20 mM Tris-HCl, pH 7.8. Dissolve 1.6 g Tris-HCl in 450 mL of ultrapure water in a 500 mL glass beaker. Adjust pH to 7.8 with NaOH, and complete volume to 500 mL in a graduated flask. Store at 4 °C.
9. Ion-exchange elution buffer (500 mL): 20 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, pH 7.8. Dissolve 1.6 g Tris-HCl and 5.8 g NaCl in 450 mL of ultrapure water in a 500 mL glass beaker. Adjust pH to 7.8 with NaOH, and complete volume to 500 mL in a graduated flask. Store at 4 °C.
10. Reverse-phase equilibration buffer (500 mL): 0.065% trifluoroacetic acid (TFA) in water. Add 325 µL of TFA in 450 mL of ultrapure water in a 500 mL glass beaker. Complete volume to 500 mL in a graduated flask. Store at 4 °C.
11. Reverse-phase elution buffer (500 mL): 0.05% trifluoroacetic acid in acetonitrile. Add 250 µL of TFA in 450 mL of acetonitrile in a 500 mL glass beaker. Complete volume to 500 mL in a graduated flask. Store at 4 °C.

2.3.2 Special Equipment

1. WiseCube incubator.
2. Seretech Gensablen French press.
3. Beckman Coulter Avanti J-26S XP centrifuge, with JA 16.250 and JLA 25.50 rotors.
4. AKTÄ purifier FPLC purification system.
5. Savant SpeedVac SVC 100H.
6. HiTrap DEAE FF 5 mL column (GE Healthcare), Source 15 RPC 7.5 × 150 mm column (Pharmacia Biotech).
7. Dialysis tubing: cellulose molecular weight cutoff 3500 Spectra/Por[®] molecular porous n°3 18 mm × 50 ft.

2.4 Sample Preparation

2.4.1 Reagents and Buffers

1. 0.1 M guanosine triphosphate sodium salt hydrate (GTP): weigh 0.0567 g GTP in a microtube, and add 970 µL of ultrapure water. Check the concentration by measuring the absorbance at 256 nm with a molecular extinction coefficient $\epsilon_{256\text{ nm}} = 13,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, and store at -20 °C (*see Note 1*).
2. 1 M TCEP stock: weigh 1.4 g of tris(2-carboxyethyl) phosphine in a 5 mL plastic tube, and add 4.5 mL ultrapure water. Use a vortex to strongly mix the solution for few minutes (*see Note 2*). Make 500 µL aliquots and store them at -20 °C.
3. 400 mM sodium phosphate buffer stock (1 L): dissolve 27.60 g NaH_2PO_4 and 28.39 g Na_2HPO_4 in ultrapure water in a 1 L glass beaker. Complete volume to 1 L in a graduated flask. Store at 4 °C.

4. P buffer: 20 mM phosphate buffer, pH 6.5. In a 100 mL glass beaker, add 5 mL of 400 mM phosphate buffer to 94 mL of ultrapure water. Verify that pH is 6.5, and transfer the buffer in a 100 mL graduated flask, and complete volume to 100 mL (*see Note 3*).
5. PG buffer is P buffer +0.1 mM GTP added extemporaneously.
6. PT buffer: 20 mM phosphate buffer, 1 mM TCEP, pH 6.5. In a 100 mL glass beaker, add 5 mL of 400 mM phosphate buffer and 100 μ L of TCEP stock to 94 mL of ultrapure water. Adjust pH to 6.5 with 10 M NaOH. Transfer the buffer in a 100 mL graduated flask, and complete volume to 100 mL (*see Note 4*).
7. PGT buffer is PT buffer +0.1 mM GTP added extemporaneously.
8. Reagent A (DCTM protein assay): alkaline tartrate copper solution.
9. Reagent B (DCTM protein assay): Folin reagent.
10. Reagent S (DCTM protein assay): surfactant solution.
11. Reagent A': add 1 mL of Reagent A to 20 μ L of Reagent S' (*see Note 5*).

2.4.2 Special Equipment

1. LLG uniCFUGE 3 mini centrifuge.
2. AKTÄ Purifier FPLC purification system (GE Healthcare).
3. LabSystems Multiskan RC microplate reader (Artisan TG).
4. Lambda 800 spectrophotometer (Perkin Elmer).
5. HiTrap Desalting 5 mL column (GE Healthcare).

2.5 MAP-Tubulin Interaction by ITC

All equipment and materials that we used for ITC experiment have been provided by MicroCal (Malvern Panalytical). It includes:

1. Isothermal titration calorimeter (VP-ITC, iTC₂₀₀ or PEAQ-ITC).
2. Origin 7.0 data analysis software (OriginLab Northampton, Massachusetts, USA).
3. Hamilton filling syringe with a long needle with silicon tube on the tip in order to fill and empty the calorimetric cell (*see Note 6*).
4. Plastic 200 μ L thin wall PCR tubes for filling titration syringe.

3 Methods

Carry out all procedures at room temperature unless otherwise specified.

3.1 Tubulin Purification

The detailed protocol of tubulin purification from bovine brain was described earlier [21].

