



HAL
open science

Agrégation in vitro de la protéine amyloïde Tau et étude de son impact sur des modèles membranaires par différentes méthodes biophysiques

Vicky Ury-Thiery

► To cite this version:

Vicky Ury-Thiery. Agrégation in vitro de la protéine amyloïde Tau et étude de son impact sur des modèles membranaires par différentes méthodes biophysiques. Chimie thérapeutique. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0440 . tel-04916461

HAL Id: tel-04916461

<https://theses.hal.science/tel-04916461v1>

Submitted on 28 Jan 2025

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ : Chimie et Technologies du Vivant

Par Vicky Ury-Thiery

Agrégation *in vitro* de la protéine amyloïde Tau et étude de son impact sur des modèles membranaires par différentes méthodes biophysiques

Sous la direction de : Sophie LECOMTE
Co-directeur : Michaël MOLINARI

Soutenue le 18/12/2024

Membres du jury :

Mme LECOMTE, Sophie	Directrice de recherche, CNRS	Directrice de thèse
Mr MOLINARI, Michael	Professeur, U. de Bordeaux	Co-directeur de thèse
Mme NOINVILLE, Sylvie	Chargée de Recherche, CNRS Paris	Rapporteuse
Mme REDONDO-MORATA, Lorena	Chargée de Recherche, INSERM Marseille	Rapporteuse
Mme GRAUBY-HEYWANG, Christine	Professeure, U. de Bordeaux	Présidente du jury
Mr WAEYTENS, Jehan	Associate Professor, U.L. de Bruxelles	Examineur
Mme FEUILLIE, Cécile	Chargée de Recherche, CNRS Bordeaux	Co-encadrante invitée

Résumé

Agrégation *in vitro* de la protéine amyloïde Tau et étude de son impact sur des modèles membranaires par différentes méthodes biophysiques

Les maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, affectent les fonctions cognitives et motrices. Elles se caractérisent par une perte progressive de neurones, sans possibilité de régénération. Avec le vieillissement de la population, ces pathologies, principalement liées à l'âge, représentent un enjeu sociétal majeur. L'absence de diagnostic précoce, de traitements efficaces et la méconnaissance des mécanismes en jeu soulignent la nécessité d'en approfondir la compréhension.

Les patients atteints de ces maladies présentent des accumulations de protéines anormales sous forme d'agrégats insolubles, dans ou à proximité des cellules cérébrales. Bien que chaque protéinopathie présente des agrégats spécifiques, elles partagent des caractéristiques communes, notamment leur structure appelée amyloïde. Ces amyloïdes, formés par l'auto-assemblage de monomères protéiques mal conformés par empilement, adoptent une structure caractéristique dite en cross- β . Plusieurs protéines amyloïdes pathogènes ont été identifiées et sont associées à diverses maladies neurodégénératives.

La protéine Tau, impliquée dans la maladie d'Alzheimer et plus largement dans un groupe de démences appelées tauopathies, est principalement localisée dans les neurones, où elle stabilise les microtubules, éléments structurants du cytosquelette cellulaire. Toutefois, dans des conditions pathologiques, Tau se dissocie des microtubules, devient hyperphosphorylée et forme des agrégats amyloïdes fibrillaires. Les mécanismes exacts de cette agrégation restent mal compris.

L'étude de l'agrégation de Tau repose sur la production *in vitro* de fibres amyloïdes. En raison de sa solubilité élevée liée à sa charge positive, la formation de ces fibres nécessite l'ajout de molécules polyanioniques, appelées cofacteurs, telles que l'héparine (un polysaccharide), des ARN ou des lipides. Cependant, des incertitudes demeurent quant au rôle précis de ces cofacteurs : catalysent-ils simplement l'agrégation ou sont-ils intégrés dans la structure des fibres ? Si tel est le cas, quel impact cela a-t-il sur la morphologie des agrégats ?

La capacité de Tau à s'agréger en présence de lipides suscite des interrogations sur son comportement vis à vis des différentes membranes des neurones. L'interaction de Tau avec les membranes plasmiques a été démontrée, et pourrait jouer un rôle autant dans des processus physiologiques que pathologiques. Tau, en présence de lipides anioniques, altère-t-elle l'intégrité membranaire ? Qu'en est-il des lipides non anioniques ?

Pour répondre à ces questions, ce projet de thèse combine plusieurs approches biophysiques : spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), microscopie à force atomique (AFM), microscopie électronique à transmission (MET) et résonance plasmonique de surface par ondes guidées (PWR). L'étude est structurée autour de deux axes principaux : (i) caractériser l'agrégation de Tau en présence de différents cofacteurs anioniques (héparine, ARN, phospholipides) et étudier l'impact sur la morphologie des fibres ; (ii) évaluer l'effet de l'interaction de Tau avec des membranes lipidiques de différentes compositions sur leur intégrité. Les résultats de cette thèse apportent de nouvelles perspectives sur les mécanismes pathogéniques de Tau et pourraient contribuer à une meilleure compréhension des tauopathies, ainsi qu'au développement de stratégies thérapeutiques.

Mots clés : amyloïdes ; protéine Tau ; AFM ; ATR-FTIR ; modèles membranaires lipidiques ; protéinopathies

Abstract

In vitro aggregation of the amyloid protein Tau and study of its impact on membrane models using various biophysical methods

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's, affect cognitive and motor functions. They are characterized by a progressive loss of neurons, with no possibility of regeneration. With an aging population, these predominantly age-related diseases represent a major societal challenge. The lack of early diagnosis, effective treatments, and understanding of the underlying mechanisms highlights the need for further investigation.

Patients suffering from these diseases exhibit abnormal protein accumulations in the form of insoluble aggregates, within or near brain cells. Although each proteinopathy presents specific aggregates, they share common features, notably their amyloid structure. These amyloids, formed by the misfolded protein monomers' self-assembly through stacking, adopt a characteristic cross- β structure. Several pathogenic amyloid proteins have been identified and are associated with various neurodegenerative diseases.

The Tau protein, implicated in Alzheimer's disease and more broadly in a group of dementias known as tauopathies, is primarily located in neurons, where it stabilizes microtubules, structural elements of the cellular cytoskeleton. However, under pathological conditions, Tau dissociates from the microtubules, becomes hyperphosphorylated, and forms fibrillar amyloid aggregates. The exact mechanisms of this aggregation remain poorly understood.

The study of Tau aggregation relies on the in vitro production of amyloid fibers. Due to its high solubility associated with its positive charge, fiber formation requires the addition of polyanionic molecules, called cofactors, such as heparin (a polysaccharide), RNA, or lipids. However, uncertainties remain regarding the exact role of these cofactors: do they simply catalyze aggregation, or are they integrated into the fiber structure? If so, what impact does this have on the morphology of the aggregates?

Tau's ability to aggregate in the presence of lipids raises questions about its behavior in relation to the different membranes of neurons. Tau's interaction with plasma membranes has been demonstrated and may play a role in both physiological and pathological processes. Does Tau, in the presence of anionic lipids, compromise membrane integrity? What about non-anionic lipids?

To address these questions, this thesis project combines several biophysical approaches: attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), atomic force microscopy (AFM), transmission electron microscopy (TEM), and plasmon waveguide resonance (PWR). The study is structured around two main axes: (i) characterizing Tau aggregation in the presence of different anionic cofactors (heparin, RNA, phospholipids) and studying their impact on fiber morphology; (ii) assessing the effect of Tau's interaction with lipid membranes of varying compositions on membrane integrity. The results of this thesis provide new insights into the pathogenic mechanisms of Tau and may contribute to a better understanding of tauopathies as well as the development of therapeutic strategies.

Keywords : amyloids ; Tau protein ; AFM ; ATR-FTIR ; lipidic model membranes ; proteinopathy

Unité de recherche

Institut de Chimie & Biologie des Membranes & des Nano-objets (CBMN), UMR 5248

Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14, 33600 Pessac

Valorisation des travaux de thèse

Publications

- **Talaga, D.; Cooney, G. S.; Ury-Thierry, V.; Fichou, Y.; Huang, Y.; Lecomte, S.; Bonhommeau, S.** Total Internal Reflection Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Tau Fibrils. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126* (27), 5024–5032. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c02786>.
- **Cooney, G. S.; Talaga, D.; Ury-Thierry, V.; Fichou, Y.; Huang, Y.; Lecomte, S.; Bonhommeau, S.** Chemical Imaging of RNA-Tau Amyloid Fibrils at the Nanoscale Using Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **2023**, *62* (50), e202314369. <https://doi.org/10.1002/anie.202314369>.
- **Ury-Thierry, V.; Fichou, Y.; Alves, I.; Molinari, M.; Lecomte, S.; Feuille, C.** Interaction of Full-Length Tau with Negatively Charged Lipid Membranes Leads to Polymorphic Aggregates. *Nanoscale* **2024**, *16* (36), 17141–17153. <https://doi.org/10.1039/D4NR01343C>.

Présentations (congrès et séminaires)

- **Journée CBMN, juin 2022** : Présentation de poster « *Understanding Tau fibrillization with RNA cofactors* » - prix meilleur poster
- **Congrès GDR Médyna, octobre 2022** : Communication orale « *Understanding Tau fibrillization in vitro and impact on membrane* » et présentation de poster
- **Journée de l'Ecole Doctorale des Sciences chimiques, avril 2023** : Présentation de poster « *Understanding Tau fibrillization in vitro and its impact on membranes* » - prix meilleur poster
- **Journées CBMN, juin 2023** : Présentation de poster « *Tau protein induces membrane damage* »
- **Congrès International EBSA, août 2023** : Présentation de poster « *Tau protein induces membrane damage* »
- **Congrès International Amyloïdes, septembre 2023** : Communication orale « *Tau protein induces membrane damage* »
- **Journée département STS, novembre 2023** : Flash poster « *Tau forms amyloids on negatively charged membranes* »
- **Congrès ESAB 2024 (European South Atlantic Biophysics Congress), juin 2024** : Communication orale au Satellite Workshop et présentation poster – prix meilleur poster
- **Journée CBMN, juin 2024** : Communication orale « *Tau selectively aggregates on membranes and induces membrane damage* »

Remerciements

Au terme de cette aventure scientifique, je tiens à exprimer toute ma gratitude envers ceux qui ont rendu ce travail de thèse possible. Mes remerciements vont tout d'abord à mes directeurs de thèse, Sophie Lecomte et Michaël Molinari, qui m'ont fait confiance pour ce projet. Merci de m'avoir enseigné des leçons essentielles pour la poursuite de l'après-thèse et d'avoir contribué à faire de ce projet de thèse ce qu'il est aujourd'hui.

Merci de m'avoir permis de participer à divers séminaires, congrès et événements, ainsi qu'à l'encadrement de stagiaires, qui ont contribué à mon épanouissement. Je remercie également l'ISM et, en particulier, Sébastien Bonhommeau et Gary Cooney pour la collaboration enrichissante et pluridisciplinaire. Je tiens également à remercier l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement de ce projet, ainsi que l'École Doctorale des Sciences Chimiques, le Département STS et le CBMN pour leur soutien à travers bourses et prix poster, facilitant ma participation à des conférences.

Je souhaite adresser ma gratitude à Sylvie Noinville et Lorena Redondo-Morata pour la relecture de ce manuscrit, ainsi qu'à Christine Grauby-Heywang et Jehan Waeytens pour leur participation au jury de thèse.

Merci à la gestion du CBMN, ainsi qu'aux équipes de Spectroscopie, d'AFM et du CBMN pour leur accueil et leur soutien au sein d'un environnement multidisciplinaire et stimulant. En particulier, je remercie Isabel Alves pour m'avoir initiée à la PWR, ainsi que Sandrine Villette et Estelle Rascol pour leur enthousiasme et nos discussions, professionnelles et autres, qui ont illuminé ces trois années. Merci également à Lucie Khemtemourian pour ses conseils et nos échanges scientifiques enrichissants, et à l'équipe des Fichou, notamment Yann pour le co-encadrement de ma première année. Merci de m'avoir offert l'opportunité de partir au Synchrotron ; bien que les manip n'aient rien donné, c'était une aventure professionnelle et personnelle mémorable, avec nos discussions à 2 h du matin après 12 h de manip qui n'avaient plus aucun sens ! Merci à Dory, qui aura été largement plus qu'une stagiaire, et à Clara pour le partage des petites frustrations communes sur nos projets respectifs.

Merci à tous les petits jeunes (et les moins jeunes) et autres colocataires des équipes Spectroscopie & AFM que j'aurais pu croiser pendant ces 3 ans : Ana, Nejma, Adeline, Ramzi, Razane, Carine, Léonie, Laura, Guillaume, Élodie. J'espère avoir contribué à vous donner une super image de la thèse. Merci à toi Anthony pour tous tes conseils et ces derniers mois de rédaction comme coloc de bureau. Une pensée également à tous les autres 3A du CBMN également en rédaction en même temps que moi : Christina, Michele, Léa, Mélanie, Loïc, Marie.

Je souhaite aussi remercier tous ceux, de près ou de loin, qui ont marqué ces années de thèse, notamment les représentants étudiants de l'EDSC et les copains de l'ADOC (et affiliés) : Loïc, Coralie, Bilal, Dory, Cat, Nadia, Nicolas et Gary ; les soirées en votre compagnie ont donné tout son sens à mon début de thèse en particulier.

Cette expérience de thèse aura été un véritable roller coaster, et je tiens à remercier celles qui m'auront permis d'y rester accroché, mes copines : Sonson, Cécile, Mamar, et Alice. Vous aurez été de véritables soutiens, des mentors, des exemples, des bouffées d'air frais dans cette thèse. Merci de m'avoir réconfortée, de m'avoir donné confiance en moi, de m'avoir félicitée, de m'avoir fait rire, de m'avoir fait aimer ma thèse. Merci particulièrement à toi Cécile, qui aura été une vraie encadrante de terrain, m'ayant tout appris et ayant participé à mes réussites comme mes frustrations. Merci à toi Mamar, tu es un véritable exemple pour moi, et toutes nos discussions ont été essentielles à tous les niveaux de ma vie, merci pour tout.

Je ne serais pas en thèse aujourd'hui sans le soutien de ma famille. Merci à Moman et Nini, vous m'avez offert toutes les opportunités possibles pour me soutenir et me permettre d'atteindre une thèse, que je n'aurais jamais cru possible il y a quelques années. J'espère que vous êtes fières de voir l'accomplissement de toute l'énergie que vous m'avez donnée. Flo, Loïc, merci pour votre appui, ainsi que pour la poursuite de nos projets personnels, qui ne se sont pas arrêtés avec la thèse. Alex, ces trois dernières années ont semblé durer le double, avec tous les événements qui ont rythmé nos vies et que nous avons décidé de jouer en mode difficile. Merci d'avoir été auprès de moi, d'avoir installé une constante dans ma multitude de variables, et d'avoir permis la réalisation de nos projets.

Pour conclure ces remerciements, je remercie toutes les personnes croisées au cours de ces trois ans, qui ont influencé mon évolution. Et enfin, comme l'a si bien dit un grand savant, "*I want to thank me*", car cette réussite, je me la dédie aussi.

Listes des Abréviations

ARN	Acide ribonucléique	PHF	Filaments amyloïdes de Tau hélicoïdaux
ATR-FTIR	Spectroscopie vibrationnelle infrarouge à transformée de Fourier en réflexion totale atténuée	PHF6	Motif "VQIVYK" de Tau (domaine R3)
BPS	Phosphatidylsérine totale extraite de cerveaux de porcs	PiD	Maladie de Pick
CBD	Dégénérescence cortico-basale	PM	Membrane plasmique
cryo-EM	Microscopie cryo-électronique	PNS	Système nerveux périphérique
DLS	Diffusion dynamique de la lumière	polyU	Polynucléotide d'uridine
DTT	Dithiothréitol	polyA	Polynucléotide d'adénosine
FTD	Dégénérescence frontotemporale	polyC	Polynucléotide de cytidine
FTDP	Dégénérescence frontotemporale avec parkinsonisme	polyG	Polynucléotide de guanosine
Ge	Germanium	polyI	Polynucléotide d'inosine
GPL	Glycérophospholipides	PTM	Modifications post-traductionnelles
GUV	Liposomes unilamellaires géants	PWR	Résonance plasmonique de surface par ondes guidées
HSPG	Protéoglycanes d'héparane sulfate	RMN	Résonance magnétique nucléaire
IDP	Protéine intrinsèquement désordonnée	RPE	Résonance paramagnétique électronique
IR	Infrarouge	SERS	Spectroscopie Raman exaltée de surface
Kd	Constante d'affinité	SF	Filaments amyloïdes de Tau droits
Ld	Liquide désordonné	Sf	Facteur de sensibilité
Lo	Liquide ordonné	SL	Sphingolipides
LUV	Liposomes unilamellaires larges	SM	Sphingomyéline
MAPT	Gène "microtubule associated protein tau"	So	Phase gel ou rigide
MET / TEM	Microscopie électronique à transmission	SUV	Petits liposomes unilamellaires
MLV	Liposomes multilamellaires	TERS	Spectroscopie Raman exaltée par la pointe
MTBR / MTBD	Domaine / région de liaison aux microtubules	ThT	Thioflavine T
NFT	Enchevêtrements neurofibrillaires	TIR	Réflexion totale atténuée
PA	Acide phosphatidique	Tm	Température de transition
PC	Phosphatidylcholine	vas	Vibration antisymétrique
PE	Phosphatidyléthanolamine	vs	Vibration symétrique
PG	Phosphatidylglycérol		

Table des matières

RESUME	1
ABSTRACT	3
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE.....	5
REMERCIEMENTS	6
LISTES DES ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	14
CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART	21
1. MALADIES NEURODEGENERATIVES	21
1.1. <i>Définition.....</i>	21
1.2. <i>Un enjeu sociétal</i>	21
1.3. <i>Caractéristiques pathologiques.....</i>	23
2. PROTEINES ASSOCIEES AUX PROTEINOPATHIES NEURODEGENERATIVES : LES AMYLOÏDES.....	26
2.1. <i>Caractéristiques structurales des amyloïdes</i>	26
2.2. <i>Mécanismes de formation.....</i>	27
2.3. <i>Impact cellulaire.....</i>	30
2.4. <i>Interaction des amyloïdes avec les membranes</i>	32
3. LA PROTEINE TAU.....	34
3.1. <i>Caractéristiques physiologiques</i>	34
3.2. <i>Pathologies associées à Tau : les Tauopathies.....</i>	39
4. MEMBRANES BIOLOGIQUES ET MODELES	45
4.1. <i>Lipides de la membrane.....</i>	45
4.2. <i>Mimer les membranes biologiques.....</i>	48
5. INTERACTION TAU-LIPIDES / TAU-MEMBRANE.....	52
5.1. <i>Impact des lipides et acides gras sur l'agrégation de Tau.....</i>	52
5.2. <i>Interaction et affinité de Tau pour des lipides</i>	54
5.3. <i>Structuration de Tau au contact des lipides</i>	57
5.4. <i>Impact sur les membranes</i>	61
5.5. <i>Conclusion sur l'impact de Tau sur les membranes lipidiques.....</i>	70
6. OBJECTIFS DE LA THESE	71
CHAPITRE 2. INDUCTEURS DE L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU	75
1. INTRODUCTION	75
2. RESULTATS	76
2.1. <i>Production et purification de la protéine Tau.....</i>	76

2.2.	<i>Agrégation en présence d'héparine</i>	78
2.3.	<i>Agrégation en présence d'ARN</i>	81
2.4.	<i>Agrégation en présence de lipides</i>	89
2.5.	<i>Comparaison entre cofacteurs</i>	95
3.	DISCUSSION	98
3.1.	<i>Quels inducteurs de l'agrégation ?</i>	98
3.2.	<i>Quel(s) mécanisme(s) dans l'interaction Tau-cofacteurs ?</i>	102
3.3.	<i>La Thioflavine T pour comparer les cofacteurs... Une technique appropriée ?</i>	103
3.4.	<i>Le rôle des cofacteurs : catalyse ou intégration ?</i>	105
4.	CONCLUSION	108
CHAPITRE 3. INTERACTION DE TAU AVEC LES MEMBRANES ANIONIQUES.....		113
1.	INTRODUCTION	113
2.	RESULTATS	114
2.1.	<i>Impact de Tau-P301L sur l'intégrité de liposomes POPS</i>	114
2.2.	<i>Etude de l'interaction Tau-P301L - POPS par PWR</i>	115
2.3.	<i>Analyse de l'interaction Tau-P301L - PS par spectroscopie ATR-FTIR</i>	120
2.4.	<i>Imagerie en temps réel et à l'échelle nanométrique de l'interaction Tau-PS</i>	128
3.	DISCUSSION	134
3.1.	<i>Interaction et affinité Tau-POPS</i>	135
3.2.	<i>Perturbation des bicouches de phosphatidylsérine</i>	136
3.3.	<i>Structuration de Tau au contact des bicouches anioniques</i>	137
3.4.	<i>Formation d'agrégats polymorphiques</i>	138
4.	CONCLUSION	139
CHAPITRE 4. INTERACTION DE TAU AVEC LES MEMBRANES ZWITTERIONIQUES		143
1.	INTRODUCTION	143
2.	RESULTATS	144
2.1.	<i>Impact de Tau-P301L sur l'intégrité de liposomes POPC</i>	144
2.2.	<i>Impact de la protéine Tau-P301L sur des bicouches de POPC</i>	145
2.3.	<i>Impact de fibres amyloïdes de Tau sur une bicouche POPC</i>	150
2.4.	<i>Impact de Tau-P301L sur des bicouches de DOPC</i>	151
2.5.	<i>Impact de Tau-P301L sur des bicouches de DPPC</i>	155
2.6.	<i>Impact de Tau-P301L sur des bicouches avec séparation de phase</i>	159
2.7.	<i>Effet du cholestérol</i>	163
3.	DISCUSSION	170
3.1.	<i>Déplétion lipidique en fonction du modèle membranaire</i>	170

3.2.	<i>Mécanisme de perturbation membranaire.....</i>	171
3.3.	<i>Quelle est l'espèce amyloïde impliquée dans l'interaction délétère ?.....</i>	176
3.4.	<i>Modèle proposé.....</i>	177
4.	CONCLUSION	178
	CONCLUSION	182
	PERSPECTIVES	184
	MATERIEL & METHODES	189
1.	PRODUCTION ET PURIFICATION DE LA PROTEINE TAU.....	189
2.	PREPARATION DES ARN.....	190
3.	TESTS D'AGREGATION A LA THIOFLAVINE T	190
4.	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	190
5.	MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM).....	191
5.1.	<i>Principe général.....</i>	<i>191</i>
5.2.	<i>Paramètres expérimentaux.....</i>	<i>191</i>
5.3.	<i>Caractérisation des fibres par AFM.....</i>	<i>192</i>
5.4.	<i>Interaction Tau-bicouches lipidiques par AFM</i>	<i>192</i>
6.	PREPARATION DES LIPOSOMES	192
6.1.	<i>Films lipidiques.....</i>	<i>192</i>
6.2.	<i>Formation des liposomes</i>	<i>193</i>
6.3.	<i>Dosage du phosphore inorganique.....</i>	<i>193</i>
7.	EXPERIENCE DE FUITE DE LIPOSOMES.....	194
7.1.	<i>Principe général.....</i>	<i>194</i>
7.2.	<i>Préparation du tampon contenant la calcéine.....</i>	<i>195</i>
7.3.	<i>Purification des liposomes</i>	<i>196</i>
7.4.	<i>Mesure de fuite de calcéine.....</i>	<i>196</i>
8.	INTERACTION TAU-POPS PAR PWR	197
8.1.	<i>Principe général.....</i>	<i>197</i>
8.2.	<i>Paramètres expérimentaux.....</i>	<i>198</i>
8.3.	<i>Traitement et analyse des données de PWR</i>	<i>199</i>
9.	INTERACTION TAU-BICOUCHES LIPIDIQUES PAR ATR-FTIR	201
9.1.	<i>Principe général.....</i>	<i>201</i>
9.2.	<i>Applications.....</i>	<i>203</i>
9.3.	<i>Paramètres expérimentaux.....</i>	<i>205</i>
9.4.	<i>Traitement des données</i>	<i>206</i>
	BIBLIOGRAPHIE	208

Introduction

Les maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, provoquent une détérioration progressive et irréversible des fonctions cognitives et motrices, conduisant à une mort prématurée des patients. Ces pathologies représentent un enjeu sociétal majeur, car elles entraînent une perte d'autonomie significative et affectent non seulement les malades, mais aussi leurs proches et la société en général, en raison du coût élevé de leur prise en charge. Principalement liées à l'âge, leur incidence devrait augmenter considérablement avec le vieillissement des populations, parallèlement à l'augmentation des facteurs de risque environnementaux tels que le diabète et l'obésité, ainsi que des conditions non métaboliques comme la dépression ou l'inactivité physique. Il est estimé que d'ici 2050, environ 113 millions de personnes seront touchées par ces démences, et l'absence de méthodes de diagnostic précoces ou de traitements efficaces souligne l'urgence de mieux comprendre leurs mécanismes pathologiques.

Un élément commun à ces maladies est l'accumulation d'agrégats protéiques insolubles dans ou autour des cellules cérébrales. Bien que les régions cérébrales affectées, les types cellulaires et les protéines impliquées varient d'une maladie à l'autre, ces pathologies partagent la présence de fibres amyloïdes, structures fibrillaires résultant du repliement anormal de protéines autrefois solubles. Les protéines spécifiques et l'architecture de ces fibres diffèrent selon les maladies.

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau (*tubulin associated unit*), normalement impliquée dans la stabilisation des microtubules, a été identifiée en 1985 comme le composant principal de fibres amyloïdes agrégées dans le cytoplasme des neurones, formant des enchevêtrements neurofibrillaires (*neurofibrillary tangles*, NFTs). Depuis, Tau a également été détectée dans d'autres tauopathies, un groupe de démences caractérisées par son agrégation pathologique. Les études structurales de ces fibres extraites de cerveaux de patients atteints de différentes tauopathies ont mis en évidence une polymorphie marquée, avec des hyperstructures variées et spécifiques à chaque tauopathie. On observe également une polydispersité au sein d'une même pathologie, comme dans le cas de la maladie d'Alzheimer, où deux types de structures distinctes ont été identifiés : les filaments twistés (*paired helical filaments*, PHF) et les filaments droits (*straight filaments*, SF). Malgré les avancées importantes dans la compréhension de la physiopathologie de Tau, les mécanismes sous-jacents à son agrégation restent encore mal élucidés.

Physiologiquement, la protéine Tau est majoritairement liée aux microtubules permettant leur stabilisation, dans les axones des cellules neuronales. Elle est exprimée à partir du gène MAPT (*microtubule associated protein tau*) situé sur le chromosome 17q21. Plusieurs isoformes de la protéine sont produites à partir du gène en fonction des épissages alternatifs, et plusieurs sont co-produites en proportion variable en fonction de l'âge, des types cellulaires ou de la présence de dérégulations pathologiques. Parmi ces isoformes, la 2N4R est la plus étudiée (aussi appelée htau40). Elle est la plus longue (en excluant la forme « Big Tau » exprimée uniquement dans le système nerveux périphérique) et possède 441 acides aminés, pour 48 kDa. Elle est composée de 2 domaines N-terminaux (N1 et N2), particulièrement riches en acides aminés acides (Glutamate

et Aspartate) et d'un domaine de liaison aux microtubules, subdivisé en 4 domaines de répétitions (R1 à R4) avec une majorité d'acides aminés basiques (Lysine et Arginine). La présence de nombreux acides aminés acides et basiques confère à la protéine une importante solubilité avec une charge globale basique et une répartition inégale de ses charges entre sa partie N-terminale et C-terminale. En solution, native, elle a la particularité de ne pas posséder de structuration précise, elle fait donc partie de la catégorie des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP). Cette absence de repliement global ne l'empêche pas d'adopter une structuration partielle et transitoire dans certaines conditions, en particulier lorsqu'elle interagit avec des partenaires, comme les microtubules. Le domaine de liaison aux microtubules, en plus de permettre l'interaction avec les microtubules est aussi impliqué dans la formation du cœur amyloïde, qui présente la partie la plus structurée et insoluble de la protéine une fois agrégée sous la forme de fibres amyloïdes pathologiques.

Pour étudier l'agrégation de Tau, diverses molécules anioniques sont utilisées pour neutraliser les charges positives de la protéine, et ainsi faciliter la formation de fibres amyloïdes. Ces cofacteurs anioniques incluent des polysaccharides comme l'héparine, des acides nucléiques tels que les ARN, ainsi que des détergents, lipides et phospholipides, tous présents dans les cellules ou à la surface des membranes. De plus, certaines de ces molécules ont été colocalisées avec les fibres de Tau dans les cerveaux de patients atteints de démence.

La capacité de Tau à s'agréger en présence de ces cofacteurs soulève des questions sur leur rôle dans le processus de fibrillation. Ces molécules sont-elles simplement des catalyseurs ou sont-elles intégrées dans les fibres amyloïdes ? Si une telle incorporation au sein des fibres amyloïdes existe, elle pourrait avoir des répercussions pathologiques sur les cellules, en particulier concernant l'interaction avec les phospholipides anioniques. Ces derniers, qui induisent la fibrillation de Tau, sont également présents en proportion significative dans les membranes plasmiques. Cela soulève la question de l'impact potentiel de Tau sur ces membranes, dont la composition lipidique pourrait favoriser des effets délétères.

Pour ces raisons, de nombreuses études se sont intéressées à l'interaction de la protéine Tau avec différents lipides ou membranes lipidiques, en s'intéressant à la structuration de la protéine et son agrégation, au mécanisme d'interaction et aux résidus impliqués, ainsi qu'à l'impact de la protéine sur les membranes. Cependant, beaucoup de ces études ont utilisé des fragments de Tau tels que K18 ou K19, des peptides ne comprenant que les domaines de répétitions de la protéine Tau pour effectuer ces études mécanistiques, pouvant expliquer les importantes variabilités observées en fonction des méthodologies, des lipides et des fragments utilisés.

Dans ce contexte, le projet de thèse s'est intéressé à l'isoforme 2N4R de la protéine Tau, et en particulier à son mutant pathogène P301L identifié dans un groupe de démences fronto-temporales. Le projet est structuré autour de deux axes principaux : (i) l'étude de l'agrégation de Tau en présence de différents cofacteurs, et (ii) l'exploration de l'interaction de Tau avec des membranes mimétiques, composées soit exclusivement de phospholipides anioniques, soit de phospholipides zwitterioniques, afin de comprendre l'impact de la composition membranaire sur l'influence de Tau sur les membranes lipidiques.

Introduction

Pour cela, un ensemble de techniques biophysiques a été utilisé, notamment la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée en mode polarisé (ATR-FTIR), la microscopie à force atomique (AFM) et la résonance plasmonique de surface à ondes guidées (*plasmon waveguide resonance*, PWR). L'ATR-FTIR et la PWR ont permis de détecter divers processus, tels que l'accumulation et/ou la structuration protéique, la déplétion lipidique, ainsi que d'informer sur l'organisation membranaire. L'AFM a, quant à elle, offert une visualisation en temps réel et à l'échelle nanométrique de ces interactions.

Ce manuscrit présentera dans un premier temps un état de l'art des connaissances actuelles sur les maladies neurodégénératives et l'accumulation de protéines mal repliées appelées amyloïdes, ainsi que leurs principaux impacts cellulaires, avant de se concentrer sur la physiopathologie de Tau en particulier. Une description de la composition des membranes lipidiques et des moyens de les mimer permettra d'analyser les études précédentes portant sur l'interaction de Tau avec des lipides et des modèles membranaires, avant de présenter les objectifs de la thèse. Les résultats seront présentés dans trois chapitres distincts : le Chapitre 2 sera consacré à l'étude de l'agrégation de Tau avec différents cofacteurs, le Chapitre 3 à l'interaction de Tau avec des modèles membranaires anioniques, et le Chapitre 4 à cette interaction avec des membranes zwitterioniques. Les détails expérimentaux sont présentés dans un chapitre Matériel & Méthodes en fin de manuscrit. Une conclusion générale permettra de synthétiser les résultats obtenus et de présenter les perspectives offertes par ce projet.





CHAPITRE

1

Table des matières

Maladies neurodégénératives	21
Protéines associées aux protéinopathies neurodégénératives : les amyloïdes	26
La protéine Tau	34
Membranes biologiques et modèles	45
Interaction Tau-lipides / Tau-membrane	52
Objectifs de la thèse	71



Chapitre 1. Etat de l'art

1. Maladies neurodégénératives

1.1. Définition

Les maladies neurodégénératives regroupent un ensemble de pathologies affectant les fonctions cognitives et motrices. Le vieillissement est une des causes principales des maladies neurodégénératives, mais des causes environnementales et génétiques peuvent entraîner des syndromes plus précoces. On retrouve parmi ces maladies des démences, comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, et les maladies du motoneurone (ou sclérose latérale amyotrophique).

Ces maladies sont caractérisées par une perte progressive des neurones, affectant leur structure ou leur fonction, sans possibilité de régénération. Cette dégénérescence neuronale progressive dont l'évolution ne peut être ralentie de manière significative, conduit à une détérioration des fonctions cognitives et motrices, se manifestant notamment par des dysfonctions synaptiques, des altérations du réseau neuronal et l'accumulation de protéines altérées, mal repliées (Lamprey et al., 2022).

Ces pathologies entraînent, de plus, une perte significative d'autonomie pour les patients, imposant une prise en charge importante pour les familles ou aidants et pour la société dans son ensemble. Avec le vieillissement démographique, la prévalence de ces maladies est appelée à croître, posant ainsi des défis supplémentaires en termes de santé publique et de prise en charge médicale. À ce jour, aucun traitement curatif n'a été identifié, ce qui souligne l'importance de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces affections, pour développer des stratégies de prévention et de traitement plus efficaces. Toutefois, malgré les progrès réalisés dans notre compréhension de ces troubles, les défis restent considérables et appellent à une exploration continue des voies de recherche prometteuses.

1.2. Un enjeu sociétal

1.2.1. Données épidémiologiques

Santé Publique France, qui assure la surveillance épidémiologique des maladies neurodégénératives en France, estime que plus d'un million de personnes sont touchées par la maladie d'Alzheimer, 175 000 personnes seraient traitées pour Parkinson, et il y aurait 2 300 nouveaux cas par an de maladies du motoneurone (sclérose en plaque) (Santé Publique France, 2023). L'algorithme d'identification des personnes souffrant de démences développées par Santé Publique France qui s'appuie sur les données de prise en charge estime la prévalence de ces troubles à 22 ‰ pour les 40-64 ans, et à 60 ‰ chez les plus de 65 ans. Aux États-Unis, la prévalence de la maladie d'Alzheimer atteint presque 50 % de la population chez les personnes âgées de 95 ans et plus (Hou et al., 2019). Les taux de prévalence pour des maladies comme Alzheimer, Parkinson et la sclérose en plaques augmentent de manière constante avec l'âge (**Figure I-1**).

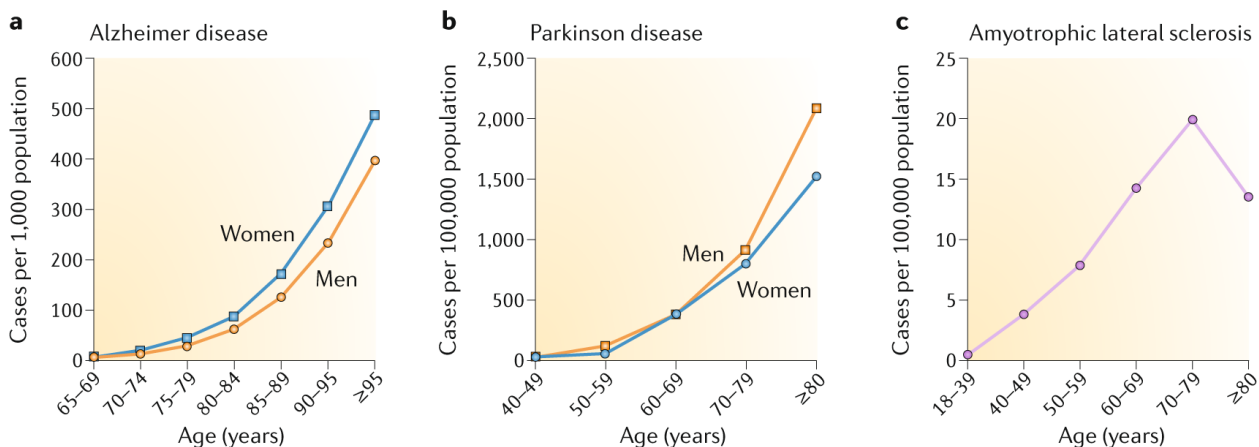


Figure I-1. Prévalence des maladies neurodégénératives aux Etats-Unis. Nombre de malades d'Alzheimer pour 1000 personnes (a), de malades de Parkinson pour 100 000 personnes (b) et de la sclérose en plaque pour 100 000 personnes (c). D'après (Hou et al., 2019).

Ainsi, ces maladies étant fortement liées à l'âge, le vieillissement global et continu de la population pose des défis considérables sur la prévention, la prise en charge, ainsi que sur la découverte de nouveaux traitements. On estime que la prévalence de toutes les démences va augmenter dans le monde, de 50 millions de personnes en 2010, à 113 millions en 2050 (Knopman et al., 2021).

1.2.2. Facteurs de risques

Les maladies neurodégénératives sont principalement dues au processus de vieillesse, ce qui en fait le principal facteur de risques. Cependant, des facteurs génétiques et environnementaux peuvent également entraîner des symptômes plus précoces, et influencer l'évolution de ces maladies (Hou et al., 2019). L'INSERM estime par exemple qu'avant 65 ans, 10% des cas d'Alzheimer seraient dus à des formes rares génétiques de la maladie (INSERM, 2017). Parmi les facteurs génétiques impliqués dans la maladie d'Alzheimer, certaines mutations dominantes sont responsables de la quasi-totalité des cas attribuables à des causes génétiques. Ces mutations se trouvent directement sur des gènes associés à la production de protéines altérées, contribuant ainsi à l'accumulation de protéines mal repliées. Ces mutations génétiques demeurent cependant rares comparées à l'influence d'autres facteurs de risques (Knopman et al., 2021).

Bien que l'établissement de relations de cause à effet entre divers facteurs de risques et l'apparition des symptômes de démence soit complexe, plusieurs facteurs de risques modifiables ont été identifiés. Parmi ceux-ci figurent des facteurs métaboliques tels que le diabète, l'hypertension, l'obésité, et un faible taux de HDL-cholestérol, ainsi que d'autres facteurs non métaboliques, comme la perte d'audition, les traumatismes crâniens, l'abus d'alcool, le tabagisme, la dépression, une activité physique insuffisante, l'isolement social, et la pollution de l'air (Knopman et al., 2021).

1.2.3. Diagnostic, prévention et traitements

La détection à un stade précoce (stade préclinique), avant l'apparition des premiers symptômes, est essentielle pour permettre une prise en charge avant que les dommages neuronaux ne soient trop importants (Dubois et al., 2016; Shusharina et al., 2023). Cette durée varie selon les pathologies, et les marqueurs cliniques sont également spécifiques à chacune (Dubois et al., 2016). La faible spécificité de certaines pathologies complique le diagnostic précis d'une maladie neurodégénérative sans recourir à des tests plus longs, complexes et coûteux (Shusharina et al., 2023). Pour pouvoir diagnostiquer et différencier ces maladies, les tests s'appuient sur diverses méthodes, incluant des symptômes comportementaux, des biomarqueurs sanguins ou dans le liquide cébrospinal, des données de neuroimagerie, l'enregistrement de la conductivité et de l'activité électrique du cerveau ainsi que des tests neuropsychologiques (Shusharina et al., 2023). Concernant les biomarqueurs, les niveaux d'amyloïde β et de protéine Tau phosphorylée dans le liquide céphalorachidien permettent notamment de détecter des stades précoces de la maladie d'Alzheimer avec une grande efficacité (Shusharina et al., 2023).

Certains facteurs environnementaux ont été identifiés comme susceptibles de protéger contre l'apparition de certaines démences. Parmi ceux-ci, des améliorations dans les domaines éducatifs, socio-économiques, en matière de soins de santé, et des changements dans le mode de vie jouent un rôle crucial. En particulier, un niveau d'éducation plus élevé est reconnu comme un facteur protecteur important (Knopman et al., 2021).

En ce qui concerne les traitements actuels pour les maladies neurodégénératives, la majorité vise principalement à atténuer les symptômes plutôt qu'à traiter directement les causes de la maladie. Ils tentent de compenser la perte neuronale en ciblant les neurotransmetteurs affectés par la mort cellulaire (Shusharina et al., 2023). Certains traitements ciblent également les agrégats amyloïdes, notamment les dépôts d'amyloïdes β dans la maladie d'Alzheimer (Lamprey et al., 2022). La difficulté à développer des traitements efficaces réside dans la spécificité de certaines pathologies (Lamprey et al., 2022). D'autres approches non pharmacologiques, comme la pratique d'exercices psychomoteurs, peuvent également ralentir le déclin neuronal (Shusharina et al., 2023).

1.3. Caractéristiques pathologiques

1.3.1. Caractéristiques histopathologiques

L'une des caractéristiques histopathologiques majeures des maladies neurodégénératives est l'accumulation de protéines mal repliées, permettant la détection de ces agrégats à l'aide de fluorophores et colorants spécifiques. Ces agrégats protéiques se manifestent sous différentes formes de dépôts neuropathologiques selon la maladie. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, on observe principalement des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires constitués de la protéine Tau (**Figure I-2**), ainsi que des plaques amyloïdes extracellulaires formées par les peptides β -amyloïdes (Dugger and Dickson, 2017).

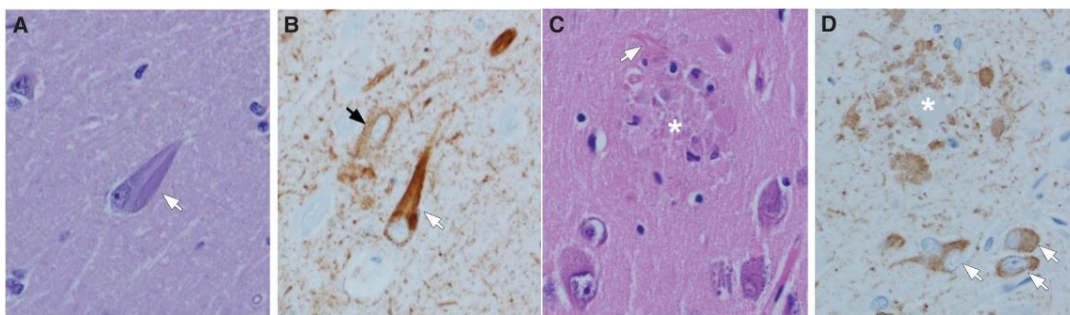


Figure I-2. Structures neuropathologiques de Tau dans la maladie d'Alzheimer, avec les enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) (A, B) et les plaques neurales (C, D). Immunohistochimie de Tau phosphorylé (flèche blanche et astérisque). D'après (Dugger and Dickson, 2017).

1.3.2. Variation des agrégats protéiques selon la maladie

Les maladies neurodégénératives se distinguent les unes des autres par l'accumulation de protéines spécifiques et par des vulnérabilités anatomiques propres à chaque condition (Dugger and Dickson, 2017). En fonction des protéines impliquées, ces maladies sont classées en différentes catégories : les amyloïdoses, causées par des dépôts de protéines prions (PrP) ou de peptides amyloïdes β ; les tauopathies, associées à l'accumulation de la protéine Tau ; les α -synucléinopathies, liées à l' α -Synucléine ; et les TDP-43-protéinopathies, associées à la protéine TDP-43, listées dans le **Tableau I-1** (Dugger and Dickson, 2017).

Dans tous les cas, l'accumulation de ces protéines et la dégénérescence neuronale observée sont associées à des impacts cellulaires variés, tels qu'un stress protéotoxique perturbant les systèmes de dégradation des protéines, un stress oxydatif, l'activation de l'apoptose, et une neuroinflammation (Dugger and Dickson, 2017).

Chapitre 1. Etat de l'art

Disease	Main neuropathology	Protein aggregate(s)
Amyloidoses		
Creutzfeldt–Jakob disease (genetic, variant, sporadic, iatrogenic)	Spongiform changes Prion protein (PrP) accumulation	PrP
Gerstmann–Sträussler–Scheinker disease	Spongiform change Multicentric PrP plaques	PrP
Familial British dementia	Amyloid angiopathy Parenchymal amyloid plaques	ABRI
Alzheimer's disease	Neurofibrillary tangles (NFTs) Neuropil threads Neuritic and amyloid plaques Amyloid angiopathy	A β 3R + 4R tau
Tauopathies		
Chronic traumatic encephalopathy	Astrocytic tau tangles Neuropil threads NFTs	3R + 4R tau
Primary age-related tauopathy	NFTs	3R + 4R tau
Pick's disease	Pick bodies Pick cells/ballooned neurons	3R tau
Progressive supranuclear palsy	Globose NFTs Tufted astrocytes Oligodendroglial coiled bodies Neuropil threads	4R tau
Corticobasal degeneration	Pretangles Astrocytic plaques Neuropil threads Ballooned neurons	4R tau
Argyrophilic grain disease	Argyrophilic grains Ballooned neurons Coiled bodies Ramified astrocytes	4R tau
Aging-related tau astrogliaopathy	Thorn-shaped astrocytes Granular astrocytes	4R tau
Synucleinopathies		
Lewy body disorders	Lewy bodies Lewy neurites	α -Synuclein
Multiple system atrophy	Glial cytoplasmic inclusions	α -Synuclein
TDP-43 Proteinopathies		
Frontotemporal lobar degeneration	Neuronal cytoplasmic inclusions Neuronal nuclear inclusions Dystrophic neurites	TDP-43
Amotrophic lateral sclerosis	Upper and lower motor neuron loss Bunina bodies Neuronal inclusions Astrocytic hyaline inclusions	TDP-43
Primary lateral sclerosis	Upper motor neuron loss Corticospinal tract degeneration	TDP-43
Progressive muscular atrophy	Lower motor neuron loss Swollen motor neurons	TDP-43

Tableau I-1. Liste de maladies neurodégénératives communes, avec leurs structures neuropathologiques, et les protéines associées. Modifié de (Dugger and Dickson, 2017).

2. Protéines associées aux protéinopathies neurodégénératives : les amyloïdes

2.1. Caractéristiques structurales des amyloïdes

Les peptides ou protéines amyloïdes possèdent la capacité de s'auto-assembler et de s'agréger en des structures fibrillaires stables et insolubles, caractérisées par des propriétés structurales spécifiques (Dugger and Dickson, 2017). Ces structures partagent un motif commun appelé cross- β , constitué par l'empilement de feuillets β orientés perpendiculairement à l'axe longitudinal de la fibre. La **Figure I-3** présente les différentes caractéristiques structurales communes aux amyloïdes, avec pour exemple un des polymorphes (« Twister ») de l' α -synucléine.

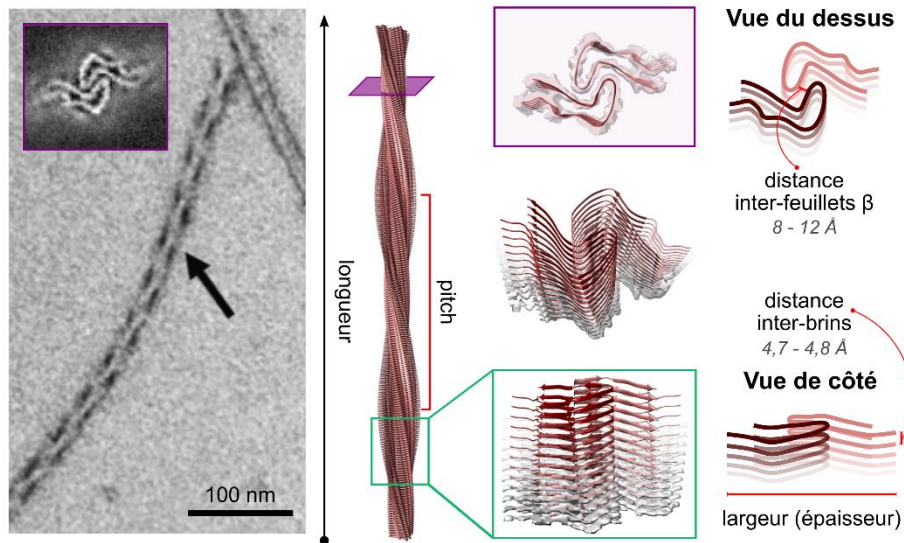


Figure I-3. Structure commune des amyloïdes, illustrée par le polymorphe « Twister » de l' α -synucléine. À gauche, image de microscopie électronique et carte de densité de cryo-microscopie (insert) d'une fibre amyloïde. Représentation de la fibre montrant son pitch (périodicité), lié à l'interdigitation de deux protofibrilles. Une section perpendiculaire à l'axe de la fibre met en évidence la distance inter-feuillets β sur une vue du dessus (en violet). Un zoom sur la fibre (vert) révèle la distance inter-brins sur une vue de côté, ainsi que l'épaisseur (ou largeur) de la fibre. Modifié de (Li et al., 2018).

Chaque feuillet- β est séparé du suivant par une distance inter-brins d'environ 4,7 à 4,8 Å (représentée sur la vue de côté sur la **Figure I-3**) (Iadanza et al., 2018). Cette distance est maintenue par des liaisons hydrogènes formées entre les groupes carbonyles et amides des chaînes polypeptidiques adjacentes : cette distance est la caractéristique principale et commune à tous les amyloïdes. La stabilité de ces structures repose en grande partie sur l'arrangement compact des chaînes latérales des acides aminés qui forment ces feuillets (Iadanza et al., 2018).

En plus des liaisons hydrogènes, d'autres interactions stabilisatrices peuvent stabiliser spécifiquement certaines fibres amyloïdes. Parmi elles, un motif courant mais pas systématique permet une interdigitation des chaînes latérales hydrophobes, créant un motif appelé *steric zipper*. Ce motif contribue à l'exclusion des molécules d'eau, renforçant la stabilité des filaments. Bien que la structure de base cross- β soit conservée parmi tous les amyloïdes, l'organisation atomique des motifs présente une grande diversité (Iadanza et al., 2018). En fonction des chaînes latérales des acides aminés, la distance entre les feuillets- β au cœur de la fibre amyloïde (représentée sur la vue du dessus sur la **Figure I-3**), est comprise entre 8 Å (peptides contenant des

motifs poly-Q) et 12 Å (peptides contenant des résidus aromatiques). Le centre très structuré et insoluble composé de ces feuillets- β est appelé cœur amyloïde.

La formation de protofibrilles par superposition de monomères protéiques en feuillets- β constitue une première étape dans la formation des fibres amyloïdes. Ces derniers peuvent s'organiser parallèlement ou de manière anti-parallèle (**Figure I-4**) (Almeida and Brito, 2020).

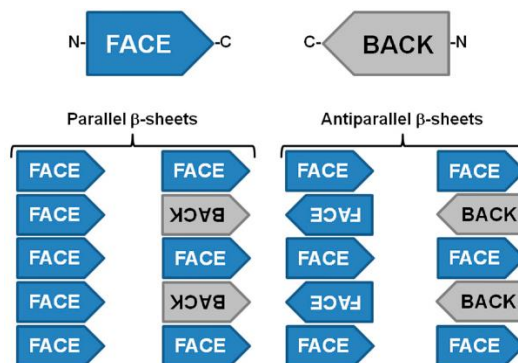


Figure I-4. Schéma des organisations des monomères amyloïdes au sein des protofibrilles. D'après (Almeida and Brito, 2020).

L'assemblage de plusieurs protofibrilles en structures plus complexes conduit à la formation de fibres amyloïdes matures, caractérisées par un degré élevé de polymorphisme (Iadanza et al., 2018). Sur l'exemple de la **Figure I-3**, la fibre mature est formée par l'interdigitation de deux protofibrilles. Cependant, des exemples de fibres composées d'une unique protofibrille, comme c'est le cas pour HET-S, ou de trois protofibrilles, comme pour la forme 3Q de $A\beta_{1-40}$, ont également été décrits (Iadanza et al., 2018). Les fibres matures possèdent des diamètres variant de 2 à 20 nm et peuvent atteindre plusieurs micromètres de longueur (Almeida and Brito, 2020).

L'organisation hiérarchique des structures amyloïdes, incluant la présence de différents types de monomères, la diversité des séquences formant le cœur amyloïde, la composition et la conformation des monomères, l'arrangement parallèle ou antiparallèle au sein des fibrilles, ainsi que la manière dont les protofibrilles s'associent pour former des fibres matures, contribuent à un polymorphisme important. Cette diversité structurale, parfois observée au sein d'une même lésion histopathologique, peut également être influencée par les mécanismes de formation.

2.2. Mécanismes de formation

2.2.1. Mécanisme général nucléation – élongation – plateau

Le mécanisme général d'agrégation des peptides ou protéines en des fibres amyloïdes est présenté **Figure I-5**. Ce mécanisme est caractérisé par une courbe sigmoïdale typique, qui se décompose en plusieurs étapes : (1) une phase initiale de nucléation, marquée par un temps de latence (*lag time*), correspondant au lent repliement des monomères, et qui constitue l'étape limitante du processus d'agrégation ; (2) une phase d'élongation et de polymérisation où la vitesse de croissance est exponentielle, conduisant à la formation de

protofibrilles à partir des espèces oligomériques majoritaires créées lors de la phase de nucléation ; (3) une phase de saturation, où un équilibre est atteint, avec une diminution des monomères libres bien qu'ils puissent toujours être présents, et une conversion progressive des protofibrilles en fibres amyloïdes matures, pouvant présenter un certain degré de polymorphisme (Almeida and Brito, 2020; Iadanza et al., 2018).

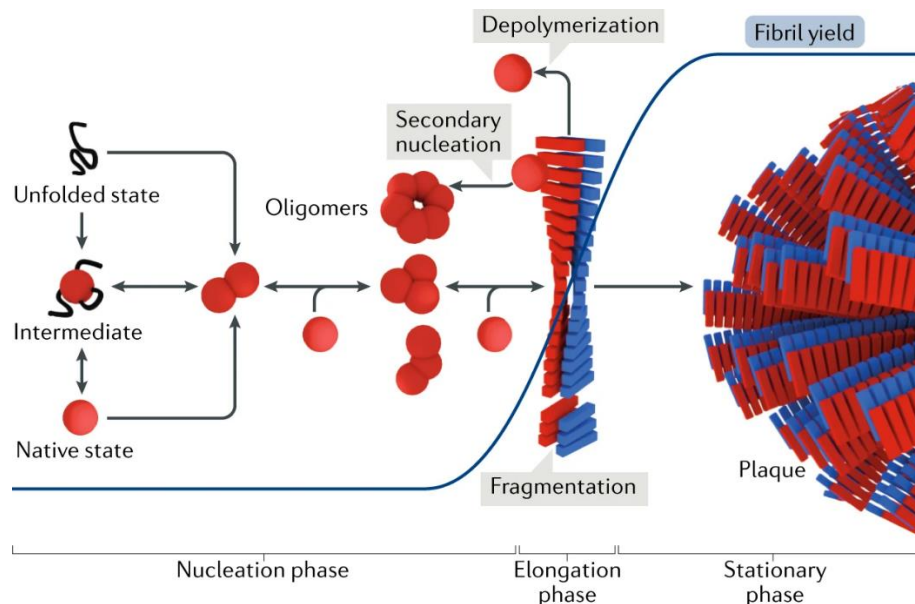


Figure I-5. Mécanisme de formation des fibrilles amyloïdes. Les monomères peuvent exister dans des états natifs, déstructurés ou intermédiaires. Un ou plusieurs de ces monomères s'assemblent pour former des oligomères, qui peuvent ensuite se réorganiser et servir de noyaux pour recruter d'autres monomères. Ce processus se déroule pendant la phase de nucléation, caractérisée par une période de latence, qui constitue l'étape limitante du mécanisme. Les fibrilles se forment ensuite et croissent rapidement. Elles peuvent se fragmenter ou se dépolymériser, générant de nouveaux noyaux de polymérisation, ce qui accélère l'association pendant la phase d'élongation, au cours de laquelle un maximum de monomères est consommé. Plusieurs fibrilles peuvent s'associer avec des cofacteurs et d'autres protéines pour former les plaques amyloïdes. Issu de (Iadanza et al., 2018).

2.2.2. Conversion des monomères en amyloïdes

Différents mécanismes sont décrits afin de décrire comment de nouveaux agrégats amyloïdes sont formés à partir des monomères solubles. Parmi eux on retrouve la nucléation primaire, la nucléation secondaire, et la fragmentation (**Figure I-6**). La nucléation primaire consiste en la conversion de monomères protéiques solubles en des petits agrégats qui forment les fibres amyloïdes par élongation. La nucléation secondaire se produit à la surface de fibres amyloïdes existantes, qui servent de catalyseurs pour l'agrégation de nouveaux monomères en fibres. Ce processus crée une amplification de l'agrégation par rapport à la nucléation primaire. Enfin la fragmentation consiste au désassemblage des fibres amyloïdes existantes qui forment de nouvelles surfaces sur lesquelles peuvent croître de nouveaux monomères (Knowles et al., 2014; Törnquist et al., 2018).

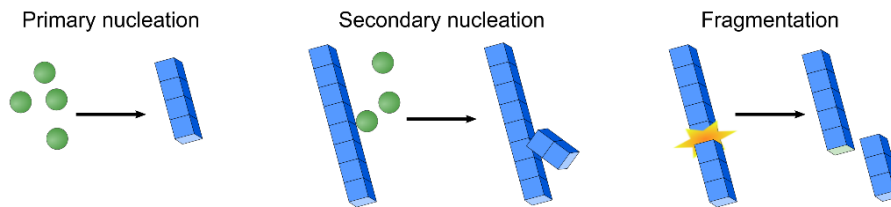


Figure I-6. Mécanismes de formation des agrégats amyloïdes (bleu, carrés) à partir de monomères protéiques ou peptidiques solubles (rond verts). Cette agrégation peut se produire par nucléation primaire, qui correspond à la conversion de monomères en agrégats ; par nucléation secondaire par croissance à partir de fibres existantes ; ou par fragmentation par clivage de fibres existantes. D'après (Knowles et al., 2014; Törnquist et al., 2018).

- **Autres paramètres**

En plus de ces processus dynamiques, des facteurs comme un faible pH, la présence d'ions métalliques, le stress oxydatif, la présence de certains lipides ou d'autres molécules peuvent influencer l'agrégation (Zampar et al., 2024). Des modifications post traductionnelles (PTMs) comme les acétylations, les glycosylations ou les phosphorylations, peuvent également favoriser la formation d'amyloïdes. En outre, la présence de mutations peuvent également favoriser la conversion des protéines et peptides natifs, en espèces amyloïdes pathogéniques (Zampar et al., 2024).

2.2.3. Détermination du mécanisme par modélisation de la cinétique d'agrégation

Afin de mieux comprendre les mécanismes de fibrillation, des expériences *in vitro* d'agrégation de ces espèces amyloïdes sont couramment réalisées. La Thioflavine T (ThT) est le fluorophore le plus utilisé pour détecter des amyloïdes *in vitro* et *in vivo*. Il est capable d'interagir avec les feuillets- β caractéristiques des amyloïdes, entraînant un décalage important du maximum d'excitation (de 385 à 450 nm) et du maximum d'émission (de 445 à 482 nm), permettant une détection spécifique des fibres amyloïdes (Biancalana and Koide, 2010). Le mécanisme de fluorescence est attribué à l'immobilisation de la rotation de la liaison centrale C-C entre le noyau benzothiazole et les anneaux d'aniline, lorsque la ThT interagit sur la surface des feuillets- β , parallèle à l'axe de la fibre **Figure I-7**. La surface minimale d'accrochage de la ThT serait de 4 feuillets- β , ce qui permet une détection assez précoce des fibres amyloïdes (Xue et al., 2016). Ce fluorophore efficace, sensible, et capable de détecter des fibres amyloïdes de diverse nature, en fait donc une sonde de choix pour l'étude des processus de fibrillation et leur cinétique.

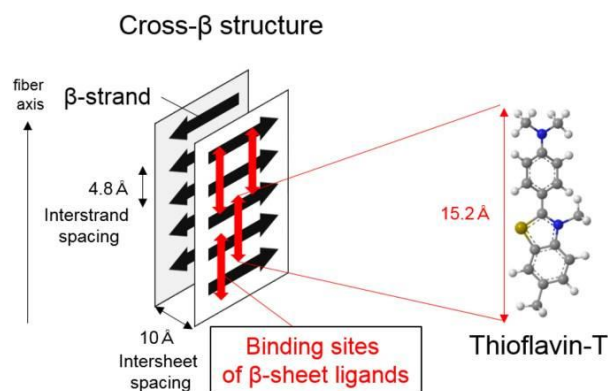


Figure I-7. Schema d'interaction entre le fluorophore Thioflavine-T, et les feuillets- β des structures amyloïdes. D'après (Harada et al., 2018).

Dans les expériences *in vitro*, la mise en présence des espèces monomériques avec de la ThT dans les conditions favorisant l'agrégation, entraîne une augmentation de l'émission de fluorescence à 482 nm au cours du temps, représentative de l'agrégation suivant une courbe sigmoïde. Un exemple de ces données expérimentales, avec plusieurs concentrations de l'amyloïde $\alpha\beta_{1-42}$ (Knowles et al., 2014) est présenté **Figure I-8**.

Il est ensuite possible de modéliser ces données expérimentales cinétiques à l'aide de modèles mathématiques, pour établir les mécanismes moléculaires sous-jacents. Un protocole basé sur ces données cinétiques et prenant en compte différents modèles d'agrégation (nucléation primaire ou secondaire, fragmentation, présence ou non de *seeds*...) a notamment été implanté dans un outil appelé Amylofit (Meisl et al., 2016). Cette approche permet de déterminer des paramètres cruciaux comme les tailles de noyau ou les constantes cinétiques, offrant ainsi une compréhension plus fine des étapes du processus d'agrégation. Le mécanisme le plus adapté est déterminé par essai / erreur des différents modèles mathématiques.

Les données expérimentales de la **Figure I-8** (séries de points), représentant le suivi de l'émission de fluorescence de la Thioflavine T pour le peptide amyloïde $A\beta_{1-42}$ à différentes concentrations, ont été fittées selon trois modèles : nucléation primaire, fragmentation, et nucléation secondaire. Dans ces conditions, le modèle de nucléation secondaire correspond de manière plus précise aux données expérimentales, en comparaison avec les modèles de fragmentation ou de nucléation primaire (Knowles et al., 2014).

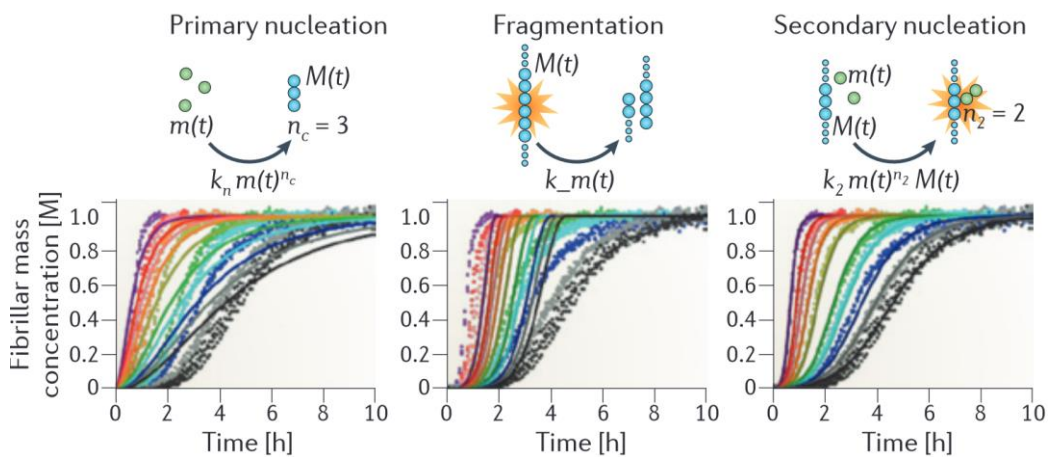


Figure I-8. Détermination du modèle d'agrégation pour un groupe de données expérimentales d'agrégation (séries de points) suivies par Thioflavine T pour l'amyloïde $\alpha\beta_{1-42}$, selon différents modèles de nucléation. Les lignes représentent les résultats de modélisation pour différents mécanismes. En particulier 3 de ces modèles sont présentés (nucléation primaire, secondaire et fragmentation), mais d'autres mécanismes peuvent exister. D'après (Knowles et al., 2014).

2.3. Impact cellulaire

Les amyloïdes, qu'ils se présentent sous forme d'oligomères ou de fibres matures, peuvent provoquer des dommages cellulaires en exposant leurs groupes hydrophobes normalement enfouis au sein de la structure (Brundin et al., 2010), ou par internalisation à travers les cellules par interaction avec différents composants de la surface membranaire (Iadanza et al., 2018). Ces effets délétères sont étroitement liés à leur mauvais repliement et à leur capacité à s'agréger. En outre, ces amyloïdes peuvent interagir avec divers composants cellulaires, déclenchant ainsi des processus pathologiques susceptibles de conduire à la mort cellulaire. Ces

interactions incluent celles avec les membranes cellulaires, d'autres protéines ou peptides, des récepteurs, des ARN, ou encore des métabolites (Almeida and Brito, 2020). Les plaques amyloïdes, qu'elles soient intra ou extracellulaires, peuvent également séquestrer des composants essentiels au bon fonctionnement cellulaire, tels que des sucres, des lipides, des ions métalliques, des acides nucléiques ou d'autres protéines (**Figure I-9**).

Les oligomères ou les fibrilles ont la capacité de pénétrer dans les cellules, d'échapper aux mécanismes de défense intracellulaires comme la dégradation lysosomale, et de causer des dommages supplémentaires, tels que la perturbation des endomembranes, le dysfonctionnement du transport d'ARN ou de protéines, ainsi que la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Figure I-9**). Cette génération de ROS peut induire des réponses protéotoxiques et inflammatoires, phénomènes couramment observés dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer (Almeida and Brito, 2020; Iadanza et al., 2018). De plus, certaines espèces amyloïdes sont capables de se propager aux cellules adjacentes, favorisant ainsi la transmission des symptômes pathologiques (Iadanza et al., 2018).

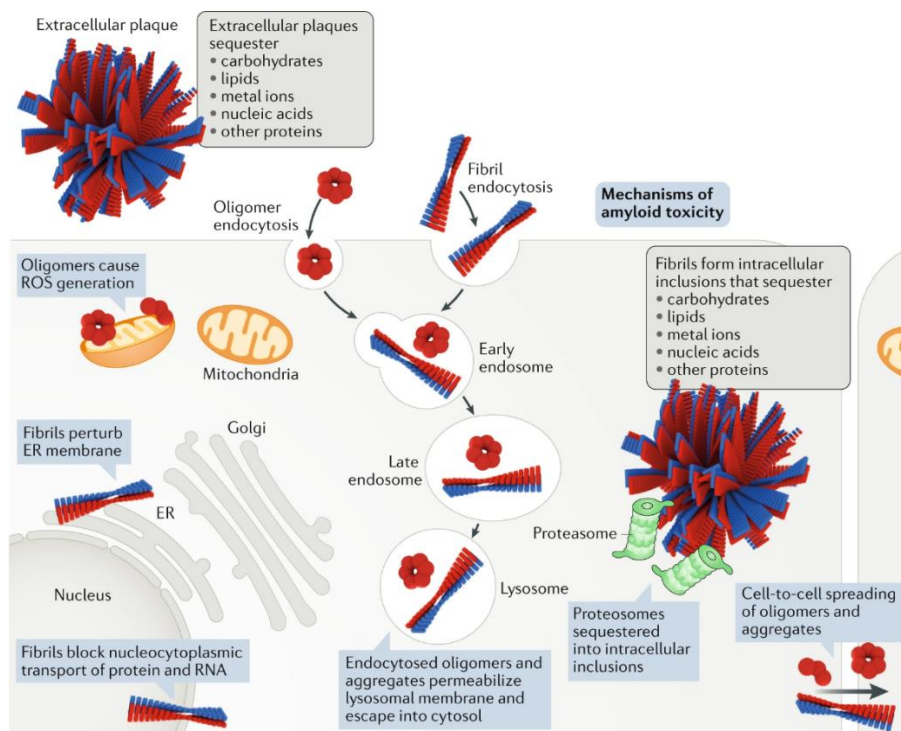


Figure I-9. Mécanismes de perturbation cellulaire induits par les espèces amyloïdes. Les différents agrégats amyloïdes, qu'ils soient intracellulaires ou extracellulaires, peuvent séquestrer d'autres biomolécules au sein des plaques, pénétrer dans les cellules, et échapper au processus de dégradation lysosomale, libérant ainsi de nouveaux oligomères potentiellement toxiques. Ces agrégats peuvent se propager aux cellules adjacentes sous forme d'oligomères ou de fibrilles, induisant notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et perturbant les endomembranes. Issu de (Iadanza et al., 2018).

Plusieurs études ont montré que si les fibres amyloïdes matures sont des marqueurs de protéinopathies, ce sont surtout les oligomères qui possèdent des propriétés toxiques. En effet les oligomères, capables de se propager entre cellules et d'induire une nouvelle fibrillation, semblent présenter une toxicité plus accrue que les fibres matures. C'est notamment le cas pour les peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ qui induisent une solubilisation des

membranes phospholipidiques par effet détergent, alors que les fibres n'entraînent pas de perturbation (Bode et al., 2019). De même, l'injection d'oligomères de Tau dans le cerveau de souris entraîne des symptômes pathologiques alors que l'injection de monomères ou de fibres n'induisent pas de symptômes (Lasagna-Reeves et al., 2011).

2.4. Interaction des amyloïdes avec les membranes

Les membranes, servant d'interface avec le milieu extérieur, sont au cœur de nombreuses études sur les amyloïdes. Leur composition lipidique ainsi que leur charge ou encore la présence de cholestérol peuvent influencer significativement leurs interactions avec les protéines amyloïdes (Berthelot et al., 2013). Par exemple, pour les peptides ou protéines amyloïdes, les interactions électrostatiques sont souvent évoquées pour expliquer les premières étapes de leur association avec des membranes, en particulier celles contenant des lipides chargés négativement (Berthelot et al., 2013). En plus de favoriser l'agrégation, les membranes peuvent également être perméabilisées par les peptides ou protéines amyloïdes via différents mécanismes (Berthelot et al., 2013). Ces mécanismes sont très similaires à ceux décrits pour les peptides antimicrobiens (AMP).

Parmi ces mécanismes, divers modes d'action sur les membranes ont été proposés pour expliquer les effets cytotoxiques de certains peptides ou protéines amyloïdes (**Figure I-10**). Ces interactions dépendent de plusieurs paramètres, tels que le ratio peptides/lipides, l'organisation et la composition de la membrane, la structure et la composition des peptides, ainsi que le degré éventuel d'oligomérisation des peptides. De plus, ces mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs, et plusieurs types d'interactions peuvent se produire simultanément selon les conditions expérimentales.

Parmi eux, on trouve l'accumulation à la surface de la membrane (mécanisme de type "carpet"), la formation de pores, ainsi que l'effet détergent (Berthelot et al., 2013). On parle également parfois de « *detergent-like carpet mechanism* », en référence au phénomène similaire que l'on retrouve pour les peptides antimicrobiens (Sato and Feix, 2006).

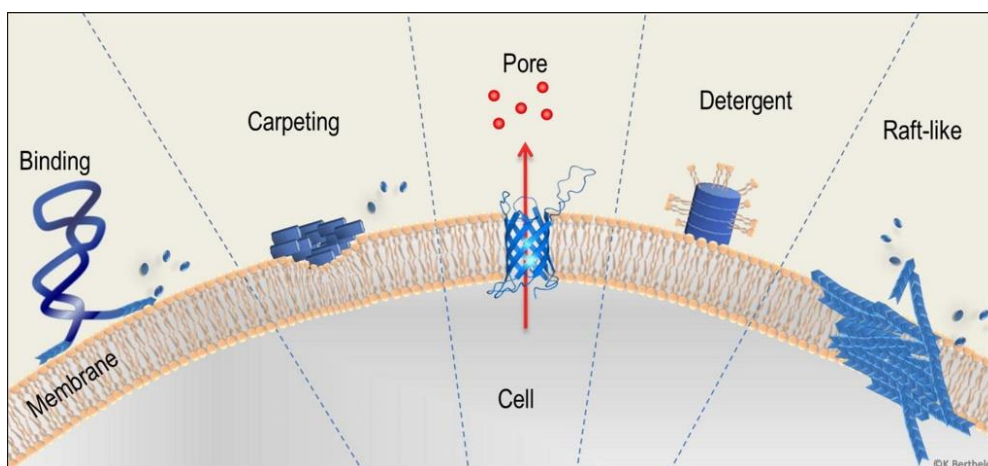


Figure I-10. Mécanismes d'interaction et de perturbation des membranes, avec l'interaction favorisant l'agrégation des amyloïdes (Binding), l'accumulation de matériel sur la membrane (Carpeting), la formation de pores (Pore), l'effet détergent (Detergent) et la formation de microdomaines sous la forme de rafts (Raft-like). Issu de (Berthelot et al., 2013).

Le mécanisme de type détergent, initialement décrit pour les peptides antimicrobiens, est également évoqué pour des amyloïdes (Azouz et al., 2021; Berthelot et al., 2013; Bode et al., 2019). Ce mécanisme débute par l'adsorption et l'accumulation des peptides ou protéines à la surface lipidique (**Figure I-11A, B**) (Sato and Feix, 2006). Lorsqu'une concentration critique est atteinte, les résidus hydrophobes des peptides interagissent avec les chaînes acyles des phospholipides, entraînant la destruction de la membrane par solubilisation (Williams and Serpell, 2011), parfois sous forme de micelles dans lesquelles les peptides et les phospholipides restent associés (**Figure I-11D**) (Sato and Feix, 2006). Cette interaction directe entre les chaînes acyles des phospholipides et les résidus hydrophobes des peptides perturbe très fortement l'organisation membranaire.

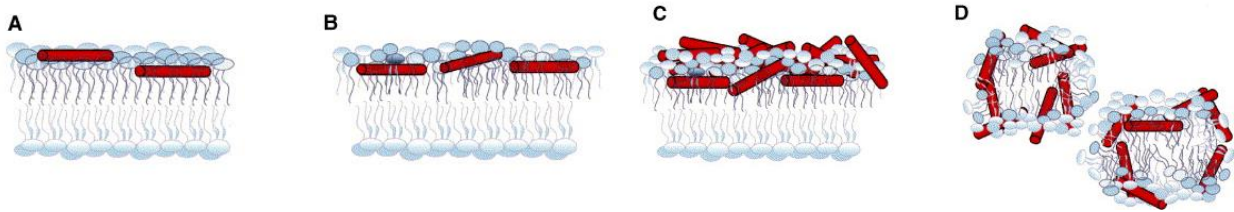


Figure I-11. Modèle de perturbation induite par l'effet détergent, décrit pour les peptides antimicrobiens formant des hélices α . Les peptides s'associent d'abord à la membrane (A) puis pénètrent plus profondément en interagissant avec les chaînes acyles des phospholipides via leurs résidus hydrophobes (B). Lorsque la concentration critique (« carpet ») est atteinte (C), la formation de micelles à partir des phospholipides membranaires (D) provoque une perturbation de la membrane. Issu de (Sato and Feix, 2006).

Les membranes jouent plusieurs rôles dans les maladies amyloïdes : elles peuvent induire l'agrégation des peptides ou protéines amyloïdes (Berthelot et al., 2013), elles agissent comme interface avec le milieu extérieur et d'autres cellules, ce qui a des implications pour la transmission des maladies.

3. La protéine Tau

Identifiée pour la première fois en 1975 lors de la purification des assemblages de tubuline, responsables de la formation des microtubules, à partir d'extraits de cerveaux de porc (Weingarten et al., 1975), la protéine Tau a ensuite été reconnue en 1986 comme le composant principal des enchevêtrements neurofibrillaires (NFT : *neurofibrillary tangles*), un des marqueurs histopathologiques de la maladie d'Alzheimer (Kosik et al., 1986). Depuis, Tau a été associée à de nombreuses autres démences, caractérisées par divers types d'agrégats protéiques. Initialement considérée comme un facteur essentiel de la stabilité des microtubules, elle suscite aujourd'hui un intérêt croissant en raison de son implication dans diverses pathologies neurodégénératives. Ces découvertes ont intensifié les recherches visant à mieux comprendre non seulement son rôle pathologique, mais aussi ses fonctions physiologiques.

3.1. Caractéristiques physiologiques

3.1.1. Expression génique et isoformes

La protéine Tau est exprimée à partir du gène MAPT composé de 16 exons et situé sur le chromosome 17. Les exons 1, 4, 5, 9, 11-13 sont constitutifs, et les autres subissent un épissage alternatif qui génère différents isoformes de tailles variables (**Figure I-12**). Le cerveau humain adulte exprime 6 isoformes qui proviennent de l'épissage alternatif de E2, E3 et E10, alors que le cerveau fœtal ne contient que l'isoforme 0N3R (Arendt et al., 2016). Les 6 isoformes chez l'humain sont donc le 2N4R (ou ht40) avec 441 acides aminés (AA) qui est donc le plus long, ainsi que les isoformes 1N4R, 0N4R, 2N3R, 1N3R, et 0N3R. Le ratio entre les isoformes 3R et 4R dans le cerveau humain adulte est d'environ 1, et la proportion de 0N, 1N, et 2N est différente avec respectivement ~37%, ~54% et ~9% du total des formes de Tau (Boyarko and Hook, 2021; Wang and Mandelkow, 2016). Une isoforme supplémentaire à haut poids moléculaire surnommée « Big Tau » ou PNS-Tau, est également identifiée dans le système nerveux périphérique, et provient de l'épissage des exons 4A et 6 aboutissant à une protéine avec 758 acides-aminoés et environ 79 kDa (Arendt et al., 2016).

En raison de son épissage alternatif et des fonctions distinctes de ses différentes régions, Tau est divisée en plusieurs domaines. Le partie N-terminale contient 0, 1 ou 2 domaines, en fonction de l'épissage des exons E2 et/ou E3, et est probablement impliqué dans l'interaction avec les membranes plasmiques (Brandt et al., 1995). Le domaine central est riche en prolines. La région d'interaction avec les microtubules, composée de 3 ou 4 domaines de répétition selon l'épissage de l'exon E10 qui introduit la région R2, joue un rôle clé dans la stabilisation des microtubules. Cette région est non seulement essentielle sur le plan physiologique, mais elle est également impliquée dans la pathogenèse de Tau en raison de la présence de corps amyloïde. Enfin, le domaine C-terminal complète cette structure.

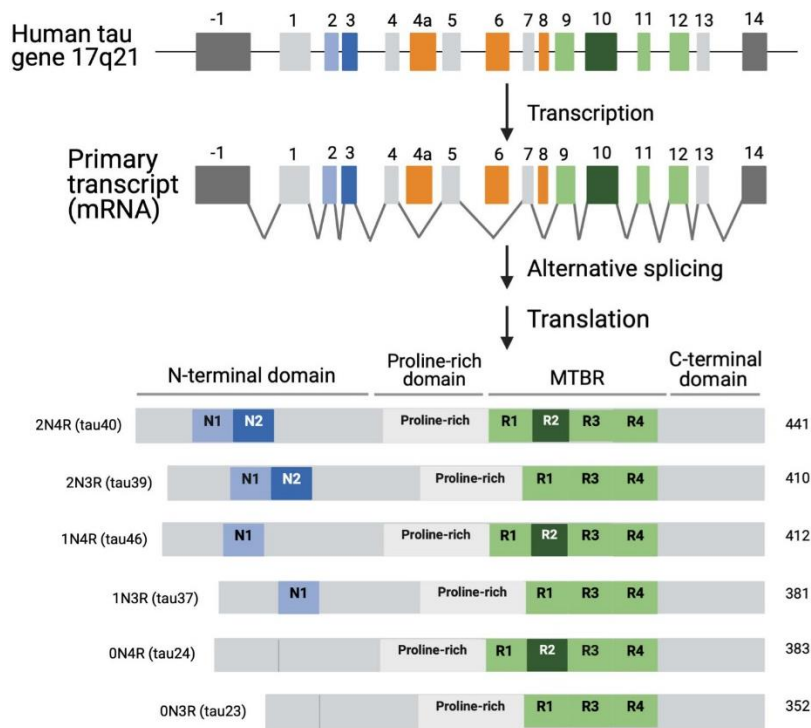


Figure I-12. Séquence de l'ADN génomique codant pour la protéine Tau, de son transcrite ARN messager, et des 6 isoformes protéiques produits par épissage alternatif des différents exons. Modifié de (Boyarko and Hook, 2021).

3.1.2. Structure

- **Structure primaire et isoformes possibles**

Tau a la caractéristique de présenter une grande solubilité, principalement due à son hydrophilie marquée, assurée par la présence de nombreux résidus polaires, tels que la sérine et la thréonine (80 résidus pour l'isoforme 2N4R), le glutamate et l'aspartate (56 résidus), ainsi que la lysine et l'arginine (58 résidus) (**Figure I-13**). Les acides aminés aromatiques, comme la tyrosine (5 résidus) et la phénylalanine (3 résidus), contribuent également à ses propriétés. De plus, cette protéine présente une stabilité notable dans des conditions acides et à haute température (Boyarko and Hook, 2021).

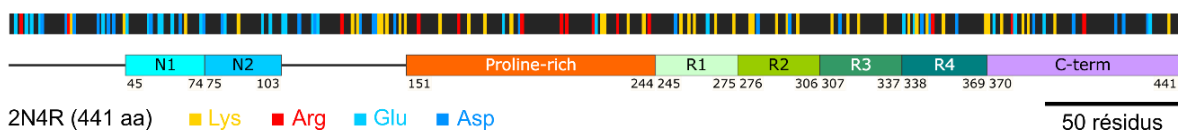


Figure I-13. Schéma de la protéine Tau 2N4R et marquage de ses résidus polaires basiques et acides, avec les Lysines en jaune, les Arginines en rouge, les Glutamates en bleu clair et les Aspartate en Bleu foncé. Les domaines N-terminaux N1 et N2, le domaine riche en proline, la région d'interaction des microtubules avec ses 4 domaines de répétition et la partie C-terminale sont indiqués.

- **Charge**

Tau présente une distribution inégale de ses charges. Bien que cette protéine soit globalement basique, son extrémité N-terminale, constituée d'environ 120 résidus, est principalement acide, tandis que les 40 résidus situés à l'extrémité C-terminale sont neutres (**Figure I-14**). Cette distribution est importante, notamment pour son interaction avec les microtubules, qui se fait via les domaines de répétitions R1-R2-R3-R4. Du fait de la

présence de résidus acides et basiques distribués inégalement le long de sa séquence, la charge nette globale de l'isoforme 2N4R est de + 2 à pH physiologique, avec une charge locale de + 10 dans son domaine très basique de liaison aux microtubules.

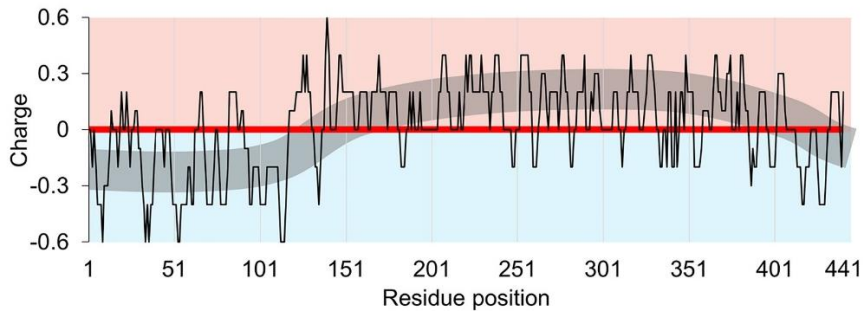


Figure I-14. Schéma de la distribution de charges le long de la protéine Tau (2N4R), depuis le N-terminal (1) au C-terminal (441). La partie basique est représentée en rouge, celle acide en bleu. D'après (Limorenko and Lashuel, 2021).

- **Structure secondaire : une protéine intrinsèquement désordonnée**

Tau appartient à la classe des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP), qui sont hautement solubles et ne présentent pas d'éléments de structure secondaire (absence de liaisons hydrogènes). Sa structure est alors décrite comme « *random coil* ». Cependant, l'interaction avec des partenaires comme d'autres protéines, des ligands, des membranes ou des organites, peut entraîner une structuration partielle de Tau (Boyarko and Hook, 2021). En outre, même en l'absence d'une conformation importante, Tau a la capacité de former une structuration en épingle (« *hairpin* » ou « *paperclip* ») sous sa forme soluble et naturellement non repliée, dans laquelle les domaines N et C terminaux se rapprochent (**Figure I-15**) (Jeganathan et al., 2006).

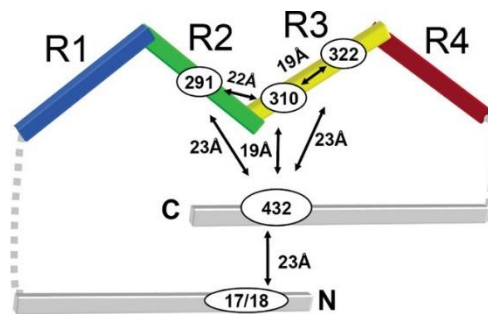


Figure I-15. Modèle de structuration en épingle (*paperclip* / *hairpin*) de Tau (2N4R) sous forme soluble, déterminé via des expériences FRET (transfert d'énergie par résonance de fluorescence) et RPE (résonance électronique paramagnétique). Issu de (Jeganathan et al., 2006).

3.1.3. Localisation et fonctions cellulaires

La protéine Tau est principalement localisée dans le cerveau, au niveau du neuropile du cortex cérébral et du cervelet, ainsi que dans les cellules neuronales de l'hippocampe. Cependant, d'autres types cellulaires peuvent également exprimer cette protéine, notamment les cellules du tractus gastro-intestinal, les cellules rénales et mammaires, les myocytes, ainsi que dans les nerfs périphériques et l'appendice ("Human Protein Atlas," 2003).

Dans le cerveau, Tau est principalement présente dans les neurones, bien qu'elle soit également retrouvée en faible quantité dans les cellules gliales et à l'extérieur des cellules (Boyarko and Hook, 2021). Sa distribution subcellulaire est régulée au cours du développement, et induit différentes fonctions. Dans les neurones immatures, Tau est uniformément répartie entre le corps cellulaire et les neurites. Cependant, après la polarisation des neurones et l'apparition des axones, Tau s'enrichit dans ces derniers et devient moins abondante dans les dendrites et le noyau (Boyarko and Hook, 2021).

- **Stabilisation des microtubules**

Dans les axones, Tau ne se trouve pas sous forme libre, mais est associée aux microtubules, où elle joue un rôle crucial dans leur stabilisation. Cette interaction s'effectue via son domaine d'interaction avec les microtubules (MTBR), plus précisément par le biais de ses différents domaines de répétition (**Figure I-16**). De ce fait, les isoformes 4R de Tau, contenant quatre répétitions, présentent une plus grande affinité pour les microtubules que les isoformes 3R, qui en possèdent trois. L'interaction de Tau se fait entre les hétérodimères d' α -tubuline et de β -tubuline, spécifiquement via les résidus 224–237, 245–253, 275–284 et 300–317, tandis que les régions situées entre ces résidus restent flexibles (**Figure I-16B**) (Wang and Mandelkow, 2016).

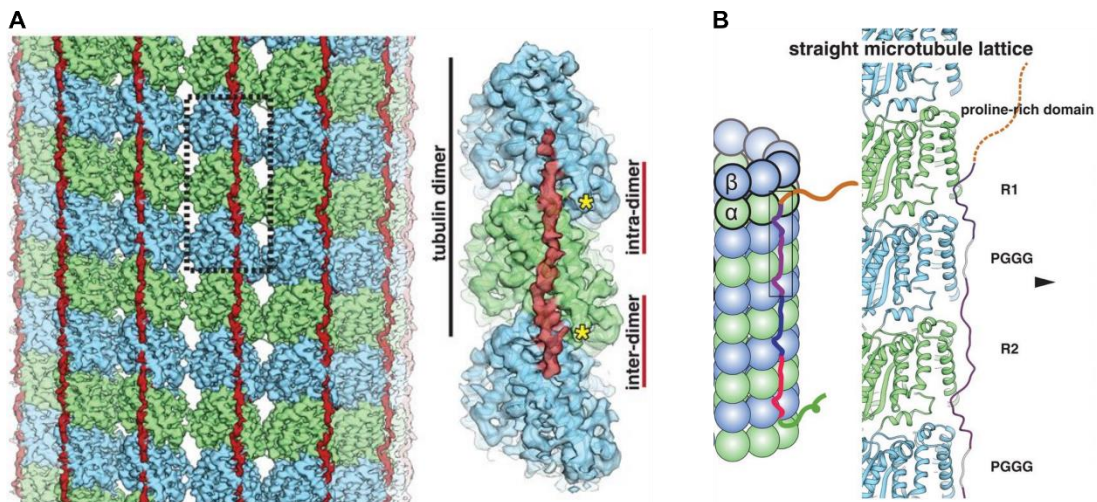


Figure I-16. Carte de densité en cryo-microscopie électronique (A) d'un microtubule décoré par la protéine Tau (en rouge), associée le long du microtubule et reliant les sous-unités d' α -tubuline (en vert) et de β -tubuline (en bleu). Modèle d'interaction des différents domaines sur les dimères (B). Modifié de (Kellogg et al., 2018).

Malgré le rôle de stabilisation des microtubules souvent attribuée à Tau, il a été démontré que cette protéine n'était pas indispensable à cette fonction. En effet d'autres protéines, telles que les protéines associées aux microtubules (MAP), sont également capables de remplir ce rôle. Tau jouerait plutôt un rôle dans la modulation de la dynamique des microtubules, en favorisant la formation de longs domaines labiles, permettant une élévation de ces structures (**Figure I-17**) (Qiang et al., 2018). Ceci jouerait un rôle important dans l'élévation et la maturation des neurites, comme le démontrent des études sur des neurones de rats dont l'expression de Tau est bloquée, entraînant une inhibition de la formation des neurites. À l'inverse, sa surexpression favorise leur développement, même dans des cellules non neuronales (Boyarko and Hook, 2021).

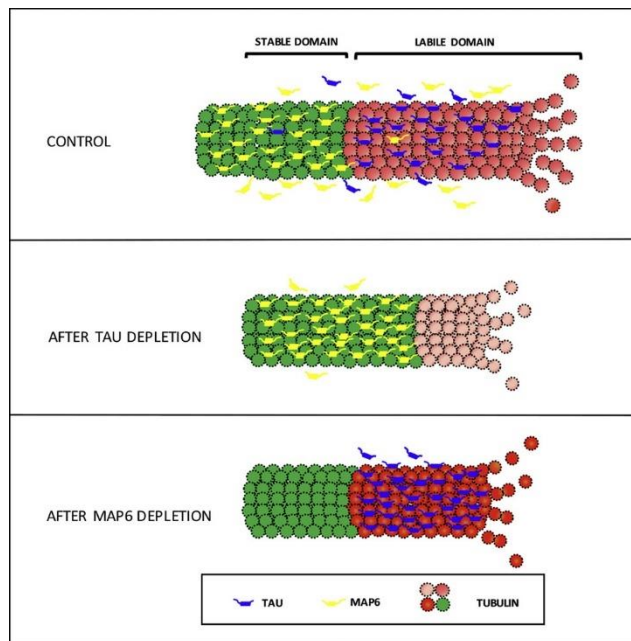


Figure I-17. Modèle des fonctions de Tau et de MAP6 dans la régulation des domaines des microtubules axonaux, mettant en évidence leur rôle respectif dans la modulation des domaines labiles (en rouge) et stables (en vert). Issu de (Qiang et al., 2018).

En plus de son rôle dans l'élongation des microtubules, l'association de Tau permettrait également de réguler le transport axonal par divers mécanismes, notamment en influençant les transporteurs moléculaires, tels que la dynéine et la kinésine. Cela facilite ainsi le déplacement des cargos le long des microtubules, contribuant à une organisation efficace du transport intracellulaire (Boyarko and Hook, 2021).

- **Autres fonctions de Tau**

La protéine Tau a également été localisée dans d'autres compartiments subcellulaires, dans lesquels de nouvelles fonctions ont été identifiées. Dans le noyau, elle jouerait, dans des conditions spécifiques, un rôle dans la régulation de l'expression génique, notamment par modulation de la stabilité génomique, de la transcription des ARN et de la compaction chromosomique (Alonso et al., 2024).

Elle serait également capable de se fixer à la face cytosolique de la membrane plasmique, en particulier dans des cultures neuronales (Brandt et al., 1995). Cette localisation contribuerait à la différenciation physiologique des neurites en neurones matures, en permettant un intermédiaire entre les microtubules et la membrane.

Enfin, Tau a été identifiée dans l'espace extracellulaire dans des modèles *in vitro* ainsi que *in vivo* dans des cerveaux de rats. Sa libération serait régulée par l'activité neuronale, une stimulation provoquant son excrétion. La fonction de Tau extracellulaire demeure incertaine, mais elle pourrait être liée à des processus pathologiques, notamment dans la transmission intercellulaires des agrégats amyloïdes (Boyarko and Hook, 2021).

3.2. Pathologies associées à Tau : les Tauopathies

3.2.1. Classification des tauopathies

Depuis sa première identification en tant que composant principal des enchevêtrements neurofibrillaires observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau a été retrouvée dans plusieurs autres démences et maladies neurodégénératives, regroupées sous le terme générique de tauopathies.

Les tauopathies se distinguent par différents types d'agrégats de Tau (enchevêtrements neurofibrillaires, filaments du neuropile, enchevêtrements d'astrocytes), des types cellulaires affectés variés (astrocytes, neurones, oligodendrocytes), ainsi que des régions cérébrales touchées de manière variable (Arendt et al., 2016). Les facteurs qui favorisent l'apparition de la maladie incluent la vulnérabilité des régions cérébrales touchées, le type de cellules affectées (en particulier les neurones présynaptiques excitatoires), l'émergence de formes de Tau particulièrement toxiques (notamment en raison de modifications post-traductionnelles ou de son association avec d'autres molécules ou protéines amyloïdes comme A β), des changements locaux dans le cerveau ou le liquide céphalo-rachidien, ainsi que la localisation subcellulaire de Tau, allant des axones au compartiment somato-dendritique (Limorenko and Lashuel, 2022).

Plus de 20 maladies ont été identifiées comme tauopathies, classées en tauopathies primaires ou secondaires dépendant du fait que Tau est le principal facteur pathologique ou non (Arendt et al., 2016). Les tauopathies primaires constituent un sous-groupe des dégénérescences fronto-temporales (FTD) qui affectent principalement les lobes frontaux et temporaux. Ces maladies sont les plus fréquentes après la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Elles impliquent souvent le système moteur et/ou des difficultés cognitives, y compris des troubles du langage. Les symptômes cliniques peuvent inclure des changements de comportement, des troubles cognitifs, des difficultés de langage et des troubles moteurs, comme dans les démences fronto-temporales (FTD) ou les altérations de la conduite personnelle et sociale. Parmi les FTD, certaines sont associées à des mutations du gène MAPT situé sur le chromosome 17, qui code pour la protéine Tau, connues sous le nom de démence fronto-temporale liée au chromosome 17 (FTDP-17) (Arendt et al., 2016).

Les tauopathies secondaires regroupent une variété de maladies, dont certaines sont liées à des facteurs environnementaux, comme l'encéphalopathie traumatique chronique (causée par des lésions cérébrales répétées), ou à des causes génétiques affectant des gènes non directement liés à Tau, comme dans la trisomie 21, les mutations sur les gènes codant d'autres protéines amyloïdes (prions, huntingtine), ainsi que la maladie d'Alzheimer, qui présente à la fois des dépôts de Tau et une accumulation de peptides amyloïdes A β (Arendt et al., 2016). Dans tous les cas, l'accumulation de protéines mal repliées est une caractéristique commune, soulignant le rôle des structures amyloïdes pathogènes dans l'apparition de ces pathologies.

3.2.2. Caractéristiques pathologiques

Les tauopathies présentent des différences dans les types de lésions formées par l'agrégation amyloïde de Tau, ainsi que les zones touchées (Arendt et al., 2016). Cependant, des caractéristiques concernant Tau sont

communes : dans un premier temps, Tau est hyperphosphorylée. Cette hyperphosphorylation entraîne la dissociation de Tau des microtubules (Sengupta et al., 1998). Elle est ensuite redistribuée, depuis les axones au compartiment somato-dendritique. Elle s'agrège ensuite sous la forme de fibres amyloïdes, et s'accumule dans les neurones et les cellules gliales, ou est transmise aux cellules avoisinantes, où elle entraîne une propagation (Arendt et al., 2016).

- **Désassemblage des microtubules**

Comme discuté précédemment, bien que le rôle de Tau dans l'assemblage des microtubules ne soit pas indispensable, en raison de la redondance d'autres protéines associées aux microtubules, l'absence de cette fonction peut avoir des conséquences notables. En effet, elle entraîne non seulement une perte de la capacité de Tau à réguler les domaines dynamiques des microtubules (Qiang et al., 2018), mais favorise également l'accumulation de Tau dans le cytosol. Cette accumulation anormale de Tau augmente sa concentration cytosolique, qui est estimée à environ 300 pM dans les cerveaux âgés, peut augmenter de 2 à 3 fois dans des conditions pathologiques (Alonso et al., 2024). L'apparition de modifications de la protéine Tau (comme des phosphorylations) peut diminuer l'affinité de Tau pour les microtubules, entraînant donc son désassemblage et son accumulation dans le cytosol.

- **Agrégation pathologique de Tau**

Contrairement aux autres protéines amyloïdes (décrites plus haut, comme A β , α -synucléine) la protéine Tau ne s'auto-assemble pas seule *in vitro*. Le nombre élevé de charges de la protéine (majoritairement basique dans sa partie C-terminale) ainsi que sa haute solubilité, inhibent les premières phases de nucléation nécessaires à la formation des fibres amyloïdes (Sallaberry et al., 2021). Plusieurs facteurs ont été identifiés comme capables de surmonter cette barrière thermodynamique et de contrer les charges positives de la protéine, comme notamment la présence de mutations, de modifications post-traductionnelles (PTMs), ou l'interaction avec des cofacteurs ou d'autres protéines amyloïdogènes, comme A β dans Alzheimer (Limorenko and Lashuel, 2022).

Sous sa forme agrégée au sein de fibres amyloïdes (extraites d'agrégats retrouvés dans différentes tauopathies), Tau est formée d'un cœur amyloïde ne comprenant qu'une centaine d'acides aminés situés majoritairement dans les domaines R2 et R3 de son domaine de liaison aux microtubules (Fitzpatrick et al., 2017; Scheres et al., 2020). Autour de ce cœur amyloïde, les parties C- et N- terminales forment un « *fuzzy coat* », globalement déstructuré (*random coil*) (Boyarko and Hook, 2021).