3.2 Tau Purification

The detailed protocol of recombinant human tau purification was described earlier [21].

3.3 Stathmin Purification

In a 500 mL Erlenmeyer flask, mix 100 mL sterilized LB Miller medium with 100 μ L ampicillin 100 mg mL⁻¹ and 100 μ L glycerol stock of stathmin-BL21DE3. Incubate at 37 °C overnight in the WiseCube incubator under a 150 rpm agitation (*see Note 7*).

3.3.1 Day 1: Small-Scale Bacterial Culture

3.3.2 Day 2: Bacterial Growth

1. Start 1 L of BL21(DE3) bacterial culture in LB medium: in two 2 L Erlenmeyer flasks, mix 500 mL sterilized LB Miller medium with 500 μ L ampicillin 100 mg mL⁻¹ and 2 mL of overnight small-scale culture. Incubate at 37 °C under a 150 rpm agitation (*see Note 7*).
2. Check growth by measuring the absorbance at 600 nm of an aliquot of the culture every hour.
3. When bacterial culture A₆₀₀ reaches 0.8–1.0 (usually about 3 h after), induce protein production by addition of 0.5 mM IPTG (500 μ L of 1 M IPTG stock per liter of LB).
4. Continue the bacterial culture for 3 h.
5. Collect bacterial pellet by centrifugation at 5000 $\times g$ for 10 min at 4 °C using JA 16.250 rotor. Pellets are recovered and resuspended in 10 mL of lysis buffer (*see Note 8*).

3.3.3 Protein Extraction

1. Apply on the resuspended pellet a four tons pressure in French press, and slowly open the French press fosset to gradually release the samples while maintaining a four tons pressure on the left over.
2. Repeat this extraction step by loading the French press with the same sample again.
3. Boil the bacterial lysate at 90 °C for 10–15 min, to select thermal-resistant proteins like stathmin.
4. Centrifuge for 30 min at 30,000 $\times g$ at 4 °C using a pre-thermostated JLA 25.50 rotor, and keep the supernatant.

3.3.4 Ion-Exchange Chromatography

1. A HiTrap DEAE FF 5 mL column (GE healthcare) is activated by running 15 mL of activation buffer at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Before sample injection, column is washed with 20 mL of equilibration buffer.
2. Load the sample in a 10 mL FPLC loop and switch it to inject. Start to collect 5 mL fractions, and inject sample with equilibration buffer at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Absorbance

increases during sample deposit. Rinse column with equilibration buffer until absorbance comes back to baseline level.

3. Apply a 50% NaCl gradient: increase the elution buffer part from 0 to 50% in 10 min with a flow rate of 1 mL min^{-1} . Stathmin is released at 48% of elution buffer. When stathmin protein has been released from the column, 100% of elution buffer are applied to wash the column for few minutes at a flow rate of 1 mL min^{-1} .
4. To check in which fractions stathmin is present, 20 μL of each fraction is mixed with 5 μL of $5\times$ SDS loading gel buffer and then loaded on a SDS-PAGE 12% acrylamide.
5. Fractions containing stathmin are pooled and loaded on the reverse-phase column.

3.3.5 Reverse-Phase Chromatography

1. A Source 15 RPC $7.5 \times 150 \text{ mm}$ is equilibrated by running 30 mL of activation buffer at a flow rate of 1.5 mL min^{-1} .
2. 1 mL of sample from ion-exchange chromatography is loaded in a 1 mL sample loop. Start to collect 5 mL fractions, and inject sample with equilibration buffer at a flow rate of 1 mL min^{-1} . Absorbance increases during sample deposit. Rinse column with equilibration buffer until absorbance comes back to baseline level.
3. Apply a 5% acetonitrile step: increase the elution buffer part to 5% at a flow rate of 1.5 mL min^{-1} for 10 mL.
4. Apply a 40% acetonitrile gradient: increase the elution buffer part from 5 to 40% in 27 min with a flow rate of 1.5 mL min^{-1} .
5. Stathmin is the second pic released. When stathmin protein has been released from the column, 100% of elution buffer are applied to wash the column for few minutes at a flow rate of 1.5 mL min^{-1} .
6. To check in which fractions stathmin is present, 20 μL of each fraction is mixed with 5 μL of $5\times$ SDS loading gel buffer and then loaded on a SDS-PAGE 12% acrylamide.
7. Fractions containing stathmin are collected and frozen at -80°C to be freeze dried.
8. Once freeze dried, stathmin can be stored at -20°C for several months.

3.4 Sample Preparation

Ideally tubulin concentration should be around 10–20 μM so that there is enough signal yet keeping the concentration of the ligand reasonable. Indeed, the ligand (here tau or stathmin) is usually tenfold more concentrated, and above 200 μM , there is a risk of oligomerization or precipitation.

3.4.1 Protein Resuspension

1. Resuspend the protein in its buffer (stathmin in P buffer and tau in PT buffer) until complete dissolution of protein (*see Note 9*).
2. Centrifuge at $1000 \times g$ for a few seconds to collect all drops on the walls of the tube.
3. Centrifuge at $2000 \times g$ for 15 min to eliminate potential aggregates.
4. Throw away the pellet and keep supernatants in the ice.