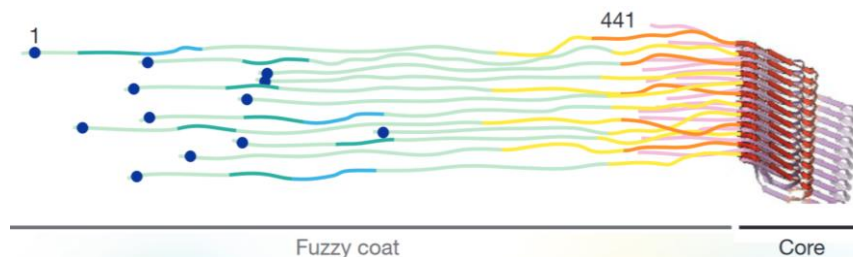


Figure I-18. Représentation schématique d'une portion de fibres amyloïdes de Tau. D'après (Fitzpatrick et al., 2017).

Le développement de méthodologies de biologie structurale, notamment la cryo-microscopie électronique, a permis la résolution des structures de Tau sous forme de filaments amyloïdes. L'élucidation des structures cryo-EM des fibres de Tau extraites depuis diverses tauopathies à des résolutions comprises entre 1,9 et 3,5 Å ont révélé une grande diversité, ainsi qu'une spécificité de ces structures en fonction des pathologies (Fitzpatrick et al., 2017; Scheres et al., 2020; Shi et al., 2021). Les résidus impliqués dans ce cœur peuvent différer en fonction des pathologies (par exemple la maladie de Pick possède un feuillet-β appelé β1 que les autres structures ne possèdent pas (**Figure I-19**)). Sur toutes ces structures, la présence de densités non attribuées (représentées par des ovales roses **Figure I-19**) pourrait correspondre à des molécules intégrées dans les fibres facilitant le repliement.

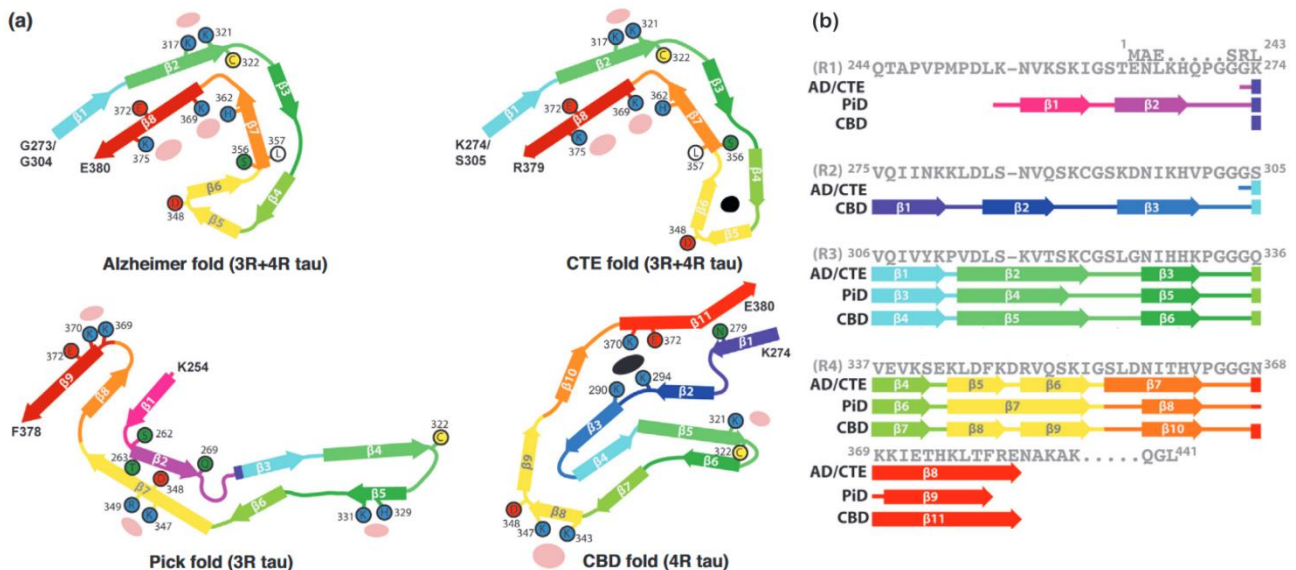


Figure I-19. Modèles schématique (a) des cœurs amyloïdes de Tau dans les fibres amyloïdes spécifiques de certaines maladies (AD : Alzheimer ; CTE : encéphalopathie traumatique chronique ; Pick ; et CBD : dégénérescence cortico-basale). Séquence primaire (b) indiquant la localisation des différents feuillets β en fonction du modèle. Les formes ovales roses correspondent à des densités non attribuées. Modifié de (Scheres et al., 2020).

- **Mutations**

À la différence des tauopathies sporadiques ou secondaires qui ne sont pas causées par des mutations génétiques spécifiques, certaines mutations sont directement associées à des tauopathies primaires et familiales. C'est le cas des mutations du gène MAPT responsables d'un sous-groupe de démences fronto-temporales avec parkinsonisme lié au chromosome 17q21, connu sous le nom de FTDP-17. Parmi les nombreuses mutations identifiées (13 liées aux démences fronto-temporales, 4 aux maladies de Pick, 2 aux PSP, et 30 aux syndromes parkinsoniens), plusieurs réduisent la capacité des microtubules à s'assembler et/ou favorisent l'agrégation de Tau. Par exemple, la mutation P301L, l'une des plus courantes, remplace la proline par une leucine en position 301 (ou position 618 dans l'isoforme PNS-Tau avec 758 résidus). Cette mutation augmente la capacité de Tau à s'agréger et diminue l'assemblage des microtubules (Clark et al., 1998; Rizzu et al., 1999).

Certaines mutations influencent également l'épissage du gène MAPT, provoquant un déséquilibre des ratios 4R/3R des isoformes de Tau. Ce déséquilibre peut être délétère, des différences d'affinités pour les

microtubules et de capacités d'agrégation existant entre les deux groupes d'isoformes. Une mauvaise répartition des isoformes 3R et 4R peut donc conduire à une toxicité accrue, avec des tauopathies spécifiques de l'un ou de l'autre groupe d'isoformes (Boyarko and Hook, 2021). En outre, d'autres modifications non génétiques de Tau peuvent également contribuer à sa pathogénèse.

- **Hyperphosphorylation et autres modifications post-traductionnelles**

Les modifications post-traductionnelles de Tau peuvent influencer sa pathogénicité de plusieurs manières, en particulier en modifiant son affinité pour les microtubules et sa capacité à s'agréger. Ces modifications incluent la phosphorylation, l'acétylation, la déamination, la méthylation, la déméthylation, la nitration, les glycosylations O et N, l'ubiquitination, la SUMOylation, et le clivage protéolytique (**Figure I-20**) (Limorenko and Lashuel, 2021).

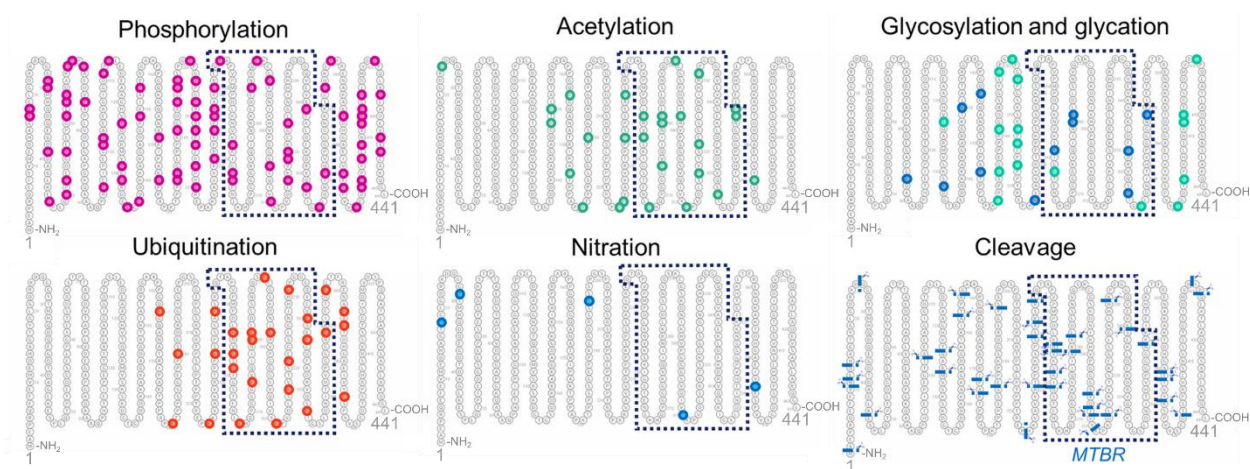


Figure I-20. Modifications post-traductionnelles de Tau avec les phosphorylations, les acétylations, les glycosylations et glycations, les ubiquitinations, les nitrations, et les clivages. Les séquences protéiques sont indiquées depuis le N-terminal (1^{er} résidu en bas à gauche), jusqu'au C-terminal (441^{ème} résidu de l'isoforme 2N4R). Le domaine de liaison aux microtubules (MTBR) est encadré. Modifié de (Limorenko and Lashuel, 2021).

Ces PTMs font partie des facteurs pouvant favoriser l'agrégation de Tau, et l'identification de la protéine sous forme hyperphosphorylée dans les agrégats semble indiquer que ces modifications sont nécessaires. Cependant, l'analyse du nombre important de sites de modifications post-traductionnelles (PTM), du rôle des clivages, ainsi que des effets parfois contradictoires de certaines phosphorylations, remet en question l'idée que la phosphorylation soit l'unique déclencheur de ce processus. En effet, certaines phosphorylations semblent favoriser l'agrégation (Despres et al., 2019), tandis que d'autres jouent un rôle inhibiteur. Par exemple, la phosphorylation de cinq tyrosines, de trois tyrosines situées dans le domaine N-terminal, ou encore d'une seule tyrosine à la position 310, a été rapportée comme ayant un effet inhibiteur sur l'agrégation (Ait-Bouziad et al., 2020).

Ces données suggèrent que les phosphorylations pourraient être davantage impliquées dans la diminution de l'affinité de Tau pour les microtubules, provoquant ainsi un désassemblage et une accumulation de Tau libre, plutôt que dans l'initiation directe de l'agrégation. Cette accumulation favoriserait alors indirectement

l'agrégation. Ainsi, les phosphorylations ne semblent pas être le seul facteur déterminant dans le processus d'agrégation.

- **Propagation**

La progression des maladies neurodégénératives, notamment des tauopathies, révèle une transmission entre les cellules au sein d'une même région cérébrale. Pour cette transmission, les espèces amyloïdes doivent d'abord être sécrétées, puis internalisées par des cellules voisines. Concernant Tau, plusieurs modes de sécrétion ont été identifiés : le transport sous forme libre à travers la membrane et dépendante de domaines de la membrane ou de la présence de protéoglycanes de type HSPG (héparine) (1), l'excrétion par ectosome (2), l'encapsulation dans des exosomes (3), ou encore la transmission directe entre cellules en contact par nanotubes (Figure I-21) (Limorenko and Lashuel, 2021).

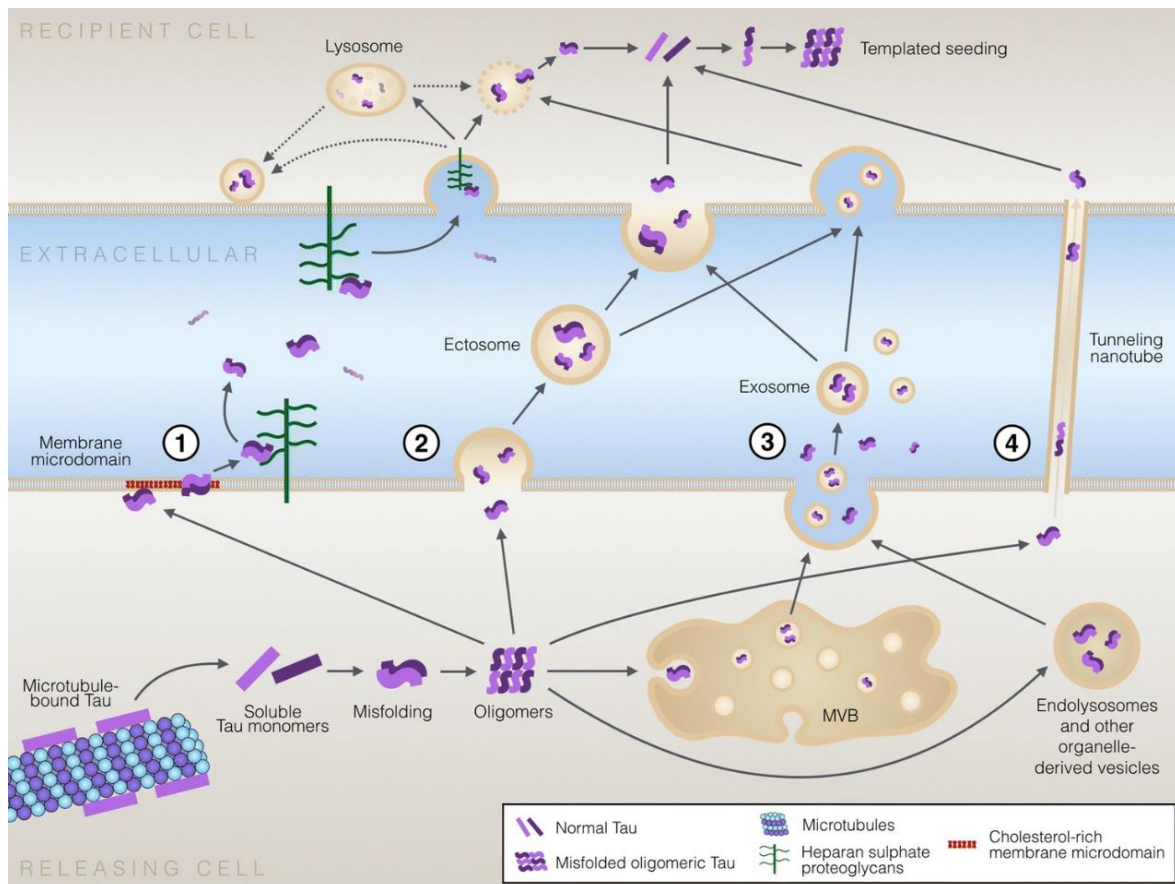


Figure I-21. Mécanismes de sécrétion impliqués dans la propagation intercellulaire d'espèces toxiques amyloïdes de Tau. Plusieurs processus ont été identifiés : (1) sécrétion directe à travers la membrane plasmique via l'interaction avec des domaines, notamment cholestérol / sphingomyéline / PIP₂ / ou HSPG ; (2) sécrétion dans des ectosomes ou (3) dans des exosomes et fusion sur la membrane d'une cellule receveuse ; (4) transfert direct par nanotubes reliant deux cellules proches. Issu de (Limorenko and Lashuel, 2021).

Ces mécanismes de sécrétion et d'internalisation favorisent la propagation de l'agrégation de Tau en agissant comme un noyau pour le mauvais repliement des espèces natives dans les cellules réceptrices, suivant un mécanisme de type prion. Comme mentionné précédemment, ce processus permet aux protéines Tau natives « saines » d'être recrutées par ces espèces mal repliées (monomères ou oligomères solubles) pour former des agrégats amyloïdes toxiques, amplifiant ainsi l'agrégation dans les cellules voisines (Arendt et al., 2016).

3.2.3. Etude de l'agrégation de Tau *in vitro*

Après l'identification des fibres amyloïdes composées de protéines Tau impliquées dans les tauopathies, il est devenu nécessaire de reproduire l'agrégation de Tau *in vitro*. En plus de l'incorporation de phosphorylations ou de l'utilisation de mutants, d'autres éléments, comme l'étude de fragments de Tau dépourvus du domaine N-terminal, ainsi que l'emploi de molécules polyanioniques neutralisant les charges positives de Tau, ont été largement exploités dans des études précédentes.

- **Fragments**

Pour faciliter l'agrégation de Tau et mieux comprendre les mécanismes sous-jacents, différents fragments de la protéine ont été utilisés. Parmi eux, des peptides composés uniquement de certains domaines, comme le P2R (El Mammeri et al., 2023) et les domaines R (R1 à R4) isolés (Dicke et al., 2017), ont permis de mieux cerner l'implication de chaque domaine. Pour accélérer l'obtention de fibres *in vitro*, les fragments K18 et K19, correspondant aux acides aminés 255 à 441 avec le domaine R2 (K18) ou sans (K19) (Haj-Yahya et al., 2020; Wegmann et al., 2010), de même que le fragment Tau187 (Fichou et al., 2019), comprenant tout le domaine de liaison aux microtubules (MTBR) ainsi que le C-terminal, ont été utilisés.

Bien que l'utilisation de ces fragments permette d'isoler les contributions de chaque domaine aux fonctions pathologiques de Tau et de faciliter l'agrégation, elle présente de nombreuses limites en ne prenant pas en compte le domaine N-terminal, pourtant essentiel pour comprendre les mécanismes d'agrégation (Sallaberry et al., 2021). En effet, la différence de charges entre le N-terminal et le MTBR induit des mécanismes très complexes d'agrégation, qui ne sont pas pris en compte lors d'utilisation de fragments.

- **Cofacteurs**

La protéine Tau est fortement chargée positivement, notamment dans son domaine MTBR impliqué dans la formation du cœur amyloïde des fibres matures, l'utilisation de molécules anioniques pour faciliter l'agrégation de Tau a été proposée dans plusieurs études. Ces molécules, appelées cofacteurs, sont de diverses natures, comme l'héparine (Goedert et al., 1996) (un carbohydrate), des ARNs (Kampers et al., 1996), des détergents, des acides gras ou des phospholipides (Chirita et al., 2003; Wilson and Binder, 1997). Certains de ces cofacteurs ont été identifiés comme capables d'interagir directement avec Tau (Gellermann et al., 2006; Zwierzchowski-Zarate et al., 2022), ce qui renforce leur pertinence pour ces études. Cependant, à ce jour, aucun élément probant ne semble confirmer l'implication d'une molécule anionique comme cofacteur dans la formation des fibres amyloïdes de Tau *in vivo* et cela reste une question ouverte.

- **Structure des fibres recombinantes**

L'élucidation de structures par cryoEM a révélé que les fibres recombinantes obtenues *in vitro* en présence d'héparine (Zhang et al., 2019) et d'ARN (Abskharon et al., 2022; Lövestam et al., 2022) différaient de celles extraites des cerveaux de patients atteints de différentes tauopathies. Cependant, compte tenu de la diversité des cofacteurs et des structures spécifiques à chaque tauopathie, il est possible que chaque structure dépende d'un cofacteur particulier, qui n'a pas encore été identifié, en lien avec les différentes maladies.

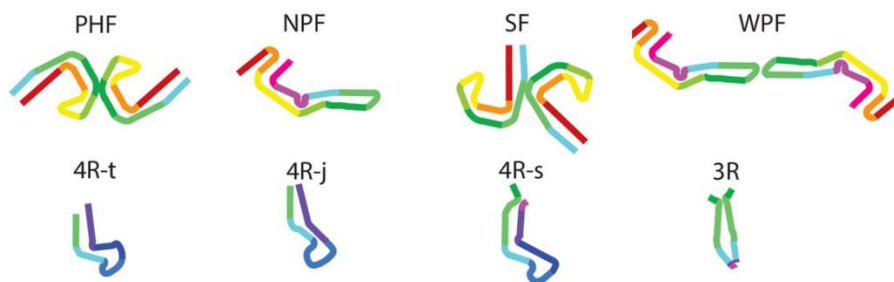


Figure I-22. Représentation schématique des différents cœurs amyloïdes ("fold") adoptés par Tau dans : les filaments twistés (PHF) et les filaments droits (SF) dans la maladie d'Alzheimer ; les filaments étroits (NPF) et larges (WPF) de la maladie de Pick, ainsi que les filaments de Tau (2N4R) induits par héparine sous forme de « twister » (4R-t), « jagged » (4R-j), et « snake » (4R-s), et par Tau (2N3R) avec héparine (3R). Modifié de (Zhang et al., 2019).

Si un tel mécanisme d'agrégation avec des cofacteurs existe, alors l'interaction entre Tau et ces molécules anioniques pourrait avoir des implications significatives sur les effets toxiques de Tau dans les cellules. Par exemple, en plus de sa capacité à former des fibres en présence d'ARN (Kampers et al., 1996), il a été démontré que Tau peut séquestrer certains composants des acides nucléiques (Ginsberg et al., 1997; Lester et al., 2021), régulant ainsi, voire empêchant, certaines transcriptions génomiques. De plus, l'agrégation de Tau avec des phospholipides et son association avec des composants membranaires soulèvent des questions quant à son impact sur les membranes.

4. Membranes biologiques et modèles

Les membranes biologiques sont des structures qui servent de frontière entre l'extérieur et la cellule pour les membranes plasmiques, et qui délimitent les compartiments que sont les organelles pour les endomembranes. Elles sont composées d'un ensemble d'espèces moléculaires qui s'organisent en des structures complexes, à savoir des protéines, des carbohydrates, et une majorité de lipides qui servent de matrice pour une organisation sous forme de bicouche. Leur composition varie en fonction de la localisation cellulaire (plasmique, endomembrane...), tissulaire (neurones, myocytes...) ou même temporelle / pathologique (apoptose, cancers, maladies neurodégénératives...).

4.1. Lipides de la membrane

Les lipides représentent 40 à 50% de la masse totale sèche de la plupart des membranes plasmiques (Calderon et al., 1995). Parmi les composants lipidiques, on retrouve les glycérophospholipides (GPL), les sphingolipides (SL), et les stérols et en particulier le cholestérol chez les mammifères (Casares et al., 2019; Harayama and Riezman, 2018; Luchini and Vitiello, 2020).

4.1.1. Glycérophospholipides (GPL)

Les GPL sont constitués de deux acides gras liés par deux chaînes acyles hydrophobes et un groupement phosphate ester lié à un glycérol (**Figure I-23**). Ces deux groupes confèrent aux GPL des caractéristiques amphiphiles, qui permettent le maintien de la structure membranaire sous forme d'une bicouche lipidique. Le glycérophosphate peut être estérifié par différentes têtes hydrophiles, conférant une charge globale aux GPL.

On retrouve ainsi les GPL zwitterioniques, c'est-à-dire neutres, comme la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) ainsi que des GPL anioniques tels que les phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylsérine (PS), et l'acide phosphatidique (PA).

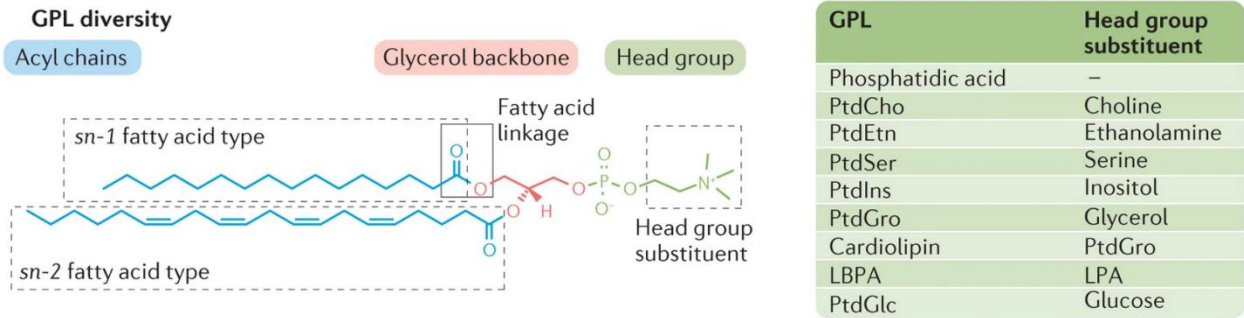


Figure I-23. Structure des glycérophospholipides (GPL) avec leurs chaînes acyles (en bleu) aux positions *sn-1* ou *sn-2*, saturées ou insaturées, le groupement glycérol (en rouge) et la tête polaire, dont les différents constituants sont listés dans le tableau, avec en particulier : la choline, l'éthanolamine, la sérine, l'inositol, le glycérol, la cardiolipine, les acides lysophosphatidique (LPA), ou le glucose. Modifié de (Harayama and Riezman, 2018).

Les acides gras présents dans les GPL et SL présentent également une variété de tailles et d'insaturations. Par exemple pour le GPL PC qui représente 50% des phospholipides totaux des membranes (Casares et al., 2019; van Meer et al., 2008), on retrouve en grande majorité la forme 16:0-18:1 (d'après la nomenclature XX:Y où X indique la longueur de chaîne, et Y le nombre d'insaturations) alors que c'est la forme 16:0-16:0 qui est majoritaire dans les poumons, ou la 16:0-22:6 dans le cœur (**Figure I-24**) (Harayama and Riezman, 2018).

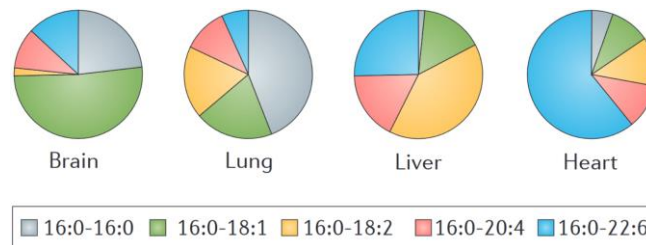


Figure I-24. Variété des compositions en acides gras de la phosphatidylcholine dans différents tissus : cerveau, poumons, foie, cœur. Modifié de (Harayama and Riezman, 2018).

La proportion de ces différents phospholipides, de même que la longueur et le nombre d'insaturations de leurs acides gras, est également différente entre le feuillet externe et le feuillet interne de la membrane (**Figure I-25**). Le feuillet interne de la membrane cytoplasmique est notamment particulièrement enrichi en phospholipides anioniques, tels que les PS et PI (Casares et al., 2019; Harayama and Riezman, 2018; Luchini and Vitiello, 2020; Luckey, 2008; van Meer et al., 2008). De plus, ces lipides sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, comme l'exocytose ou la transduction de signal (Di Paolo and De Camilli, 2006; Kim et al., 2014),

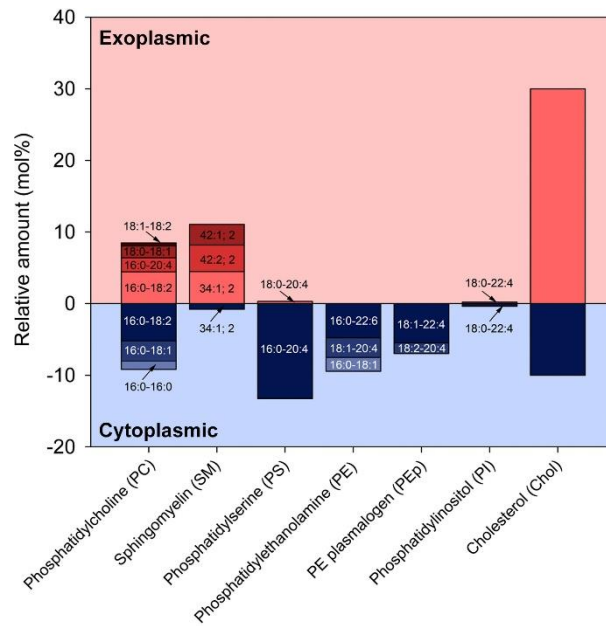


Figure I-25. Distribution des différentes espèces lipidiques dans des érythrocytes humains. Issu de (Pabst and Keller, 2024).

La composition et la quantité relative des lipides est également différente en fonction des types cellulaires (**Figure I-26**), avec par exemple des ratios en cholestérol entre la membrane externe et la membrane interne moins prononcés dans les membranes neuronales que pour d'autres types cellulaires (Ingólfsson et al., 2017) (comme les érythrocytes par exemple (Pabst and Keller, 2024)). Le cholestérol semble globalement enrichi dans les membranes neuronales, et la quantité de certains lipides (notamment les PE et PC) est différente (Ingólfsson et al., 2017).

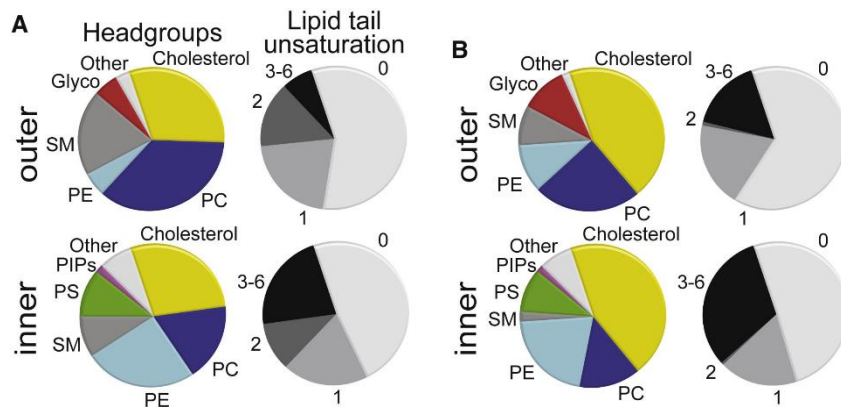


Figure I-26. Proportions des différents lipides de la membrane déterminées par modélisation dans une membrane plasmique modèle de mammifère (A) par rapport à une membrane cérébrale (B). Modifié de (Ingólfsson et al., 2017).

- **La phosphatidylcholine**

La phosphatidylcholine (PC) est le phospholipide majoritaire des membranes plasmiques (Casares et al., 2019; van Meer et al., 2008). La choline étant chargée positivement, et le groupement phosphate étant négatif, le PC est donc un lipide zwitterionique. Il est donc couramment utilisé comme matrice pour former des membranes mimétiques lipidiques (Ottova-Leitmannova, 2006).

- **La phosphatidylsérine**

Le PS représente 13-15% des lipides totaux dans les membranes plasmiques internes des mammifères (Kim et al., 2014; Svennerholm, 1968). Il est le lipide anionique majoritaire des membranes et est particulièrement enrichi dans les feuillettes internes des membranes neuronales (Ingólfsson et al., 2014; Kim et al., 2014). De plus, son rôle est essentiel dans la survie neuronale, de par son interaction avec des molécules activant des cascades de signalisation impliqués dans la survie et la croissance neuronale, ainsi que la synaptogenèse (Kim et al., 2014). Il est également impliqué dans la transmission synaptique via entre autres son rôle dans l'exocytose ou de modulation de récepteurs de transmetteurs (Kim et al., 2014). C'est également un marqueur des cellules en état d'apoptose, via la translocation de PS sur le feuillet externe.

4.1.2. Cholestérol

Les stérols, et en particulier le cholestérol chez les mammifères, représentent l'autre composant majoritaire lipidique des membranes. Il représente 20 à 40 mol% du contenu lipidique total des membranes plasmiques (Casares et al., 2019; Luchini and Vitiello, 2020; Mouritsen and Zuckermann, 2004).

Son rôle est essentiel dans les membranes plasmiques, car il participe à la dynamique de la membrane en modifiant sa fluidité. Cette modulation est complexe, du fait de son rôle opposé en fonction de l'organisation membranaire. Dans les membranes fluides, le cholestérol augmente l'ordre des chaînes acyles, stabilisant les membranes, dépendant de la concentration en cholestérol (Mouritsen and Zuckermann, 2004). En revanche dans des membranes rigides (phase gel), le cholestérol permet de fluidifier ces membranes (van Meer et al., 2008), en diminuant la compaction des chaînes acyles.

4.2. Mimer les membranes biologiques

Afin d'étudier les membranes biologiques, et plus particulièrement leurs interactions avec des peptides/protéines, plusieurs systèmes modèles peuvent être utilisés. Différents modèles membranaires, aux compositions et organisations variées, peuvent être utilisés pour reproduire diverses structures membranaires, notamment les liposomes, les monocouches et les bicouches lipidiques. Les modèles utilisés au cours de cette thèse, à savoir les liposomes et les bicouches supportées, sont présentées ci-dessous.

4.2.1. Modèles membranaires

- **Liposomes**

Les liposomes unilamellaires, ou vésicules lipidiques sont des modèles membranaires composés d'une bicouche lipidique et d'une cavité aqueuse (**Figure I-27**). La bicouche est composée d'une double couche de phospholipides organisés avec les têtes polaires vers l'extérieur. Ils sont classés selon leurs tailles : on regroupe sous le terme de petits liposomes unilamellaires (SUVs) les structures d'une taille inférieure à 100 nm, les larges unilamellaires entre 100 nm et 1 μm et les géants unilamellaires au-delà de 1 μm . Des liposomes multilamellaires, composés de plusieurs bicouches concentriques, existent également et ont des tailles au-delà de 500 nm.

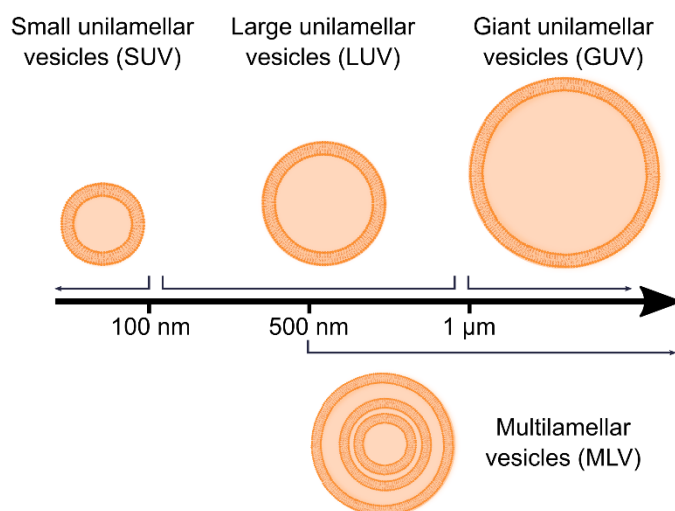


Figure I-27. Schéma des différents liposomes et indication de leur taille avec les petits liposomes unilamellaires (SUVs) de moins de 100 nm, les larges unilamellaires (LUVs) entre 100 nm et 1 µm, et les géants unilamellaires de plus de 1 µm. Les liposomes multilamellaires (MLVs) possèdent plusieurs bicouches et ont une taille supérieure à 500 nm. D'après (Mardešić et al., 2023).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour obtenir ces liposomes. Les vésicules multilamellaires (MLVs) sont préparées en dissolvant des phospholipides dans du chloroforme, puis en séchant la solution par un flux d'azote sur les parois de tubes, créant un film lipidique (Mardešić et al., 2023). Lorsqu'il est hydraté avec une solution aqueuse, ce film se resolubilise pour former des MLVs.

Les autres types de liposomes sont dérivés de cette solution de MLVs. Les SUVs, par exemple, peuvent être produits par sonication des MLVs, générant des liposomes d'une taille comprise entre 15 et 50 nm (Mardešić et al., 2023). Les LUVs, quant à eux, sont obtenus par extrusion, en passant les MLVs à travers une membrane en polycarbonate dont les pores ont la taille désirée (par exemple, 100 ou 200 nm) (Mardešić et al., 2023). Plusieurs passages permettent d'obtenir une solution de LUVs homogènes de la taille souhaitée.

- **Bicouches lipidiques supportées**

Les bicouches supportées sont des modèles membranaires plans constitués d'une bicouche de phospholipides déposée sur une surface solide, avec une fine couche aqueuse de 1-2 nm entre la surface et la bicouche (Mardešić et al., 2023). Divers supports peuvent être utilisés, tels que du mica pour l'AFM ou un cristal (Germanium, diamant) pour l'ATR-FTIR. La méthode la plus courante pour former une bicouche sur une surface est la fusion de SUVs (**Figure I-28**). Une suspension de SUVs est déposée sur la surface à une température supérieure à la température de transition du phospholipide (**Figure I-28, 1**) (Mardešić et al., 2023). Les liposomes s'adsorbent sur la surface (**Figure I-28, 2**) et forment une bicouche lipidique (**Figure I-28, 3**). Grâce à leur petite taille, les SUVs se rompent facilement, et des ions tels que CaCl_2 peuvent être ajoutés pour favoriser cette rupture, surtout avec des lipides anioniques. Cette méthode simple et rapide permet d'obtenir une bicouche homogène après rinçage, éliminant les vésicules non fusionnées.

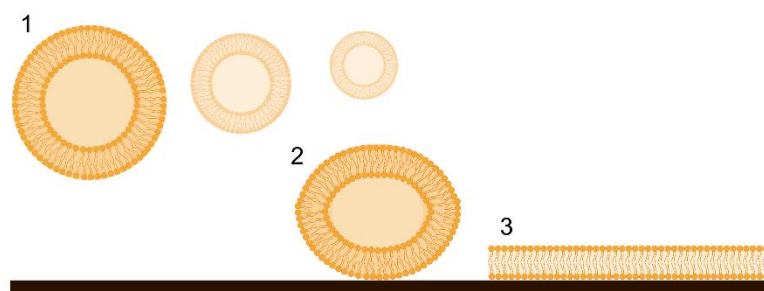


Figure I-28. Schéma de formation d'une bicouche supportée (SLB) par fusion d'une solution de SUVs. Les liposomes en solution (1) sont déposés sur une surface, et leur adsorption (2) permet le dépôt d'une bicouche (3). D'après (Mardešić et al., 2023).

4.2.2. Notion de transition de phase

Les lipides membranaires ont la capacité de s'organiser de diverses façons dans un milieu aqueux, selon leur structure chimique, l'hydratation, la température, la pression et la composition de la solution (Koynova and Tenchov, 2013). Plusieurs transitions de phase peuvent survenir en fonction des conditions du milieu. La plus importante d'un point de vue biologique est la transition gel-cristallin-liquide, où les lipides passent d'une phase gel (solide) à une phase liquide-cristalline (Koynova and Tenchov, 2013). Cette transition, observée au-delà d'une température dite de transition ou de fusion (T_m), correspond à un désordre des chaînes hydrocarbonées. La température de fusion des phospholipides dépend de leur structure chimique : plus la chaîne est longue et plus elle est saturée, plus la température de fusion est élevée. La position et le type de double liaison, ainsi que la nature du groupe polaire, influencent également cette température (Koynova and Tenchov, 2013).

Lipid phases in membranes

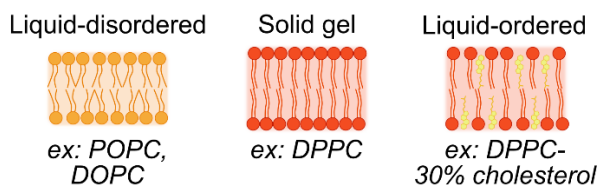


Figure I-29. Principales phases des membranes lipidiques avec les phases Liquide-désordonnées (Ld, ou liquide-cristalline), les phases solide gel (so), et les phases plus complexes, Liquide-ordonnées (Lo) qui se produisent dans des mélanges plus complexes, en présence de cholestérol. D'après (van Meer et al., 2008).

D'autres transitions de phase, plus complexes, peuvent apparaître dans des mélanges lipidiques contenant du cholestérol (**Figure I-30**). Par exemple, le DPPC, un phospholipide saturé, se trouve sous forme gel (so) à température et pression ambiantes. Au-delà de sa température de transition (41 °C), il passe en phase liquide-désordonnée (Ld). L'ajout de cholestérol au DPPC à température ambiante désorganise partiellement les chaînes du DPPC, l'amenant à une phase liquide-désordonnée (Ld). Entre 10 et 30 % de cholestérol, une coexistence de deux phases est observée : gel et liquide-ordonnée (so-Lo) (Koynova and Tenchov, 2013).

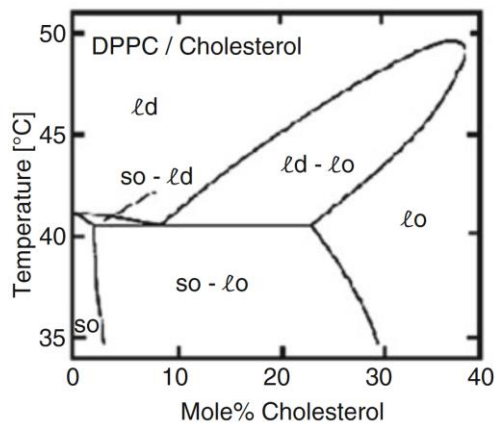


Figure I-30. Transitions de phases d'un mélange DPPC / cholestérol en fonction de la concentration en cholestérol et de la température. Plusieurs phases peuvent être observées en fonction de ces deux conditions : solide ou gel (so), liquide-ordonnée (lo) et liquide-désordonnée (ld). Issu de (Koynova and Tenchov, 2013).

Afin de reproduire certaines propriétés des membranes biologiques, notamment la présence de différentes phases, il est donc important d'inclure dans les modèles membranaires considérés des lipides présentant des températures de fusion variées.

4.2.3. Lipides utilisés dans cette étude

L'utilisation de lipides synthétiques offre l'avantage d'accéder à une variété de lipides avec une grande reproductibilité. Elle permet également de travailler avec des mélanges simples constitués à partir de molécules pures pour mieux comprendre le rôle d'un lipide spécifique, ainsi que dans des mélanges plus complexes (binaires, ternaires, etc.) pouvant mimer différents types de membranes.

La phosphatidylcholine (PC) (**Figure I-31A**) est un phospholipide couramment utilisé, car elle constitue l'un des principaux composants des membranes (Casares et al., 2019; van Meer et al., 2008). Elle existe avec différentes longueurs de chaînes et divers degrés et sites d'insaturation, ce qui lui confère des propriétés variées, telles que des températures de fusion distinctes permettant des organisations membranaires différentes en fonction de la température. Par exemple, le POPC et le DOPC, dont les températures de fusion sont respectivement de -2 °C et -18 °C, sont en phase liquide-désordonnée à température ambiante (~ 20 °C), tandis que le DPPC, avec une température de fusion de 41 °C, adopte une phase solide de type gel.

Les phosphatidylsérines (PS) (**Figure I-31B**) sont fréquemment utilisées pour intégrer des phospholipides anioniques dans des modèles membranaires, car elles représentent 13 à 15 % des phospholipides des membranes plasmiques internes, notamment dans les neurones (Kim et al., 2014; Svennerholm, 1968). Le POPS et le DOPS, avec des températures de transition de 14 °C et -11 °C respectivement, sont en phase liquide-désordonnée à température ambiante.

Enfin, le cholestérol (**Figure I-31C**), autre composant majeur des membranes aux côtés des phospholipides, joue un rôle essentiel dans la modulation de la fluidité membranaire (Mouritsen and Zuckermann, 2004).

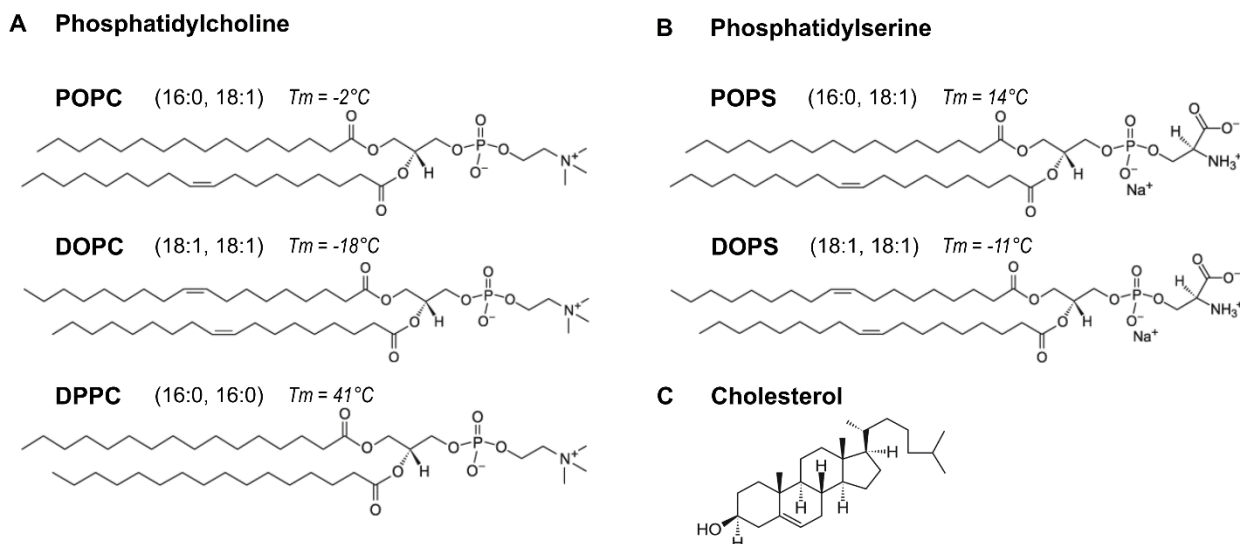


Figure I-31. Structure des lipides utilisés dans ce projet, avec des phosphatidylcholines (A) zwitterioniques (POPC, DOPC, et DPPC), des phosphatidylsérines (B) anioniques (POPS et DOPS), et du cholestérol (C). Les températures de transition (T_m) sont indiquées pour chaque phospholipide.

5. Interaction Tau-lipides / Tau-membrane

De nombreuses études ont démontré la capacité de Tau à interagir avec la membrane plasmique, principalement composée de lipides (Brandt et al., 1995; Pooler et al., 2012). Plus précisément, Tau peut interagir avec des composants protéiques de la membrane, tels que la tyrosine kinase fyn de la famille Src, ainsi qu'avec des lipides comme le PIP2, le cholestérol et la sphingomyéline (Katsinelos et al., 2018; Merezhko et al., 2020).

Ainsi, de nombreuses recherches se sont concentrées sur les interactions entre Tau et les lipides, ainsi que sur celles entre Tau et les membranes. En particulier, plusieurs aspects de cette interaction ont été étudiés : i) la capacité de Tau à s'agréger sous forme d'amyloïdes en présence de lipides, ii) sa structuration en présence de lipides, et iii) son interaction avec les structures membranaires et les conséquences qui en découlent.

5.1. Impact des lipides et acides gras sur l'agrégation de Tau

5.1.1. Agrégation avec des acides gras libres

Wilson et Binder sont les premiers à identifier des cofacteurs lipidiques comme inducteurs de l'agrégation de Tau (Wilson and Binder, 1997). Pour cela ils utilisent des acides gras libres, et en particulier l'acide arachidonique (acide 5,8,11,14-éicosatétraénoïque, 20:4) pour induire la fibrillation de divers extraits de Tau, dont le recombinant 2N4R, après incubation pendant 3 jours (**Figure I-32**).

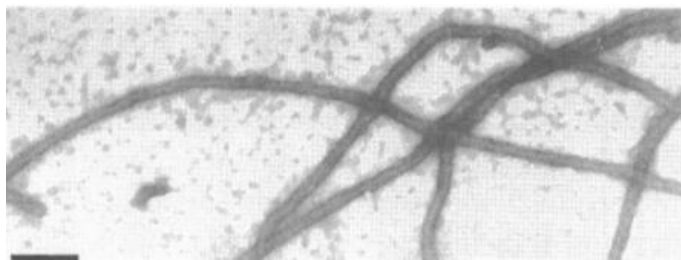


Figure I-32. Image TEM de filaments de Tau humain recombinant après 72h d'incubation en présence d'acide arachidonique. Echelle 100 nm. Modifié de (Wilson and Binder, 1997).

D'autres acides gras libres de longueurs de chaîne variables, saturés ou insaturés, ont également été étudiés (**Figure I-33**). La quantité de fibres pour chaque condition est mesurée en fonction de leur proportion relative en microscopie électronique, indiquant que l'agrégation de Tau est plus prononcée avec des acides gras à chaînes plus longues et avec un nombre élevé d'insaturations.

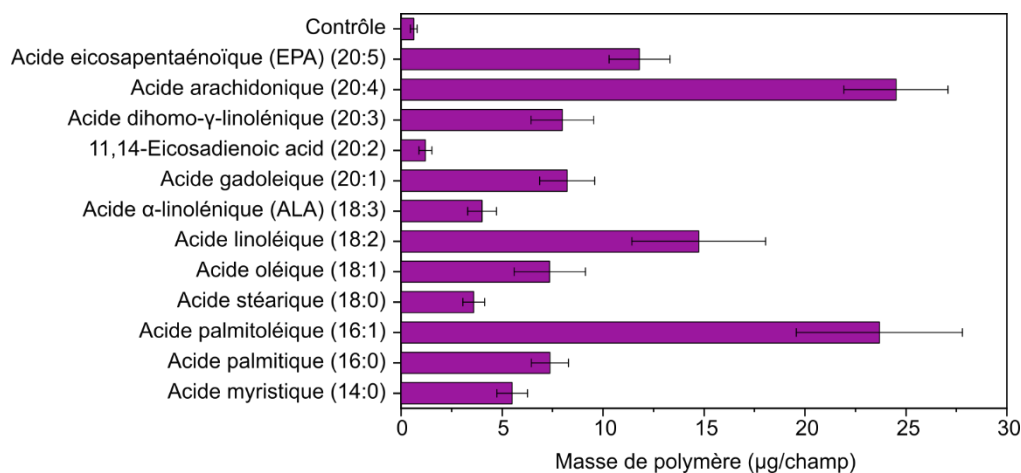


Figure I-33. Masse de polymères amyloïdes formés après incubation de Tau extrait de microtubules de rats avec différents acides gras libres. Les données, issues de (Wilson and Binder, 1997), correspondent aux moyennes des masses de 12 échantillons, exprimées en μg par champs d'observation.

Dans une étude complémentaire, Chirita et al. ont examiné en détail l'impact de la longueur des chaînes d'acides gras et d'autres paramètres sur la fibrillation de Tau. En utilisant plusieurs acides gras libres de tailles variées ainsi qu'une série de détergents anioniques, cationiques et non ioniques pour induire l'agrégation de Tau, ils ont déterminé par TEM qu'une chaîne acyle d'au moins 12 carbones et une tête chargée négativement sont les deux facteurs principaux pour la formation de fibres (Chirita et al., 2003).

Ensemble, ces deux études identifient les acides gras capables d'induire la fibrillation de diverses isoformes de Tau provenant d'extraits variés, et mettent en évidence la nécessité de la présence de charges négatives ainsi que d'un nombre suffisant de carbones.