3.4.2 Protein Equilibration

The same procedure is used for the three proteins, but with different PX buffers: P buffer is used for stathmin, PT buffer is used for tau, and PG buffer is used for tubulin before a tubulin-stathmin interaction of PGT buffer in case of a tubulin-tau interaction.

1. Equilibrate the 5 mL HiTrap Desalting column by running 30 mL of PX buffer at a flow rate of 1 mL min^{-1} on the FPLC.
2. Load previous supernatants manually with a syringe in a 1 mL FPLC loop.
3. Start collecting fractions immediately as PX buffer continues to run through the column at a flow rate of 1 mL min^{-1} , with the UV detector set to follow absorbance at 215 nm, 260 nm, and 280 nm (*see Note 10*).
4. Collect the peak as precisely as possible (*see Note 11*).
5. Pool the fraction(s) containing the protein, and store them on ice before concentration determination.

3.4.3 Determination of Tau and Tubulin Concentration

As described in the previous detailed protocol [21]:

1. Tau concentration is determined in a P buffer using the extinction coefficient of $7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 280 nm (calculated from protein sequence using Protein Sequence Analysis Tool [22]).
2. Tubulin concentration is determined in 6 M guanidine hydrochloride using the extinction coefficient of $109,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 275 nm.

3.4.4 Determination of Stathmin Concentration

Determination of stathmin concentration is more challenging, as stathmin bears no tyrosine or tryptophan residues. We use colorimetric methods (DC Protein Assay, Bio-Rad) with BSA as standard as a first estimation. Since BSA does not behave the same way as stathmin, we usually have to adjust stathmin concentration after ITC experiments in order to reach the expected stathmin/tubulin stoichiometry of 0.5 (*see Note 12*).

1. The entire colorimetric test should be done at room temperature.
2. Add 5 μL of standard protein at different known concentrations in each well and 5 μL of stathmin sample in another well.

3. Repeat twice in order to have triplicates.
4. Add 25 μL of Reagent A' in each well; never put B before A' (*see Note 13*).
5. Finally, add 200 μL of Reagent B in the same wells.
6. Incubate sample for 15 min in the dark.
7. Read the plate with the microplate reader at 600 nm.
8. Trace standard curve with each known concentration point, and mark the stathmin value on it (*see Note 14*).
9. You can now estimate stathmin concentration using the X-axis.

3.5 MAP-Tubulin Interaction by ITC

3.5.1 Instrument Settings

Configure iTC200 control software using the following settings:

1. 20 injections
2. Initial delay 60 s.
3. Spacing 180 s.
4. Filter period 5 s.
5. Injection volume 2 μL .
6. Measurement temperature of 37 °C (*see Note 15*).
7. Reference power of 10 $\mu\text{cal s}^{-1}$.
8. Stirring speed of 200 rpm.
9. Feedback mode—high.

3.5.2 Cell Filling

All manipulations with calorimetric cell should be performed with extra care to avoid damaging cell with filling syringe.

1. Fill the Hamilton syringe (“filling syringe”) with at least 300 μL of 37 °C preheated buffer (*see Note 16*).
2. Introduce the filling syringe all the way to the bottom of the calorimetric cell without injecting, then lift silicon tip of the syringe needle up about 1 mm above the bottom of the cell (*see Note 17*).
3. To inject in the calorimetric cell, push the syringe piston slowly until half of solution volume is injected, then inject the rest by doing several small but rapid injections (*see Note 18*).
4. Proceed with the injection up to the point when the sample overflows the calorimetric cell (*see Note 19*).
5. Remove this overflowing liquid.

3.5.3 Titration Syringe Filling

1. Put titration syringe piston in position “Open fill port” in control software (tab “Instrument control”) when syringe is on the rest position.
2. Fill PCR plastic tube with 200 μL of buffer, and place it in the instrument holder.

3. Put syringe of “filling” position and submerge syringe needle into buffer.
4. Connect 1–5 mL plastic syringe to the titration syringe using dedicated adapter (*see* **Note 20**).
5. Then pull up plastic syringe piston to pump all the buffer from PCR tube through titration syringe, and empty it.
6. Refill PCR tube with buffer, and carefully draw buffer into titration syringe until it fills completely (*see* **Note 21**).
7. Close titration syringe choosing “Close fill port” in tab “Instrument control” of control software, disconnect filling syringe and put titration syringe in the rest position.
8. Carefully remove the drops of the liquid from titration syringe needle using Kimberly-Clark precision Wipes without bending the needle.
9. Place titration syringe into calorimetric cell and push it down to be sure that syringe properly gained the lower position.

3.5.4 Buffer-to-Buffer Titration

1. Start ITC titration with calorimetric cell and titration syringe filled with buffer solution.
2. Titration peaks should not exceed 0.1. Otherwise, calorimetric cell and titration syringe should be cleaned using detergent, and buffer-to-buffer titration should be repeated.

3.5.5 MAP-Tubulin Interaction Measurement

When performing MAP-tubulin interaction, it is better to put the tubulin in the calorimetric cell and the MAP in the titration syringe (*see* **Note 22**).

1. Empty calorimetric cell and titration syringe, and fill them with tubulin and MAP solution, respectively, as described in Subheadings 3.5.2 and 3.5.3.
2. If saturation is not reached after first titration is finished (*see* **Note 23**), refill the titration syringe by placing the needle into MAP solution and pressing button “close filling port” in control software. Otherwise go directly to Subheading 3.5.6.
3. Remove excess of the solution from the borders of calorimetric cell.
4. Place the syringe in titration position and run the experiment.
5. Repeat **steps 2–4** until titration peaks will stay the same in several consecutive injections.

3.5.6 Baseline Titration

1. Rinse the calorimetric cell with buffer.
2. If saturation was not reached at the end of the first titration, repeat the same number of consecutive titrations of MAP

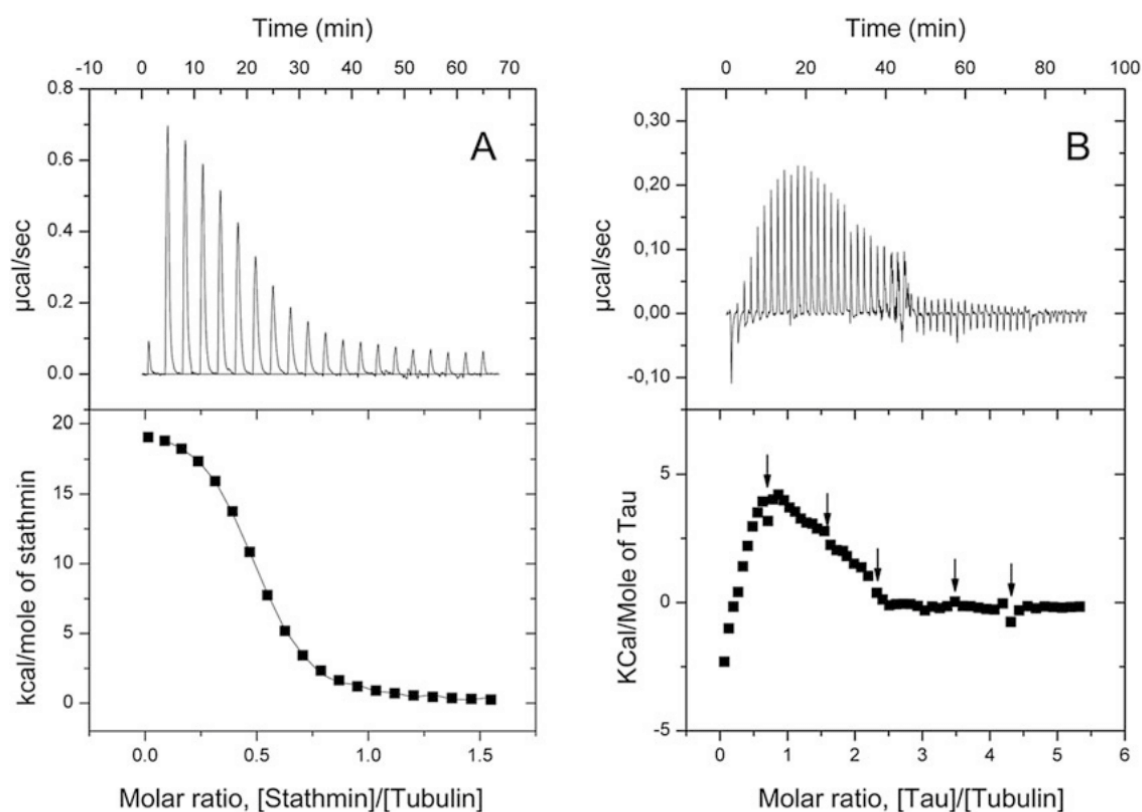


Fig. 2 Raw ITC curves (top panels) and binding isotherms with fitting curves (bottom panels) of tubulin titration by MAPs. Titration of tubulin by stathmin (A) and tau (B) proteins obtained at VP-ITC and iTC₂₀₀, respectively, in 20 mM NaPi, 0.1 mM GTP, and 1 mM TCEP, buffer at pH 6.5. (A) is an example in which saturation was reached at the end of the first titration, while (B) is an example in which saturation was only reached after the sixth consecutive titration. The arrows show syringe refilling with the same tau solution. Adapted from Tsvetkov et al. 2013 [20]

solution into buffer filled in the cell the same number of times as for tubulin titration by repeating **steps 15–18**.

3. Clean calorimetric cell and titration syringe using detergent as described in instrument manual.

3.5.7 Data Processing and Fitting

1. If saturation was reached at the end of the first titration (Fig. 2a), go directly to point 4.
2. If saturation was not reached at the end of the first titration (Fig. 2b), combine data from consecutive titrations of MAP in buffer solution into single titration file using ConCat32 tool provided by iTC200 manufacturer.
3. If saturation was not reached at the end of the first titration, combine data from consecutive titrations of MAP in tubulin solution into single titration file using ConCat32 tool provided by iTC200 manufacturer.