5.1.2. Agrégation en présence de vésicules phospholipidiques

Les liposomes anioniques ont également été utilisés pour démontrer leur capacité à induire l'agrégation de la protéine Tau. Notamment, l'isoforme 2N4R a été incubé avec des SUVs de BPS (phosphatidylsérine extraite de cerveaux). Cette incubation, tout comme celle réalisée en présence de détergents anioniques, a entraîné la formation de fibres amyloïdes (Chirita et al., 2003). Les fibres obtenues après incubation de Tau avec les

liposomes semblent s'être formées directement à partir de ces vésicules. En effet, les observations en TEM montrent des fibres attachées et s'étendant depuis les liposomes, comme indiqué par les flèches noires (**Figure I-34**). Cette étude suggère que les vésicules et plus globalement les membranes, pourraient servir de centres de nucléation pour l'agrégation de Tau.

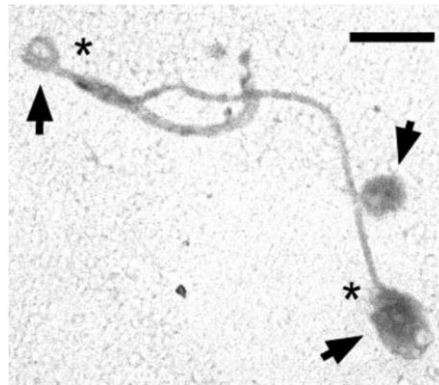


Figure I-34. Fibrillation de Tau (2N4R) après 3h d'incubation avec des vésicules de phosphatidylsérine. Echelle 100 nm. Issu de (Chirita et al., 2003).

Dès lors, plusieurs études se sont intéressées à la formation de fibres amyloïdes en présence de liposomes anioniques, en particulier après incubation de Tau avec des lysophosphatidylglycerols (LPG) (**Figure I-35A**) (Rasmussen et al., 2023), ou du fragment K18 avec un mélange de POPC:PIP₂ (4 :1) (**Figure I-35B**) (Talaga et al., 2018).

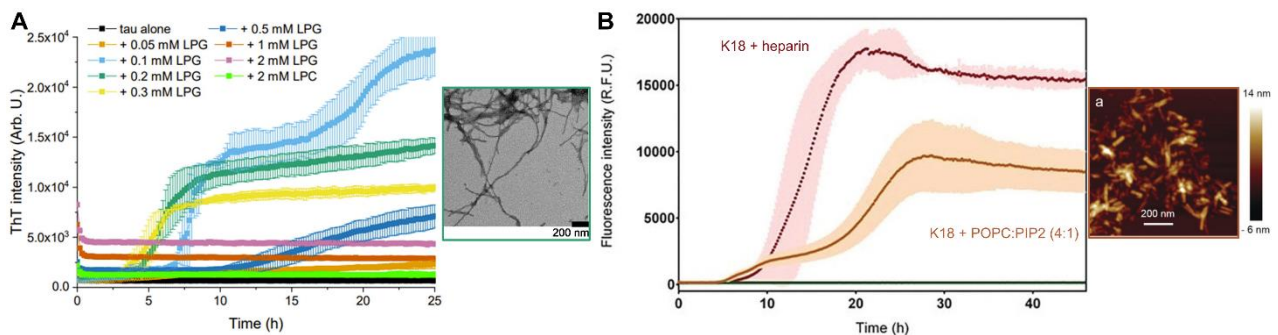


Figure I-35. Courbes d'agrégation en présence de thioflavine T de la protéine Tau avec différentes concentrations de 1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-(10-rac-glycerol) (LPG) et image TEM obtenue à la fin des 25h d'incubation avec 0,2 mM de LPG (A). Courbes ThT de K18 en présence d'héparine (rouge) ou de vésicules POPC :PIP₂ (4 :1) (orange) et image AFM de l'échantillon K18-POPC:PIP₂ (B). Modifié de Rasmussen et al. (A) (Rasmussen et al., 2023) et (Talaga et al., 2018).

Ainsi, ces études sur l'agrégation de Tau mettent en évidence la capacité de différents types de phospholipides anioniques comme les PS, les PG ou le PIP₂, à induire la fibrillation de Tau. Ceci indique la présence d'une interaction entre Tau et la surface des vésicules lipidiques.

5.2. Interaction et affinité de Tau pour des lipides

La mise en évidence d'une interaction entre Tau et la membrane plasmique et sa capacité à former des fibres amyloïdes en présence de phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine, ont mis en évidence la nécessité d'étudier l'interaction entre Tau et des systèmes membranaires lipidiques. Plusieurs aspects de l'interaction sont étudiés.

5.2.1. Affinité et mécanisme d'interaction

Des mesures d'affinité entre des liposomes et la protéine Tau ont été réalisées pour mieux comprendre leurs mécanismes d'interaction. Les auteurs ont utilisé la spectroscopie de fluorescence à la tyrosine pour déterminer les constantes d'affinité (K_D) de Tau et de ses fragments avec différentes vésicules lipidiques zwitterioniques, anioniques ou mixtes. Cette méthode repose sur l'émission de fluorescence des résidus tyrosine de Tau, dont l'intensité change lors de l'interaction avec les liposomes. En mesurant l'émission de fluorescence de la tyrosine à différents ratios lipides/protéines, il est possible de déduire une constante d'affinité, où une valeur faible de K_D indique une interaction forte, généralement dans des plages micromolaires ou nanomolaires.

Le K_D ainsi obtenu pour l'interaction entre K19 (fragment de Tau contenant les domaines R1, R3 et R4) et des liposomes de DMPS (Künze et al., 2012) est de $0,22 \pm 0,04 \mu\text{M}$. Il est de $0,32 \pm 0,12 \mu\text{M}$ pour la protéine entière (2N4R) avec ce même lipide (Yao et al., 2022). Ces valeurs sub-micromolaires démontrent une forte affinité entre les deux partenaires, qui est fortement réduite pour les vésicules mixtes DMPC:DMPS (4:1), présentant moins de charges négatives et un K_D plus fort à $2,4 \pm 0,18 \mu\text{M}$ (**Tableau I-2**). Cette diminution de l'affinité est particulièrement importante en l'absence totale de charges anioniques, illustré par un K_D de $0,93 \pm 0,08 \mu\text{M}$ pour les vésicules POPC:POPS (4:1), et qui atteint $53,3 \pm 18,3 \mu\text{M}$ avec du POPC pur (Künze et al., 2012). Ces exemples illustrent l'importance des interactions électrostatiques dans l'affinité entre Tau et les vésicules lipidiques, dépendante du nombre de charges anioniques des liposomes.

Enfin, le nombre de charges négatives disponibles au sein même des phospholipides semble influencer sur l'affinité, illustré par le K_D 8 fois supérieur lorsque le POPA (ne présentant qu'un groupe anionique, $K_D \sim 7,97 \mu\text{M}$) remplace le POPS (deux charges négatives, $K_D \sim 0,93 \mu\text{M}$). L'impact de la force ionique sur l'affinité des vésicules POPC:POPS est importante, avec un K_D 2 fois plus fort lorsque la force ionique augmente de 10 mM NaCl ($K_D \sim 0,42 \mu\text{M}$) à 100 mM ($K_D \sim 0,93 \mu\text{M}$), indiquant qu'un écrantage des charges négatives sur les vésicules de POPC:POPS diminue grandement l'affinité.

Ces résultats démontrent que les interactions électrostatiques entre les résidus basiques de K19 et les charges négatives présentes sur les têtes polaires des phospholipides au sein des liposomes sont les principales forces influençant l'affinité de ces partenaires.

Lipid composition	mol%	NaCl (mM)	$K_D \pm S.D. (\mu\text{M})$
POPC	100	100	53.3 ± 18.3
DMPS	100	100	0.22 ± 0.04
POPC/POPA	80:20	100	7.97 ± 4.34
POPC/POPS	80:20	100	0.93 ± 0.08
DMPC/DMPS	80:20	100	2.40 ± 0.18
POPC/POPS	80:20	10	0.42 ± 0.06
DMPC/DMPS	80:20	10	0.38 ± 0.10

Tableau I-2. Constantes d'affinités (K_D) déterminées par spectroscopie de fluorescence à la tyrosine pour le fragment K19 de Tau et plusieurs compositions lipidiques de liposomes et différentes salinités reportées dans (Künze et al., 2012).

5.2.2. Résidus protéiques impliqués dans l'interaction

L'affinité similaire entre les couples K19-DMPS (Künze et al., 2012) et Tau(2N4R)-DMPS (Yao et al., 2022), semble indiquer que les résidus majoritairement impliqués dans l'interaction sont situés dans le domaine de liaison aux microtubules. Pour identifier les résidus clés de l'interaction, Ait-Bouziad et al. ont utilisé différentes techniques de RMN liquide et solide pour examiner les complexes K18-BPS. En particulier, les méthodes de corrélations carbone-carbone (DARR) et de corrélations carbone-azote (HSQC) fournissent des informations sur les régions structurées et flexibles de la protéine K18 en interaction avec les liposomes (Ait-Bouziad et al., 2017). La méthode DARR a permis de mesurer les déplacements chimiques de plusieurs résidus d'après les spectres (**Figure I-36A**). Les valeurs très négatives sont généralement associées à des résidus rigides ou structurés, ce qui peut indiquer des sites d'interaction. Parmi les résidus proches avec des déplacements chimiques fortement négatifs, on trouve une isoleucine, une lysine, et deux valines (**Figure I-36B,C**). En tenant compte de la proximité de ces résidus, les auteurs ont déduit que le motif PHF6 (VQIVYK) de K18 était le seul à correspondre à cette région structurée de la protéine, identifiant ainsi les résidus V306, I308, V309 et K311 comme impliqués dans l'interaction. De plus, d'autres résidus des domaines R2 et R3 semblent également jouer un rôle dans l'interaction, notamment des valines, sérines et glycines présentes dans les motifs KCGS (290-293 et 321-324).

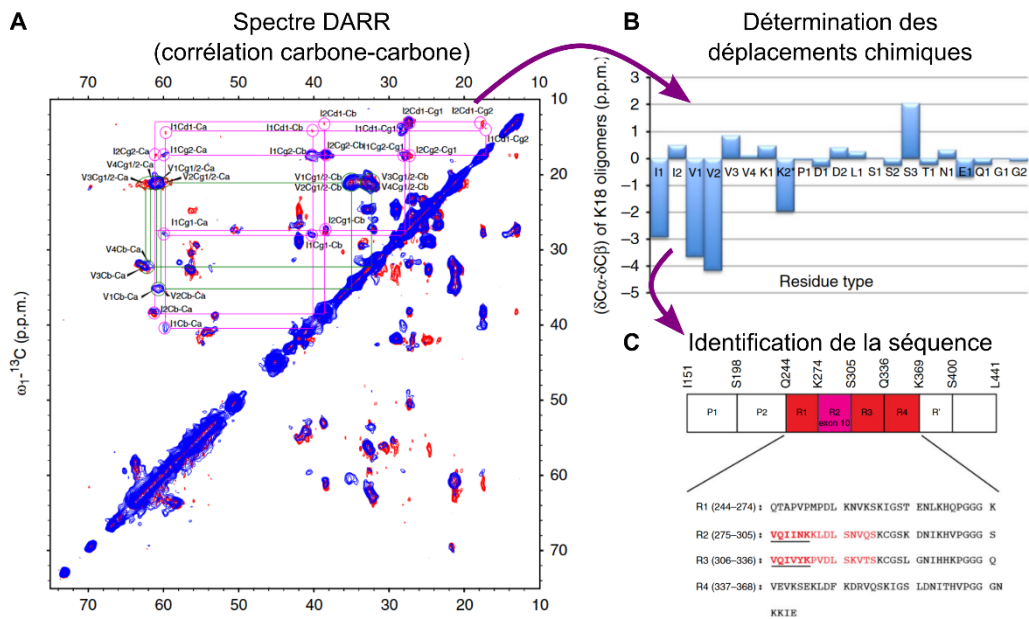


Figure I-36. Identification des résidus structurés de K18 en interaction avec des BPS par corrélation carbone-carbone avec un spectre DARR (A), les déplacements chimiques associés (B) et l'identification des motifs correspondants (C). Modifié de (Ait-Bouziad et al., 2017).

Après avoir identifié les acides aminés impliqués dans l'interaction, Ait-Bouziad et al. ont créé des mutants de K18 et de Tau (2N4R) incapables de se lier à la membrane tout en conservant leur capacité à s'agréger en présence d'héparine (Ait-Bouziad et al., 2017). Ces mutants MBD (*membrane-binding deficient*), MBD-K18 (V287E, V318E, I308E) et MBD-Tau (V287E, V318E, K311A), présentent des mutations spécifiques sur des résidus hydrophobes, notamment des valines. La réduction de leur capacité à former des complexes avec les membranes est confirmée par des expériences de chromatographie d'exclusion par la taille, qui permet de

différencier les espèces oligomériques (complexes) des monomériques (**Figure I-37**). Cette réduction suggère une implication importante des résidus mutés dans cette interaction.

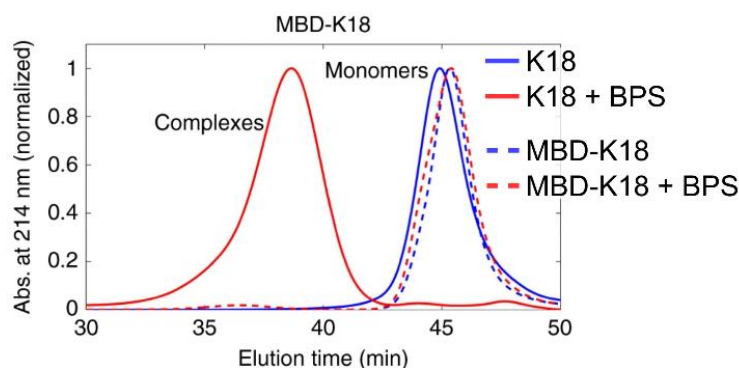


Figure I-37. Chromatogrammes de chromatographies d'exclusion de taille de Tau avec ou sans vésicules BPS. A gauche : K18-WT (ligne continue) et MBD-K18 (pointillée) seule (bleu) ou avec (rouge) vésicules BPS. A droite : Tau-WT avec BPS (bleu) ou MBD-Tau avec BPS (rouge) (Ait-Bouziad et al., 2017).

Les auteurs mettent cependant en évidence une formation d'oligomères plus importantes pour Tau que pour K18 dans des études de co-sédimentation, indiquant le rôle potentiel du N-terminal dans cette interaction (Ait-Bouziad et al., 2017). Cette observation est corroborée par une étude ultérieure s'intéressant au rôle des phosphorylations. Dans cette étude, les auteurs identifient des phosphorylations critiques, empêchant l'agrégation mais également les capacités d'interaction avec les lipides (et également avec les microtubules) (Ait-Bouziad et al., 2020). Pour cela, les auteurs ont utilisé des mutants phospho-mimétiques ou phosphorylés *in vitro* par des kinases à des positions spécifiques, et ont caractérisé leurs capacités d'agrégation, de structuration et de co-sédimentation en présence de BPS. Leurs résultats indiquent que la phosphorylation des cinq tyrosines (Y18, Y29, Y197, Y310, Y394), de plusieurs tyrosines situées dans le domaine N-terminal (Y18, Y29, Y197), ou uniquement de la tyrosine présente dans le motif PHF6 (Y310), abolit complètement l'agrégation de Tau et inhibe ses propriétés de liaison aux microtubules et aux lipides (Ait-Bouziad et al., 2020).

L'ensemble de ces résultats indiquent que plusieurs résidus de Tau participent à l'interaction avec les phospholipides. Les domaines R2 et R3 semblent particulièrement critiques pour cette interaction, notamment à travers les motifs PHF6 et PHF6* qui contiennent des résidus clés comme les valines et les tyrosines. Certains de ces résidus, en particulier les lysines basiques, sont également impliqués dans le processus d'agrégation, ce qui rend souvent difficile la distinction entre les interactions avec les lipides et celles conduisant à l'agrégation de la protéine. Le rôle des valines, tyrosines et isoleucines suggère l'existence d'interactions hydrophobes, illustrant la diversité des types d'interaction au sein d'une même région. Cette diversité au sein de motifs courts révèle le rôle potentiel de la structuration de ces domaines. Cette structuration permettrait des interactions variées selon le résidu exposé, influençant ainsi la nature de l'interaction.

5.3. Structuration de Tau au contact des lipides

Tau est une protéine fortement chargée et très soluble, adoptant une structure majoritairement désordonnée avec très peu d'éléments de structure secondaire. Cependant, en présence de partenaires d'interaction tels que des protéines ou des lipides, Tau peut adopter des structurations localisées, éventuellement transitoires. Ces

changements conformationnels significatifs sont souvent observés par dichroïsme circulaire, comme dans les exemples de K19 avec des micelles ou des détergents anioniques (Barré and Eliezer, 2006), ou avec des liposomes de DMPS (Künze et al., 2012).

5.3.1. Feuilletés β

L'une des structures les plus observées de Tau est liée à son agrégation. En présence de cofacteurs anioniques, Tau peut se structurer en feuilletés- β permettant de détecter des événements d'interaction avant même que des structures amyloïdes ne soient observables. Dans une étude portant sur l'interaction d'un fragment de Tau, P2R (Tau198-400, comprenant les domaines P2, R1, R2, R3, R4, R'), avec des vésicules de différentes tailles et compositions, notamment des SUV POPC:POPE:POPS:cholestérol (au ratio molaire 30:25:25:20) par RMN solide, la conversion de la protéine désordonnée vers une structure riche en feuilletés- β a été observée (El Mamméri et al., 2023). En effet, après 2 jours d'incubation de P2R avec les SUVs, peu de pics sont détectables sur les spectres de corrélation carbone-carbone (**Figure I-38A**, gauche), avec seulement les lysines détectées sous forme de feuilletés- β , indiquant une absence de structuration spécifique (*random coil*). En revanche après 6 semaines (**Figure I-38A**, droite), on voit apparaître de nombreux pics, correspond aux résidus sérine, lysine, valine et isoleucine. Les déplacements chimiques associés aux positions des résidus indiquent une structuration sous la forme de feuilletés- β , ce qui est corrélé avec l'apparition de fibres attachées aux vésicules, observées par microscopie électronique à transmission (**Figure I-38B**).

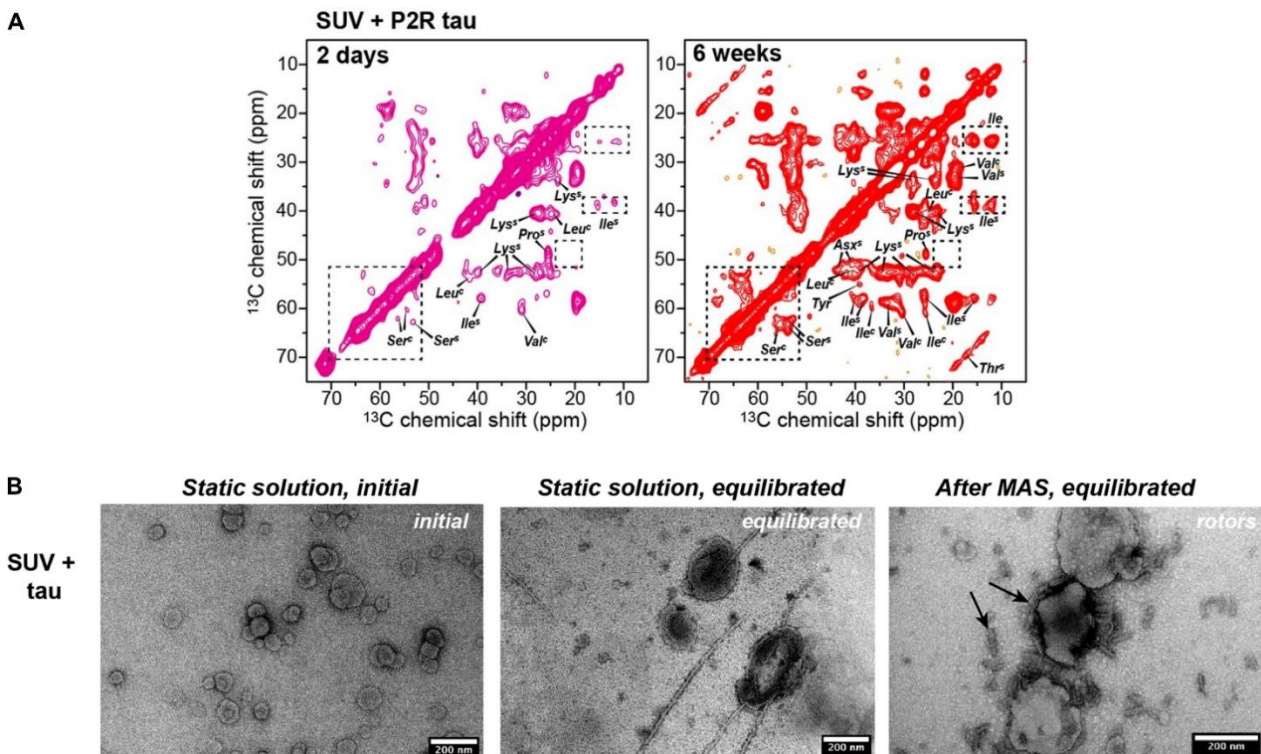


Figure I-38. Spectres de corrélation carbone-carbone de P2R avec les SUV POPC:POPE:POPS:cholestérol (30:25:25:20) après 2 jours et 6 semaines (A). Images de microscopie électronique à transmission de P2R-SUV à l'état initial, après plusieurs semaines d'équilibration (en solution ou dans le rotor après mesure MAS) (B). D'après (El Mamméri et al., 2023).

5.3.2. Hélices α

En plus des feuillets- β observés dans les conditions favorisant l'agrégation, d'autres éléments de structures secondaires ont également été rapportés. En effet, lors de l'interaction avec des micelles ou des vésicules lipidiques, Tau semble capable de former de courtes hélices, souvent transitoires. La première étude à y faire référence s'intéresse à l'interaction de K19 avec des détergents et des micelles anioniques de LPPG, par corrélation RMN solide proton-azote (Barré and Eliezer, 2006). Les déviations des déplacements chimiques des $C\alpha$ par rapport aux valeurs attendues pour l'absence de conformation (*random coil*) montrent trois régions de K19 avec des valeurs positives, généralement attribuées à des hélices α (**Figure I-39**). Les 3 régions hélicoïdales concernent les résidus 253–261, 315–323, et 346–355 (Barré and Eliezer, 2006).

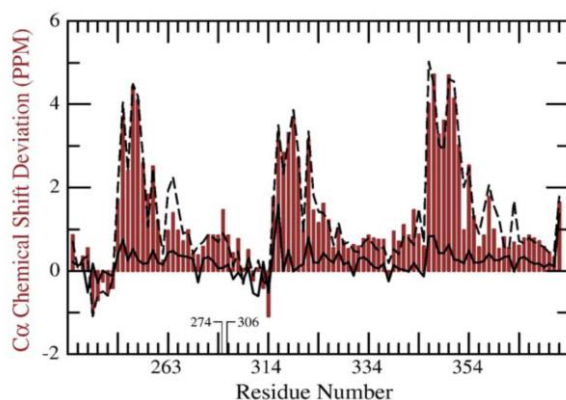


Figure I-39. Déviations des déplacements chimiques des $C\alpha$ par rapport aux valeurs attendues pour une conformation en *random coil*, pour K19 en solution (ligne continue), en présence de SDS (histogramme) ou de micelles LPPG (lignes pointillées) d'après (Barré and Eliezer, 2006).

Par la suite, des études par résonance paramagnétique électronique (RPE) ont été menées sur K19 avec des liposomes POPC:POPS (1:1) (Georgieva et al., 2014). Dans ces expériences, des sondes sensibles à l'environnement sont fixées sur certains résidus protéiques, et leur accessibilité est évaluée. Selon leur exposition au solvant ou leur enfouissement dans la membrane, les résidus interagissent différemment avec l'environnement. Ces interactions permettent de déterminer les paramètres de profondeur (Φ), qui reflètent la position de chaque résidu par rapport à la membrane (**Figure I-40**). Les auteurs ont ainsi identifié trois courtes régions formant des hélices α amphipathiques, avec des résidus hydrophobes orientés vers la membrane et des résidus hydrophiles exposés au solvant. Ces régions concernent les résidus 253–261, 315–323 et 346–355 (Georgieva et al., 2014), identique à la précédente étude RMN (Barré and Eliezer, 2006).

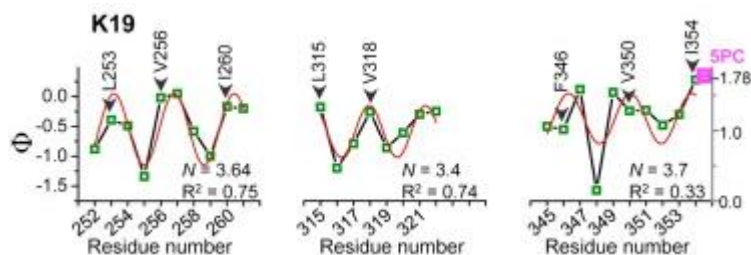


Figure I-40. Dépendance du paramètre de profondeur, Φ , en fonction des résidus marqués pour les hélices 1, 3 et 4, situées dans les domaines de répétitions R1, R3 et R4 de la protéine tau K19. Les données expérimentales (carré vert) ont été modélisées par une fonction cosinus afin d'examiner la périodicité (courbe orange). Figure issue de (Georgieva et al., 2014).

Dans ces hélices, les résidus hydrophobes (L253, V256 et I260 dans l'hélice 1 ; L315 et V318 dans l'hélice 3 ; et F346, V351 et I354 dans l'hélice 4) font face à la surface des liposomes, tandis que les résidus hydrophiles (N255 et S258 dans l'hélice 1 ; S316, T319 et S320 dans l'hélice 3 ; et D348 et S352 dans l'hélice 4) sont exposés au solvant (**Figure I-41a, b**). Ces résultats ont été ultérieurement confirmés par des simulations de dynamique moléculaire (MD), enrichissant ainsi la compréhension de la localisation de K19 et de ses hélices amphipathiques en interaction avec les membranes composées de POPC:POPS (1:1) (MacAinsh and Zhou, 2023). Ces études ont permis d'identifier les résidus impliqués dans des interactions hydrophobes ou électrostatiques, avec les résidus apolaires (valines, leucine, isoleucine, phénylalanine) interagissant avec les chaînes acyles hydrophobes des phospholipides membranaires, tandis que les résidus polaires (lysines, arginines) interagissent avec les têtes polaires anioniques du POPS (**Figure I-41c**) (MacAinsh and Zhou, 2023).

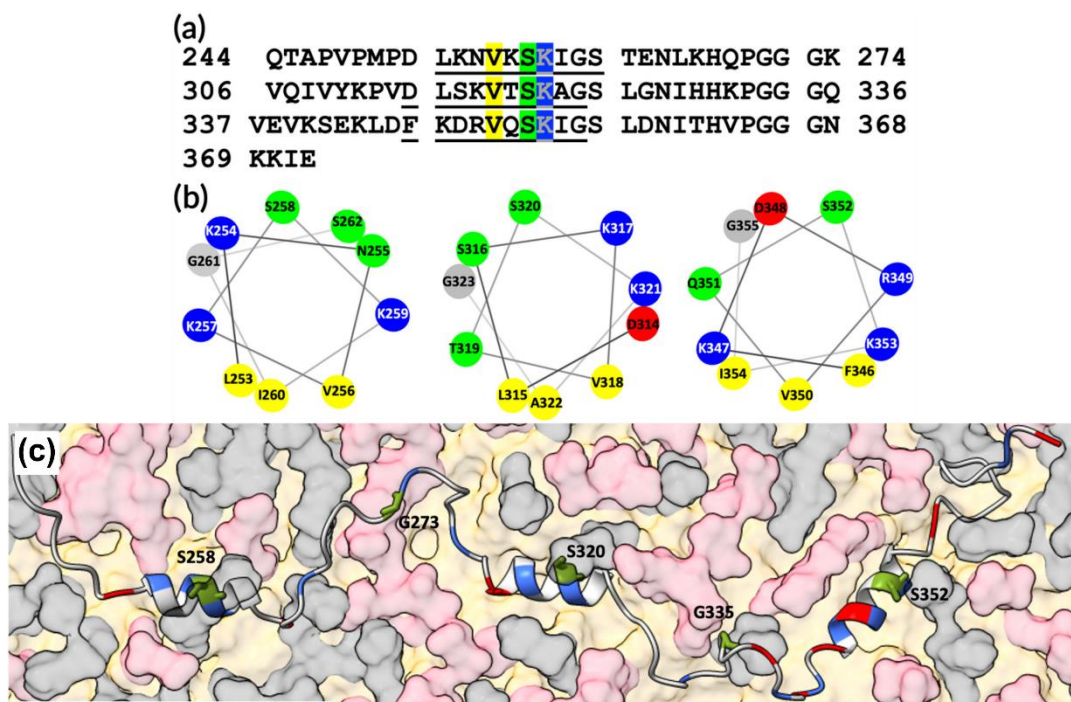


Figure I-41. Séquence (a) et représentation (b) des 3 régions hélicoïdales (253–261, 315–323 et 346–355), précédemment identifiées par RPE (Georgieva et al., 2014). Représentation d'une simulation de dynamique moléculaire (MD), de la protéine tau K19 liée à une membrane POPC:POPS (1:1), en vue du dessus (c). Les têtes polaires de POPC sont grises, celles de POPS sont roses, et les chaînes acyles sont jaunes. Les chaînes latérales des résidus protéiques apolaires, polaires, acides et basiques, sont respectivement jaunes, verts, rouges, et bleus. Modifiés de (MacAinsh and Zhou, 2023).

Ces résultats révèlent ainsi un nouveau type de structuration secondaire de Tau en interaction avec des micelles ou des liposomes, qui pourrait influencer l'impact de l'interaction de la protéine avec les membranes lipidiques.

5.3.3. Compaction, extension

Enfin, sans déterminer de structures précises, des études rapportent une compaction ou une extension de la protéine à la surface de membranes lipidiques (Jones et al., 2012; Yao et al., 2022). En particulier, une étude de transfert d'énergie par résonance Förster en molécule unique (sm-FRET) a montré que Tau avait tendance

à adopter une structure étendue et ouverte (Yao et al., 2022). Dans cette conformation, les domaines N-terminal et C-terminal de la protéine, qui ont tendance à se rapprocher sous forme de pince (“*paperclip*”) en solution (Jeganathan et al., 2006), s'écartent pour exposer le domaine de liaison aux microtubules (MTBR) afin de se fixer à la surface des liposomes de DMPS. Cette ouverture est plus prononcée lorsque les liposomes sont en excès par rapport à la protéine (**Figure I-42**, Tau:DMPS 1 : >100), permettant à Tau de s'étendre complètement à la surface et d'interagir fortement avec les phospholipides. À des concentrations plus faibles de DMPS, les protéines adoptent une structure partiellement étendue qui est propice à l'agrégation (**Figure I-42**, Tau:DMPS 1 : 20), facilitant ainsi la formation d'oligomères et ensuite de fibres amyloïdes (Yao et al., 2022).

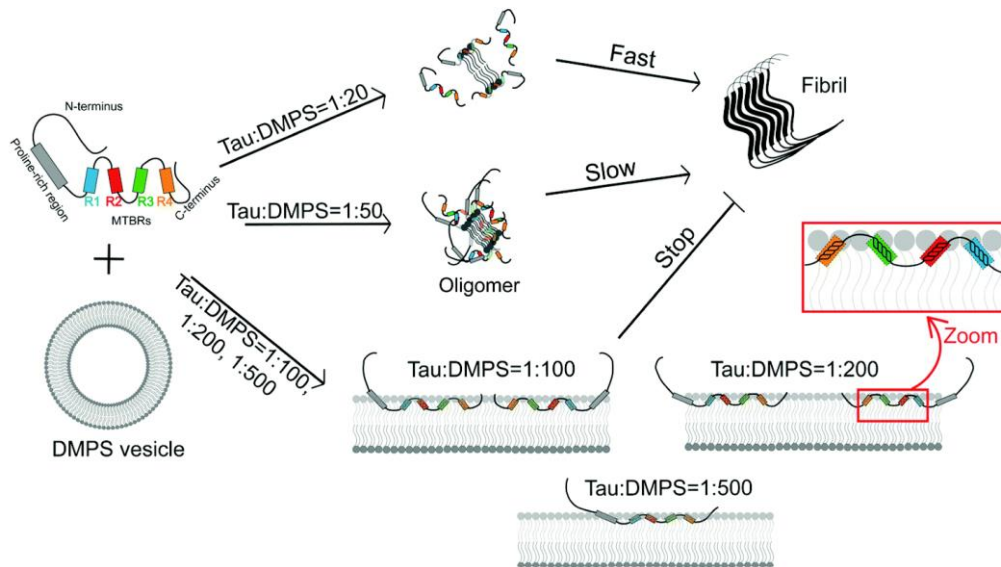


Figure I-42. Modèle proposé par les études de sm-FRET à différents ratios Tau(2N4R)-liposomes DMPS. En excès de protéine (ratios Tau:DMPS de 1:20 à 1:50), Tau adopte une structure partiellement étendue propice à l'agrégation, alors qu'en excès de DMPS, la protéine s'étend complètement à la surface des liposomes (ratios Tau:DMPS au-delà de 1:100), inhibant la formation de fibres amyloïdes. D'après Yao et al. (Yao et al., 2022).

5.4. Impact sur les membranes

Selon les modèles membranaires utilisés, le fragment protéique de Tau, les concentrations, et la méthode d'étude, différents effets de perméabilisation des bicouches lipidiques par Tau sont reportés.

5.4.1. Perturbation des liposomes

La technique de fuite d'une molécule fluorescente (calcéine) encapsulée dans des liposomes est utilisée pour évaluer la perturbation des liposomes en présence de la protéine Tau. Lorsque le fluorophore est encapsulé à haute concentration dans les liposomes, son émission de fluorescence est inhibée. Lorsqu'une protéine interagit avec les liposomes, le fluorophore est libéré et émet une fluorescence mesurable, permettant de déterminer le pourcentage de fuite induite par la protéine.

Cette méthode a été utilisée pour étudier différents fragments et mutants de Tau, ainsi que pour évaluer les effets des compositions lipidiques des liposomes. Des fuites à hauteur de ~70% ont été observées après 1h d'incubation de Tau wt (ON4R) et de liposomes « PM-like + 2% PI(4,5)P₂ » (**Figure I-43**, triangle gris) (Katsinelos et al., 2018), qui contiennent un mélange de lipides représentatifs de la membrane et de PIP₂, un lipide capable d'induire la fibrillation de Tau. Ces résultats indiquent que Tau est capable d'induire une fuite importante de liposomes contenant des phospholipides anioniques, suggérant la présence d'une interaction.

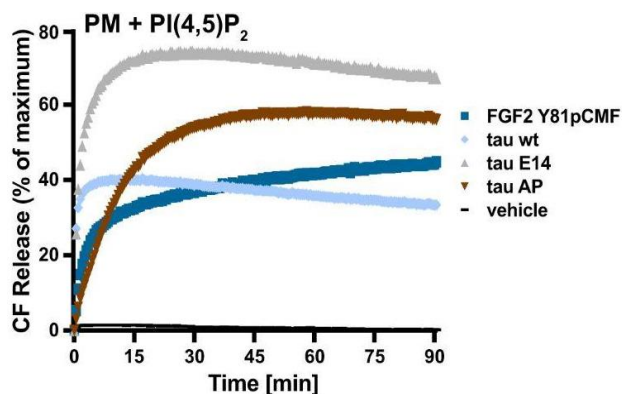


Figure I-43. Mesure de fuite de liposomes LUV « PM-like » composés de 2mol% de PIP₂, induite par Tau(ON4R) sous forme sauvage (tau wt), phosphomimétique (tau E14) ou mutant alanine (tau-AP). Issu de (Katsinelos et al., 2018).

Une autre manière de détecter une perturbation des liposomes après incubation de protéine, est l'observation directe par microscopie électronique (TEM). C'est ainsi qu'Ait-Bouziad *et al.* ont observé la disparition de liposomes de BPS après incubation avec Tau, au profit d'oligomères globulaires composés de protéines et de lipides (**Figure I-44**), dû à l'association de Tau avec ces derniers (Ait-Bouziad et al., 2017). Cette disparition des liposomes BPS se fait dans des conditions qui précèdent la formation de fibres amyloïdes, observée dans les mêmes conditions mais après une incubation plus longue (48h) (Ait-Bouziad et al., 2017).

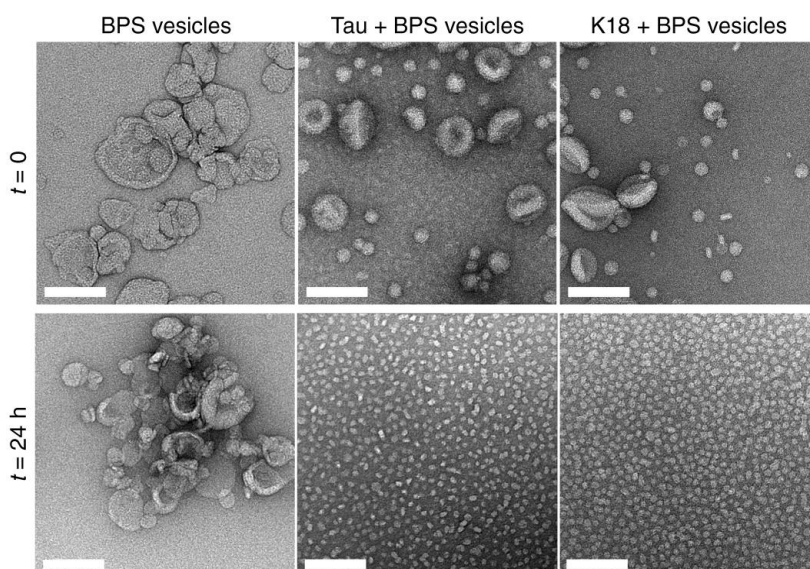


Figure I-44. Images TEM de liposomes BPS seuls (gauche) et après incubation avec Tau (milieu) ou K18 (droite) à t = 0 (haut) ou après 24h (bas). L'échelle est de 100 nm. D'après (Ait-Bouziad et al., 2017).

Les expériences de perturbation ou de disparition des liposomes après incubation avec Tau indiquent une interaction, mais ne précisent pas son type. Pour obtenir des détails sur le mécanisme d'interaction, d'autres techniques ont été utilisées, révélant divers aspects de ce processus.

5.4.2. Insertion

Un des premiers mécanismes de perturbation observés est l'insertion de Tau dans la bicouche lipidique. Künze et al. ont étudié cette insertion pour le fragment K19 dans des liposomes mixtes DMPC:DMPS (4:1) ainsi que dans des liposomes purement anioniques DMPS en utilisant la RMN du deutérium (RMN ^2H) (Künze et al., 2012). Les résultats montrent que, dans des liposomes DMPC:DMPS (4:1), la présence de K19 n'affecte pas significativement l'ordre des chaînes acyles des phospholipides, indiquant que le peptide pénètre peu dans la bicouche lipidique (**Figure I-45a**). En revanche, dans des liposomes entièrement anioniques DMPS, cet ordre diminue fortement (**Figure I-45b**). Cette diminution indique une réduction de la densité et une augmentation de l'aire par molécule de DMPS, ce qui suggère une insertion du peptide plus importante dans les membranes anioniques, que dans les mixtes.

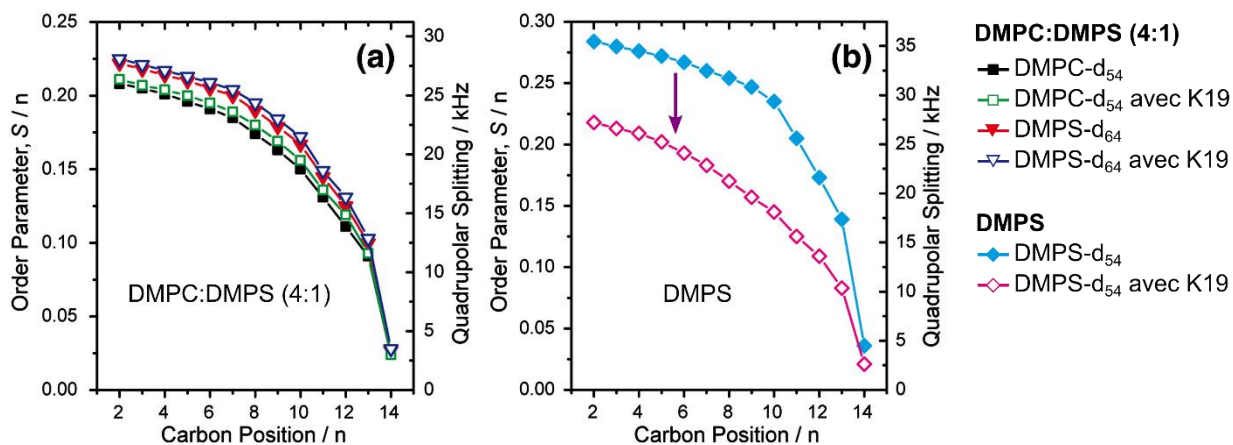


Figure I-45. Paramètres d'ordre ^2H NMR des groupes méthylènes des lipides de DMPC:DMPS (4:1) (a) et de DMPS (b) en l'absence et en présence de 2 mol% de tau K19. Profils des paramètres d'ordre pour DMPC-d₅₄ et DMPS-d₆₄, avec et sans K19. Modifié de (Künze et al., 2012).

L'étude du peptide P2R, qui comprend les domaines P2 et l'ensemble du MTBR, en présence de différentes vésicules lipidiques par RMN solide (méthode HETCOR corrélation proton-carbone ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$)) suggèrent une interaction avec les têtes polaires mais pas d'insertion dans les chaînes acyles hydrophobes des phospholipides (El Mammeri et al., 2023). Les auteurs n'ont observé aucune corrélation entre les ^{13}C protéiques et les ^1H des chaînes acyles dans les liposomes (SUV, LUV et MLV composés d'un mélange POPC:POPE (38:31:31)) (**Figure I-46**), ce qui indique que Tau est associée à l'interface membrane-eau sans s'insérer profondément dans les chaînes lipidiques hydrophobes (El Mammeri et al., 2023).

D'autres mécanismes d'interaction ont également été rapportés, ajoutant à la diversité des modes d'interaction observés.

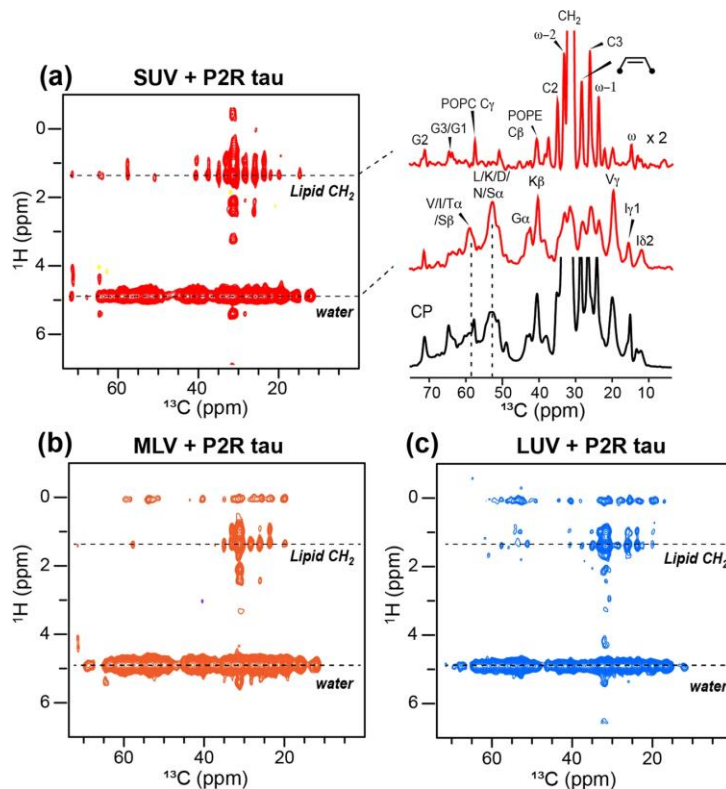


Figure I-46. Spectres 2D ^1H - ^{13}C HETCOR de Tau (P2R) lié à des SUV (a), à des MLV (b) et à des LUV (c) de composition POPC:POPE:POPS (38:31:31). Sections des spectres ^{13}C de Tau (P2R) avec SUV aux déplacements chimiques CH_2 des lipides et ^1H de l'eau (à droite). Aucune corrélation entre le ^{13}C des protéines et le ^1H des chaînes acyles lipidiques n'est observée dans ces membranes. Issu de (El Mammeri et al., 2023).

5.4.3. Formation de pores

Une seule étude fait référence à la formation de pores dans des bicouches lipidiques en présence de Tau. Patel et al. ont utilisé des mesures de conductivité couplées à la microscopie à force atomique (AFM) pour tester l'existence de canaux au sein de la bicouche, pouvant être responsables d'un autre type de perméabilisation membranaire (Patel et al., 2015). Dans leur étude, ils ont mesuré une conductivité dans une bicouche POPC:POPG (2:1) avant et après addition de la protéine Tau (2N4R), révélant l'existence d'une conductivité après l'injection de la protéine (**Figure I-47**, gauche). Ces résultats indiquent la présence possible de pores dans la bicouche POPC:POPG (2:1) formés par Tau laissant passer les ions. L'imagerie AFM, quant à elle, suggère également la présence de structures similaires après dépôt d'une solution de protéoliposomes, issue de l'incubation de Tau et de liposomes de DOPS (au ratio 1:100). Ces structures sont décrites comme ayant 4 à 5 sous-unités et une protrusion de 1,5 à 1,8 nm au-dessus de la bicouche DOPS (**Figure I-47**, droite) (Patel et al., 2015).



Figure I-47. Conductances hétérogènes de canaux ioniques uniques dans une bicouche POPC:POPG (2:1) en conditions acides après incubation de Tau(2N4R), indiquant la formation de plusieurs structures avec différentes conductances de canaux uniques (à gauche). Structure annulaire ressemblant à un canal ionique ("pore-like") observée par AFM haute résolution après incubation de Tau sur une bicouche supportée de DOPS (à droite). D'après (Patel et al., 2015).

Les insertions ou la formation de pores sont des mécanismes susceptibles de conduire à une perméabilisation membranaire. D'autres études ont également mis en évidence des perturbations significatives de certaines compositions membranaires, notamment par des processus de solubilisation.

5.4.4. Solubilisation

Les phénomènes de solubilisation des bicouches lipidiques sont des perturbations membranaires importantes, dans lesquelles on observe une destruction de la membrane. Ce type de perturbation a également été reporté après incubation de Tau sur des modèles membranaires spécifiques.

En particulier, des expériences de réflectométrie neutronique (NR) ont été effectuées entre Tau (2N4R) et des bicouches de DMPG ou DPPC. Les résultats montrent une disparition totale des signaux de densité électronique des neutrons dans les bicouches de DMPG après l'ajout de Tau (**Figure I-48**). Cela indique que Tau (2N4R) perturbe de manière significative les bicouches de DMPG, tandis que les bicouches composées de DPPC restent intactes (Jones et al., 2012).

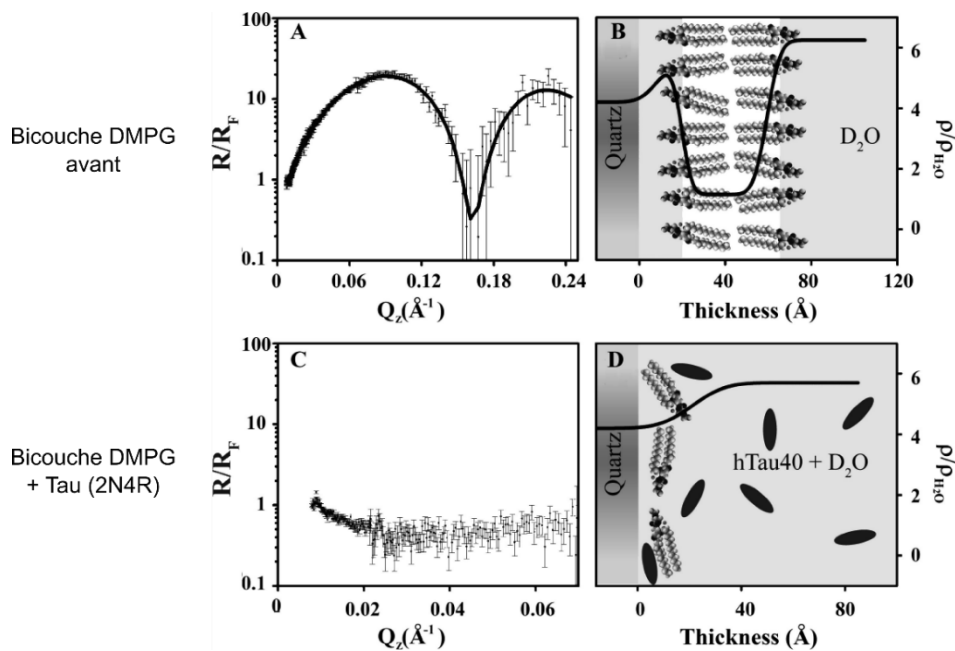


Figure I-48. Réflectivité neutronique normalisée de Fresnel (R/R_F) (A, C) et profils de densité de diffusion (B, D) pour une bicouche lipidique de DMPG avant (A, B) et après (C, D) l'ajout de la protéine Tau(2N4R). Modifié de (Jones et al., 2012).