4. Subtract baseline titration from experiment titration. For that purpose:
 - (a) In Origin software, open baseline titration file obtained above by choosing “Read data” from side menu “ITC Main Control.”
 - (b) Go back to raw data window choosing from top menu “Window/mRawITC.”
 - (c) Press again “Read data” from side menu “ITC Main Control,” and choose the sample titration obtained above.
 - (d) Repeat **step (b)**.
 - (e) From top menu, choose “Math/Simple math. . .”
 - (f) In pop-up window, choose “DATA2RAW_CP” in the field “Y1” and “DATA1RAW_CP” in the field “Y2” by scrolling “Available data” list and pressing corresponding button with arrow “=>.” Then put “-” (minus) sign in “Operator” field and press “Ok.”
5. Prepare data for fitting by integrating titration peaks, removing bad data points, and subtracting baseline. For that purpose:
 - (a) In “ITC Main Control” on the left from plot, select “Auto baseline.”
 - (b) If necessary, press “Adjust integration,” and move baseline points using mouse.
 - (c) Select “Integrate All Peaks” from side menu “ITC Main Control.”
 - (d) Select “Remove bad data” from side menu “Data Control,” and delete bad data point by clicking it (*see Note 24*).
 - (e) Subtract baseline if the titration curve does not tend to zero at the end of the experiment by performing the following steps:
 - Press “Data selector” tool on side toolbar, and two selection markers will appear on the curve.
 - Select final linear region of the titration curve by dragging, and drop first selection marker and then press “Enter.”
 - Select “Math/Linear regression” from top menu.
 - Press “Data selector” tool on side toolbar and select entire curve.
 - Select “Math/Simple math” and subtract linear regression (LinearFit1_Data2) from experimental data (DATA2_NDH).

6. Fit experimental data using “One Set of Sites” for tubulin/stathmin interactions and “Two set of Sites” for tubulin/tau interactions by choosing appropriate model in “Model Fitting” side menu. In fact the mode of tau binding to tubulin is still under debate; thus the appropriate fitting model is also still questionable (*see* **Note 25**).
7. Since the stoichiometry of tubulin/stathmin is well-known and concentration of stathmin could be determined with significant error, correct stathmin concentration multiplying it by factor corresponding to the found stoichiometry divided by 2 and then redo Subheading 3.5.7 starting from **step 4** (*see* **Note 26**).

4 Notes

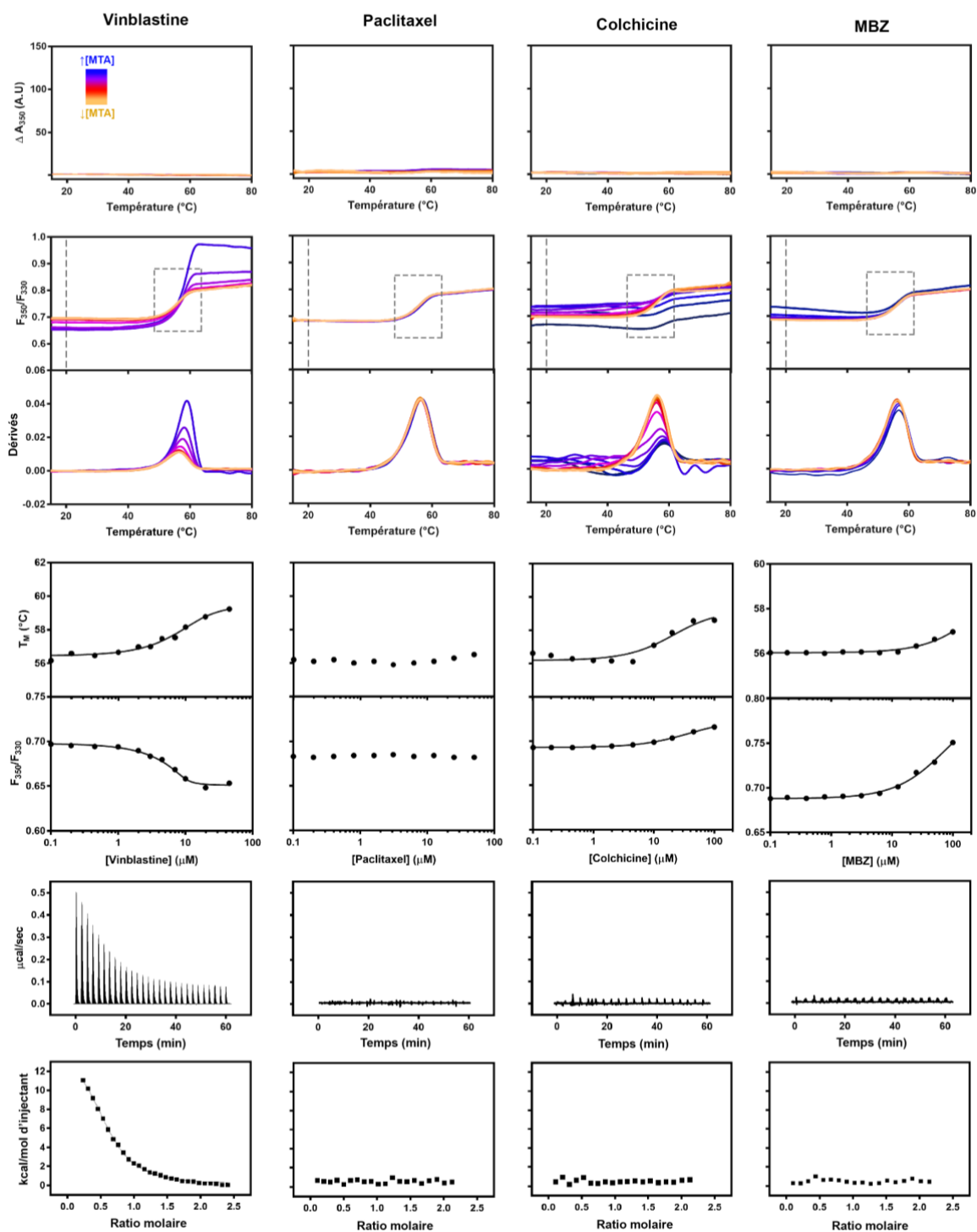
1. GTP is dissolved in water. Make aliquots of 100 μ L and store them at -20°C . GTP should be added freshly to buffer to avoid hydrolysis of GTP into GDP, and make sure that tubulin is always with GTP.
2. TCEP, which is a little difficult to dissolve at this concentration, is preferred to DTT because it is more stable. It is used to reduce disulfide bonds and maintain tau monomeric.
3. This buffer will be used to resuspend and equilibrate stathmin before ITC experiment.
4. This buffer will be used to resuspend and equilibrate tau before ITC experiment. Even though TCEP is rather stable, PT buffer should be prepared extemporaneously. pH should always be adjusted after TCEP since TCEP usually changes the pH.
5. A' should be prepared extemporaneously.
6. The silicone tubing is fitted on the needle tip in order to protect the bottom of the ITC calorimetric cell from repeated contact with the needle.
7. All bacterial culture must be prepared near a Hoffman Heater to prevent contamination.
8. Sample can be kept in lysis buffer for a few weeks at -20°C . For prolonged storage (superior to 6 months), samples need to be stored at -80°C .
9. Pipet up and down to make sure all the powder is dissolved.
10. The strongest signal will be observed at 215 nm. No major signal will be observed at 280 nm for stathmin since it has no aromatic residues.
11. Depending on how concentrated was your initial supernatant and how concentrated you want your final protein, you might want to collect only the central fraction of the peak.

12. Ideally, the most precise method is to constitute a stock of stathmin of known concentration (e.g., previously determined by amino acid composition) and aliquot it to use as standards instead of BSA.
13. If you put B before A', the protein concentration of the sample cannot be measured.
14. If the absorbance of the stathmin samples is too high, restart the whole process (including standards) with a dilution of the sample.
15. If necessary, change to the temperature at which the interaction is measured.
16. Preheated buffer is needed to prevent the formation of bubbles on the wall of the cell upon heating. This can be done by holding tight the filling syringe with buffer solution in your hand.
17. If there is a tight contact between tip of the needle and the bottom of the cell during injection, it might generate solution jets that could result in bubble creation.
18. Short rapid injections will help remove bubbles attached to the cell walls if they exist.
19. This procedure also decreases the chances of having bubbles stuck in the cell.
20. Do not tighten the screw, since it can damage the titration syringe.
21. The small bubble on the top of the titration syringe close to piston is acceptable. Pay attention not to draw air in titration syringe, since even small bubble injected in the calorimetric cell can dramatically influence the experiment.
22. The opposite can be done, but since the concentration in the syringe is usually at least tenfold higher than in the cell, it is better to put the molecule that has the smallest tendency to self-assemble or aggregate in the syringe.
23. Saturation is reached when the signal reaches the baseline and is constant.
24. On one hand, usually the first point of each titration should be removed. On the other hand, be careful not remove too many points, especially on the slope of the titration curve, since this can lead to serious mistakes in data fitting.
25. For analyzing experimental data with more complex models, use dedicated software [23].
26. There are some ITC fitting software that allow fitting concentration in the cell or in the syringe by fixing stoichiometry.