De leur côté, dans l'objectif de mieux comprendre l'impact de Tau sur différentes organisations et compositions membranaires, Azouz et al. ont incubé le fragment K18 de la protéine Tau avec divers modèles membranaires à une concentration de $1 \mu\text{M}$ (**Figure I-49**), et ont observé l'évolution de la morphologie des bicouches par imagerie AFM. Sur les bicouches POPC, DOPC:DPPC (1:1), DOPC:DPPC:cholestérol (1:1:1), POPC:POPS (4:1), et POPC:PIP₂ (4:1), les auteurs ont observé d'importantes perturbations membranaires, allant jusqu'à la solubilisation partielle ou complète des membranes après fragmentation. Sur la bicouche DOPC:DPPC, seul le domaine DOPC a été solubilisé (**Figure I-49D**), tandis que sur la bicouche POPC:PIP₂, un affinement de la membrane a été noté (**Figure I-49J**), suggérant une déplétion lipidique équivalente à celle d'une monocouche (Azouz et al., 2021).

Les bicouches ont été solubilisées à des moments différents : la perturbation de la bicouche POPC a été observée après seulement 1h (**Figure I-49B**), celle de DOPC:DPPC après environ 3h (**Figure I-49D**), celle de DOPC:DPPC:cholestérol après seulement 30 minutes (**Figure I-49F**), celle de POPC:POPS après 1h15 (**Figure I-49H**), et celle de POPC:PIP₂ après 1h20 (**Figure I-49J**). Ces variations temporelles semblent indiquer une interaction différente en fonction de la composition lipidique.

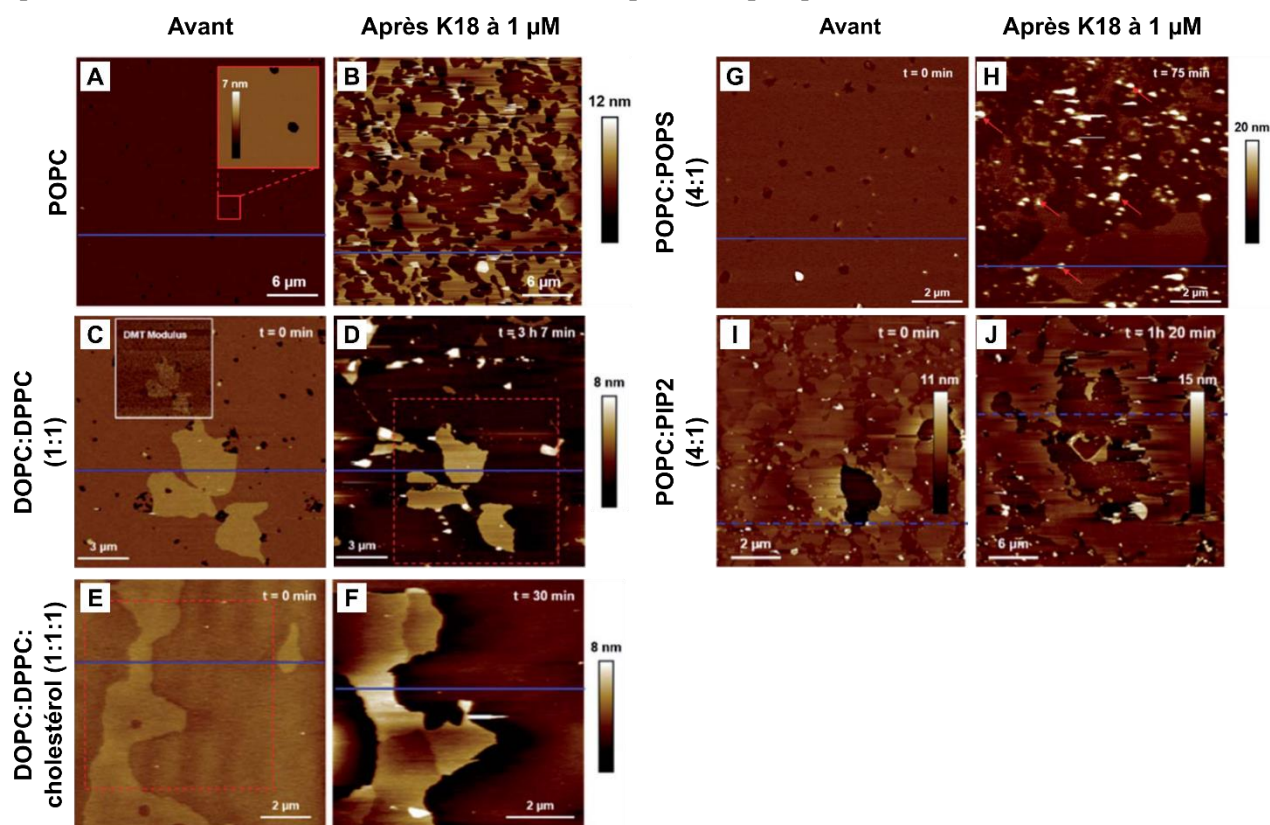


Figure I-49. Images AFM de différentes bicouches avant (gauche) et après incubation (droite) de K18 à $1 \mu\text{M}$. Bicouches : POPC (A, B) ; DOPC:DPPC (1:1) (C, D) ; DOPC:DPPC:cholestérol (1:1:1) (E, F) ; POPC:POPS (4:1) (G, H) ; POPC:PIP₂ (4:1) (I, J). Modifié de (Azouz et al., 2021).

L'ensemble de ces résultats met en évidence la diversité des perturbations membranaires induites par la protéine Tau ou ses fragments. Ces perturbations varient en fonction des méthodes expérimentales, des conditions spécifiques, du type de protéine (fragments ou entière), de la nature des lipides, du modèle membranaire employé et des concentrations utilisées.

5.4.5. Assemblage et accumulation

En plus des perturbations, Tau peut également s'assembler et/ou s'accumuler à différents niveaux de la membrane. Dans l'étude de Patel et al. mentionnée précédemment, les auteurs décrivent des structures autres que les canaux ioniques ou les pores. Après avoir déposé une solution de protéoliposomes contenant Tau (2N4R) et DOPS au ratio 1:100 sur du mica, ils ont observé divers types de dépôts de la protéine sur la bicouche (Patel et al., 2015). Par AFM, des monomères ainsi que des oligomères globulaires ont été identifiés (**Figure I-50**). L'imagerie en mode tapping à haute résolution a révélé des agrégats globulaires d'un diamètre de $14,6 \pm 4,4$ nm et d'une hauteur de $4,33 \pm 1,68$ nm (Patel et al., 2015).

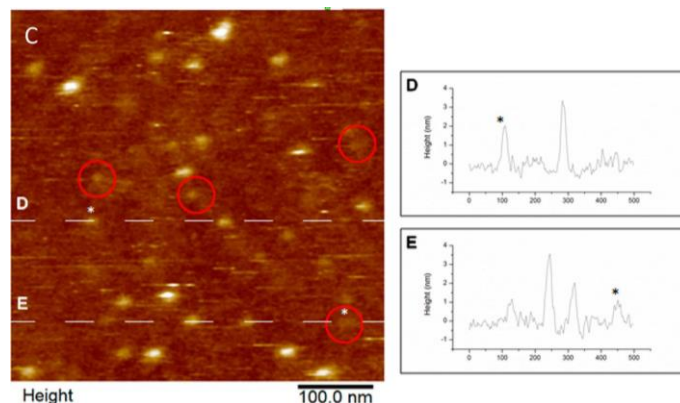


Figure I-50. Images AFM après dépôt d'une solution de protéoliposomes à un ratio Tau(2N4R) : DOPS de 1:100. Un dépôt de monomères et d'oligomères globulaires sont visibles sur la bicouche, dont une section transversale est présentée (D, *), ainsi que des structures sous forme de pores (section transversale E, *). Issue de (Patel et al., 2015).

Les oligomères (ainsi que les pores) décrits dans l'étude précédente sont observés après une pré-incubation de Tau avec des solutions lipidiques, ce qui ne permet pas de visualiser directement les effets de l'ajout de la protéine sur une bicouche lipidique. Pour pallier cette limitation, d'autres recherches ont examiné l'impact de Tau sur une bicouche supportée, formée par fusion de solutions lipidiques sur du mica. Mari et al. ont étudié ce phénomène en injectant Tau (2N4R) sur une bicouche constituée d'extraits totaux lipidiques de cerveaux (BTE, composition indiquée en **Figure I-51C**), puis en observant les effets par AFM (Mari et al., 2018). Ils ont observé des patches d'agrégats qu'ils attribuent à la protéine Tau, qui se déposent sur la bicouche même à une faible concentration protéique de 100 nM. Ces agrégats s'assemblent rapidement, recouvrant environ 20% de la surface de la bicouche en une minute (**Figure I-51A**). À une concentration plus élevée de 300 nM, l'assemblage est similaire, mais la surface couverte augmente, atteignant plus de 60% après 90 minutes (**Figure I-51B**).

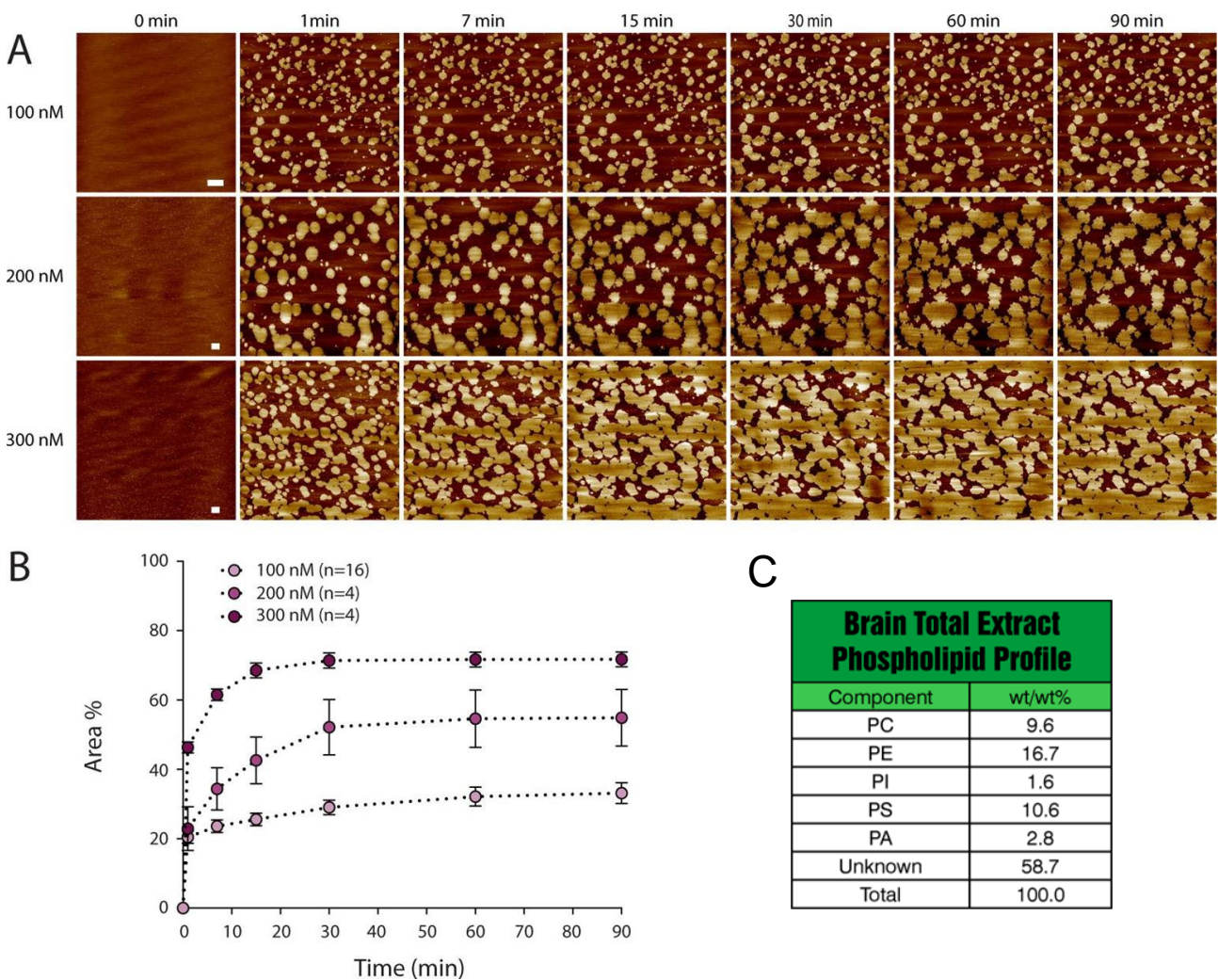


Figure I-51. Séquence d'images AFM d'une bicouche lipidique composée d'un extrait lipidique de cerveau après addition de Tau (2N4R) à différentes concentrations (100 nM, 200 nM, 300 nM) (A). Surfaces couvertes par le dépôt des patches sur les bicouches pour chaque concentration au cours du temps (B). Composition de l'extrait lipidique de cerveau issu du fournisseur Avanti (C). Modifié de (Mari et al., 2018).

Une observation à haute résolution de ces patches déposés sur la surface de la bicouche révèle des structures hétérogènes (**Figure I-52**). Les tailles des structures sont irrégulières, avec des zones peu épaisses mesurant $0,78 \pm 0,15$ nm, dépourvues de structure particulière, et des régions plus élevées présentant des formes globulaires ou allongées, avec une hauteur moyenne de $2,28 \pm 0,21$ nm (Mari et al., 2018).

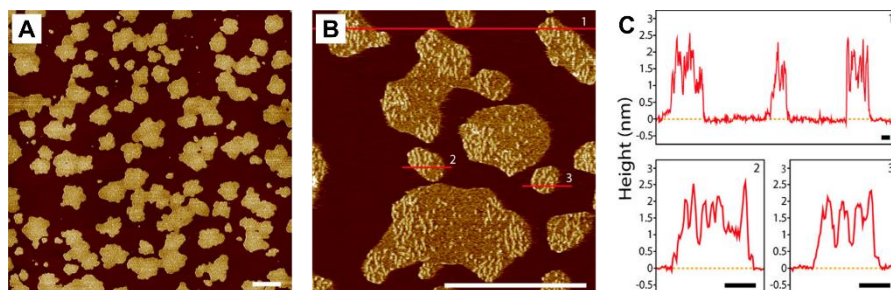


Figure I-52. Images AFM d'une bicouche supportée de TBE (extraits de cerveaux totaux) après incubation de Tau (2N4R) à 100 nM après 1h20 (A, B). Profils de hauteurs (C) des sections 1, 2 et 3 de l'image (B). La barre d'échelle est de 1 μ m (A, B) et de 100 nm (G), et celle de hauteur de 4,3 nm (A, B). Modifié de (Mari et al., 2018).

Les bicouches supportées utilisées par Mari et al. sont constituées d'un mélange de différents lipides. Une étude ultérieure de Azouz et al. s'est intéressée à des modèles membranaires simplifiés, et met en évidence d'autres types d'accumulation sur les bicouches en fonction des compositions.

Sur des bicouches DOPC:DPPC (1:1), les auteurs indiquent la présence d'épaississements d'environ 5 nm sur les domaines DPPC, après ~ 6h d'incubation à 1 μ M du fragment K18 (**Figure I-53**) (Azouz et al., 2021).

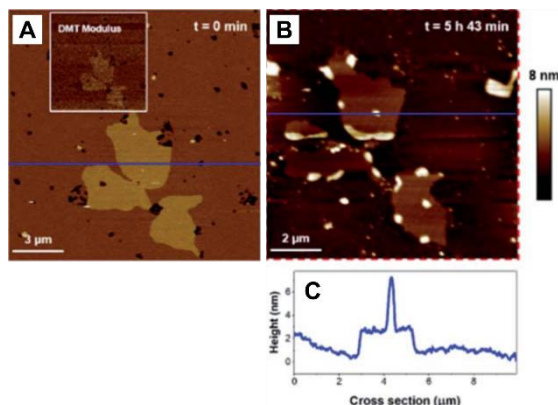


Figure I-53. Images AFM d'une bicouche DOPC:DPPC avant (A) et après (B) incubation de K18 à 1 μ M pendant environ 6h. Le profil de hauteur (C) correspond à la section en (B). Modifié de (Azouz et al., 2021).

Sur des bicouches POPC:POPS (4:1), les auteurs observent de larges agrégats d'épaisseurs variés, de la même manière que l'étude de Mari et al., cependant ces derniers possèdent des épaisseurs importantes et hétérogènes, d'environ 7 et 17 nm (**Figure I-54**) (Azouz et al., 2021).

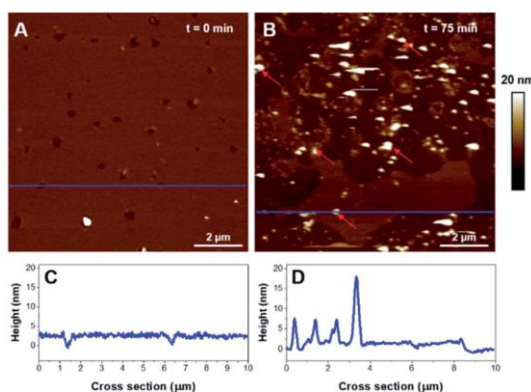


Figure I-54. Images AFM d'une bicouche POPC:POPS (4 :A) avant (A) et après (B) incubation de K18 à 1 μ M pendant 1h15. Les profils de hauteurs (C, D) correspondent respectivement aux sections des images (A, B). D'après (Azouz et al., 2021).

Enfin, l'incubation de K18 sur une bicouche POPC:PIP2 (4:1) révèle la formation de types d'agrégats plus structurés, avec des patches plats, ressemblant aux structures décrites par Mari et al., bien que plus épaisses (**Figure I-55A**), et des filaments qui semblent provenir de ces patches (**Figure I-55B**) (Azouz et al., 2021). Ces filaments ont une épaisseur d'environ 10 nm et pourraient correspondre à des fibres amyloïdes, le PIP2 ayant été rapporté comme capable d'induire la fibrillation de Tau (K18) (Talaga et al., 2018).

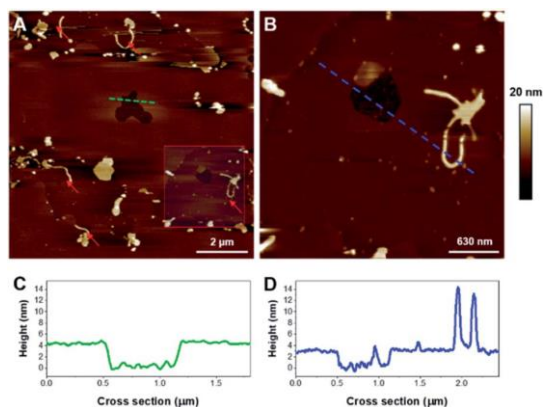


Figure I-55. Images AFM d'une bicouche POPC:PIP2 (4:1) après incubation de K18 à 1 μ M pendant 6h. (B) correspond à un zoom de la zone encadrée par un carré rouge sur (A). Les profils de hauteurs (C, D) correspondent respectivement aux sections des images (A, B). D'après (Azouz et al., 2021).

Ces résultats démontrent la variété de structures induites par l'incubation de la protéine Tau (ou de ses fragments) sur les membranes en fonction des compositions membranaires.

5.5. Conclusion sur l'impact de Tau sur les membranes lipidiques

La littérature examinée met en évidence l'impact varié de la protéine Tau sur les membranes lipidiques modèles (monocouches ou bicouches), incluant des perturbations, insertions, formation de pores, solubilisation, ainsi que divers assemblages et accumulations structurés et non structurés.

Les résultats obtenus sont souvent difficiles à comparer avec l'utilisation de différents types de modèles (liposomes, monocouches, bicouches supportées), des compositions différentes et des rapports de concentrations protéine/lipide différents. Les structures apparentes observées par AFM comme des pores (Patel et al., 2015) pourraient expliquer les fuites de fluorophore observées dans les liposomes (Katsinelos et al., 2018). En revanche, les résultats obtenus avec des bicouches et monocouches DMPC montrent des effets de perméabilisation qui diffèrent de la simple formation de canaux, incluant davantage d'insertion, d'invagination (Fanni et al., 2019), voire de destruction par solubilisation (Azouz et al., 2021; Jones et al., 2012). Ces effets varient également en fonction du fragment de Tau et des types de phospholipides utilisés.

De plus, à des concentrations élevées, l'agrégation de Tau en présence de lipides anioniques semble introduire une variabilité supplémentaire, en modifiant l'impact observé et en créant différentes espèces à la surface des lipides (monomères, oligomères, fibres amyloïdes). Cette variabilité complique l'établissement d'une conclusion générale sur la nature et l'ampleur des perturbations induites par Tau, en particulier en ce qui concerne la perte de lipides à l'échelle de la bicouche dans des conditions physiologiques. De plus peu d'études décrivent l'état de structuration de la protéine Tau au contact des différents modèles membranaires.

6. Objectifs de la thèse

Les objectifs de cette thèse s'articulent autour de deux axes principaux.

(i) Dans un premier temps, nous étudierons l'agrégation de la protéine Tau *in vitro* en présence de divers cofacteurs anioniques, connus pour favoriser sa fibrillation. Les questions posées sont les suivantes : l'agrégation de Tau est-elle similaire en présence de chacun de ces cofacteurs ? À quel type de mécanisme cette agrégation correspond-elle ? Enfin, les fibres générées présentent-elles des similitudes structurelles ou morphologiques ? Bien que l'intégration des cofacteurs dans les fibres amyloïdes ne soit pas directement confirmée, nous nous demanderons si l'incorporation de phospholipides dans la structure des fibres pourrait affecter les structures membranaires, constituées en majorité de phospholipides.

(ii) Le second axe est dédié à l'analyse des effets de Tau sur des modèles de membranes composées de phospholipides. Nous utiliserons des membranes anioniques, en particulier de phosphatidylsérine (PS), qui est abondante dans les membranes neuronales internes, lieu d'agrégation de Tau, ainsi que des membranes de phosphatidylcholine (PC) zwitterioniques, pour observer les effets de Tau sur des membranes dépourvues de charges et présentant des fluidités variables.

Pour répondre à ces objectifs, plusieurs techniques biophysiques seront employées (détaillées en fin de manuscrit dans la section **Matériel & Méthodes**, p.189). Afin de suivre l'agrégation de Tau, nous réaliserons des expériences d'émission de fluorescence à la Thioflavine T sur la protéine Tau-WT et son mutant pathogène Tau-P301L en présence de différents cofacteurs : l'héparine, plusieurs types d'ARN polynucléotidiques, ainsi que les phospholipides POPS et DOPS. La formation de fibres amyloïdes sera confirmée par microscopie électronique à transmission, ainsi que par microscopie à force atomique (AFM) en milieu liquide. L'impact de Tau sur les modèles membranaires lipidiques sera ensuite évalué par différentes approches : des tests de fuite sur liposomes pour évaluer les effets de Tau sur la perméabilité des vésicules ; la spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) en mode polarisé pour quantifier les lipides restants à la surface du cristal après incubation, examiner une potentielle insertion ou accumulation protéique, et évaluer une éventuelle structuration de la protéine ; la méthode de résonance plasmonique de surface par ondes guidées (PWR) pour mesurer la force d'interaction entre Tau et une bicouche de POPS ; et enfin la microscopie à force atomique (AFM) pour une visualisation en temps réel et à l'échelle nanométrique des effets de Tau sur les différentes bicouches.

Ces travaux visent à approfondir la compréhension des mécanismes d'agrégation de Tau et de ses interactions avec les membranes, avec des implications potentielles pour les pathologies associées.



CHAPITRE 2

Table des matières

Introduction	75
<hr/>	
Résultats	76
Production et purification de la protéine Tau	76
Agrégation en présence d'héparine	78
Agrégation en présence d'ARN	81
Agrégation en présence de lipides	89
Comparaison entre cofacteurs	95
<hr/>	
Discussion	98
<hr/>	
Conclusion	108



Chapitre 2. Inducteurs de l'agrégation de la protéine Tau

1. Introduction

La production de fibres de Tau *in vitro* est essentielle pour mieux comprendre son mécanisme d'agrégation. Cependant, il est difficile de produire ces fibres par auto-association en l'absence de cofacteurs, ces derniers facilitant la nucléation, une étape limitante de l'agrégation. La protéine Tau est globalement chargée positivement, avec une charge globale nette de + 2, et une concentration importante d'acides aminés basiques dans son domaine de liaison aux microtubules (MTBR), dont la charge est de + 10. Les cofacteurs utilisés pour induire son agrégation sont donc des polyanions.

L'héparine sulfate, un polysaccharide, a été le premier cofacteur couramment utilisé pour induire l'agrégation de la protéine Tau (Goedert et al., 1996). Son intérêt réside également dans son implication biologique, l'héparine ayant été identifiée comme une cible pour la sécrétion de Tau à travers la membrane plasmique (Katsinelos et al., 2018; Merezhko et al., 2020). Bien que les fibres Tau-héparine soient souvent utilisées pour mimer les fibres pathogènes de type PHF/SF retrouvées dans les enchevêtrements neurofibrillaires associés à la maladie d'Alzheimer, elles sont hautement polymorphiques et leurs structures diffèrent des fibres *in vivo* (Fitzpatrick et al., 2017; Zhang et al., 2019).

D'autres polyanions tels que les ARN (Kampers et al., 1996) et les lipides (Chirita et al., 2003) ont également été utilisés pour induire l'agrégation de la protéine Tau. Les ARN présentent un intérêt particulier, car la protéine Tau est impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'ADN génomique et des ARN nucléaires et cytoplasmiques au sein du noyau (Wang and Mandelkow, 2016). Les lipides sont très abondants dans les membranes plasmiques auxquelles Tau peut s'associer (Brandt et al., 1995), jouant potentiellement un rôle dans sa sécrétion (Katsinelos et al., 2018; Merezhko et al., 2020) ou comme centres de nucléation (Chirita et al., 2003). En outre, ces deux cofacteurs ont été colocalisés avec des fibres amyloïdes extraites des cerveaux de patients atteints de tauopathies (Gellermann et al., 2006; Ginsberg et al., 1997). Des études *in vitro* semblent indiquer que ces cofacteurs sont intégrés dans les fibres amyloïdes, car la dégradation des cofacteurs (par héparinase ou RNase) entraîne la dissociation des fibres (Fichou et al., 2019; Zwierzchowski-Zarate et al., 2022).

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur des formes tronquées de la protéine Tau mais peu sur la protéine entière. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la capacité de différents cofacteurs (héparine, ARNs, lipides) à induire l'agrégation de la protéine Tau entière. L'agrégation de la protéine Tau est suivie par émission de fluorescence de la Thioflavine T (ThT), qui se lie spécifiquement aux structures en feuillets- β , caractéristiques des fibres amyloïdes (Biancalana and Koide, 2010) et est donc un marqueur de la fibrillation. Pour confirmer ou infirmer la présence de fibres amyloïdes, les échantillons sont ensuite observés par microscopie électronique à transmission (TEM) et leur morphologie est déterminée par microscopie à force atomique (AFM) en milieu liquide.

2. Résultats

2.1. Production et purification de la protéine Tau

La première étape de ce projet de thèse s'est concentrée sur la production de différentes constructions de la protéine Tau. Les plasmides ainsi que les protocoles étaient déjà établis et disponibles (voir section **Matériel & Méthodes** et (Fichou et al., 2019)). Dans cette étude, nous avons choisi de nous focaliser sur l'isoforme le plus long, 2N4R, composé de 441 acides aminés et d'une masse d'environ 48 kDa, car plus pertinente biologiquement que des fragments plus courts.

La **Figure II-1** présente la séquence de la protéine Tau (2N4R) avec ses différents domaines, avec pour référence le fragment K18, qui ne comprend que les 4 domaines de répétition (R1-R4). La construction protéique des protéines Tau (2N4R) présente un His-Tag nécessaire à la purification en N-terminal de la protéine. Les deux seules cystéines, impliquées dans le repliement physiologique et pathologique de Tau, sont situées respectivement dans les domaines R2 (position 291) et R3 (position 322).

La mutation P301L, correspondant au remplacement d'une proline par une leucine en position 301, est la mutation la plus fréquente du gène MAPT codant pour la protéine Tau. Cette mutation est directement liée à une sous-famille de démences, les démences fronto-temporales avec parkinsonisme associé au chromosome 17 (FTDP-17). Nous avons choisi de nous intéresser à la forme sauvage (WT) de Tau(2N4R), ainsi qu'au mutant P301L de cette même isoforme dans ce projet de thèse, ci-après référencés Tau-WT et Tau-P301L.

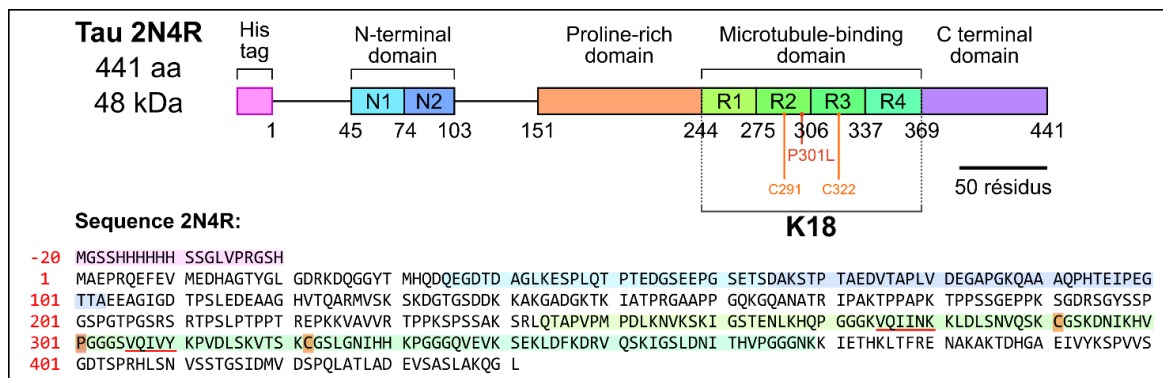


Figure II-1. Représentation des domaines de l'isoforme 2N4R de la protéine Tau, indiquant la localisation du His-tag utilisé dans le projet, ainsi que des deux cystéines natives (impliquées dans le repliement de Tau) et de la mutation P301L. Le fragment K18 est également représenté, accompagné de la séquence d'acides aminés de 2N4R, avec les éléments suivants : le His-tag, les domaines N-terminaux, les domaines de répétition, les séquences PHF6 et PHF6* soulignées en rouge (impliquées dans la formation du cœur amyloïde), ainsi que la position de la mutation P301L et des cystéines natives.

2.1.1. Etapes de production et purification

En raison de la grande variabilité entre les lots protéiques et de la nécessité d'assurer la reproductibilité des expériences *in vitro*, la majorité des expériences présentées dans ce manuscrit sont réalisées à partir d'un seul lot protéique, sauf mention contraire. Nous présenterons les résultats de la production et de la purification de ce lot protéique, produit en quantité suffisante pour les expériences du projet, et conservé sous la forme de

Chapitre 2. Inducteurs de l'agrégation de la protéine Tau

fractions congelées à -20°C . Une représentation schématique des principales étapes de production et de purification est présentée **Figure II-2**.

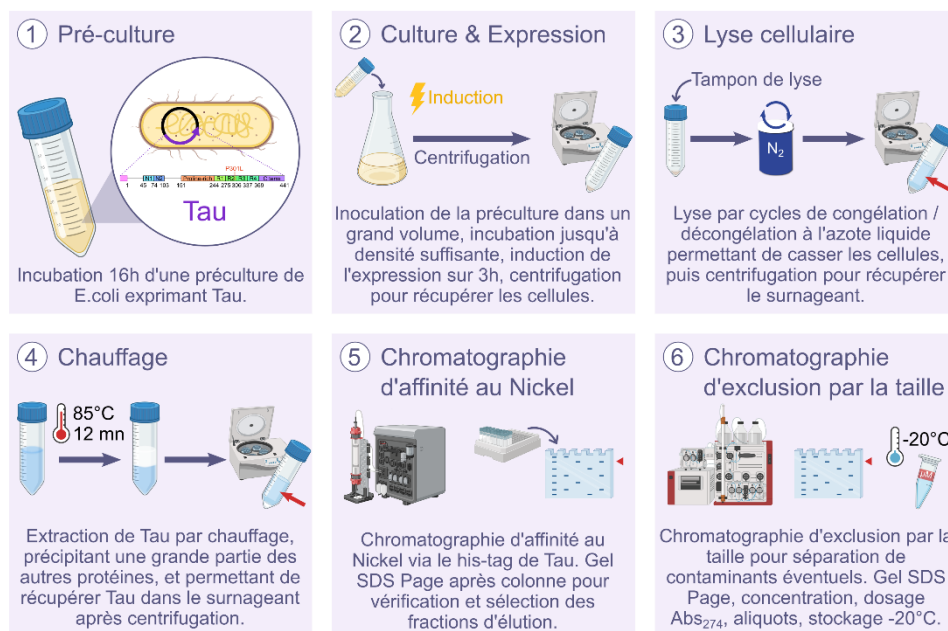


Figure II-2. Schéma des principales étapes de production et purification de la protéine Tau(2N4R). La production débute par une pré-culture de colonies bactériennes transformées avec un plasmide codant pour Tau(2N4R) avec un His-tag en N-terminal (1). Cette pré-culture est ensuite utilisée pour inoculer une culture plus grande, dans laquelle l'expression de la protéine est induite pendant 3 heures après avoir atteint la phase stationnaire (2). Les cellules sont récoltées par centrifugation, puis lysées par choc thermique à l'azote liquide (3). Une étape de chauffage à 85°C permet de précipiter les protéines autres que Tau, qui reste dans le surnageant (4). La protéine est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur Nickel, suivie d'une sélection des fractions par SDS-PAGE (5). Une seconde chromatographie d'exclusion par taille élimine les contaminants restants (6). La pureté est vérifiée par SDS-PAGE avant le regroupement, la concentration, et le stockage des fractions à -20°C .

Les colonies bactériennes (*Escherichia coli* BL21 DE3) contenant les plasmides pet28 codant pour les protéines Tau-WT et Tau-P301L, taguées en N-terminal par une histidine, ont été fournies par Yann Fichou (CBMN, CNRS Bordeaux) et sont stockées sous forme de stocks glycérol à -80°C . Pour le lot protéique utilisé dans la majorité des expériences de ce manuscrit, les protéines Tau-WT et Tau-P301L ont été produites à partir de 2 L de milieu de culture. Afin d'éviter la saturation des colonnes de chromatographie et d'optimiser la purification, seul 1 L de culture est purifié à la fois, avant regroupement des fractions pour le stockage.

2.1.2. Résultats de la purification

La production et la purification des deux lots protéiques Tau-WT et Tau-P301L ont permis d'obtenir un total d'environ 4,9 et 13,6 mg de protéine, à partir de respectivement 1 L et 2 L de culture (**Tableau II-1**).

Protéine	A274	Concentration (μM)	Concentration (mg/ml)	Volume total (μl)	Quantité (mg)	Rendement (mg/L de culture)
Tau(2N4R)-WT	2,55	340	16,3	300	4,9	4,9
Tau(2N4R)-P301L	2,12	283	13,6	1000	13,6	6,8

Tableau II-1. Résultats de purification des protéines Tau-WT et Tau-P301L. Les concentrations sont calculées à partir de la valeur de l'absorbance à 274 nm (ϵ à $7500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, et un poids moléculaire de 48 kDa).

Chapitre 2. Inducteurs de l'agrégation de la protéine Tau

Les gels SDS-PAGE (**Figure II-3**) montrent une pureté plus élevée pour la protéine Tau-WT par rapport à P301L, qui montre la présence de quelques contaminations. Cependant nos études ne nécessitant pas une pureté importante (contrairement à des études structurales), nous avons utilisé ces lots protéiques pour les études ultérieures. Les fractions sont stockées à -20°C et ne sont décongelées qu'au moment de l'utilisation. Après prélèvement, elles sont soit recongelées immédiatement, soit conservées à 4°C pour un maximum de 2 semaines afin de limiter la dégradation.

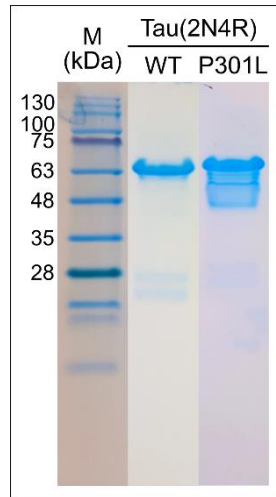


Figure II-3. Gel SDS Page Tris-tricine à 13% d'acrylamide des fractions finales après purification de Tau-WT et Tau-P301L. La protéine Tau, bien qu'ayant un poids moléculaire de 48 kDa, migre à des poids moléculaires plus élevés du fait de sa densité de charges importante. La piste M (kDa) contient le marqueur de poids moléculaire.

2.2. Agrégation en présence d'héparine

Une fois les protéines purifiées, nous avons évalué leur capacité d'agrégation avec l'héparine (dont la structure est présentée **Figure II-4**) par méthode de fluorescence à la ThT. Pour cela, les deux protéines ont été incubées avec l'héparine à un ratio 4:1 (20 μM protéine, 5 μM héparine), dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 μM ThT, à 37°C et sous agitation régulière. Après excitation à 450 nm, l'agrégation des fibres amyloïdes est détectée par une augmentation de la fluorescence à 485 nm.

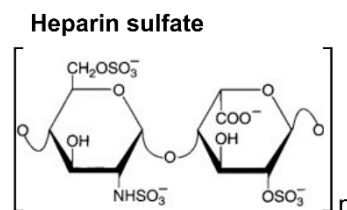


Figure II-4. Structure d'un monomère d'héparine sulfate, dont le n correspond au nombre de répétitions au sein du polymère.

2.2.1. Réponse en ThT de Tau-WT et Tau-P301L

Les résultats d'agrégation présentés dans la **Figure II-5** montrent une augmentation progressive de la fluorescence à 485 nm pour Tau-WT et Tau-P301L. Pour Tau-WT (gris), la fluorescence augmente rapidement, sans temps de latence. La courbe atteint une saturation à environ 10 000 UA, suivant un profil sigmoïde typique des amyloïdes. En revanche, Tau-P301L (rouge) présente une nucléation initiale plus lente

mais atteint une fluorescence maximale légèrement plus élevée, autour de 17 000. Les temps de demi-vies ($t_{1/2}$) sont d'environ 3h pour Tau-WT et 8h20 pour Tau-P301L, et indiquent que pour cette expérience la phase de nucléation de Tau-P301L est plus lente que Tau-WT. Ces résultats indiquent que les deux protéines Tau-WT et Tau-P301L peuvent former des fibres amyloïdes en présence d'héparine, bien que des observations directes en microscopie soient nécessaires pour confirmer ces résultats.

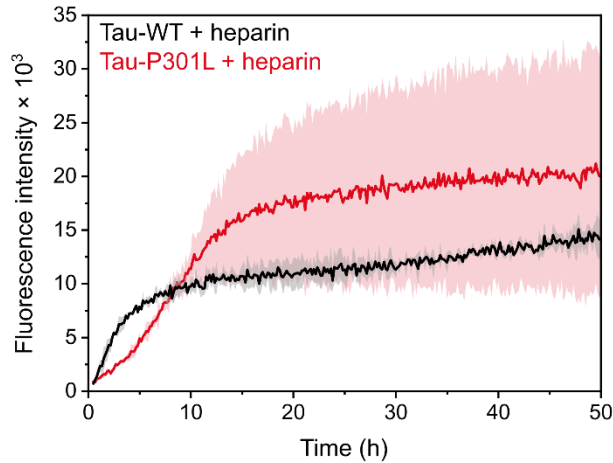


Figure II-5. Cinétique d'agrégation des protéines Tau(2N4R)-WT (gris) et -P301L (rouge) à 20 μ M, en présence d'héparine à 5 μ M, après plusieurs heures d'incubation à 37°C, sous agitation dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5mM DTT, 20 μ M ThT. La moyenne et les écarts-types de 2 réplicats sont présentés pour chaque protéine.

2.2.2. Observation des fibres par microscopie électronique à transmission

Pour confirmer la présence de fibres amyloïdes, les échantillons d'agrégation sont déposés à la fin de la cinétique sur grilles de microscopie électronique, et colorés par acétate d'uranyle. Les images sont présentées **Figure II-6**.

Les images TEM mettent en évidence des fibres longues et fines, caractéristiques des fibres amyloïdes. Pour chaque échantillon, deux champs d'imagerie permettent de mettre en évidence l'hétérogénéité du dépôt (images (A) et (B) pour la condition Tau-WT + héparine, (C) et (D) pour Tau-P301L + héparine), avec certaines zones sur une même grille avec un très grand nombre de fibres, et d'autres plus éparse. On distingue également des morphologies différentes, notamment la présence de fibres très droites, rectilignes (**Figure II-6A**, triangles magenta), et d'autres plus ondulées de façon répétitives (**Figure II-6**, triangles vert).

Bien que ces types de fibres ne soient visibles ici que pour Tau-WT, elles sont également retrouvées et reportées pour des fibres de Tau-P301L (Wegmann et al., 2010), et ne sont probablement ici pas visibles du fait de dépôts épais et de la présence de nombreuses fibres sur un même champ.

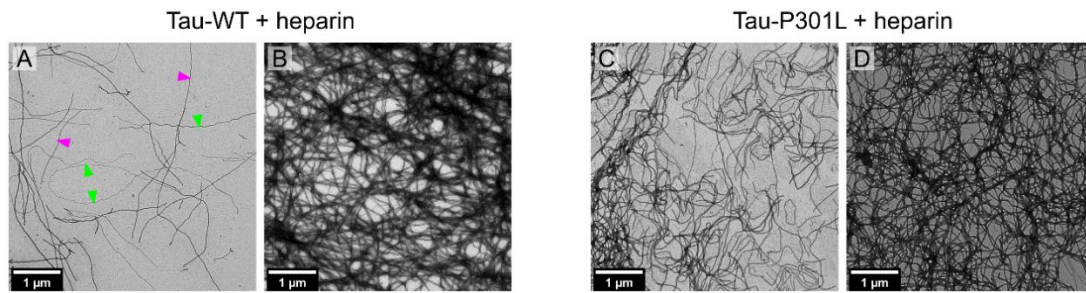


Figure II-6. Images TEM d'une même zone des mêmes échantillons de Tau-WT (A, B) et Tau-P301L (C, D) après incubation avec héparine, au ratio 4:1 (protéine:héparine), après ~ 60h d'incubation à 37°C sous agitation, dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5mM DTT, 20 μM ThT. Les triangles verts correspondent à des fibres ondulées, ceux en magenta à des fibres droites. L'échelle est de 1 μm pour toutes les images.

Les observations en TEM confirment la formation de fibres pour les protéines Tau-WT et Tau-P301L lors de leur agrégation induite par l'addition d'héparine. Bien que les courbes de ThT pour Tau-WT soient moins intenses en fin de cinétique que celles de Tau-P301L, une grande quantité de fibres est observée dans les deux conditions. Pour les expériences futures, nous nous focaliserons sur Tau-P301L, et utiliserons la condition avec héparine comme référence.

2.2.3. Morphologie des fibres Tau-P301L + héparine par AFM

L'AFM permet de travailler en milieu liquide, et d'ainsi accéder à des informations morphologiques précises à l'échelle nanométrique en conditions physiologiques. Les différents échantillons sont déposés en faible volume sur du mica fraîchement clivé et incubés quelques minutes avant d'être doucement rincés puis imagés dans le tampon (20 mM HEPES pH7 avec 100 mM NaCl pour faciliter l'imagerie en AFM).

Après dépôt, un nombre important de fibres est observé sur le mica, comme on peut le voir sur la **Figure II-7A**. Pour comparer à même échelle, une image de microscopie électronique est indiquée à côté d'un zoom de l'image AFM (**Figure II-7B, C**), et révèle des similarités. De longues fibres de plusieurs micromètres de longueur et d'autres plus courtes sont observées, mais on peut néanmoins noter que les fibres en AFM semblent beaucoup plus larges qu'en microscopie électronique, alors que les images sont à la même échelle. Cela est dû aux limites inhérentes à l'AFM et à sa pointe qui bien que de rayon nanométrique, tend à surestimer la largeur d'objets (dont l'épaisseur est comprise entre 5 et 15 nm) (Gołek et al., 2014).

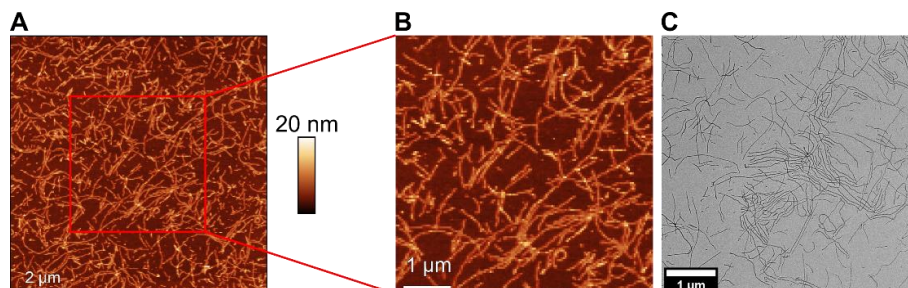


Figure II-7. Image AFM de fibres Tau-P301L + héparine, préalablement obtenues après ~ 60h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 μM de Tau-P301L et 5 μM d'héparine dans un tampon 20 mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl. L'image (B) est un zoom au niveau du carré rouge de l'image (A) et possède la même échelle que l'image de microscopie électronique en (C). Les échelles sont de 2 μm pour (A) et de 1 μm pour (B), et (C).

Bien qu'il soit difficile de mesurer précisément la largeur des fibres amyloïdes par AFM en raison de la forme et du rayon de la pointe, il est possible d'obtenir des informations précises en utilisant l'épaisseur des fibres (Wegmann et al., 2010). Pour cela, plusieurs sections perpendiculaires aux fibres peuvent être réalisées, fournissant un profil de hauteur qui permet de mesurer la différence de hauteur entre le mica et la fibre, offrant ainsi une mesure précise de l'épaisseur des fibres. Sur la **Figure II-8**, les sections réalisées sur 3 images distinctes du même échantillon sont indiquées par des lignes bleues, et un profil de hauteur représentatif pour une des sections est représenté pour indication.

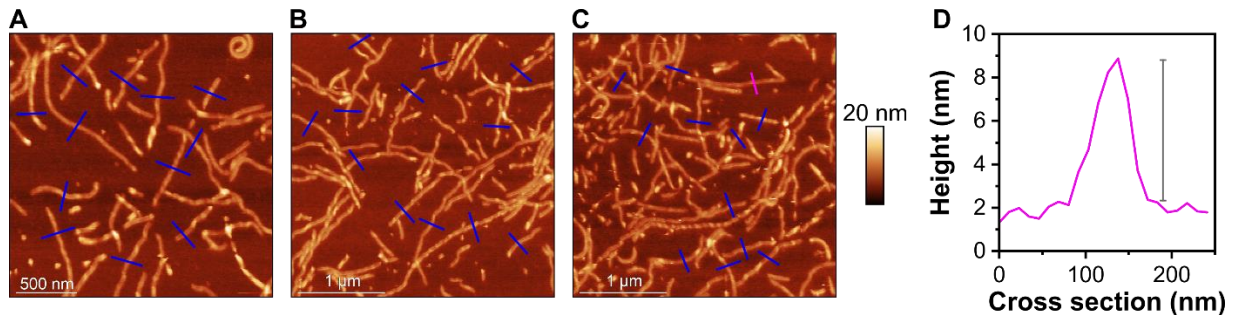


Figure II-8. Image AFM de fibres Tau-P301L + héparine préalablement obtenues après ~ 60h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 μM de Tau-P301L et 5 μM d'héparine dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 μM ThT. Les fibres sont imagées dans un tampon 20 mM HEPES pH 7, 100 mM NaCl. Les lignes bleues sur les images (A, B, C) sont les sections qui ont permis de déterminer l'épaisseur moyenne des fibres. La section rose (C) correspond au profil de hauteur en (D), sur lequel la hauteur de la fibre est représentée par une ligne verticale grise. L'échelle de hauteur est commune aux 3 images et l'échelle latérale est de 500 nm pour (A), et 1 μm pour (B, C).

Au total, 36 sections réalisées sur ces 3 images issues du même échantillon permettent d'estimer une épaisseur globale des fibres à $5,2 \pm 1,0$ nm. Les fibres reportées dans la littérature pour Tau (2N4R) avec héparine caractérisées par AFM possèdent des tailles comprises entre $9,8 \pm 1,2$ nm et $18,5 \pm 1,7$ nm (Wegmann et al., 2010). Les fibres obtenues dans nos conditions sont donc nettement plus fines que celles reportées dans la littérature.

2.3. Agrégation en présence d'ARN

2.3.1. Choix des ARN

Des séquences spécifiques d'ARN ont déjà été identifiées comme partenaires potentiels de Tau (Wang and Mandelkow, 2016). Cependant pour permettre une comparaison en fonction des ARN et simplifier les séquences utilisées, nous avons souhaité comparer l'agrégation avec différents nucléotides, sur des séquences polynucléotides d'homopolymères. En tout, 5 homopolymères nucléotidiques ont été utilisés : des polynucléotides d'adénosine (polyA), de cytidine (polyC), d'uridine (polyU), de guanosine (polyG) et d'inosine (polyI), un nucléotide synthétique (**Figure II-9**). Ces ARN sont tous polydisperses, contenant un mélange de tailles variées allant jusqu'à plusieurs milliers de nucléotides.

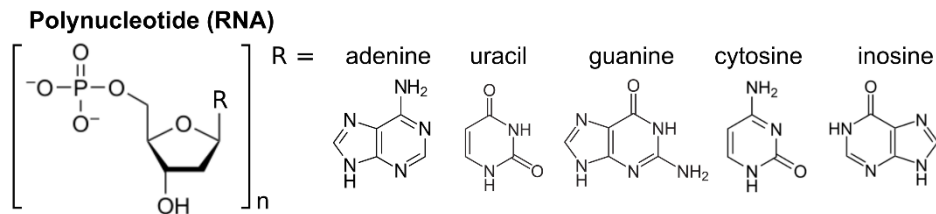


Figure II-9. Structure des homopolymères nucléotidiques utilisés dans cette étude, basés sur un squelette commun de ribose phosphate dont un monomère est présenté, avec le R étant une des 5 bases nucléotidiques dont les structures sont indiquées (adénine, uracile, guanine, cytosine, inosine).

2.3.2. Agrégation avec polyA

- **Optimisation des conditions**

Nous avons d'abord déterminé les conditions optimales d'agrégation, en faisant varier (i) les ratios protéine : ARN et (ii) la salinité. En effet, les interactions électrostatiques entre Tau et des cofacteurs polyanioniques vont influencer l'agrégation, et la présence de NaCl peut fortement modifier la formation des fibres amyloïdes. Pour ces optimisations, nous avons utilisé Tau-P301L, ainsi que le polyA. Plusieurs conditions ont été testées avec addition de polyA à 100 µg/ml ou 200 µg/ml et de NaCl à 0, 50, et 100 mM. La cinétique d'agrégation de Tau-P301L (20 µM) a été suivie par ThT, et les résultats sont présentés en **Figure II-10**.

Les résultats de ThT montrent que polyA induit la fibrillation de Tau-P301L dans les deux ratios testés. Pour les deux concentrations, une très faible augmentation de la fluorescence est observée avec 100 mM NaCl. Une concentration de 50 mM de NaCl induit une forte augmentation de fluorescence liée à la formation de fibres. La cinétique d'agrégation est plus rapide pour une concentration plus faible en polyA. En absence de sel, le comportement est différent, il n'y a pas d'agrégation pour une forte concentration de polyA (**Figure II-10B**) et une agrégation lente est observée pour une concentration moindre en polyA (100 µg/ml, **Figure II-10A**).

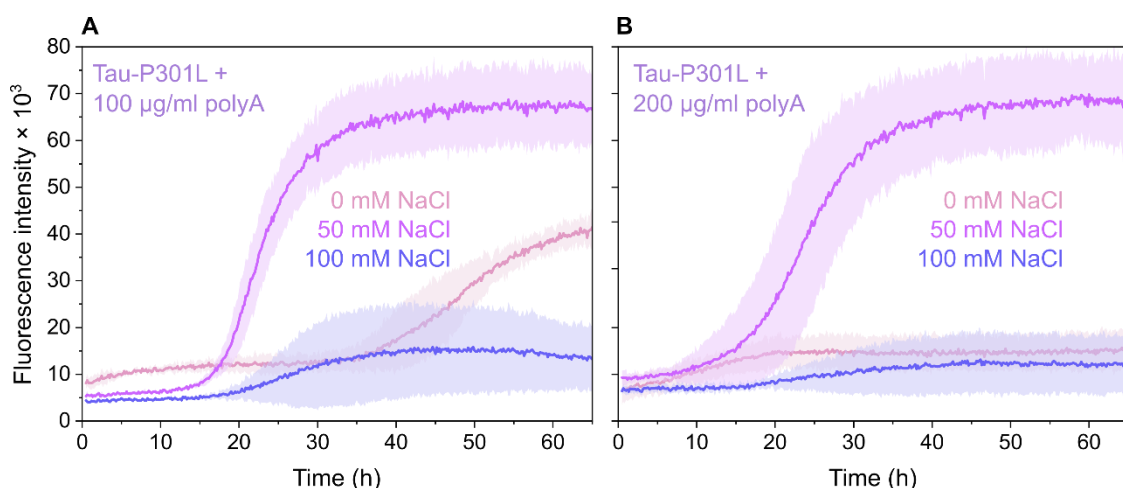


Figure II-10. Cinétique d'agrégation de Tau-P301L (20 µM) suivie par fluorescence de la thioflavine T, en présence de polyA à 100 µg/ml (A) ou à 200 µg/ml (B), avec 0 (rose), 50 (fuchsia), ou 100 (violet foncé) mM de NaCl et après incubation à 37°C sous agitation dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5mM DTT, 20 µM ThT. La moyenne et l'écart-type de 3 répliques sont présentés pour chaque condition. L'axe de l'intensité de fluorescence est commun aux deux graphiques.

Ces échantillons ont été observés par microscopie électronique à transmission afin de confirmer la présence ou l'absence de fibres amyloïdes dans les échantillons Tau-P301L + polyA. Les images des agrégations de Tau-P301L avec les conditions suivantes sont présentées dans la **Figure II-11** : polyA à 100 $\mu\text{g/ml}$ et 50 mM NaCl (**Figure II-10A**, fuchsia), 100 $\mu\text{g/ml}$ sans NaCl (**Figure II-10A**, rose) et 200 $\mu\text{g/ml}$ avec 50 mM NaCl (**Figure II-10B**, fuchsia).

Les images révèlent la présence de fibres amyloïdes dans les trois conditions observées. Même dans la condition sans NaCl (**Figure II-11E, F**), qui montrait une faible augmentation de fluorescence sur les courbes ThT (**Figure II-10A**, rose), un grand nombre de fibres est détecté. Cela confirme les résultats d'agrégation observés dans les conditions à 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de polyA avec 50 mM NaCl, mais montre aussi que la formation de fibres reste possible en l'absence de NaCl. L'interaction de la ThT avec la fibre semble néanmoins différente sans NaCl, puisque l'émission de fluorescence n'est pas observée. Par ailleurs, aucune différence morphologique majeure n'est observée pour les différentes conditions avec polyA ou avec héparine.

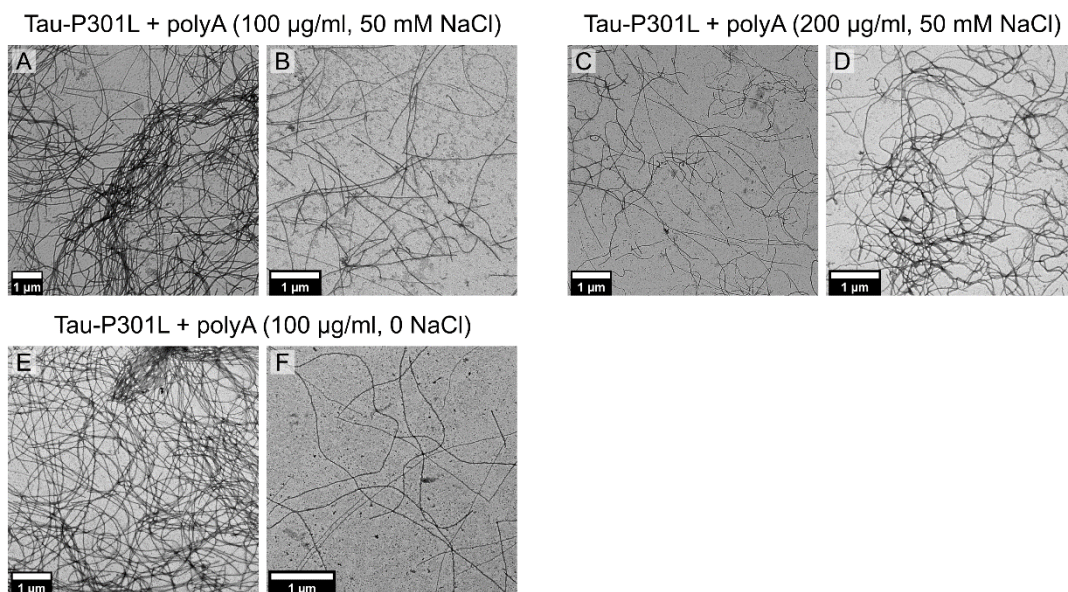


Figure II-11. Images TEM de deux champs pour chaque échantillon de Tau-P301L avec polyA après ~ 60h d'incubation à 37°C sous agitation, en présence de Thioflavine T dans les conditions suivantes : polyA à 100 $\mu\text{g/ml}$ et 50 mM NaCl (A, B), 100 $\mu\text{g/ml}$ sans NaCl (E, F) et 200 $\mu\text{g/ml}$ avec 50 mM NaCl (C, D), après ~60 h d'incubation à 37°C sous agitation dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5mM DTT, 20 μM ThT. L'échelle est de 1 μm pour toutes les images.

Pour les expériences de fibrillation suivantes en présence d'ARN, nous avons retenu les conditions optimales d'agrégation : 200 $\mu\text{g/ml}$ d'ARN (ratio protéine : ARN de 1 μM : 10 $\mu\text{g/ml}$) et 50 mM NaCl.

2.3.3. Caractérisation des fibres Tau-P301L + polyA par AFM

Les fibres Tau-P301L + polyA sont ensuite imagées en milieu liquide par AFM afin d'obtenir davantage d'informations morphologiques qu'avec la microscopie électronique.

Les images AFM présentées dans la **Figure II-12A** révèlent la présence de nombreuses fibres déposées sur le mica. Pour comparer la morphologie des fibres visualisées par AFM avec celles observées en TEM, une analyse comparative à échelle équivalente (**Figure II-12B** et C) montre une apparence générale similaire.

Cependant, tout comme pour les fibres Tau-héparine, ces fibres semblent plus épaisses en AFM, ce qui est également attribué à la surestimation de leur taille en raison de la forme et de la taille de la pointe AFM.

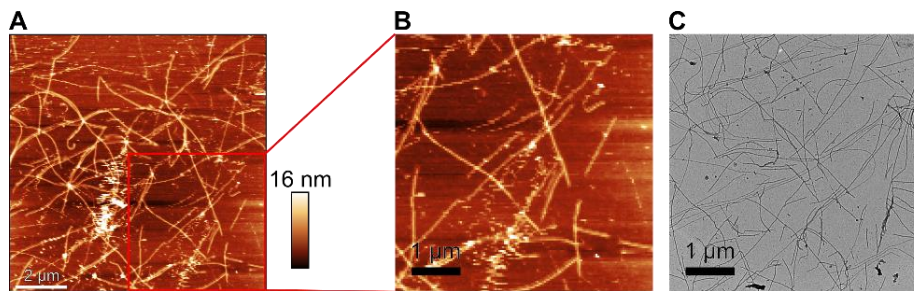


Figure II-12. Image AFM de fibres Tau-P301L + polyA, préalablement obtenues après ~ 50h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 μM de Tau-P301L et 200 μg/ml d'ARN polyA dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 μM ThT. Les fibres sont imagées dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl. L'image (B) est un zoom au niveau du carré rouge de l'image (A) et possède la même échelle que l'image de TEM en (C). Les échelles latérales sont de 2 μm pour (A) et de 1 μm pour (B), et (C).

Afin de mesurer la taille des fibres amyloïdes Tau-P301L + polyA, plusieurs images de l'échantillon sont prises, et des profils de hauteur sont réalisés sur plusieurs fibres. Pour les fibres Tau-P301L + polyA, 26 sections de fibres sur 3 images distinctes (**Figure II-13A, B, et C**) ont permis de déterminer une épaisseur moyenne de $4,7 \pm 1,1$ nm. La ligne rose avec un astérisque correspond à une section dont le profil de hauteur est illustré en **Figure II-13D**. Sur ce profil, une ligne grise indique la hauteur de la fibre. Globalement, les fibres obtenues sont homogènes et similaires à celles observées avec l'héparine.

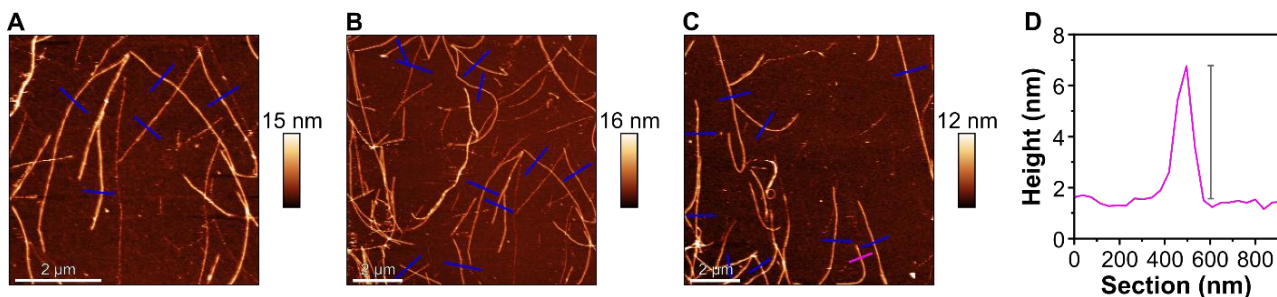


Figure II-13. Images AFM de fibres Tau-P301L + polyA, obtenues après ~ 50h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 μM de Tau-P301L et 200 μg/ml d'ARN polyA dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 μM ThT. Les fibres sont imagées dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl. Les lignes bleues sur les images (A, B, C) sont les sections qui ont permis de déterminer l'épaisseur moyenne des fibres. La section rose (C) correspond au profil de hauteur en (D), dont la hauteur de la fibre est représentée par une ligne verticale grise.

L'AFM permet également de déduire d'autres informations sur la structure des fibres. En effet, certaines fibres présentent une succession de segments fins puis épais. Ce phénomène de périodicité est souvent observé dans les fibres amyloïdes, résultant de l'entrelacement de plusieurs protofibrilles (Fitzpatrick et al., 2017; Wegmann et al., 2010). Sur l'une des fibres rectilignes visibles dans l'image **Figure II-13C**, un zoom (**Figure II-14A**) permet d'analyser plus en détail cette organisation. Une section longitudinale le long de cette fibre révèle la périodicité, comme indiqué sur le profil de hauteur en **Figure II-14B**. Dans ce cas précis, la périodicité est d'environ 113 nm pour cette fibre, représentée par la ligne horizontale grise sur la **Figure II-14B**.

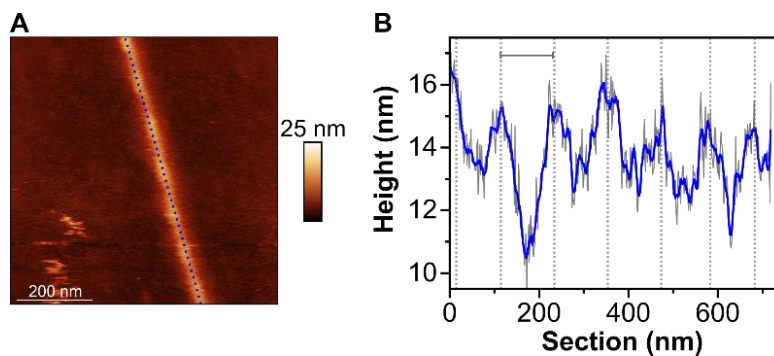


Figure II-14. Zoom en AFM sur une fibre Tau-P301L + polyA (A). La ligne bleue, tracée le long de cette fibre, représente le profil de hauteur (B), où les épaisissements sont marqués par des lignes pointillées verticales. La distance entre deux de ces épaisissements est indiquée par une ligne horizontale grise. L'échelle de hauteur est de 25 nm, et l'échelle latérale est de 200 nm.

Ces observations en AFM confirment les résultats obtenus en microscopie électronique tout en fournissant des informations morphologiques plus détaillées sur les fibres Tau-P301L + polyA. Elles permettent notamment de mesurer l'épaisseur de ces fibres, d'évaluer leur homogénéité (ou hétérogénéité) et d'identifier des détails structuraux, tels que la présence d'épaissements.

2.3.4. Comparaison entre ARN

Nous avons ensuite évalué l'agrégation de Tau-P301L avec différents ARN, autres que polyA. Sur ces différentes expériences, nous avons pu observer une variabilité importante, en particulier lors de l'utilisation de différents lots de protéine. Sur la **Figure II-15** sont comparés les résultats obtenus pour l'agrégation de Tau-P301L avec héparine (référence), polyA, polyI, et polyC, ainsi que ceux obtenus avec un autre lot de Tau-P301L (Tau-P301L*) avec héparine, polyA, polyI, polyC, polyU et polyG (**Figure II-9**).

Les résultats présentés **Figure II-15** montrent des différences en fonction des ARNs. Pour les 2 lots de Tau-P301L + polyA (violet (A) et (B)), l'augmentation de fluorescence est différente entre les lots, et par rapport aux expériences précédentes présentées sur la **Figure II-10B**, avec une augmentation débutant après 35h pour Tau-P301L (**Figure II-15A**), contre 60h pour Tau-P301L* (**Figure II-15B**), alors qu'elle commençait dès 10h précédemment **Figure II-10B**. Ces différences entre expériences sont également visibles pour les conditions avec héparine (rouge), où là aussi des différences de cinétiques et/ou d'intensités sont observées, par rapport aux conditions sur la **Figure II-10**.

Pour les autres ARNs, pour les 2 lots protéiques présentés, une augmentation de fluorescence est observée pour le polyI et le polyC, avec des augmentations faibles et très lentes de fluorescence. Cette augmentation est légèrement plus intense pour les conditions avec polyI qu'avec polyC (avec pour Tau-P301L (A) une intensité maximale de 8000 pour polyI et 2000 pour polyC). Pour les conditions avec polyU, aucune augmentation de fluorescence n'est observée avec Tau-P301L*. Pour polyG, aucune augmentation de la fluorescence n'est observée par rapport aux valeurs d'intensité initiales (B, vert). On observe également que par rapport aux autres ARN, cette intensité initiale est très élevée.

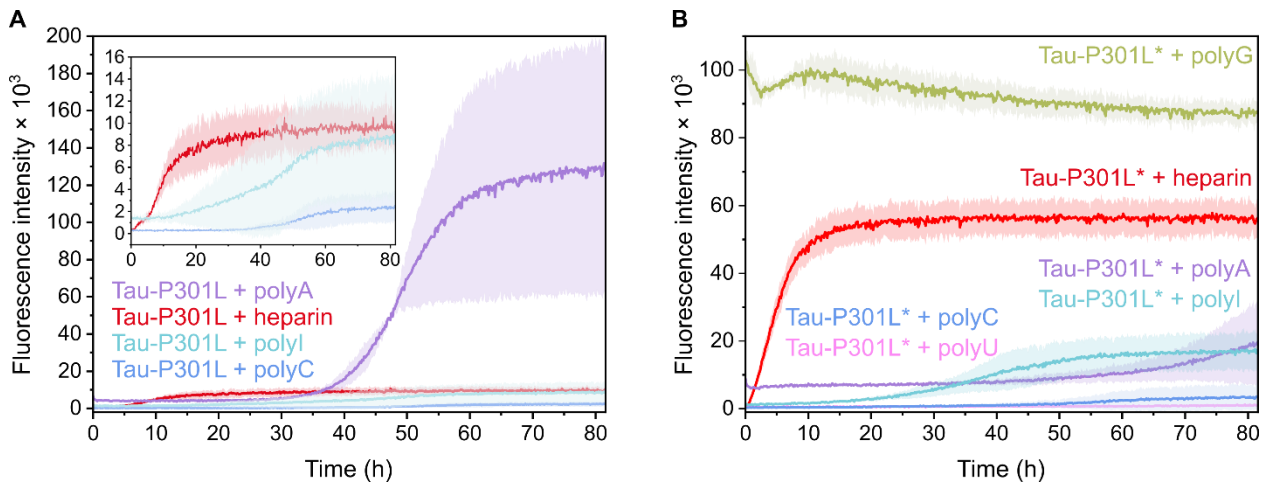


Figure II-15. Cinétique d'agrégation de deux lots distincts de Tau-P301L (le lot utilisé dans la quasi-totalité du manuscrit (A), et un lot différent, Tau-P301L* (B)). Les protéines (20 μ M) sont incubées avec divers ARN à 200 μ g/ml dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 μ M ThT. Les ARN testés sont : polyA (violet), polyI (cyan), polyC (bleu foncé), polyU (rose), polyG (vert). L'insert sur le graphe de gauche montre un zoom sur les intensités de fluorescence entre 0 et 16 000. Les moyennes et écarts-types de 3 réplicats sont présentés pour chaque condition, sauf pour Tau-P301L + polyA où il y a 2 réplicats (A).

Pour déterminer si l'intensité de fluorescence initiale de la condition avec l'ARN polyG était bien due à une interaction Protéine/ThT, tous les ARN ont été incubés seuls en présence de ThT (ARN à 200 μ g/ml dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 μ M ThT, incubés ~80h à 37°C). Les résultats sont présentés sur la **Figure II-16**. L'incubation de polyG avec ThT met en évidence une intensité de fluorescence très élevée, en l'absence de protéine Tau. Les intensités initiales des ARN polyA et polyI sont équivalentes, avec une intensité à environ 1000 alors que celle des ARN polyU et polyC sont à 250. Ces résultats indiquent que selon les ARN, une interaction avec la ThT existe, en l'absence d'une agrégation amyloïde de la protéine Tau. Ils expliquent les intensités de fluorescence élevées constatées particulièrement pour le polyG dès le départ des expériences.

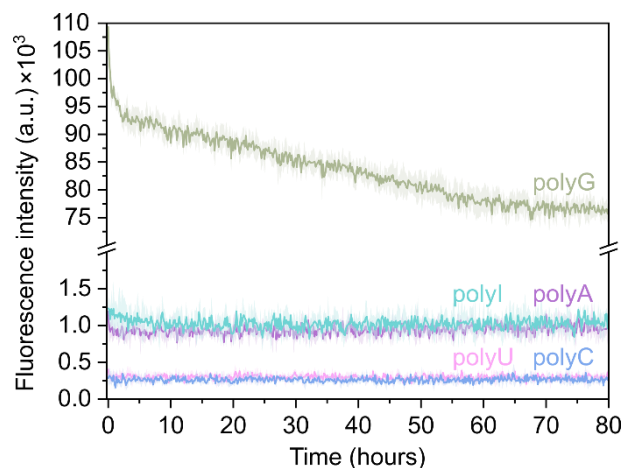


Figure II-16. Cinétique d'expérience de Thioflavine T avec uniquement les ARN polyG (vert), polyA (violet), polyI (bleu clair), polyU (rose) et polyC (bleu foncé) après incubation ~ 80h à 37°C à 200 μ g/ml dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 μ M ThT. Les moyennes et les écart-types correspondent à 3 réplicats.

Chapitre 2. Inducteurs de l'agrégation de la protéine Tau

Les résultats des expériences de fluorescence à la ThT suggèrent que l'agrégation n'est optimale qu'avec polyA, bien que variable, faible avec polyI et polyC, et nulle en présence de polyU et polyG. Les échantillons d'agrégation présentés sur la **Figure II-15** sont observés en microscopie électronique à transmission, avec : sur la **Figure II-17** : Tau-P301L + polyI (cinétique cyan de la **Figure II-15A**) et Tau-P301L* + polyA (**Figure II-15B** en violet) ; sur la **Figure II-18** : Tau-P301L + polyC (**Figure II-15B**, en bleu foncé), Tau-P301L* + polyU (**Figure II-15A** ; en rose) ; et sur la **Figure II-19** : Tau-P301L* + polyG (**Figure II-15A**, en vert) et polyG seul (**Figure II-16** en vert). Cette dernière est incluse pour observer l'interaction suggérée entre polyG et la ThT.

Ces images permettent de comparer la morphologie des fibres amyloïdes formées en présence des différents ARNs, tout en reliant ces observations aux cinétiques d'agrégation obtenues précédemment. Les fibres observées présentent des différences de morphologie, d'hétérogénéité, ainsi que de quantité. Cependant, la quantification par TEM reste difficile et ne permet ici qu'une évaluation qualitative.

Pour la condition Tau-P301L + polyI (**Figure II-17A, B**), les courbes d'agrégation montraient une légère augmentation de la fluorescence, suggérant une fibrillation modeste. Cette hypothèse est confirmée par la microscopie, où l'on observe de longues fibres, mais aussi des structures plus amorphes, potentiellement non fibrillaires (indiquées par des triangles verts). Pour Tau-P301L* + polyA (**Figure II-17C, D**), les courbes indiquaient un début d'agrégation avec une augmentation de fluorescence tardive, pouvant indiquer un début de formation de fibres amyloïdes, et donc potentiellement une agrégation incomplète au moment de l'observation par microscopie. Ceci est confirmé par l'observation d'un nombre réduit de fibres en comparaison avec ce qui avait été observé précédemment (**Figure II-11D**).

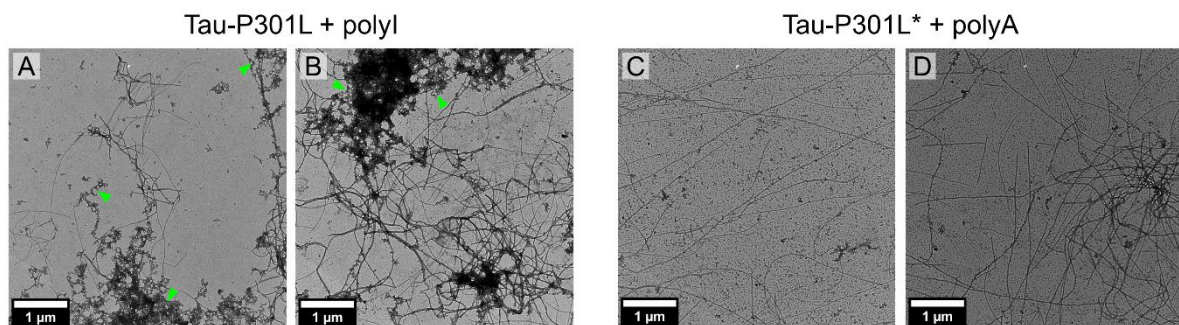


Figure II-17. Images de TEM des échantillons de Tau-P301L (gauche) et Tau-P301L* (droite) après ~60 heures d'incubation avec différents ARN à 37°C, sous agitation, en présence de Thioflavine T. Les conditions d'agrégation incluent 20 µM de protéine (Tau-P301L ou Tau-P301L*) dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 50 mM NaCl, avec les ARN suivants à 200 µg/ml : polyI (A, B), polyA (C, D). L'échelle est de 1 µm pour toutes les images.

Dans le cas de Tau-P301L + polyC (**Figure II-18A, B**), les résultats d'agrégation indiquaient une augmentation de fluorescence encore plus faible qu'avec polyI. Microscopiquement, on observe des fibres avec des structures globulaires le long de celles-ci (triangles magenta), ressemblant à des "guirlandes". Ces formations pourraient être un artefact de coloration ou résulter d'autres facteurs influençant l'agrégation. En présence de polyU (**Figure II-18C, D**), des fibres sont également visibles, accompagnées de structures amorphes similaires à celles observées pour polyI. Les résultats combinés des expériences de ThT et des

Chapitre 2. Inducteurs de l'agrégation de la protéine Tau

observations en TEM suggèrent que ces structures amorphes se forment principalement lorsque l'agrégation reste incomplète. Ces conditions présentant une grande hétérogénéité d'agrégats rendent difficile l'interprétation précise des résultats.

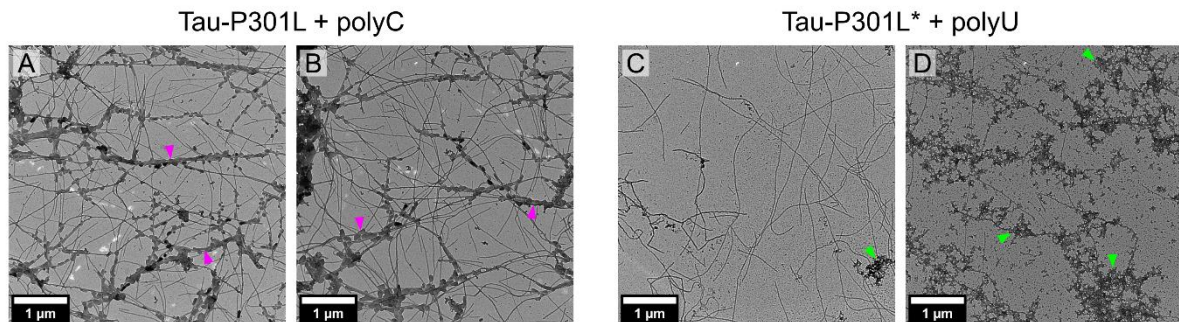


Figure II-18. Images de TEM des échantillons de Tau-P301L (gauche) et Tau-P301L* (droite) après ~ 60 heures d'incubation avec différents ARN à 37°C, sous agitation, en présence de Thioflavine T. Les conditions d'agrégation incluent 20 µM de protéine (Tau-P301L ou Tau-P301L*) dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 50 mM NaCl, avec les ARN suivants à 200 µg/ml : polyC (A, B), polyU (C, D). L'échelle est de 1 µm pour toutes les images.

Enfin, pour la condition Tau-P301L* + polyG (**Figure II-19**), on observe de nombreuses petites fibres, fragmentées, avec une morphologie différente des fibres amyloïdes typiques, qui sont généralement plus longues. Quelques fibres plus longues sont présentes (triangles cyan) mais en bien moindre proportion comparé aux petites fibres fragmentées. Les résultats d'agrégation montraient une intensité de fluorescence initiale élevée sans augmentation au fil du temps, confirmant que le polyG seul tend à former des structures indépendamment de la protéine, ce qui pourrait expliquer les résultats observés avec la ThT.

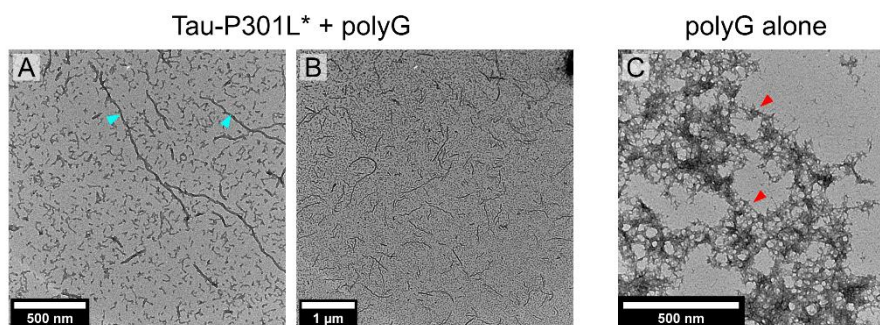


Figure II-19. Images de TEM des échantillons de Tau-P301L (gauche) et Tau-P301L* (droite) après ~ 60 heures d'incubation avec différents ARN à 37°C, sous agitation, en présence de Thioflavine T. Les conditions d'agrégation incluent 20 µM de protéine (Tau-P301L ou Tau-P301L*) dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 50 mM NaCl, avec polyG à 200 µg/ml (A, B). En (C), la condition avec l'ARN polyG seul, incubé dans les mêmes conditions, mais sans protéine. L'échelle est de 1 µm pour (B), et 500 nm pour (A, C).

Les observations en microscopie électronique des différents ARN incubés avec Tau-P301L, couplés aux expériences de ThT, suggèrent que les augmentations de l'intensité de fluorescence peuvent être liées à l'hétérogénéité des structures observées en TEM. En effet pour les conditions avec polyC ou polyU, les augmentations de fluorescence étaient faibles voire inexistantes, et pourtant quelques fibres sont détectables en microscopie. Cependant, ces dernières semblent peu nombreuses, et s'accompagnent de structures ne ressemblant pas à des fibres amyloïdes matures, rassemblées sous les termes de structures amorphes (triangles

verts, **Figure II-18**), et pouvant ressembler à des « guirlandes » (triangles magenta, **Figure II-18**). La fixation de la ThT sur ces structures est vraisemblablement différente.

La comparaison entre ces différents ARN suggère que malgré un squelette phosphate commun entre les différents ARNs, ces derniers ne sont pourtant pas tous capables d'induire l'agrégation de Tau-Pa301L, et peuvent également induire l'apparition de structures polydisperses et différentes des fibres amyloïdes, pouvant être dépendantes du type d'ARN (notamment dans le cas du polyG).

2.4. Agrégation en présence de lipides

Après avoir étudié l'agrégation de la protéine Tau en présence d'ARN, nous avons orienté nos recherches vers un autre cofacteur clé : les lipides. En effet, plusieurs types de lipides sont capables d'induire l'agrégation de Tau (2N4R), notamment les acides gras libres comme l'acide arachidonique (Chirita et al., 2003; Wilson and Binder, 1997) et les phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine (PS) (Chirita et al., 2003). Pour nos expériences, nous avons choisi de nous concentrer sur les phospholipides présents sur la membrane plasmique interne neuronale, étant donné que Tau a été identifié comme capable de s'y associer (Brandt et al., 1995).

2.4.1. POPS

Nous avons tout d'abord testé l'agrégation de Tau-P301L avec du POPS pur, représentant 13-15% des phospholipides totaux des membranes plasmiques internes des neurones. Contrairement au BPS (PS totaux extraits de cerveaux de porcs), qui est un mélange de phospholipides PS avec des chaînes de longueur et insaturation variables, nous avons choisi d'utiliser du POPS (16:0, 18:1) pur.

Nous avons réalisé l'incubation de Tau avec des liposomes de POPS, sous forme de SUVs. Pour préparer ces SUVs, des films lipidiques de POPS ont été réhydratés dans un tampon d'agrégation (20 mM HEPES, pH 7, 5 mM DTT, sans NaCl), ce qui a permis de former des vésicules multilamellaires (MLV), hétérogènes et composées de plusieurs bicouches. Ensuite, pour obtenir des liposomes homogènes avec une seule bicouche (similaires aux membranes cellulaires), la solution de MLV a été soumise à une sonication à l'aide d'une sonde, générant ainsi les SUVs. Les SUVs obtenus ont un diamètre de ~ 25 nm (Huang, 1969).

De manière similaire aux expériences avec l'héparine, ces SUVs ont été incubés avec Tau-P301L en présence de ThT. Dans un premier temps, nous avons optimisé les ratios protéine : lipides, avec 20 μ M de Tau-P301L et des concentrations molaires de 200, 400, et 600 μ M de SUVs, correspondant à des ratios protéine : lipides de 1:10, 1:20, et 1:30.

- Tests d'agrégation

Les résultats d'agrégation obtenus sont présentés en **Figure II-20**. L'augmentation de l'émission de fluorescence de la ThT montrent que POPS est capable d'induire l'agrégation de Tau, à un ratio optimal de 1:10. À une concentration de 200 μ M de POPS, la fluorescence initiale de 7 500 commence à augmenter après environ 8 heures, avec un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de 11 heures, atteignant une intensité maximale d'environ 17 500. Une concentration plus élevée en lipides n'a pas permis d'obtenir une agrégation optimale, avec une

augmentation de la fluorescence observée uniquement à 400 μM de POPS, mais bien plus tardivement (débutant à 35 heures). Il est également notable que l'intensité de fluorescence initiale semble dépendre de la concentration en lipides, suggérant, comme pour certains ARN (notamment polyA et polyG), une interaction entre les lipides et le ThT.

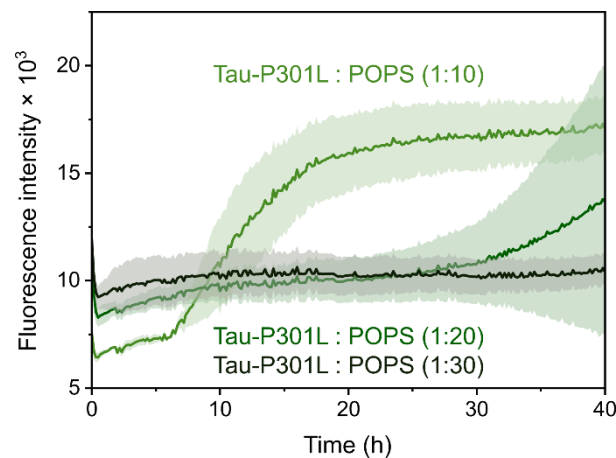


Figure II-20. Cinétique d'agrégation obtenue en fluorescence de la Thioflavine T pour Tau-P301L à 20 μM en présence de différentes concentrations de SUVs de POPS, avec 200 μM (vert clair), 400 μM (vert), 600 μM (vert foncé). Les conditions d'agrégation consistent en une incubation à 37°C sous agitation dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 μM ThT. Les cinétiques correspondent aux moyennes et écarts types de 3 réplicats.

- **Observation des fibres par TEM**

L'observation des échantillons aux ratios 1:10 et 1:30, présentée sur la **Figure II-21**, confirme les résultats de ThT, avec des fibres visibles dans la condition à 200 μM de POPS. En revanche, une concentration lipidique trop élevée semble inhiber l'agrégation puisqu'aucune fibre n'est observée dans cette condition (**Figure II-21C, D**). On observe des structures contrastées (triangles verts), qui sont des agrégats non fibrillaires.

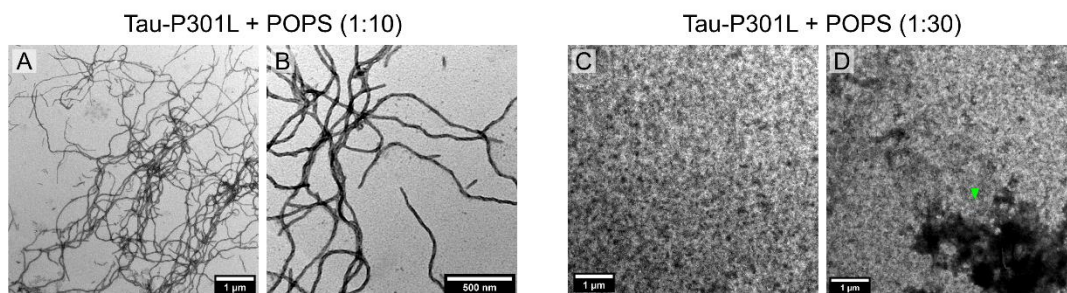


Figure II-21. Images TEM des échantillons de Tau-P301L à 20 μM après environ 40 heures d'incubation à 37°C avec 200 μM de SUVs de POPS (A et B) et 600 μM de SUVs de POPS (C et D), dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 μM ThT. Pour chaque concentration, deux zones distinctes ont été imagées (A, B pour 200 μM et C, D pour 600 μM). Le triangle vert pointe vers une zone fortement contrastée, amorphe et non structurée. L'échelle est de 1 μm pour A, C, D, et de 500 nm pour B.

- **Caractérisation des fibres Tau-P301L + POPS par AFM**

Les fibres Tau-P301L en présence de POPS ont été analysées par AFM en milieu liquide, et une image représentative est présentée dans la **Figure II-22A**. On observe de très longues fibres de plusieurs micromètres de longueur, en accord avec les observations réalisées par TEM à la même échelle (**Figure II-22B**). Les images

Chapitre 2. Inducteurs de l'agrégation de la protéine Tau

AFM permettent d'observer que l'épaisseur n'est pas homogène le long d'une fibre, avec la présence d'épaississements. Une image 3D permet de mieux les visualiser (**Figure II-22C**). En raison de la variabilité dans les fibres, il est difficile d'évaluer la périodicité de ces épaississements.

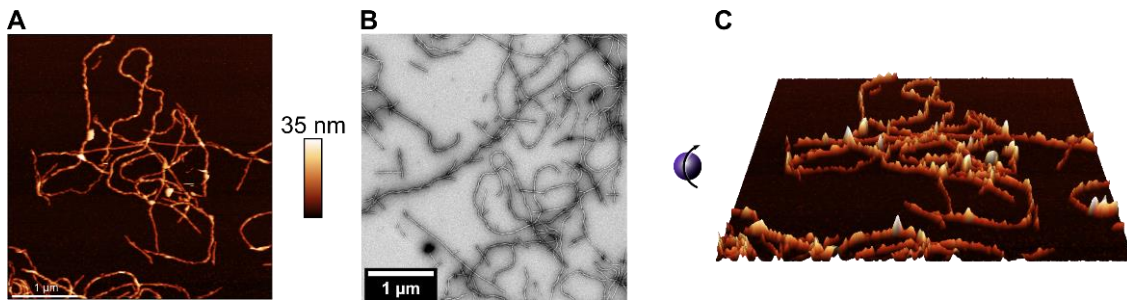


Figure II-22. Image AFM de fibres Tau-P301L + POPS (A), préalablement obtenues après ~ 50h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 μM de Tau-P301L et 200 μM de SUVs POPS dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 μM ThT. Les fibres sont imagées dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl. L'image de microscopie électronique en (B) est une image de fibres Tau-P301L + POPS agrégées dans les mêmes conditions, et permettent une comparaison à la même échelle. Représentation 3D (C) de l'image (A) permettant de mettre en évidence les épaississements. L'échelle latérale en AFM vaut 1 μm .

Afin de mesurer l'épaisseur moyenne des fibres, plusieurs profils de hauteur sont réalisés sur plusieurs échantillons de fibres obtenues dans les mêmes conditions. Les images et les profils effectués sur chacune sont présentées **Figure II-23**. Un total de 44 sections a été réalisé, révélant une hétérogénéité importante, avec une épaisseur moyenne de $16,1 \pm 5,8$ nm.

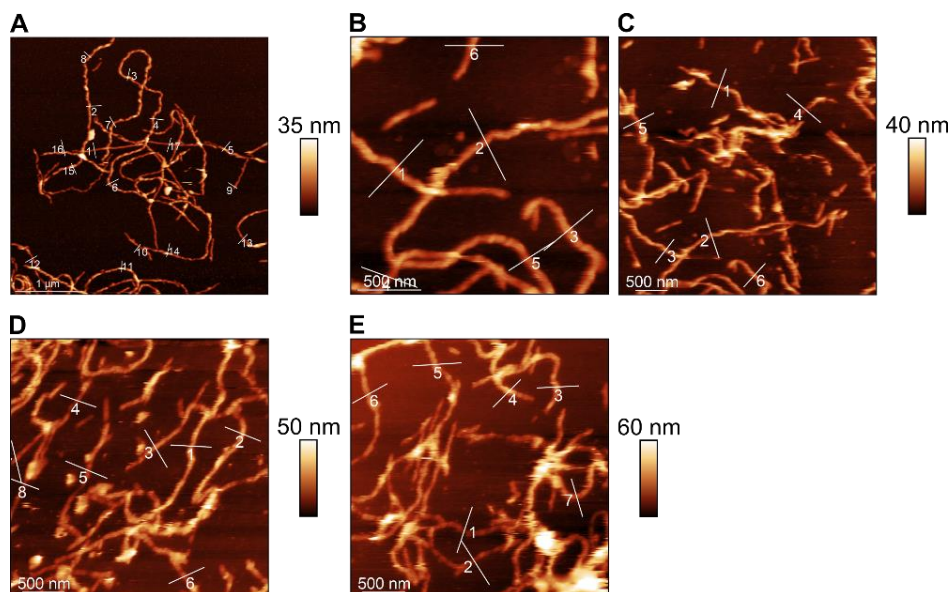


Figure II-23. Images AFM de fibres Tau-P301L + POPS, obtenues après ~ 50h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 μM de Tau-P301L et 200 μM de SUVs POPS dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 μM ThT (0 mM NaCl). Les fibres sont imagées dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl. Les lignes sur les images sont les sections qui ont permis de déterminer l'épaisseur moyenne des fibres. L'échelle latérale est de 500 nm.

Un histogramme représentant la distribution des données d'épaisseurs des fibres Tau-P301L + POPS est présenté **Figure II-24**. Ces épaisseurs sont comprises entre 5 et 35 nm, avec une proportion importante entre 17 et 20 nm (comptant pour ~ 27% de toutes les sections). Cette importante hétérogénéité peut être due à la

présence des épaissements, qui en fonction de la localisation de la section, vont influencer la hauteur de la fibre. Globalement, les fibres sont plus épaisses que celles avec héparine ou polyA.

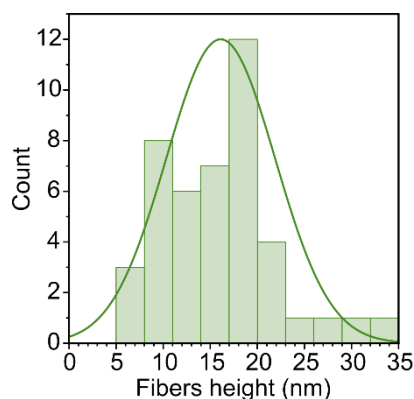


Figure II-24. Histogramme de distribution de l'épaisseur des fibres Tau-P301L + POPS, dont la moyenne est de $16,1 \pm 5,8$ nm, avec une largeur de bin de 3 nm.

2.4.2.DOPS

Afin de vérifier que l'agrégation de Tau avec le PS (phosphatidylsérine) n'est pas spécifique au POPS, nous avons également réalisé des tests d'agrégation avec du DOPS. Le DOPS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine) est un phospholipide symétrique, contrairement au POPS (16:0, 18:1), et présentant une double insaturation avec une composition en (18:1, 18:1) (**Figure II-25**).

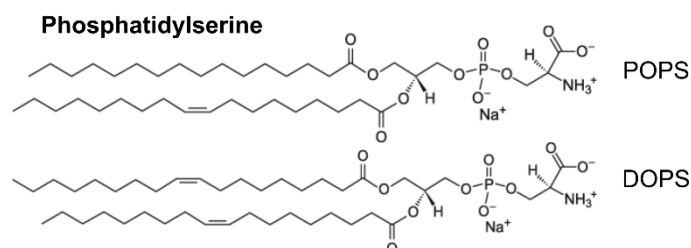


Figure II-25. Structures du POPS (16:0, 18:1) et DOPS (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine, 18:1, 18:1).

- Tests d'agrégation

L'agrégation est réalisée en utilisant un autre lot protéique que pour les autres expériences d'agrégation, indiqué par le nom Tau-P301L#. L'agrégation de Tau-P301L# a été testée avec plusieurs cofacteurs : l'héparine à 5 μ M (pour référence), POPS à 200 μ M (ratio 1:10), DOPS à 100 μ M (1:5), DOPS à 200 μ M (1:10) et DOPS à 400 μ M (1:20). Les résultats d'agrégation sont présentés dans la **Figure II-26**.

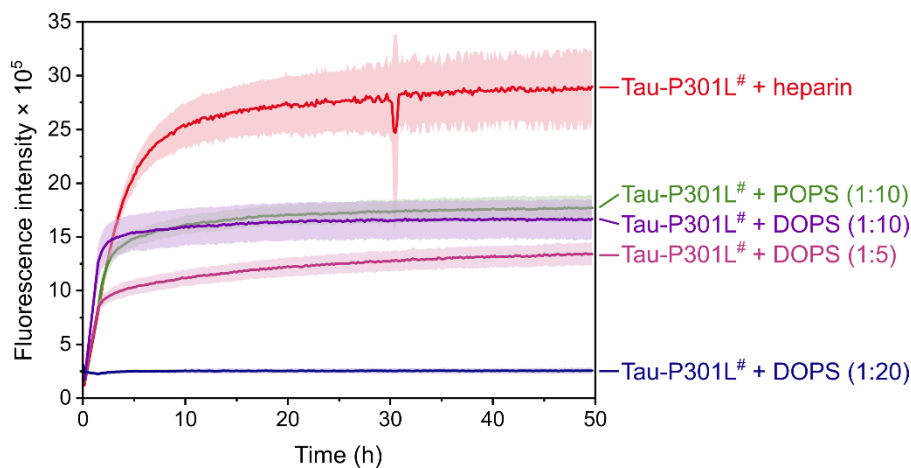


Figure II-26. Cinétique d'agrégation de Tau-P301L[#] (20 µM) suivie par fluorescence à la Thioflavine T (20 µM), en présence de différents cofacteurs, dans un tampon HEPES pH7 avec 5 mM de DTT, après environ 50 heures d'incubation à 37°C. Les cofacteurs incluent : l'héparine à 5 µM (rouge), des SUVs POPS à 200 µM (vert), des SUVs DOPS à 100 µM (rose), à 200 µM (violet), ou à 400 µM (violet foncé). Les courbes de cinétique représentent les moyennes et écarts-types de 3 réplicats.

Les cinétiques obtenues avec l'héparine et le POPS possèdent un temps de latence plus court que pour les résultats présentés précédemment, bien que l'intensité de l'héparine soit toujours plus intense que le POPS. Ces différences peuvent être expliquées par l'utilisation d'un autre lot protéique, qui induit des différences d'agrégation (Faller and Hureau, 2021). Comme avec le POPS, un ratio molaire protéine : lipide de 1:10 semble optimal pour le DOPS. En effet, à un ratio inférieur (1:5), bien qu'une agrégation soit détectée avec une augmentation rapide de fluorescence ($t_{1/2}$ de 1h30) et une intensité maximale de $1,3 \times 10^5$, un ratio de 1:10 conduit à une agrégation plus importante avec un $t_{1/2}$ d'environ 1h et une intensité maximale atteignant $1,6 \times 10^5$. Cependant, au-delà de ce ratio, l'agrégation est inhibée. Par exemple, à 400 µM de DOPS (ratio 1:20), aucune augmentation de fluorescence n'est observée, indiquant l'absence d'agrégation dans ces conditions. Ainsi, ces résultats nous indiquent que l'agrégation en présence de DOPS est très similaire à celle de POPS, avec des ratios optimaux de 1:10 (tau:lipides) identiques, ainsi qu'une cinétique avec un temps de latence et une intensité de fluorescence très similaire.

- **Observation par TEM**

Les échantillons de Tau-P301L[#] incubés avec DOPS (1:10) ont ensuite été analysés par TEM (**Figure II-27**), révélant la présence de nombreuses fibres amyloïdes. Cependant, contrairement aux autres échantillons, des structures globulaires de petite taille (indiqués par des triangles magenta sur la **Figure II-27**, et qui mesurent environ 30 à 50 nm selon les images de microscopie) ont également été observées. Ces structures pourraient correspondre à des SUVs résiduelles ou à des oligomères Tau-DOPS.