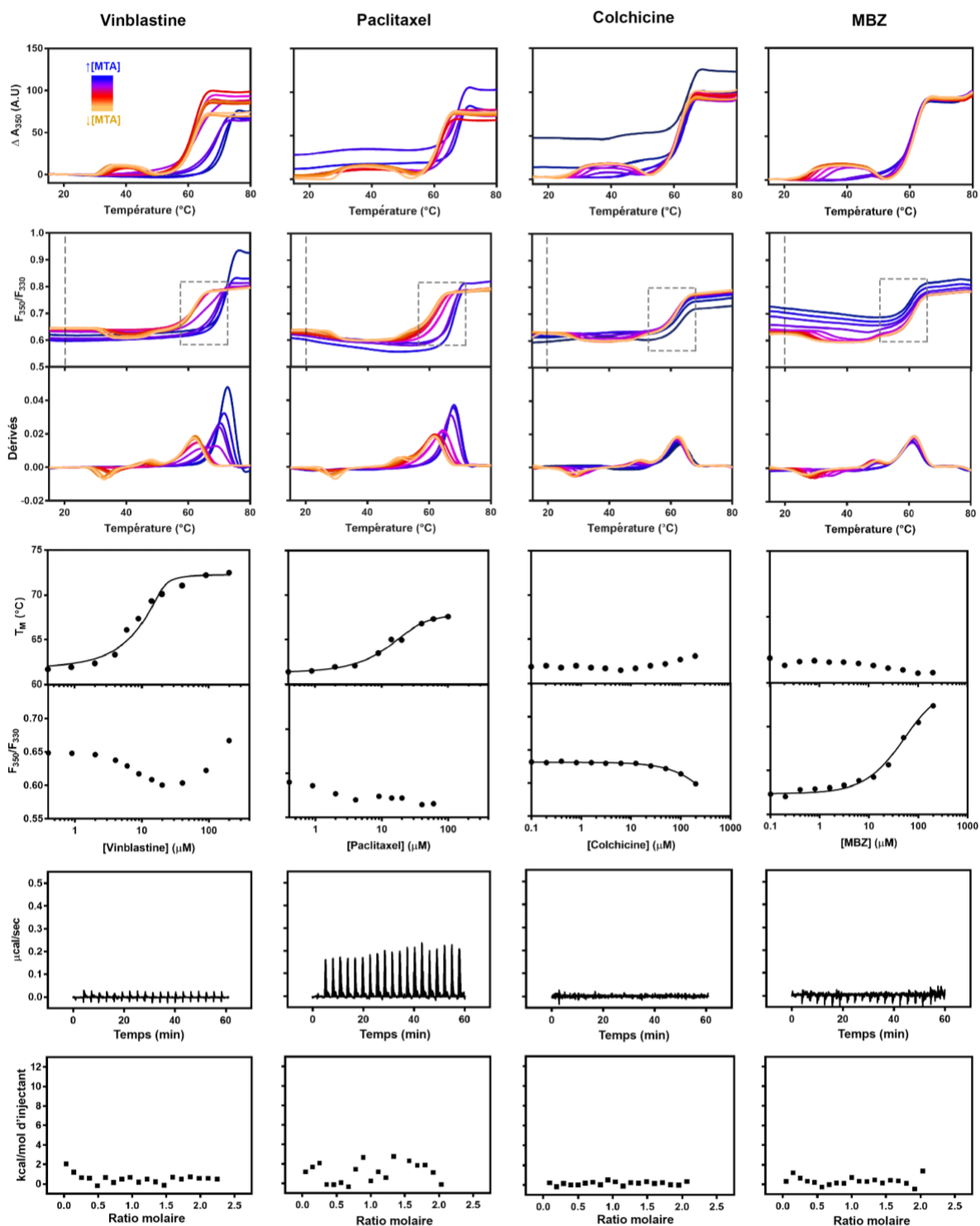
References

1. Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237–242
2. Larsson N, Marklund U, Gradin HM, Brattsand G, Gullberg M (1997) Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol* 17:5530–5539
3. Jameson L, Frey T, Zeeberg B, Dalldorf F, Caplow M (1980) Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 19:2472–2479
4. Kiris E, Ventimiglia D, Feinstein SC (2010) Quantitative analysis of MAP-mediated regulation of microtubule dynamic instability in vitro. *Methods Cell Biol* 95:481–503
5. Ross JL, Dixit R (2010) Multiple color single molecule TIRF imaging and tracking of MAPs and motors. *Methods Cell Biol* 95:521–542
6. Devred F, Barbier P, Lafitte D, Landrieu I, Lippens G, Peyrot V (2010) Microtubule and MAPs: thermodynamics of complex formation by AUC, ITC, fluorescence, and NMR. *Methods Cell Biol* 95:449–480
7. Kellogg EH, Hejab NMA, Poepsel S, Downing KH, DiMaio F, Nogales E (2018) Atomic model of microtubule-bound tau. *Science*, in press
8. Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA (2003) Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 22:70–77
9. Tsvetkov PO, Makarov AA, Malesinski S, Peyrot V, Devred F (2012) New insights into tau-microtubules interaction revealed by isothermal titration calorimetry. *Biochimie* 94:916–919
10. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277:665–667
11. Weisenberg RC, Timasheff SN (1970) Aggregation of microtubule subunit protein. Effects of divalent cations, colchicine and vinblastine. *Biochemistry* 9:4110–4116
12. Calligaris D, Verdier-Pinard P, Devred F, Villard C, Braguer D, Lafitte D (2010) Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. *Cell Mol Life Sci* 67:1089–1104
13. Devred F, Tsvetkov PO, Barbier P, Allegro D, Horwitz SB, Makarov AA, Peyrot V (2008) Stathmin/Op18 is a novel mediator of vinblastine activity. *FEBS Lett* 582:2484–2488
14. Barbier P, Tsvetkov PO, Breuzard G, Devred F (2013) Deciphering the molecular mechanisms of anti-tubulin plant derived drugs. *Phytochem Rev* 13:157–169
15. Malesinski S, Tsvetkov PO, Kruczynski A, Peyrot V, Devred F (2015) Stathmin potentiates vinflunine and inhibits Paclitaxel activity. *PLoS One* 10:e0128704
16. Honnappa S, Cutting B, Jahnke W, Seelig J, Steinmetz MO (2003) Thermodynamics of the Op18/stathmin-tubulin interaction. *J Biol Chem* 278:38926–38934
17. Honnappa S, Jahnke W, Seelig J, Steinmetz MO (2006) Control of intrinsically disordered stathmin by multisite phosphorylation. *J Biol Chem* 281:16078–16083
18. Devred F, Barbier P, Douillard S, Monasterio O, Andreu JM, Peyrot V (2004) Tau induces ring and microtubule formation from alphabeta-tubulin dimers under nonassembly conditions. *Biochemistry* 43:10520–10531
19. Tsvetkov PO, Barbier P, Breuzard G, Peyrot V, Devred F (2013) Microtubule-associated proteins and tubulin interaction by isothermal titration calorimetry. *Methods Cell Biol* 115:283–302
20. Tsvetkov FO, Kulikova AA, Devred F, Zernii EI, Lafitte D, Makarov AA (2011) Thermodynamics of calmodulin and tubulin binding to the vinca-alkaloid vinorelbine. *Mol Biol* 45:697–702
21. De Bessa T, Breuzard G, Allegro D, Devred F, Peyrot V, Barbier P (2017) Tau interaction with tubulin and microtubules: from purified proteins to cells. *Methods Mol Biol* 1523:61–85
22. Tsvetkov PO Protein sequence analysis tool. <http://www.prot-seq.org>
23. AFFINImeter for Isothermal Titration Calorimetry. <https://www.affinimeter.com/site/itc/>