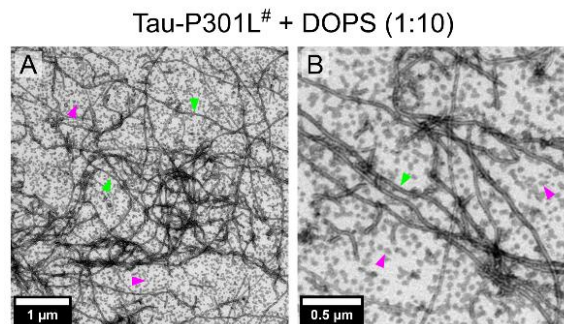


Figure II-27. Images TEM représentant l'agrégation de Tau-P301L[#] à 20 µM en présence de SUVs de DOPS à 200 µM, incubés pendant plus de 50 heures à 37°C dans un tampon composé de 20 mM HEPES, pH7, 5 mM DTT, 20 µM de ThT. Les triangles verts correspondent à des fibres amyloïdes, ceux en magenta correspondent à des petites structures globulaires d'environ 30-50 nm, qui pourraient correspondre à des SUVs ou à des oligomères Tau-DOPS. L'échelle est de 1 µm pour (A) et de 0,5 µm pour (B).

Ensemble, ces résultats confirment que le DOPS possède des capacités similaires à celles du POPS pour induire la fibrillation amyloïde de Tau-P301L. Le ratio molaire optimal de 1:10 observé pour le POPS est également valable pour le DOPS.

- **Caractérisation des fibres Tau-P301L + DOPS par AFM**

Les fibres sont ensuite imagées par AFM en milieu liquide et les images sont présentées sur la **Figure II-28A, B**, avec pour référence l'image de microscopie électronique (C) à la même échelle que (B). Les images AFM révèlent peu de fibres déposées à la surface du mica, comparé aux images TEM. Ceci peut se produire lorsque la fibre n'adhère pas suffisamment au mica pendant le dépôt, et a été observé indépendamment du cofacteur utilisé. Les petites structures globulaires qui étaient présentes en microscopie électronique sont également plus difficilement identifiables, possiblement pour les mêmes difficultés d'adhésion que les plus longues fibres.

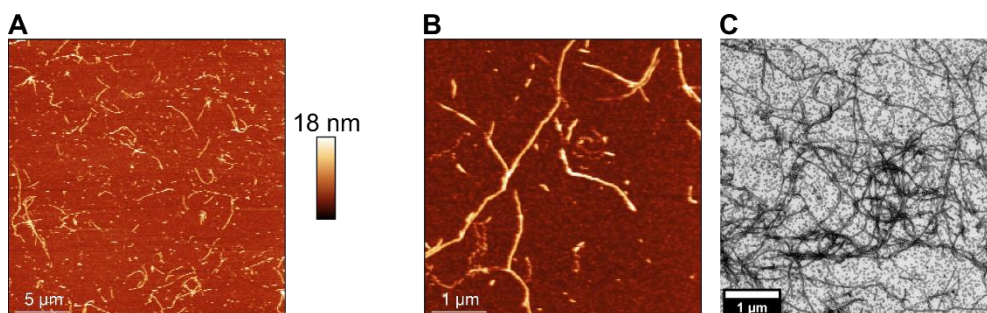


Figure II-28. Images AFM de fibres Tau-P301L + DOPS, obtenues après ~ 50h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 µM de Tau-P301L et 200 µM de SUVs DOPS dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 µM ThT. Les fibres sont imagées dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl. L'image AFM en (B) et celle de microscopie électronique en (C) permettent une comparaison à la même échelle, qui est de 1 µm pour les deux images.

Les profils de hauteur réalisés (16 sections au total) permettent de déterminer une épaisseur moyenne de $9,3 \pm 1,4$ nm, avec une épaisseur plus homogène que pour Tau-POPS. En outre, ces dernières ont également une épaisseur intermédiaire entre les fibres avec héparine ou polyA, ainsi que celles avec POPS.

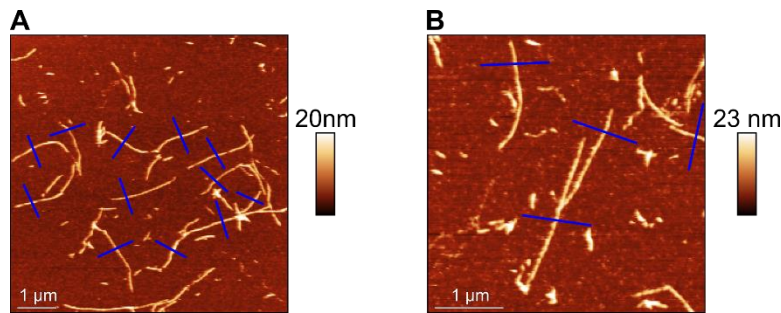


Figure II-29. Images AFM de fibres Tau-P301L + DOPS, obtenues après ~ 50h d'incubation à 37°C sous agitation. L'agrégation est réalisée avec une concentration de 20 µM de Tau-P301L et 200 µM de SUVs DOPS dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, 20 µM ThT. Les fibres sont imagées dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl. Les lignes sur les images sont les sections utilisées pour mesurer l'épaisseur moyenne des fibres. Les échelles de hauteur sont annotées à droite des images, et l'échelle latérale est de 1 µm.

En résumé, les tests d'agrégation avec DOPS confirment que Tau-P301L est également capable de fibriller avec ce phospholipide, de manière similaire au POPS et dans les mêmes conditions expérimentales (notamment en ce qui concerne les ratios tau : lipide). Cependant, des différences d'épaisseur et d'hétérogénéité sont observées entre les deux conditions.

2.5. Comparaison entre cofacteurs

2.5.1. Cinétique d'agrégation à la Thioflavine T

Dans ce chapitre, les capacités d'agrégation de Tau en présence de différents cofacteurs (héparine, ARN et phospholipides) ont été comparées. Nous nous sommes particulièrement concentrés sur l'agrégation du mutant Tau-P301L avec les cofacteurs héparine, polyA, POPS et DOPS. Pour permettre une comparaison de l'agrégation à partir des courbes de fluorescence à la ThT, plusieurs courbes obtenues dans les conditions optimales pour chaque cofacteur ont été normalisées (plateau normalisé à 1) et représentées sur la **Figure II-30**.

La normalisation permet de comparer les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) pour chaque cofacteur. Ces résultats mettent en évidence une forte variabilité pour une même condition, avec des cinétiques fluctuantes, notamment pour polyA, où le temps de latence est deux fois plus long dans un réplicat par rapport à l'autre. De plus, des différences de cinétique peuvent être observées entre Tau-P301L + héparine, Tau-P301L + POPS, et Tau-P301L + polyA. Pour quantifier ces différences, les $t_{1/2}$ de chaque condition sont représentés avec les moyennes et écarts-types de plusieurs réplicats indépendants (4 pour Tau-héparine, 2 pour Tau-polyA, 3 pour Tau-POPS, 1 pour Tau-DOPS).

Les $t_{1/2}$ (**Figure II-30B**) sont de 8 h ± 4 h pour Tau-héparine, de 37 h 00 ± 18 h 30 pour Tau-polyA, de 9 h ± 7 h pour Tau-POPS et de 44 minutes pour Tau-DOPS. Ces résultats confirment une cinétique de fibrillation plus lente pour Tau-polyA par rapport aux autres cofacteurs, en revanche il n'y a pas de différence significative entre Tau-héparine et Tau-POPS. Concernant Tau-DOPS, la détermination de la cinétique n'a pu être établie que pour un réplicat, avec le seul lot protéique démontrant un temps de demi-vie bien inférieur aux autres lots (**Figure II-26**). Ceci explique donc son $t_{1/2}$ bien plus faible que le POPS notamment.

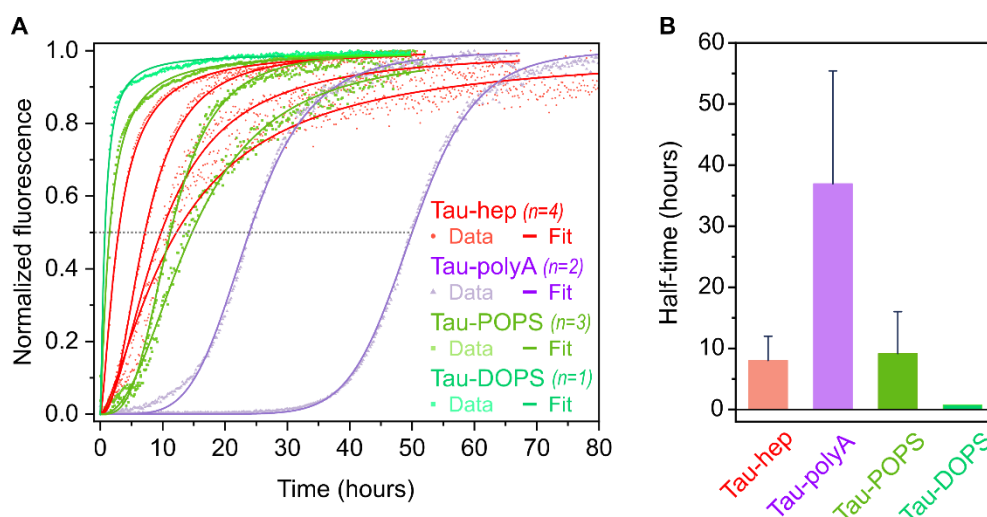


Figure II-30. Cinétiques de fluorescence à la ThT normalisées (A) et temps de demi-vie mesurés (B) pour différentes conditions d'agrégation de Tau-P301L avec des cofacteurs. Les expériences, d'une durée de 50 à 80 heures, ont été réalisées à 37°C sous agitation dans un tampon HEPES 20 mM pH7, 5 mM DTT, et 20 μ M ThT. Les cofacteurs utilisés sont : 5 μ M héparine (Tau-hep), 200 μ g/ml polyA avec 50 mM NaCl (Tau-polyA), et 200 μ M d'une suspension de liposomes POPS (Tau-POPS) ou DOPS (Tau-DOPS). Les données expérimentales (A, "data") sont modélisées (« Fit ») à l'aide de courbes de Hill (une version du modèle de Michaelis-Menten qui intègre la coopérativité initiale, notamment visible avec polyA). Les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) sont définis comme le temps nécessaire pour atteindre 50 % de la fluorescence maximale, et sont présentés avec les moyennes et écarts-types pour plusieurs réplicats (4 pour Tau-hep, 2 pour Tau-polyA, 3 pour Tau-POPS, 1 pour Tau-DOPS).

2.5.2.Épaisseur des fibres

Des fibres ont pu être formées avec le mutant pathogène de Tau, Tau-P301L, pour les cofacteurs suivants : héparine, polyA, POPS et DOPS. Ces fibres ont été caractérisées en milieu liquide par AFM, permettant de mesurer l'épaisseur moyenne de chaque type de fibre, désignées par simplification Tau-héparine, Tau-polyA, Tau-POPS et Tau-DOPS (bien qu'il s'agisse à chaque fois de Tau-P301L). Les épaisseurs moyennes de chaque fibre sont présentées dans le **Tableau II-2**.

Les résultats montrent que les fibres Tau-polyA sont les plus fines, avec une épaisseur de $4,7 \pm 1,0$ nm, suivies des fibres Tau-héparine, puis Tau-DOPS, et enfin les fibres Tau-POPS, qui présentent non seulement la plus grande épaisseur, mais également la plus grande variabilité.

Fibres	Épaisseur des fibres (nm)
Tau-héparine	$5,2 \pm 1,0$ nm
Tau-polyA	$4,7 \pm 1,0$ nm
Tau-POPS	$16,1 \pm 5,8$ nm
Tau-DOPS	$9,3 \pm 1,4$ nm

Tableau II-2. Comparaison de l'épaisseur des fibres amyloïdes formées par Tau-P301L selon le cofacteur utilisé. L'épaisseur est déterminée à partir des hauteurs mesurées sur chaque section, réalisées sur les images AFM (indiquées par des lignes sur les images).

Afin de comparer les différentes épaisseurs et de mieux visualiser leurs distributions, celles-ci sont représentées pour chaque type de fibre en **Figure II-31**. Cette figure met en évidence la variabilité des fibres

Chapitre 2. Inducteurs de l'agrégation de la protéine Tau

Tau-POPS, dont l'épaisseur varie entre 6 et 30 nm, tandis que les autres fibres sont plus homogènes. Cette différence pourrait être attribuée aux épaissements identifiés pour les fibres Tau-POPS, qui ne sont pas autant présentes dans les autres conditions.

Il est important de noter que les fibres Tau-héparine et Tau-DOPS ont été caractérisées à partir d'un même lot de protéines, dans une même expérience ThT, et observées par AFM simultanément. En revanche, les deux autres types de fibres ont été étudiés à partir de lots protéiques distincts et à des moments différents. Bien que cela limite la comparaison directe entre les fibres, ces résultats offrent néanmoins des pistes intéressantes à approfondir.

Les fibres Tau-polyA sont significativement plus fines ($p = 0,039$) que les fibres Tau-héparine. Les fibres Tau-DOPS montrent des différences significatives par rapport à toutes les autres ($p < 10^{-5}$), avec une épaisseur intermédiaire, tandis que les fibres Tau-POPS sont les plus épaisses de manière hautement significative ($p < 10^{-5}$). Globalement, les fibres formées en présence de phospholipides sont plus épaisses que celles formées avec l'héparine et le polyA.

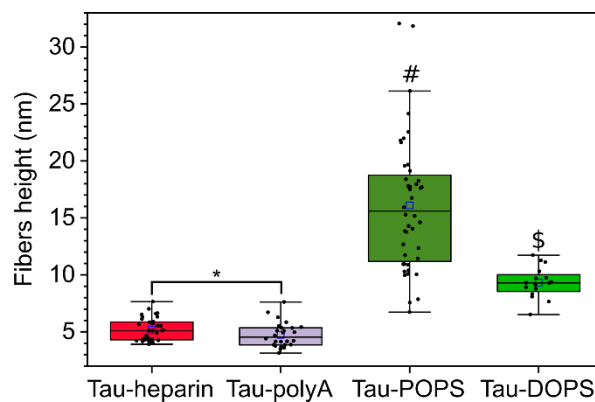


Figure II-31. Distribution des épaisseurs des fibres Tau-P301L en fonction du cofacteur. La moyenne est représentée par les petits carrés bleus, et la médiane par la ligne horizontale au centre de la boîte qui correspond à l'intervalle interquartile (IQR). Les moustaches représentent 1,5 fois l'IQR. Les points noirs indiquent les données individuelles. L'astérisque (*) indique une différence statistiquement significative ($p \leq 0,05$). Les fibres formées avec le cofacteur POPS montrent une différence très significative (#, $p \leq 0,001$) par rapport aux autres conditions, tout comme les fibres Tau-DOPS (\$).

Ainsi, bien que tous ces cofacteurs polyanioniques puissent induire la fibrillation de Tau, ils semblent générer des différences morphologiques distinctes.

3. Discussion

3.1. Quels inducteurs de l'agrégation ?

Le mécanisme précis menant à l'agrégation de Tau sous forme de fibres amyloïdes pathologiques dans les cellules cérébrales de patients atteints de maladies neurodégénératives liées à la protéine Tau reste incompris. Les avancées en détermination de structure atomique des fibres extraites de patients atteints de différentes tauopathies (Alzheimer, dégénérescence cortico-basale, démence fronto-temporale avec parkinsonisme...) (Shi et al., 2021) ont révélé un haut polymorphisme, avec une structure du cœur amyloïde spécifique de certaines pathologies (« Alzheimer fold » ; « CBD fold ») (Scheres et al., 2020). La colocalisation de diverses biomolécules (héparine, ARN, phospholipides) à proximité d'extraits de fibres pathologiques de Tau (Gellermann et al., 2006; Ginsberg et al., 1997), l'existence d'interactions directes avec ces partenaires dans des expériences cellulaires (Katsinelos et al., 2018; Lester et al., 2021; Merezhko et al., 2020), ainsi que l'agrégation de Tau en présence de ces biomolécules (Chirita et al., 2003; Goedert et al., 1996; Kampers et al., 1996), soulèvent des questions sur le lien potentiel entre le polymorphisme élevé des fibres pathologiques *in vivo* et la source de cette diversité structurale, qui pourrait être liée au cofacteur utilisé. Dans ce chapitre, nous avons donc souhaité comparer les fibres obtenues à partir de différents cofacteurs.

3.1.1. Différences de cinétique d'agrégation selon le cofacteur

Les cofacteurs utilisés dans ce chapitre pour induire l'agrégation de la protéine Tau diffèrent significativement par leur nature, leur structure, et la répartition de leur charge (**Figure II-32**).

- L'héparine, un polymère polysaccharidique, est composée d'une succession de carbohydrates sulfatés. Les groupes portant la charge négative sont les groupes sulfate (SO_4^-) ou carboxylate (COO^-).
- Les ARN utilisés sont des polynucléotides constitués d'un squelette phosphate, auquel sont attachées les bases nucléotidiques, la charge négative étant portée par le groupe phosphate (PO_4^-).
- En ce qui concerne les lipides, le POPS et le DOPS sont des phospholipides avec une tête phosphatidylsérine et une chaîne acyle hydrophobe composée de carbones saturés ou insaturés. Dans ces phospholipides, la charge négative est localisée au niveau du groupe carboxylate (COO^-) de la sérine.

Tous les cofacteurs utilisés sont anioniques et la protéine P301L possède une région très chargée positivement (MTBR) donc la force motrice de l'interaction est de nature électrostatique.

Les polyanions sont en revanche de tailles et de structures très différents, pouvant expliquer les variations observées. Les différences d'interaction entre Tau et les cofacteurs se caractérisent notamment par des intensités de fluorescence différentes en fonction du cofacteur, et également avec des différences cinétiques. Dans nos expériences, il n'a pas été possible de détecter de différences significatives dans les temps de demi-vies entre Tau-P301L + héparine et Tau-P301L + POPS. En revanche, cette augmentation de fluorescence est bien plus tardive en présence d'ARN polyA. Étant donné qu'un seul réplicat a été analysé pour Tau-DOPS, il n'est pas possible de conclure de manière définitive sur les temps de latence. Cependant, d'après l'expérience

d'agrégation de la **Figure II-26** menée simultanément pour Tau-POPS et Tau-DOPS à partir d'un même lot, le DOPS semble se comporter de manière similaire au POPS. Globalement, les différences d'intensité de fluorescence entre les conditions avec polyA et celles avec héparine ou POPS suggèrent que la nature même du cofacteur – en particulier sa distribution de charges négatives et sa structure – influence directement l'interaction avec Tau, induisant une fibrillation plus ou moins rapide.

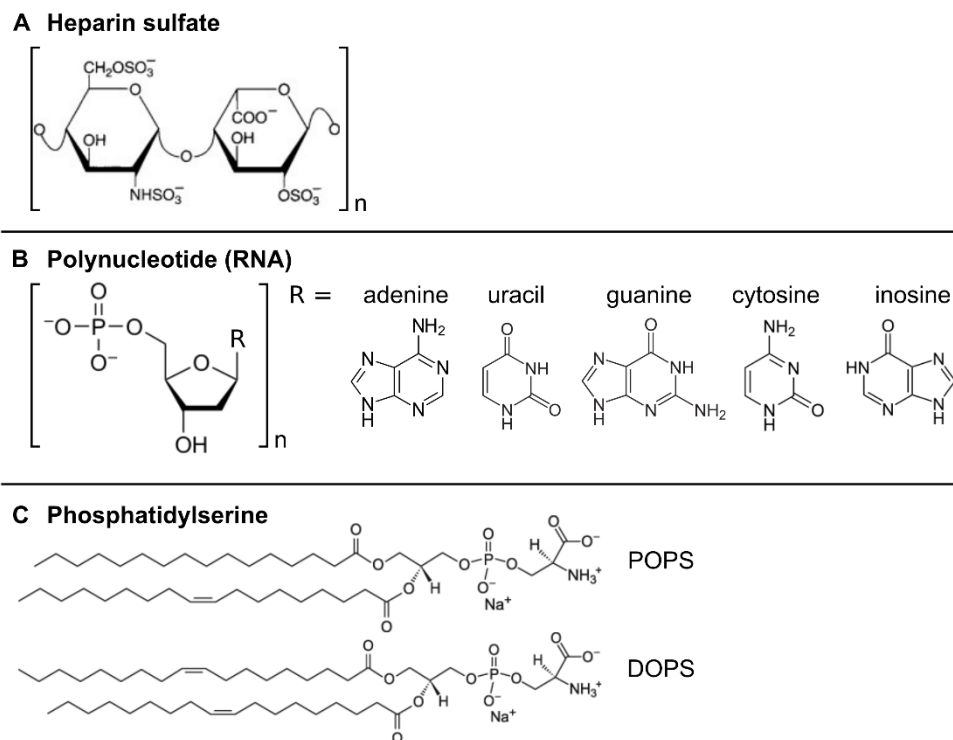


Figure II-32. Formules des différents cofacteurs utilisés dans ce chapitre : l'héparine sulfate (A) composée de n répétitions pour former un polymère carbohydrate ; les polynucléotides ou ARN (B) avec différentes bases (R), composés eux-aussi de plusieurs répétitions en fonction de la taille du polymère ; et les phospholipides sous la forme de phosphatidylsérine (C) avec le POPS ou le DOPS.

3.1.2. Morphologie des fibres

L'agrégation de Tau-P301L en présence de différents cofacteurs a conduit à la formation de fibres amyloïdes, dont les épaisseurs ont été caractérisées. Nos résultats mettent en évidence des différences significatives dans l'épaisseur des fibres obtenues en fonction du cofacteur, avec $5,2 \pm 1,0$ nm avec héparine, $4,7 \pm 1,0$ nm avec polyA, $16,1 \pm 5,8$ nm avec POPS et $9,3 \pm 1,4$ nm avec DOPS. Aucune étude à ce jour n'a entrepris de caractérisation précise de l'épaisseur des fibres de Tau en présence de l'ensemble de ces cofacteurs, bien que certaines aient décrit en détail les fibres formées avec l'héparine (Wegmann et al., 2013, 2010).

- **Fibres Tau-héparine**

L'étude de Wegmann et al. s'est en effet intéressée à la caractérisation (en termes de formes et de dimensions) de fibres produites à partir de la protéine complète de Tau (2N4R) ainsi qu'à la construction K19 (comprenant les domaines R1, R3 et R4) (Wegmann et al., 2010). Les auteurs ont mis en évidence un fort polymorphisme des fibres, les regroupant en trois catégories : des fibres épaisses et ondulées, qualifiées de "thick corrugated", des fibres fines et ondulées, appelées "thin corrugated", et des fibres fines et lisses,

désignées "thin smooth". En fonction de ces catégories, plusieurs épaisseurs ont été rapportées. D'après leurs résultats, les épaisseurs varient entre $6,9 \pm 0,8$ nm pour les fibres fines ondulées de K19 et $18,5 \pm 1,7$ nm pour les fibres épaisses ondulées de Tau (2N4R) (Wegmann et al., 2010). De manière générale, les fibres produites à partir de K19 sont plus fines que celles de Tau, ce qui a été confirmé par une étude ultérieure (Wegmann et al., 2013).

Nos résultats montrent des fibres Tau-héparine nettement plus fines ($5,2 \pm 1,0$ nm) que celles rapportées dans la littérature, où les tailles rapportées pour les fibres de Tau (2N4R) avec héparine sont comprises entre 9,4 et 18,5 nm (Wegmann et al., 2010). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette divergence. L'hétérogénéité des fibres, mentionnée dans l'étude, pourrait dépendre des conditions d'agrégation ainsi que des lots protéiques utilisés (Faller and Hureau, 2021). En effet, bien que deux types de fibres coexistent dans l'étude de Wegmann et al., il est possible que, dans notre cas, une forme unique particulièrement fine soit prédominante, au détriment des formes plus épaisses (Wegmann et al., 2010).

Une autre explication réside dans les conditions expérimentales, notamment lors de l'imagerie. Les forces exercées par la pointe lors de l'AFM pourraient aplatir les fibres, conduisant à une sous-estimation de leur épaisseur par rapport aux mesures effectuées dans d'autres études. Ce phénomène est décrit dans une autre étude de Wegmann et al. qui décrit des différences de près de 6 nm d'épaisseur entre des fibres imagées à 50 pN par rapport à 400 pN (Wegmann et al., 2013).

La durée d'agrégation de nos conditions, plus courte que dans l'étude de Wegmann (3 jours dans notre étude, 7 pour la leur) (Wegmann et al., 2010), pourrait également expliquer la présence de fibres plus fines, ou protofibrilles, non matures. Enfin, la présence potentielle de fragments de Tau issus de dégradations protéiques pourrait expliquer la formation de fibres plus fines, comme le démontre l'étude qui compare l'épaisseur des fibres entre Tau(2N4R) et K19, avant ou après utilisation de trypsine, qui permet de dégrader le *fuzzy coat* de la fibre amyloïde, et donc aboutir à un filament dont le cœur amyloïde n'est formé que de fragments de la protéine initiale (Wegmann et al., 2013).

- **Dimension des fibres en fonction du cofacteur**

Bien que nos observations nécessitent d'être approfondies, il apparaît que les fibres formées en présence d'ARN sont plus fines que celles produites avec l'héparine, tandis que celles obtenues avec POPS et DOPS sont significativement plus épaisses. Cela peut s'expliquer par le polymorphisme induit par la nature du cofacteur. En effet, une étude en cryo-EM a montré que les fibres de Tau formées en présence d'ARN présentaient un cœur amyloïde différent, ne contenant pas les résidus habituels du domaine de liaison aux microtubules (MTBR) (Wang and Mandelkow, 2016), mais des résidus situés dans la région C-terminale (Abskharon et al., 2022). Il est donc possible que le cofacteur influence la structure du cœur amyloïde, modifiant ainsi l'épaisseur globale des fibres.

Une autre hypothèse repose sur la taille du cofacteur lui-même, qui semble s'intégrer à l'intérieur des fibres amyloïdes, comme observé pour le PIP_2 dans les fibres de K18 caractérisées par TERS (Talaga et al., 2018) ou pour l'ARN en cryo-EM pour les fibres de Tau (Abskharon et al., 2022). L'incorporation du cofacteur dans

la fibre mature pourrait ainsi générer des variations d'épaisseur, directement liées à la taille et à la manière dont le cofacteur interagit avec la protéine. Pour valider ces hypothèses, des études structurales plus approfondies à l'échelle atomique sont nécessaires. À ce jour, aucune étude en cryo-EM n'a été réalisée sur les fibres de Tau (et en particulier de la protéine entière) associées aux phospholipides.

- **Morphologie globale**

Les images de TEM et d'AFM sur les fibres ont mis en évidence des différences morphologiques au sein des mêmes échantillons, avec des fibres droites, d'autres twistées ou courbées, et d'autres présentant des épaississements (en particulier pour Tau-polyA dont la périodicité a été mesurée pour une des fibres, ainsi que pour Tau-POPS dont les épaississements étaient très importants). Afin de pouvoir conclure sur la proportion relative de chaque forme et mieux les caractériser (en particulier la périodicité des épaississements), il serait nécessaire d'acquérir davantage d'images pour chaque condition. L'étude de Wegmann et al. présente une caractérisation de ce type et a été réalisée sur des fibres Tau-héparine (Wegmann et al., 2010), et a permis d'identifier deux types de structures distinctes (« thin twisted » ainsi que « thin smooth »), en accord avec la polydispersité démontrée par la détermination de structures par cryo-EM de ces types de fibres par la suite (nommées « jagged », « twister », « hose », « snake ») (Zhang et al., 2019).

3.1.3. Agrégation en fonction de la forme protéique

- **Tau-WT versus Tau-P301L**

Dans notre étude, nous avons observé des temps de demi-vie ($t_{1/2}$) d'agrégation plus longs pour Tau-P301L que pour Tau-WT. Pourtant, la littérature indique que le mutant P301L s'agrège généralement plus rapidement que le type sauvage (Nacharaju et al., 1999). Cette contradiction peut s'expliquer par la grande variabilité des expériences, ainsi que par l'agrégation plus intense de Tau-P301L, qui peut prendre plus de temps à atteindre une valeur de fluorescence maximale en ThT. Une comparaison de ces cinétiques par normalisation aurait été possible en présence de davantage de répliquats de résultats d'agrégation des conditions Tau-WT + héparine.

- **Tau entière versus fragments**

Bien que l'agrégation étudiée dans ce chapitre ait été réalisée à partir de la protéine Tau entière (2N4R), des études antérieures ont également démontré les capacités de fibrillation de fragments de Tau en présence de cofacteurs tels que l'héparine, les ARN ou les phospholipides. Par exemple, la fibrillation du fragment K18 (comprenant uniquement le MTBR) (Azouz et al., 2021) ou de Tau187 (résidus 255 à 441, comprenant le MTBR et le C-terminal) (Fichou et al., 2019) a été observée en présence d'héparine. De même, le fragment Tau187 a montré une agrégation en présence d'ARN polyU (Fichou et al., 2019) ou polyC (Pounot et al., 2024), et pour les phospholipides, la fibrillation a été observée du fragment K18 en présence de liposomes POPC:PIP2 (4:1) (Talaga et al., 2018). Ces résultats d'agrégation avec des fragments de Tau, dépourvus du domaine N-terminal, soulignent le rôle prépondérant du MTBR dans la formation des fibres de Tau. Ils suggèrent également que l'interaction entre Tau et les cofacteurs est principalement, voire exclusivement, de nature électrostatique, expliquant ainsi la capacité de diverses molécules polyanioniques à induire son agrégation.

3.2. Quel(s) mécanisme(s) dans l'interaction Tau-cofacteurs ?

3.2.1. Interaction électrostatique

- Molécules polyanioniques

Nos résultats indiquent que seules des molécules anioniques sont capables d'induire l'agrégation de Tau, peu importe le cofacteur. Ces molécules peuvent en revanche être de natures très variables (carbohydrate, ARN, phospholipide). Les différences d'induction de l'agrégation de Tau en fonction du cofacteur peuvent d'ailleurs être expliquées par le nombre de charges anioniques selon le polymère. En effet, bien que l'héparine et les ARN soient des polymères, l'héparine possède davantage de charges négatives, avec plusieurs groupements anioniques sur un seul monomère, alors que l'ARN n'en possède qu'une sur son squelette phosphate. Quant aux phospholipides, et en particulier à la phosphatidylsérine, cette dernière ne possède qu'une charge négative sur sa tête polaire, en plus d'un groupement chargé positivement et du groupement phosphate anionique.

En ce qui concerne les phospholipides et l'agrégation avec des lipides ou des chaînes hydrocarbonées en particulier, deux études se sont également penchées sur l'agrégation de Tau en présence d'acides gras libres ou de détergents. La première a conclu que les longues chaînes insaturées favorisent la formation de fibres, comme observé en TEM (Wilson and Binder, 1997). Une autre étude, qui a testé différents détergents et acides gras libres, a déterminé que deux critères principaux sont nécessaires pour la formation de fibres : une chaîne de 12 carbones et une tête chargée négativement (Chirita et al., 2003). Ainsi, bien que l'agrégation dépende de la présence d'une charge anionique sur la molécule servant de cofacteur, d'autres paramètres ou mécanismes peuvent également expliquer les différences observées en fonction du cofacteur utilisé.

- Rôle du NaCl

Pour permettre l'agrégation avec le polyA, différentes conditions de salinité ont été testées dans cette étude. Nos résultats indiquent qu'une concentration de 50 mM de NaCl était optimale pour favoriser l'agrégation entre Tau et le polyA, tandis que l'absence de NaCl ou une concentration trop élevée (100 mM) inhibait fortement cette agrégation. Ces résultats semblent contradictoires avec l'hypothèse où l'interaction entre les résidus basiques de la protéine et le phosphate chargé négativement du polyA serait uniquement électrostatique. En effet, dans le contexte d'interaction entre les résidus basiques de la protéine et le phosphate chargé négativement du polyA, la présence puis l'augmentation de NaCl devrait diminuer puis inhiber totalement l'agrégation, avec un optimum en l'absence totale de NaCl. Nos résultats suggèrent plutôt qu'une présence minimale et optimale de NaCl est nécessaire. Ces contradictions suggèrent de nouveau un mécanisme plus complexe d'agrégation entre les deux partenaires, où la charge négative du cofacteur serait certes nécessaire, mais pas suffisante pour expliquer les différences entre cofacteurs.

3.2.2. Un mécanisme plus complexe

Dans cette étude, nous avons évalué l'effet de plusieurs polynucléotides sur l'agrégation de Tau. Le polyA s'est révélé être le cofacteur le plus efficace pour induire la fibrillation de Tau, bien que le polyC et le polyI aient également montré une certaine capacité à déclencher ce processus. Une étude précédente sur Tau (2N4R)-

WT a également rapporté que seul le polyA était capable d'induire la formation de fibres amyloïdes, malgré une interaction détectable avec d'autres séquences ARN telles que le polyU et le polyC (Zwierzchowski-Zarate et al., 2022). Cette observation suggère que certaines séquences nucléotidiques simple brin sont plus propices à induire l'agrégation de Tau, bien que toutes puissent interagir avec la protéine.

La différence de capacité d'induction de l'agrégation de Tau entre ces ARN, malgré leur squelette phosphate identique et chargé négativement, suggère l'implication de mécanismes additionnels. Une étude précédente portant sur la stœchiométrie entre Tau et ses cofacteurs, notamment l'héparine, a montré que la présence d'un cofacteur induisait un changement morphologique de Tau, lui conférant une conformation propice à l'agrégation (Fichou et al., 2019). Selon la molécule anionique, les auteurs ont introduit la notion de cofacteurs "forts" ou "faibles", certains stabilisant plus ou moins la conformation propice à l'agrégation de Tau. Ils ont conclu que l'ARN, en particulier le polyU, est un cofacteur plus faible que l'héparine, car bien qu'il stabilise le complexe de Tau, il inhibe en partie l'agrégation. Dans ces conditions, la stœchiométrie joue un rôle central dans la stabilisation des complexes, et la structure adoptée par Tau est également cruciale pour permettre (ou non) l'agrégation des monomères en fibres amyloïdes. Des interactions de nature hydrophobe ou π -stacking peuvent aussi être envisagées entre les résidus aromatiques de la protéine Tau et les acides nucléiques.

Ce mécanisme serait donc fortement dépendant de la structure du cofacteur et des changements qu'il induit sur Tau. Cette hypothèse est cohérente avec les structures obtenues en cryo-EM pour les fibres issues de différents cofacteurs. Par exemple, le cœur amyloïde des fibres en présence d'héparine (avec quatre structures identifiées, décrites plus haut) (Zhang et al., 2019) diffère de celui récemment observé dans des fibres obtenues à partir d'une séquence d'ARN, où le cœur amyloïde ne contient pas les résidus des domaines R2 et R3 du MTBR, mais plutôt ceux du C-terminal (Abskharon et al., 2022).

En résumé, la présence de la charge anionique sur les molécules anioniques utilisées comme cofacteur pour permettre l'agrégation de Tau en fibre amyloïde est une exigence, mais d'autres mécanismes, comme la stabilisation d'une structuration de Tau, ou d'un complexe Tau-cofacteur, sont également essentiels et peuvent expliquer les différences constatées en fonction des conditions d'agrégation.

3.3. La Thioflavine T pour comparer les cofacteurs... Une technique appropriée ?

La ThT est un marqueur spécifique des structures en cross- β qui sont spécifiques des peptides et protéines amyloïdes qui s'auto-assemblent (amyloïde A β , IAPP, α -synucléine...) (Biancalana and Koide, 2010). Le positionnement de la ThT sur ces fibres ainsi que son émission de fluorescence sont donc quasi identiques. L'intensité de la fluorescence dépend de la proportion des fibres formées dans l'échantillon.

3.3.1. Variabilité des résultats en fluorescence de la Thioflavine T

Dans ce chapitre, un large ensemble d'expériences de cinétique d'agrégation suivies par ThT ont été présentées. Cependant, nous avons mis en évidence une variabilité importante, même avec des conditions identiques (voir **Figure II-30**). Bien que majoritairement utilisée dans les recherches sur les amyloïdes du fait

de sa facilité de mise en œuvre et sa rapidité, les expériences de ThT se sont révélées très limitées du fait de plusieurs éléments. Ces derniers sont répertoriés dans une étude récente sur la variabilité d'un autre peptide amyloïde, A β (Faller and Hureau, 2021). Parmi les critères susceptibles d'induire une variabilité dans les expériences, l'utilisation de différents lots protéiques et, plus généralement, la qualité de ceux-ci joue un rôle clé, notamment lorsque la protéine est sujette à la dégradation. Bien que des précautions aient été prises, comme l'utilisation d'un lot unique autant que possible, les expériences ont été menées sur une longue période. Cela pourrait avoir influencé la qualité des protéines, conservées à -20°C, certaines ayant été utilisées dans les semaines suivant leur production, tandis que d'autres sont restées stockées plusieurs mois.

Par ailleurs, pour minimiser la consommation de matériel, notamment protéique, les expériences de fluorescence au ThT ont été réalisées dans des plaques à 384 puits, avec des volumes réduits à 20 μ l. L'utilisation de faibles volumes peut également expliquer une certaine variabilité, même au sein d'une même série d'expériences.

En raison de ces limites inhérentes à la méthode ThT, nous avons systématiquement choisi de confirmer la présence de fibres par des techniques de microscopies (TEM et AFM). Ces méthodes, en plus de valider la présence ou l'absence de fibres, ont permis de caractériser leur morphologie et d'estimer leur abondance.

3.3.2. Interaction cofacteurs et/ou structures spécifiques avec la ThT

Dans nos expériences avec la ThT, nous avons également observé des intensités initiales de fluorescence très élevées pour certaines molécules, directement dépendantes de leur concentration, et même en l'absence de Tau. En particulier, pour le polyG, mais aussi pour le polyA, nous avons constaté une intensité de fluorescence initiale nettement supérieure à celle des autres ARN. L'incubation de ces ARN en présence de ThT a permis de confirmer l'existence d'une interaction entre eux et la ThT, conduisant à une intensité de fluorescence qui n'est pas liée à la présence de structures amyloïdes.

En plus d'une interaction possible entre les molécules utilisées comme cofacteurs et la ThT, des perturbations pourraient également provenir de l'intégration des cofacteurs au sein des fibres. Cette intégration pourrait influencer la fixation de la ThT sur les structures cross- β , et ainsi expliquer les différences observées entre les émissions de fluorescence et les résultats de microscopie (MET ou AFM), avec parfois une absence d'émission de la ThT alors que des fibres sont présentes en MET (par exemple Tau-P301L + polyA en l'absence de NaCl).

En plus de l'augmentation de l'émission de la ThT en l'absence de fibres due à une interaction avec d'autres structures, la ThT s'est révélée être sensible aux conditions expérimentales, notamment de salinité et de pH (Biancalana and Koide, 2010). Cette sensibilité pourrait expliquer des faibles émissions de fluorescence, alors que des fibres sont observées en TEM.

3.3.3. Polymorphisme et impact sur l'interaction avec la ThT

En résumé, l'agrégation de Tau en présence de cofacteurs repose sur un mécanisme complexe, où la structure du cofacteur, celle adoptée par la protéine après interaction avec le cofacteur ou celle du complexe

Tau-cofacteur lui-même, peuvent influencer la formation de fibres amyloïdes de Tau. Ce mécanisme peut expliquer les différences de cinétiques d'agrégation selon la nature du cofacteur, mais aussi l'épaisseur des fibres que nous avons caractérisées par AFM. Ce polymorphisme significatif pourrait en effet résulter de la structure adoptée par Tau au sein de la fibre, laquelle peut être différente en fonction du cofacteur.

Cependant, une question demeure quant au rôle précis du cofacteur dans cette interaction : permet-il uniquement d'induire un changement de conformation de Tau, facilitant ainsi la formation de fibres amyloïdes, ou est-il véritablement intégré dans la structure même des fibres amyloïdes ?

3.4. Le rôle des cofacteurs : catalyse ou intégration ?

La question de l'intégration des cofacteurs au sein même de la structure fibrillaire a été soulevée depuis plusieurs années. Certaines études ont même utilisé des méthodes indirectes pour démontrer leur intégration, notamment en employant des molécules dégradant les cofacteurs, ce qui entraînait le désassemblage des fibres amyloïdes (Fichou et al., 2019). Une étude précédente sur la détection chimique par TERS du phospholipide PIP2 dans des fibres de K18 avait également indiqué l'intégration du cofacteur (Talaga et al., 2018). Cependant, cette identification n'avait pas été réalisée de manière directe pour la protéine Tau entière ni pour d'autres cofacteurs.

En plus de fournir des informations sur l'agrégation de Tau avec différents cofacteurs, cette étude a permis l'obtention de fibres amyloïdes qui ont pu être analysées par la suite par nos collaborateurs dans le cadre de l'ANR AquaTERS (portée par S. Bonhommeau de l'Institut des Sciences Moléculaires, Bordeaux), ayant conduit à deux publications, l'une sur l'identification de l'héparine au sein de fibres Tau-WT + héparine (Talaga et al., 2022), l'autre sur l'identification de polyA dans des fibres Tau-P301L + polyA (Cooney et al., 2023).

3.4.1. Détection de l'héparine dans les fibres de Tau

Nos collaborateurs de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM) ont pu appliquer une technique de spectroscopie Raman couplée à l'AFM et amplifiée par la pointe et en réflexion totale interne (TIR-TERS) pour observer les fibres Tau-WT en présence d'héparine (Talaga et al., 2022). Cette méthode a permis une identification chimique à l'échelle nanométrique, notamment des résidus aromatiques et non aromatiques au sein des fibres (**Figure II-33**). Cette étude a mis en évidence la présence de l'héparine au sein de la fibre, ainsi qu'une forte abondance de feuillets β antiparallèles dans le cœur amyloïde, au détriment des feuillets β parallèles et des structures désordonnées en boucles aléatoires (*random coil*).

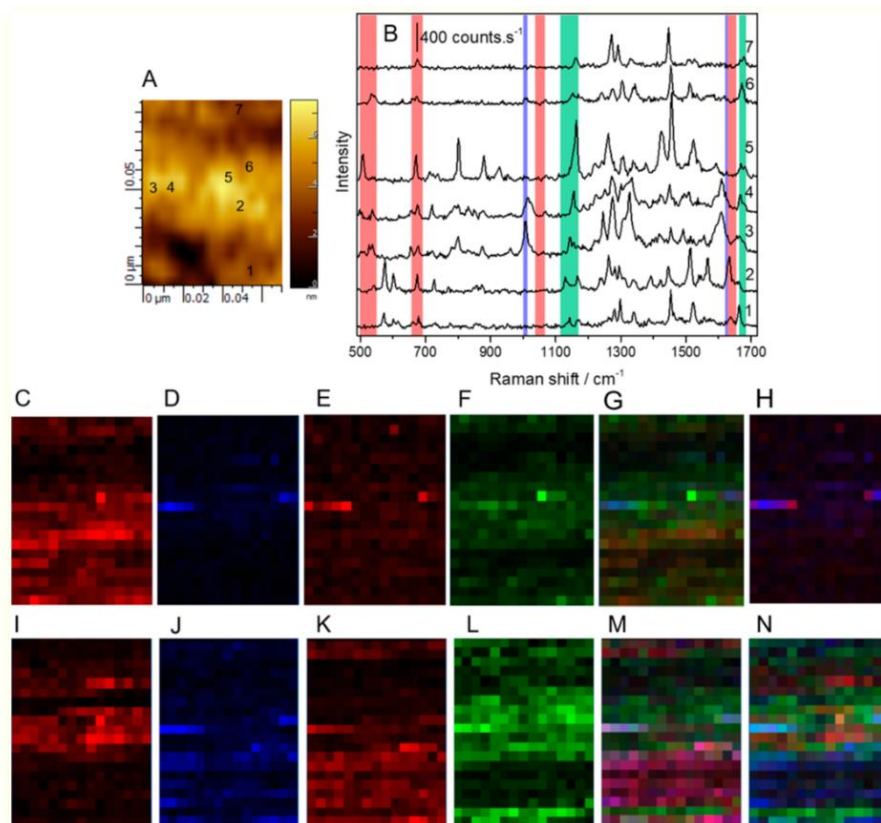


Figure II-33. Image AFM d'une fibre Tau-héparine (A). Spectres TERS (B) associés aux sept points indiqués dans (A). Les bandes de (B) correspondent (de gauche à droite) : aux cystéines (rouge), aux phénylalanines (bleu), à l'héparine (rouge), aux résidus acides et basiques (Lys/Arg/Asn/Gln) (vert), aux bandes amide I associées aux feuillets β parallèles (bleu), aux random coil (rouge) et aux feuillets β antiparallèles ou au cœur de la fibre (vert). Cartes TERS des régions spectrales de (B) : Cys (C), Phe (D), héparine (E), Lys/Arg/Asn/Gln (F), pont S-S des Cys (I), bandes amide I associées aux feuillets β parallèles (J), random coil (K) et feuillets β antiparallèles ou au cœur des fibres (L). Les images G, H, M, et N sont des superpositions de plusieurs cartes : $G=C+D+F$; $H=D+E$; $M=J+K+L$; et $N=I+J+L$ (Talaga et al., 2022).

3.4.2. Détection de l'ARN dans les fibres Tau-polyA

L'obtention des fibres Tau-polyA décrites dans ce chapitre a ensuite permis une caractérisation par nos collaborateurs à l'aide de la spectroscopie TERS (Cooney et al., 2023). Dans cet article, l'analyse des spectres Raman, TERS et SERS (diffusion Raman exaltée de surface) ont permis l'identification de la signature spécifique de l'adénine, principal composant de l'ARN polyA, au sein des fibres amyloïdes Tau-P301L + polyA (**Figure II-34**). Il apparaît que ce cofacteur se trouve principalement en surface du cœur amyloïde en feuillet β de la fibre, tout en étant partiellement enveloppé par la couche périphérique désordonnée ("fuzzy coat"), sous forme de structures en *random coil*. De plus, une colocalisation des résidus d'arginine, lysine et histidine, chargés positivement, avec le polyA, chargé négativement, a été mise en évidence. Ces résultats confirment donc les observations indirectes qui avaient été faites de l'incorporation des ARN dans les fibres amyloïdes produites en leur présence.

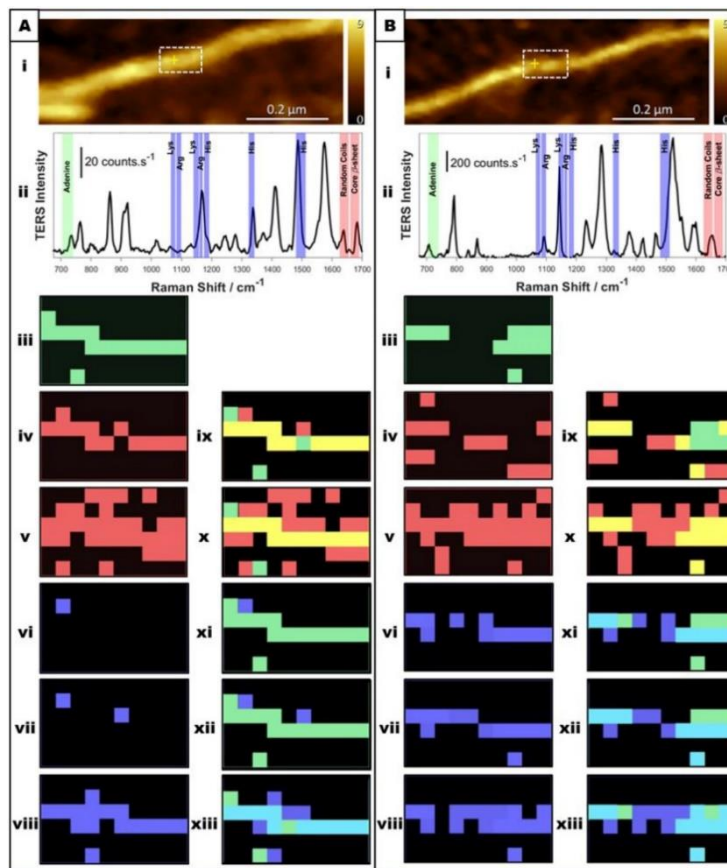


Figure II-34. Images AFM d'une même fibre de Tau-polyA (A et B, i). Spectres TERS au point indiqué par une croix blanche sur (i). Cartes TERS correspondant aux régions spectrales indiquées sur (ii), avec l'adénine (iii), les structures feuillettes β (iv), les structures en random coil (v), l'arginine (vi), les lysines (vii), les histidines (viii). Superposition avec adénine et random coil (x), arginine et adénine (xi), lysine et adénine (xii), histidine et adénine (xiii). Issu de Cooney et al. (Cooney et al., 2023).

3.4.3. Et les lipides ?

En ce qui concerne les fibres produites à partir de phospholipides (POPS et DOPS), ces dernières n'ont pas donné lieu à une caractérisation par TERS. En revanche, de précédentes études avec K18 co-incubé avec des liposomes mixtes POPC:PIP2 (4:1) ont permis l'identification de ce cofacteur dans ces fibres (Talaga et al., 2018). Il serait envisageable d'effectuer une telle caractérisation à l'aide de ces méthodes, mais également en utilisant d'autres approches. En effet, les phospholipides, détectables par spectroscopie infrarouge à des nombres d'ondes spécifiques, distincts de ceux des protéines, pourraient être identifiés grâce à une autre technique de détection chimique nanométrique, en fonction de leur localisation dans les fibres amyloïdes, l'AFM-IR (ou Nano-IR), qui repose sur le couplage entre l'AFM et la spectroscopie infrarouge.

3.4.4. Perspectives : fibres pathologiques extraites

Enfin, une question demeure concernant l'intégration de molécules autres que Tau dans les fibres extraites de patients atteints de Tauopathies. À ce jour, aucun cofacteur n'a été identifié comme faisant partie intégrante de ces structures. De plus, l'agrégation en présence de cofacteurs *in vivo* dans le contexte de la pathologie n'a pas encore été établie. Cependant, les structures obtenues par cryo-EM présentent des densités au sein du cœur amyloïde, ce qui pourrait suggérer la présence d'une molécule ou d'un cofacteur (Fitzpatrick et al., 2017; Shi

et al., 2021). Ce dernier pourrait également se trouver en dehors du cœur amyloïde, qui n'est jamais cristallisé dans les structures cryo-EM en raison de l'absence d'une architecture définie, se manifestant alors sous la forme d'un « fuzzy coat » désorganisé.