Annexe 2 : Interactions tubuline - MTA en tampon phosphate



Annexe 3 : Polymérisation de tubuline en présence de MTA (tampon PEMGT)



Résumé / abstract

La protéine tau est un acteur important de la physiopathologie des neurones, de par son rôle dans la régulation de la dynamique des microtubules, mais aussi par son agrégation pathologique dans les maladies neurodégénératives. Depuis de nombreuses années, les agrégats de tau sont les objets d'études *in vivo* et *in vitro* qui visent à comprendre pourquoi et comment la protéine s'agrège, en essayant d'identifier des facteurs qui déclenchent cette agrégation. Durant ces dernières années, le zinc est apparu comme un acteur important pouvant contribuer à cette agrégation pathologique dans la cellule. Cependant, le mécanisme moléculaire à l'origine de cette agrégation en présence de zinc n'a pas été décrit. Par des approches biophysiques (turbidimétrie, DLS, ITC, microscopie électronique), nous nous sommes intéressés à ce mécanisme en montrant dans un premier temps que le zinc induit la formation d'agrégats de tau réversibles en se liant directement à la protéine, et que ces agrégats possèdent une structure différente de celle des agrégats pathologiques de tau. Dans un second temps, nous avons identifié les sites de fixation du zinc par RMN et proposé un schéma de liaison entre la protéine tau et le zinc par ITC, en mettant en évidence l'importance de la partie C-terminale de tau dans le processus d'agrégation avec des expériences de turbidimétrie et de DLS. Ce travail décrit pour la première fois le mécanisme d'agrégation de la protéine tau induit par le zinc, qui pourrait être à l'origine de l'agrégation pathologique observée dans les pathologies neurodégénératives. En parallèle, nous avons développé l'utilisation d'un appareil biophysique permettant d'étudier à la fois l'agrégation et les interactions protéiques : le nanoDSF Prometheus NT.Plex.

The tau protein is an important actor of physiopathology in neurons, mainly because of its regulation role of microtubules dynamics and its pathological aggregation in neurodegenerative disorders. For many years, tau aggregates are studied *in vivo* and *in vitro* in order to understand why and how this aggregation can occur. In the last few years, several factors were identified as enhancers or inducers of aggregation in neurons, including zinc. However, the molecular mechanism behind this aggregation was not described yet. With biophysical approaches (turbidimetry, DLS, ITC, TEM), we focused on this mechanism and showed in a first instance that zinc induces the formation of reversible aggregates of tau by binding directly to tau, and that these aggregates have a different morphology in comparison to the pathological ones. In a second time, we identified the zinc binding sites on tau by NMR and proposed a binding scheme of the tau-zinc interaction with ITC while highlighting the importance of the C-terminal part of tau in the aggregation process with turbidity and DLS experiments. This work describes for the first time the zinc-induced aggregation of tau, which may be the first step leading to the pathological aggregation largely described in neurodegenerative diseases. In parallel, we derived the classical utilization of a biophysical device called nanoDSF Prometheus NT.Plex in order to study protein aggregation and interaction with one unique experiment.