4. Conclusion

La présence de fibres amyloïdes de Tau dans les cellules cérébrales de patients est observée dans de nombreuses maladies neurodégénératives, notamment dans la maladie d'Alzheimer, qui présente la plus forte prévalence. Ces fibres sont donc particulièrement importantes pour la compréhension de ces pathologies, mais les mécanismes menant à leur formation demeurent mal compris. Bien que l'existence de cofacteurs, c'est-à-dire de molécules capables d'induire ou de faciliter l'agrégation de Tau, n'ait jamais été démontrée *in vivo*, plusieurs indices suggèrent cette possibilité. En particulier, les fibres extraites des cerveaux de patients atteints de démences sont hautement polymorphiques et présentent, dans leur structure résolue par cryo-EM, des densités non attribuées (Fitzpatrick et al., 2017; Shi et al., 2021).

Dans notre étude, nous avons utilisé plusieurs molécules anioniques pour induire l'agrégation du mutant pathologique Tau-P301L, et avons comparé les capacités d'agrégation en fonction du cofacteur, ainsi que l'épaisseur des fibres générées. Nous avons mis en évidence des différences de cinétiques selon les molécules, révélant un mécanisme complexe qui ne repose pas uniquement sur des interactions électrostatiques. Les fibres obtenues présentent également des épaisseurs variables en fonction du cofacteur, ce qui pourrait s'expliquer par la taille de ces molécules. Leur intégration potentielle dans la structure des fibres amyloïdes, confirmé par des expériences ultérieures, pourrait ainsi influencer la taille des fibres.

Ainsi, si une telle intégration est possible pour les phospholipides utilisés dans ce chapitre, il est pertinent de se demander si l'agrégation de Tau à partir de ces cofacteurs pourrait avoir un impact sur les membranes, majoritairement composées de lipides, et constituer une source potentielle pour la fibrillation de Tau.

Principaux Résultats

- ▶ Tau est capable de former des fibres amyloïdes en présence de molécules anioniques de différentes natures
- ▶ Les fibres de Tau obtenues après incubation avec divers cofacteurs présentent des tailles significativement différentes
- ▶ Certains des cofacteurs (héparine, ARN polyA) ont pu être identifiés chimiquement incorporés au sein des fibres de Tau par TERS
- ▶ La différence de taille des fibres pourrait être due à l'intégration du cofacteur au sein de la fibre, influençant donc son épaisseur globale dépendante de la molécule





CHAPITRE 3

Table des matières

Introduction	113
<hr/>	
Résultats	114
Impact de Tau-P301L sur l'intégrité de liposomes POPS	114
Etude de l'interaction Tau-P301L - POPS par PWR	115
Analyse de l'interaction Tau-P301L - PS par spectroscopie ATR-FTIR	120
Imagerie en temps réel et à l'échelle nanométrique de l'interaction Tau-PS	128
<hr/>	
Discussion	134
<hr/>	
Conclusion	139



Chapitre 3. Interaction de Tau avec les membranes anioniques

Les lipides et la membrane plasmique de façon générale représentent des cibles et interfaces impliquées dans plusieurs mécanismes de la pathologie de la protéine Tau, comme son agrégation, sa sécrétion, et son effet délétère vis-à-vis des cellules neuronales (Bok et al., 2021). En particulier, nous avons discuté de la capacité de Tau à former des fibres amyloïdes en présence de liposomes de phosphatidylsérine, notamment de BPS dans la littérature (Ait-Bouziad et al., 2017; Chirita et al., 2003) et de POPS ou DOPS dans nos expériences. En lien avec cette capacité, de nombreuses études s'intéressent à des aspects particuliers de cette interaction Tau - lipides anioniques, comme la structuration de la protéine et la formation de complexes protéines-lipides, largement liés à son agrégation. Cependant, de nombreuses questions demeurent quant à l'impact de cette interaction sur la membrane cytoplasmique, notamment en raison des résultats variés observés en termes de perturbation membranaire (Azouz et al., 2021; Mari et al., 2018; Patel et al., 2015).

1. Introduction

Tau est capable de former des fibres amyloïdes en présence de lipides organisés en petits liposomes de phosphatidylsérine (PS), notamment de BPS dans la littérature (Ait-Bouziad et al., 2017; Chirita et al., 2003), ou POPS et DOPS dans les résultats présentés dans le chapitre précédent. En plus de contribuer potentiellement à la pathogénicité de Tau en favorisant la formation de fibres amyloïdes, cette agrégation peut également perturber les membranes en extrayant des lipides pour former ces fibres.

Nous nous intéresserons dans ce chapitre à plusieurs modèles membranaires de POPS et de DOPS afin d'évaluer l'impact de Tau sur ces membranes. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le mutant pathogène P301L de Tau présentait une capacité d'agrégation accrue, ce qui nous a conduits à le sélectionner pour ces expériences, afin de corrélérer son agrégation aux effets observés sur les membranes. Par souci de simplicité, Tau-P301L sera ici simplement désigné sous le nom de Tau.

Deux types de modèles membranaires seront utilisés : d'une part, des liposomes unilamellaires (LUV), pour évaluer les perturbations éventuelles des structures en solution à travers des expériences de fuite des liposomes et d'autre part, des bicouches supportées, étudiées à l'aide de méthodes biophysiques adaptées à l'analyse des surfaces, telles que la spectroscopie infrarouge polarisée (ATR-FTIR), la résonance plasmonique de surface (PWR) et la microscopie à force atomique (AFM), le tout en milieu liquide.

2. Résultats

2.1. Impact de Tau-P301L sur l'intégrité de liposomes POPS

L'impact de Tau-P301L sur des liposomes est évalué par étude de fuite de calcéine, méthode couramment utilisée pour évaluer la perturbation de l'organisation des membranes.

Pour cela, un fluorophore, ici la calcéine, est encapsulée à forte concentration dans des liposomes de type LUV, taille < 200 nm, puis mis en présence de protéine Tau-P301L. A forte concentration la fluorescence de la calcéine est inhibée, par effet de *stacking* des molécules. Une perturbation de la membrane provoque la libération de la calcéine dans le milieu extérieur. Plus diluée, l'émission de fluorescence peut être mesurée. Le pourcentage de fuite (L_T %) est ensuite calculé par normalisation de la fluorescence (F_T) par rapport à la fluorescence initiale avant addition de la protéine (F_0), et par la fluorescence finale maximale après addition d'un détergent (F_{max}), le Triton X100, qui induit la destruction complète des liposomes, tel que : $L_T \% = [(F_T - F_0) \div (F_{max} - F_0)] \times 100$

Les résultats de fuite de calcéine sur plusieurs heures et à différents ratios POPS : Tau-P301L sont présentés **Figure III-1**. La condition contrôle avec les liposomes seuls (gris) permet de confirmer la stabilité de ces derniers sur le temps observé, à savoir 18h. Avant l'addition de Triton X100, aucune fuite n'est observée, déterminée par l'absence d'augmentation de la fluorescence. A un ratio tau : lipide inférieur à 1 : 100, la stabilité est la même qu'en l'absence de protéine. Pour des concentrations plus élevées en protéine, on observe une fuite progressive du fluorophore. Pour un ratio protéine : lipide de 1 : 2, cette fuite atteint même 100% après 18h. En outre, après seulement 3h (**Figure III-1B**), la fuite dépasse les 50% pour atteindre $67\% \pm 25\%$ à une concentration de Tau de 1 μM , soit un ratio de 1 : 10 (tau : lipides).

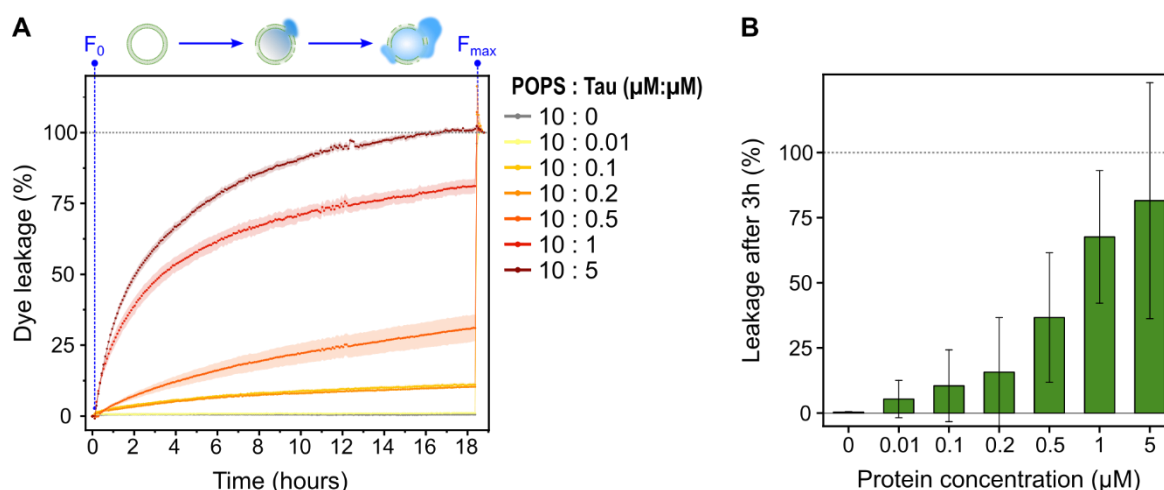


Figure III-1. Cinétiques de fuite de calcéine d'une concentration fixe de LUVs de POPS (10 μM) en présence de concentrations croissantes (0,01 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 5 μM) de protéine Tau-P301L (A). Pourcentage de fuite de calcéine après 3h pour 3 réplicats indépendants aux différentes concentrations protéiques (B).

La fuite de calcéine des liposomes POPS observée en présence de protéine Tau-P301L confirme l'existence d'une interaction entre la protéine et les lipides. Cette interaction entraîne une perturbation totale ou partielle des vésicules, qui permet au fluorophore de s'en échapper.

Nous pouvons ensuite évaluer l'impact de Tau-P301L sur des bicouches supportées, qui sont les modèles le plus usuellement étudiés. Ces dernières sont obtenues par fusion d'une solution de petits liposomes unilamellaires (SUVs) sur les surfaces.

2.2. Etude de l'interaction Tau-P301L - POPS par PWR

La technique de résonance plasmonique de surface par ondes guidées (PWR, *plasmons waveguide resonance*) permet d'étudier l'impact de Tau-P301L sur une bicouche POPS, et peut informer sur l'existence de perturbation, de dépôts, ou de réorganisation, et également de déterminer une constante d'affinité apparente.

Une expérience de PWR génère des spectres représentant la réflectance de la lumière, ici produite par une source laser polarisée émettant dans le domaine visible, en fonction de l'angle d'incidence, après avoir traversé un capteur sur lequel est déposé l'échantillon. Une gamme d'angles d'incidence est balayée à l'aide d'une table rotative, et plusieurs pics sont suivis en fonction des résonances spécifiques qui se produisent à l'interface du capteur. Ce dernier est composé d'un prisme en verre, recouvert d'une fine couche d'argent, et d'une couche plus épaisse de silice. L'échantillon est injecté dans une cellule en Téflon, en contact direct avec le capteur. Les modifications dans l'échantillon sont reflétées par des variations de la position et de l'intensité des pics de résonance *p-* et *s-*.

Pour chaque expérience, 3 réplicats ont été réalisés mais pour alléger les résultats, un seul des trois réplicats est présenté.

2.2.1. Dépôt de la bicouche POPS

Dans un premier temps, le spectre du tampon seul (20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl) est enregistré (**Figure III-2**, en gris). On y retrouve les 3 pics caractéristiques qui correspondent à des diminutions de la réflectance de la lumière réfléchi au niveau du détecteur, à des angles spécifiques, avec :

- Le TIR ou pic de réflexion totale interne, dont le maximum correspond à un angle de $61,529^\circ$. Ce dernier est utilisé comme référence par rapport aux autres pics car son intensité ne dépend pas de l'épaisseur déposée sur le capteur.
- Le pic de résonance *p-* négatif, dont la valeur d'angle d'incidence est de $62,061^\circ$.
- Le pic de résonance *s-* négatif, dont la valeur d'angle d'incidence est de $66,048^\circ$, et moins intense que le pic *p-*.

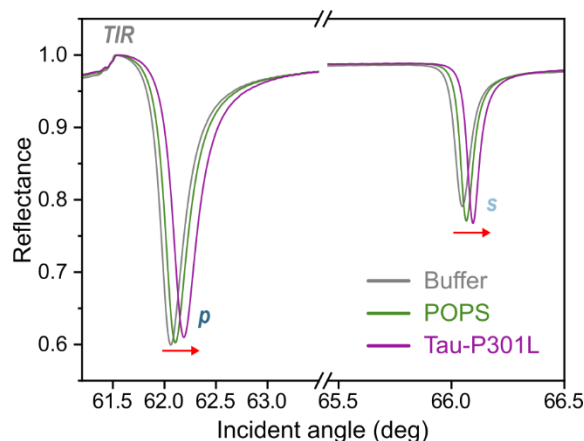


Figure III-2. Spectres PWR du tampon (gris), de la bicouche POPS (vert) et de la bicouche après addition de 350 nM de protéine Tau-P301L (violet), pour une expérience indépendante sur les 3 réplicats effectués. Les pics TIR, *p*- et *s*- caractéristiques de la PWR sont indiqués.

La bicouche supportée est ensuite formée à la surface du prisme, en injectant dans la cellule de PWR la solution de SUVs de POPS en présence de calcium. La formation de la bicouche est suivie par un déplacement des pics de résonance *p*- et *s*- vers des valeurs d'angles d'incidence plus élevées (indiquées par des flèches rouges sur la **Figure III-2**). Ce décalage est lié à l'indice de réfraction des lipides, plus élevé que celui du tampon qu'il remplace (Harté et al., 2014). Ces déplacements se font progressivement lors du dépôt, et les décalages sont indicatifs de continuité de la bicouche. Pour cela, la cellule est rincée, et les valeurs des angles de résonance pour les pics de la bicouche POPS sont de 61,531° pour le **TIR**, 66,066° pour le *s*-, et 62,105° pour le pic *p*-, pour le réplicat présenté, soit des variations de 44 mdeg pour le pic *p*-, et 19 mdeg pour le pic *s*-. Dans une précédente étude utilisant de la phosphatidylcholine (PC), ces décalages par rapport au tampon étaient d'environ 185 mdeg pour le pic *p*- et d'environ 83 pour le pic *s*- (Harté et al., 2014). Par rapport à ces valeurs, les nôtres sont plus faibles ce qui pourrait indiquer soit l'existence d'une bicouche discontinue, soit d'une différence d'épaisseur pour la bicouche PS comparé à PC (Harté et al., 2014; Salamon et al., 2005).

2.2.2. Addition de Tau-P301L sur la bicouche POPS

Une fois la bicouche stable, la protéine Tau-P301L est ajoutée dans la cellule PWR progressivement, avec des additions successives par paliers à des concentrations allant de 100 nM à 1000 nM. La **Figure III-3** présente les variations des maximums des pics *p* (bleu foncé), *s* (bleu clair) et **TIR** (gris) au cours du temps, pour un des réplicats. Les lignes verticales pointillées grises représentent l'addition de la protéine Tau-P301L dans la cellule en nanomolaire. Chaque point de ces courbes correspond au maximum de chaque bande observée sur les spectres PWR.

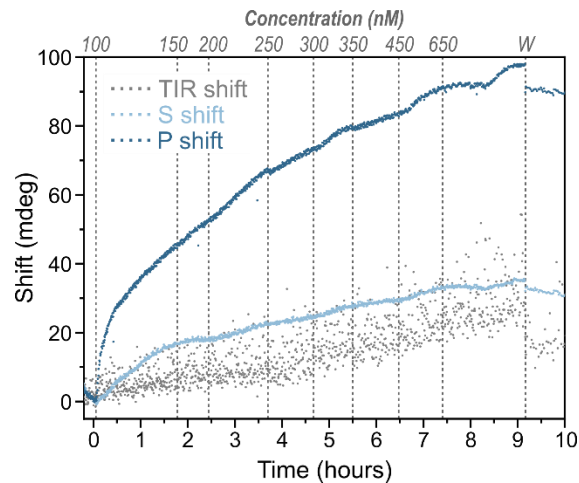


Figure III-3. Décalage des pics TIR (gris), *p* (bleu foncé) et *s* (bleu clair) en fonction du temps après chaque addition protéique, normalisés par rapport aux valeurs d'angle d'incidence de la bicouche POPS seule. Les lignes pointillées verticales indiquent chaque addition de protéine, dont la concentration est indiquée au-dessus de l'axe en nano molaire. Le W indique le rinçage de la cellule de PWR, permettant de rincer toute protéine non fixée sur la bicouche.

Chaque addition de Tau-P301L sur la bicouche POPS induit un décalage positif des pics de résonance *p* (bleu foncé sur la **Figure III-3**) et *s* (bleu clair sur la **Figure III-3**), qui augmente progressivement au fil du temps et des ajouts de protéine (lignes pointillées verticales en gris **Figure III-3**). Ces augmentations sont lentes, avec un décalage maximal observé pour la première addition à 100 nM, où le pic *p* montre un shift de 45 mdeg, 1h45 après l'ajout de la protéine. Le système n'atteint pas un équilibre, les spectres ne se stabilisant pas après chaque addition. C'est pourquoi nous avons ajouté la protéine environ toutes les heures par rapport à nos observations pendant nos mesures.

Les paramètres expérimentaux de notre expérience induisent des décalages du pic *p*- plus importants que ceux du pic *s*-, du fait du facteur de sensibilité (Sf) qui est ici de 0,74 (Salamon and Tollin, 2004). Cependant, le ratio *p/s* reste constant au cours des différentes additions et expériences. Lorsque le système est rincé (annoté par W sur la **Figure III-3**), une diminution des valeurs des angles de résonance pour tous les pics est observée, indiquant une saturation du volume de la cellule et suggérant que les effets observés ne se limitent pas à la proximité de la surface. Cependant, les spectres restent décalés de manière significative par rapport à notre condition contrôle, suggérant un effet irréversible de l'interaction. Pour aller plus loin dans notre analyse, nous avons ensuite essayé de comprendre si les décalages observés étaient dus à une variation de la masse sur le capteur (et donc à un dépôt de protéine sur les bicouches) ou à un changement de l'anisotropie et de la structure de la bicouche (et donc plutôt à une insertion de la protéine dans la bicouche).

2.2.3. Analyses des contributions masse / structure

Les variations des ratios *p/s* permettent de déterminer les contributions de changements de masse ou d'anisotropie (augmentation ou diminution de l'anisotropie) par analyse graphique (Salamon and Tollin, 2004). Pour cela les décalages des pics *p*- et *s*- pour chaque addition protéique sont reportées sur un graphique avec en abscisse les décalages du pic *s*-, et en ordonnée ceux du pic *p*- (**Figure III-4**).

Chapitre 3. Interaction de Tau avec les membranes anioniques

L'analyse est décrite en détail dans la section **Matériel & Méthodes** (p.199189). Brièvement, les axes de masse et de structures servant de référence sont représentés sur un graphique. Ces derniers sont déterminés à partir d'un facteur de sensibilité (S_f) spécifique aux paramètres expérimentaux utilisés, et traduit le rapport des décalages observés en s - pour le décalage d'une valeur de 1 mdeg en p - (Salamon and Tollin, 2004). Dans nos conditions, le S_f est de 0,74, et les axes de structure et de masse sont déterminées à partir des équations suivantes : $2\Delta S/\Delta P = S_f$ pour l'axe de structure, et $\Delta S/\Delta P = S_f$ pour l'axe de masse.

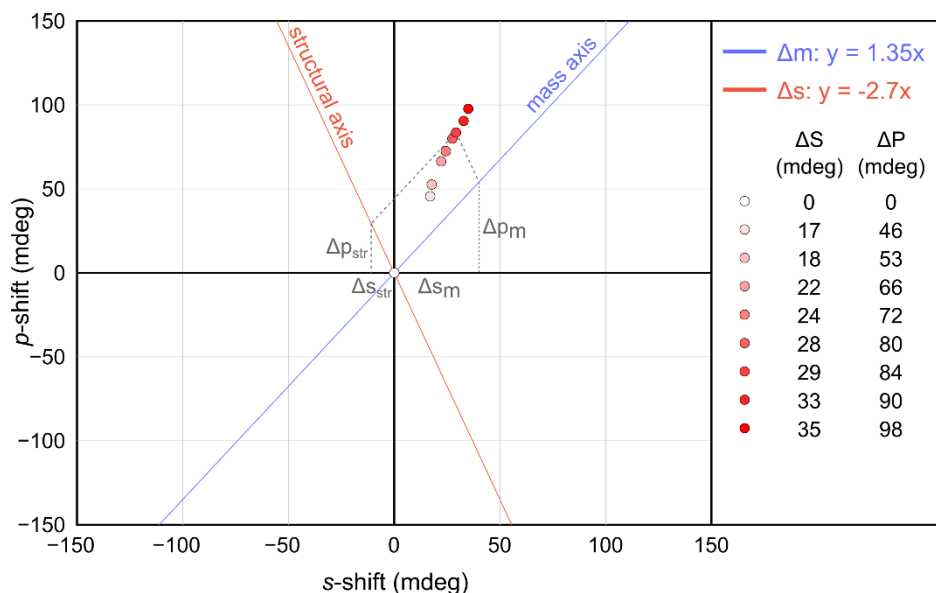


Figure III-4. Coordonnées des décalages des pics p et s d'après le système de coordonnées masse-structure (Salamon and Tollin, 2004) pour une expérience de PWR représentative après injection sur une bicouche POPS de différentes concentrations en Tau-P301L (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 450, 650 nM, des cercles plus clairs aux plus foncés). Les axes de masse et de structure sont indiqués respectivement en violet et en rouge, et leurs équations sont précisées dans la légende (calculées avec un $S_f = 0,74$ (Salamon and Tollin, 2004)). Les décalages de masse ou de structures des pics s et p sont annotés (respectivement Δs_m , Δs_{str} pour le pic s -, Δp_m , Δp_{str} pour le pic p -).

L'analyse graphique des ratios p/s met en évidence la contribution majoritaire du paramètre « masse » qui augmente après addition de Tau-P301L. La lecture graphique des intersections des projections des courbes de masse et de structure permet de déterminer les contributions de l'augmentation de masse ou de l'anisotropie après chaque addition de protéine.

Par exemple, pour une concentration de 350 nM de Tau-P301L (point avec les lignes pointillées sur la figure), les décalages des shifts s et p , induits par les changements de masse et de structure, montrent que les variations du spectre dépendent à environ 69 % d'une augmentation de masse et à 31 % d'une augmentation d'anisotropie. Ces contributions restent stables pour toutes les additions protéiques dans les trois réplicats. Les variabilités observées entre réplicats ne permettent pas de conclure sur une orientation spécifique (augmentation d'anisotropie) du système, mais confirment le rôle majoritaire de l'augmentation de masse sur les décalages des spectres, avec des contributions de changements de masse pour les 3 réplicats de $70,4 \pm 8,7$ %.

Ces résultats suggèrent que les modifications spectrales induites par Tau-P301L proviennent majoritairement d'une augmentation de masse à la surface de la bicouche POPS, et que cette augmentation est équivalente pour toutes les concentrations testées.

2.2.4. Détermination de la constante d'affinité

Les décalages du pic p pour trois réplicats indépendants après addition de Tau-P301L sur la bicouche POPS, en fonction de la concentration en protéine, sont présentés dans la **Figure III-5**. Pour ces trois réplicats, le dépôt de la bicouche POPS induit des décalages de 28 ± 13 mdeg pour le pic s - et de 75 ± 11 mdeg pour le pic p -. Les ratios p/s étant identiques au cours du temps, nous nous concentrerons uniquement sur les décalages du pic p -. Les données expérimentales sont ensuite modélisées selon une équation hyperbolique similaire à celle de Michaelis-Menten, dont l'équation est : $y = \frac{V_{max} \times x}{K_D + x}$, où V_{max} correspond à une valeur limite d'un décalage maximal ($P_{shift_{MAX}}$) et K_D correspond à la constante d'affinité apparente de l'interaction de Tau-P301L avec la bicouche POPS (Devanathan et al., 2006). Le K_D ainsi calculé est de $0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$, soit une valeur sub micromolaire, caractéristique d'une interaction forte entre Tau et la bicouche POPS.

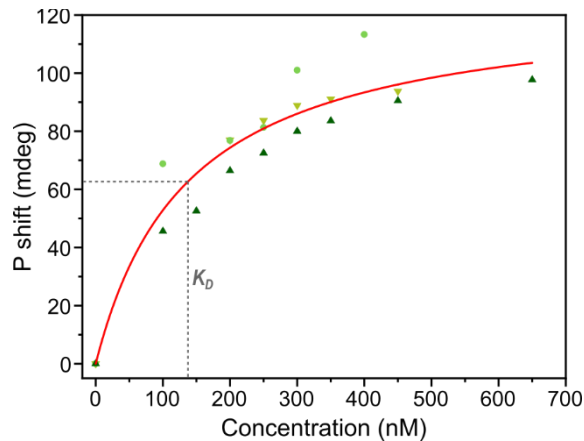


Figure III-5. Décalages du pic de résonance p vers des plus hautes valeurs d'angle d'incidence après chaque addition protéique, normalisés par rapport à la bicouche POPS seule, pour 3 réplicats indépendants. La modélisation des points expérimentaux d'après une équation hyperbolique (rouge) permet de déterminer un K_D de $0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$ et un $P_{shift_{MAX}}$ de 125 ± 11 mdeg.

Cette interaction est irréversible, comme l'indique la très faible diminution des décalages des pics p et s après rinçage de la cellule de PWR (indiquée par W sur la **Figure III-3**). La valeur $P_{shift_{MAX}}$ vaut 125 ± 11 mdeg, ce qui correspond à une augmentation importante de l'épaisseur de la bicouche (Harté et al., 2014).

D'après les analyses de contributions des changements de masse ou d'anisotropie du système, on voit que les contributions de chacune sont stables au cours du temps (représenté par des ratios p/s qui n'évoluent pas au cours des additions), et que la contribution de la masse est majoritaire par rapport à l'anisotropie. Ceci tend à privilégier l'hypothèse d'une variation d'épaisseur qui pourrait être expliquée par une accumulation de protéines sur la bicouche, l'ordre et la structure celle-ci ne semblant pas varier au cours du temps. Par ailleurs, l'absence d'épaulements ou de modifications dans la forme des pics suggère l'absence de formation de microdomaines ou d'organisations détectables par cette méthode (Devanathan et al., 2006).

En outre, bien que l'on détecte une augmentation de masse, cette méthode ne permet pas d'obtenir d'informations précises et spécifiques sur l'organisation de la membrane, ou sur la structuration protéique.

Pour mieux caractériser les interactions spécifiques, nous avons utilisé la spectroscopie ATR-FTIR. Cette méthode permet de distinguer précisément l'organisation des lipides au sein d'une bicouche supportée et la structure des protéines lors de l'interaction.

2.3. Analyse de l'interaction Tau-P301L - PS par spectroscopie ATR-FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée (ATR-FTIR) est une technique vibrationnelle permettant de détecter les modes de vibrations spécifiques de groupes fonctionnels d'intérêt, dans notre cas les protéines et les lipides. De par sa détection spécifique, il est possible d'observer des changements de la bicouche lipidique, mais aussi au niveau de la protéine. Le mode polarisé utilisé dans cette étude permet également d'informer sur l'orientation des molécules à la surface du cristal. Dans le cadre de l'étude d'interaction protéine / membrane, elle permet de travailler dans le tampon, et d'informer sur la présence de perturbation, d'insertion ou d'accumulation protéique sur la bicouche, mais également de déceler une structuration de la protéine.

2.3.1. Spectres ATR-FTIR d'une bicouche POPS

Les spectres obtenus pour les polarisations *s* (0°) et *p* (90°) du tampon (20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl) sont d'abord acquis. La bicouche POPS est ensuite déposée sur le cristal de germanium par fusion des SUVs en présence de calcium. Après incubation, le cristal est rincé trois fois avec du tampon pour éliminer l'excès de vésicules non fusionnées. Les spectres aux deux polarisations sont alors de nouveau enregistrés, puis traités par soustraction du tampon et correction de la ligne de base. Les expériences sont réalisées en triplicat, mais pour simplifier, une seule expérience avec les spectres aux deux polarisations de la bicouche POPS seule est présentée dans la **Figure III-6**, avec les différents pics caractéristiques annotés.

La bicouche lipidique de POPS seule présente les modes d'élongation antisymétrique et symétrique des groupements CH₂, $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ et $\nu_s(\text{CH}_2)$ respectivement à 2923 cm⁻¹ et 2850 cm⁻¹. Les modes $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ et $\nu_s(\text{CH}_3)$, moins intenses, apparaissent comme des épaulements à 2950 cm⁻¹ et 2870 cm⁻¹. La position de la bande $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ à 2923 cm⁻¹ indique des chaînes désordonnées, comme attendu pour des membranes fluides (Lewis and McElhaney, 2013). Une valeur d'absorbance de $1,6 \times 10^{-3}$ (pour la polarisation *p*) est cohérente avec la formation d'une bicouche unique à la surface du cristal ATR (Castano and Desbat, 2005; Goormaghtigh et al., 1999). La bande à 1740 cm⁻¹, attribuée au mode de vibration du C=O de la fonction ester ($\nu(\text{C}=\text{O})$) du phospholipide est aussi détectable (Lewis and McElhaney, 2013). L'acquisition des spectres aux polarisations *s* et *p* permet d'obtenir des informations sur l'orientation des phospholipides dans la bicouche, via le ratio dichroïque exprimé par $R_{ATR} = \text{Ab } \nu_s\text{CH}_2 \text{ p-pol} / \text{Ab } \nu_s\text{CH}_2 \text{ s-pol}$ (Goormaghtigh et al., 1999). Ce dernier est de $1,19 \pm 0,10$, soit cohérent avec l'orientation d'une bicouche fluide (Castano and Desbat, 2005; Goormaghtigh et al., 1999).

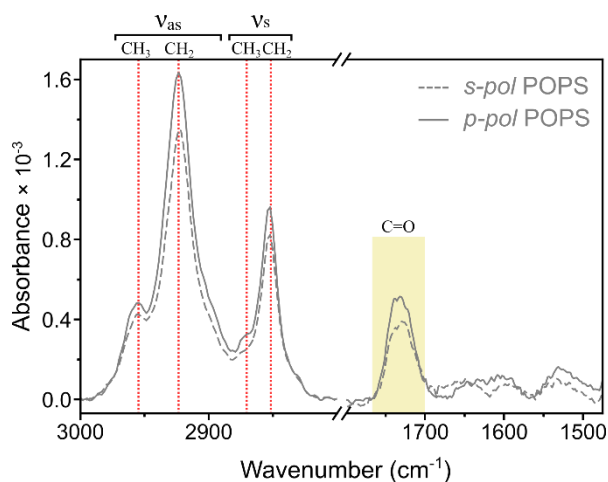


Figure III-6. Spectres ATR-FTIR d'une bicouche POPS aux polarisations *s* (0°) et *p* (90°). Les pics caractéristiques des phospholipides sont identifiés par des lignes verticales, avec les modes d'élongation antisymétrique et symétrique des groupements CH_2 , $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ et $\nu_s(\text{CH}_2)$ respectivement à 2923 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} , et ceux des groupements CH_3 , $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ et $\nu_s(\text{CH}_3)$ à 2950 cm^{-1} et 2870 cm^{-1} . La bande correspondant au groupement ester des phospholipides est représentée en jaune.

Pour s'assurer de la stabilité de la bicouche seule, et servir de contrôle en l'absence de protéine, cette dernière est incubée seule dans du tampon pendant 3h. L'intensité du pic à 2923 cm^{-1} , directement liée à la quantité de phospholipides à la surface du cristal, permet de quantifier la déplétion lipidique. En l'absence de protéine pour 3 réplicats indépendants, le pourcentage de lipides restants dans la bicouche par rapport à l'intensité initiale du pic à 2923 cm^{-1} est de $87 \pm 16\%$, indiquant une faible déplétion lipidique et permettant de confirmer la stabilité globale de la bicouche POPS dans des conditions contrôles.

2.3.2. Impact de 3h d'incubation de Tau-P301L à $1\text{ }\mu\text{M}$ sur POPS

Pour étudier l'impact de Tau-P301L, les bicouches POPS sont d'abord formées dans les mêmes conditions que précédemment. Après avoir pris les spectres avant addition de Tau, un volume de $10\text{ }\mu\text{l}$ de tampon (sur les $20\text{ }\mu\text{l}$ totaux) est remplacé par la protéine à une concentration finale de $1\text{ }\mu\text{M}$. Cette dernière est incubée sur la bicouche 3 heures avant d'être rincée trois fois avec du tampon. Les spectres sont ensuite acquis aux deux polarisations. Les spectres ATR-FTIR aux deux polarisations, avant et après incubation de Tau-P301L à $1\text{ }\mu\text{M}$ pendant 3h, sont présentés **Figure III-7A**.

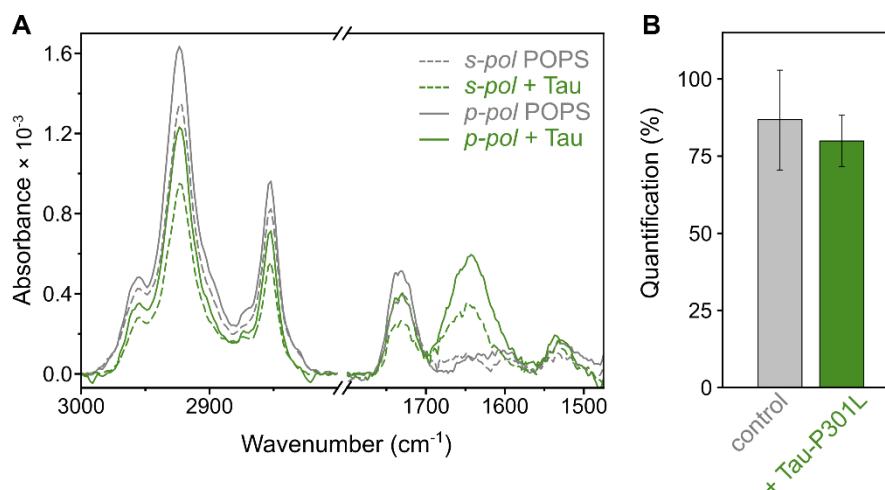


Figure III-7. Spectres ATR-FTIR de la bicouche POPS avant (gris) et après (vert) incubation de Tau-P301L à 1 μM pendant 3h aux polarisations s (ligne pointillée) et p (ligne continue), à une résolution de 4 cm^{-1} (A). Quantification des lipides restants sur la bicouche par rapport à l'intensité initiale pour la condition contrôle (gris) et avec Tau-P301L (vert) (B).

Après 3 heures d'incubation avec Tau-P301L, l'absorbance des bandes $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ et $\nu(\text{C}=\text{O})$ ester a diminué, mais de manière similaire à celle observée en l'absence de protéine, avec $80 \pm 8\%$ des lipides restants après incubation de Tau, contre $87 \pm 16\%$ dans la condition contrôle (**Figure III-7B**). Cela suggère que l'intégrité de la membrane n'est pas significativement affectée par son interaction avec la protéine Tau. De plus, le rapport dichroïque n'a pas varié avec ou sans addition de protéine, avec un ratio de $1,19 \pm 0,10$ avant addition, contre $1,23 \pm 0,15$ après incubation de Tau-P301L, indiquant que la protéine ne s'est pas insérée profondément dans la membrane lipidique.

2.3.3. Accumulation de la protéine et structuration

L'intérêt de l'ATR-FTIR est qu'au-delà de la variation de la bicouche lipidique, il est également possible de suivre la protéine via les bandes amide I et II. Ainsi, l'accumulation de Tau-P301L sur la membrane POPS est révélée par l'observation des bandes amide I et amide II centrées respectivement à 1640 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} . Par exemple, l'étude de la largeur de la bande centrée autour de 1640 cm^{-1} permet d'indiquer l'hétérogénéité de la structure secondaire des protéines, avec un pourcentage élevé de structures non organisées (*random coil*).

Pour déterminer la présence d'éléments de structure secondaire, il est possible de déconvoluer la bande amide I. En effet, chaque élément de structure secondaire (hélices α , feuillets β , β -turn, *random coil*) possède des nombres d'ondes caractéristiques, et peut participer en différentes proportions à la structure globale de la protéine.

Les détails de la déconvolution des spectres de la protéine dans les différentes conditions sont précisés dans le **Matériel & Méthodes** (p.206), et la déconvolution est réalisée sur les bases d'une précédente étude (Goormaghtigh et al., 1990). Brièvement, un modèle comprenant les contributions de six courbes de Voigt, correspondant à chaque élément de structure secondaire (contribution intense des feuillets β antiparallèles, feuillets β parallèles, structure désorganisée (*random coil*), hélices α , β -turn, et contribution faible des feuillets

β parallèles) est utilisé pour ajuster les données expérimentales et déterminer les contributions de chacun de ces éléments à la structure globale de la protéine.

La bande amide I de la protéine après incubation sur la bicouche POPS est comparée à une condition dans laquelle la protéine est native, et une condition dans laquelle elle est structurée dans des fibres Tau-P301L + héparine. Le spectre de la protéine native est acquis après dépôt d'une solution à 20 μM , correspondant à une protéine entièrement désordonnée en raison de sa nature intrinsèquement désordonnée (IDP). Pour obtenir une référence de Tau plus structurée, des fibres de Tau-P301L + héparine sont produites dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre précédent, mais en l'absence de ThT. Le spectre est enregistré après dépôt de 20 μl d'un échantillon d'agrégation (20 μM Tau-P301L, 5 μM héparine).

La **Figure III-8** présente les bandes amide I des données expérimentales (en violet), accompagnées des différents pics annotés de 1 à 6, qui correspondent aux courbes modélisant chaque élément de structure secondaire, ainsi que les données ajustées. La déconvolution permet de mettre en évidence des différences importantes entre chaque structure.

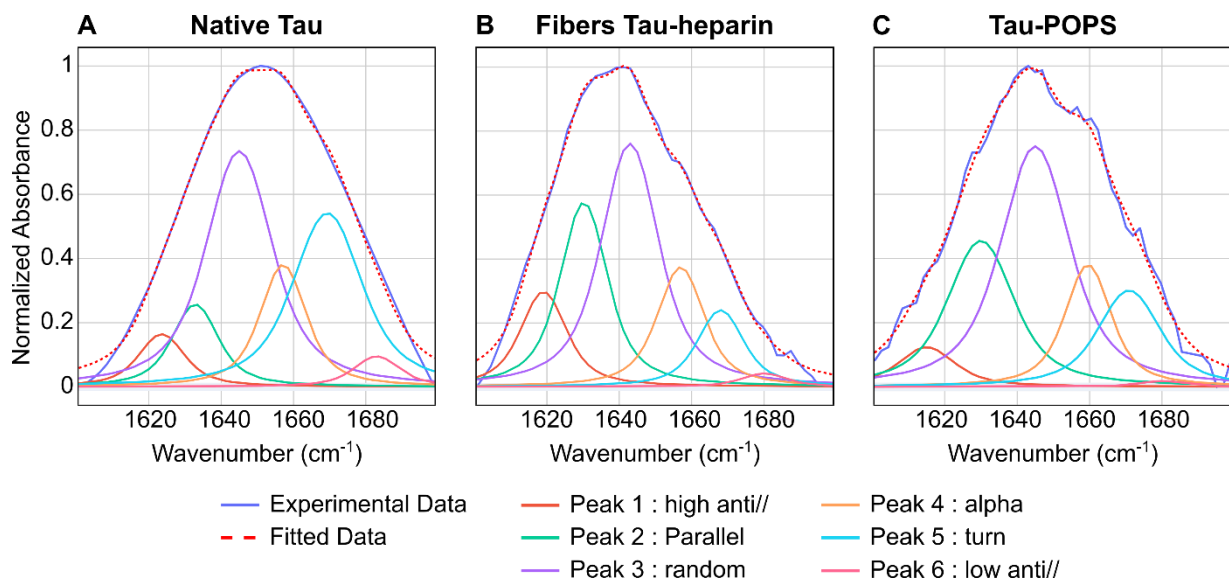


Figure III-8. Résultats de déconvolution des bandes amides I de Tau-P301L native (A), agrégées sous forme de fibres amyloïdes Tau-héparine (B), ou après incubation 3h à 1 μM sur une bicouche POPS (C). Pour chaque condition, les données expérimentales normalisées (violet), les différentes courbes de Voigt (numérotées de 1 à 6) correspondant à chaque élément de structure secondaire, ainsi que les données corrigées (rouge) sont représentées. L'axe des ordonnées est commun aux 3 conditions.

La bande amide I des fibres est décalée vers des plus bas nombres d'ondes en comparaison avec la protéine native, avec les maxima situés respectivement à 1636 cm^{-1} , et à 1650 cm^{-1} , soit une différence de près de 14 cm^{-1} , bien au-delà de la résolution spectrale qui est de 4 cm^{-1} . La bande amide I de la protéine Tau-P301L après incubation sur la bicouche POPS, présente un maximum centré à 1643 cm^{-1} , soit entre les pics de la protéine native et de la protéine agrégée.

Les bas nombre d'ondes sont attribués à la formation de feuillets β , dont les nombres d'ondes sont compris entre 1613 et 1637 cm^{-1} (Goormaghtigh et al., 1990). Le décalage de la bande de l'amide I des fibres, ainsi que celle de la protéine après incubation sur la bicouche POPS, par rapport à celle de la protéine native, indique donc une augmentation des feuillets β .

Pour déterminer les contributions relatives de chaque structure à partir de la déconvolution, les pourcentages relatifs peuvent être calculés à partir des aires sous chaque courbe. La **Figure III-9** présente ces pourcentages pour chaque pic, dans les trois conditions étudiées. Ces résultats montrent que les différences dépendent très peu des feuillets β antiparallèles (pics 1 et 6) ou des portions désordonnées (pic 3), mais principalement des feuillets β parallèles et des β -turns. En effet, la protéine Tau-P301L incubée sur POPS (Tau-POPS) présente $25 \pm 1\%$ de feuillets β parallèles et $16 \pm 2\%$ de β -turns, tandis que pour la protéine native et les fibres Tau-héparine, ces proportions sont respectivement de 9 % et 30 %, et de 23 % et 10 %. Ces résultats suggèrent que la protéine Tau-P301L se structure en feuillets β parallèles au contact de la membrane POPS.

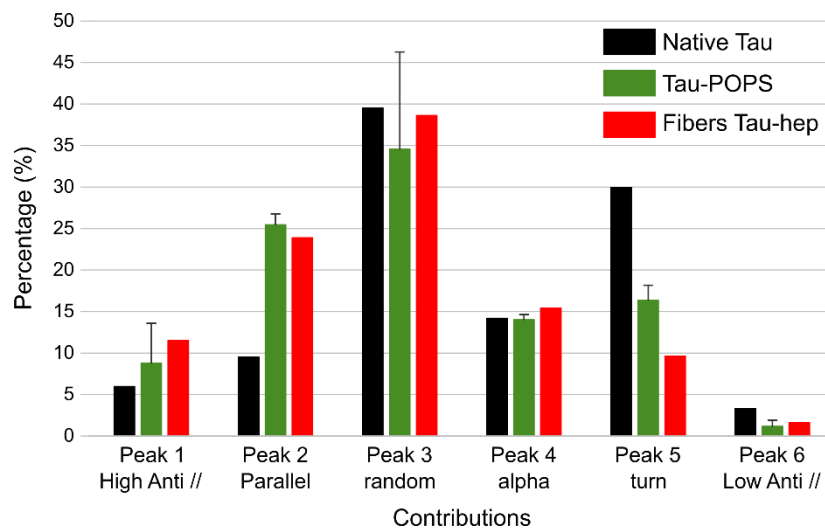


Figure III-9. Contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale de la protéine Tau-P301L dans différentes conditions : native (noir), après incubation sur la bicouche POPS (vert) ou dans des fibres Tau-héparine (rouge). Pour les conditions Tau native et Fibres Tau-héparine, les contributions ne correspondent qu'à un seul réplicat, et pour Tau-POPS, les contributions de 3 réplicats sont présentées.

2.3.4. Impact de 3h d'incubation de Tau-P301L à 5 μM sur POPS

Afin de déterminer si l'absence de perturbation de la bicouche par l'ajout de la protéine dépend du rapport tau : lipides, nous avons effectué la même expérience mais avec 5 fois plus de protéine, avec une concentration de Tau à 5 μM . Les spectres aux polarisations p avant et après incubation de la bicouche POPS avec 5 μM de Tau-P301L, sont présentés **Figure III-10**. A cette concentration, un effet similaire est observé, sans diminution de l'absorbance de la membrane de POPS, suggérant l'absence de perturbation membranaire.

Une augmentation de la quantité de protéine adsorbée est révélée par l'augmentation de l'intensité de la bande amide II d'un facteur 4, passant d'une absorbance à $1,9 \times 10^{-4}$ après incubation à 1 μM , jusqu'à $6,5 \times 10^{-4}$ après incubation à 5 μM .

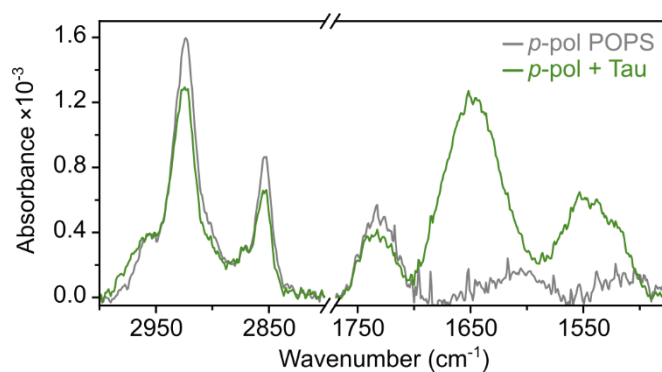


Figure III-10. Spectres ATR-FTIR de la bicouche POPS avant (gris) et après (vert) incubation de Tau-P301L à 5 μM pendant 3h à la polarisation *p*.

Bien qu'une augmentation significative de l'accumulation de Tau soit observée en augmentant la concentration de protéine incubée sur la bicouche POPS, il est intéressant de déterminer si la structure de la protéine accumulée à 5 μM est similaire, ou différente, de celle observée à 1 μM . Pour cela, les spectres des bandes amides pour les trois conditions précédentes sont comparés à celui obtenu avec 5 μM de Tau incubée sur la bicouche POPS (en bleu, **Figure III-11**). Il est notable que, cette fois-ci, le spectre est plus proche de celui de la protéine native que de celui des fibres, ou même de celui correspondant à 1 μM de Tau sur la bicouche POPS. Les contributions dans les bas nombres d'ondes, correspondant aux feuillettes β , ne sont plus présentes, et le maximum est à nouveau situé autour de 1650 cm^{-1} .

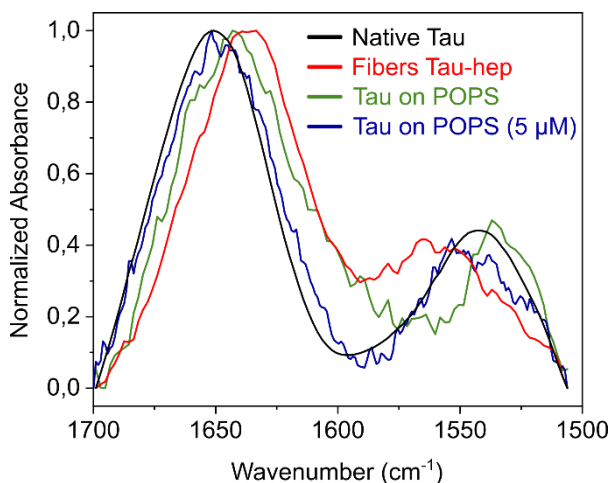


Figure III-11. Comparaison de la région amide (1500-1700 cm^{-1}) des spectres à la polarisation *p* de la protéine Tau-P301L native (noir), agrégées sous forme de fibres Tau-héparine (rouge), ou après 3h d'incubation soit à 1 μM (vert), soit à 5 μM (bleu), sur une bicouche de POPS. L'absorbance est normalisée pour tous les spectres.

Cela suggère qu'à une concentration protéique plus élevée (5 μM), bien que l'accumulation de Tau sur la bicouche augmente, la structuration semble atteindre un seuil de saturation. À 1 μM , la structuration globale est plus définie, avec une plus forte contribution des feuillettes β , tandis qu'à 5 μM , la protéine semble globalement moins structurée. En ATR-FTIR, les structures observées représentent une moyenne de toutes les conformations présentes en solution. Il est donc possible qu'une partie de la protéine à 5 μM conserve une structure similaire à celle observée à 1 μM , mais, en moyenne, la protéine semble moins organisée à plus haute concentration.

En résumé, les résultats d'ATR-FTIR suggèrent que la protéine Tau-P301L s'accumule sur la membrane POPS sans provoquer de perturbation de la membrane, avec une structuration intermédiaire entre la protéine entièrement désordonnée, et celle observée dans les fibres amyloïdes, après incubation à une concentration de 1 μM . Cette structuration se traduit par une diminution de la proportion des β -turn, au profit des feuillettes β parallèles. Même à plus haute concentration protéique (5 μM), nous n'observons pas de déplétion en lipides de la membrane.

Ces résultats sont en accord avec ceux de PWR, dans lesquels une accumulation protéique sur la bicouche de POPS est observée. En revanche, cette accumulation protéique ne semble de nouveau pas entraîner de perturbation majeure de la membrane.

2.3.5. Impact de Tau sur une bicouche DOPS

Précédemment, au niveau des lipides, nous avons vu que le DOPS était similaire au POPS, et était également capable de conduire à l'agrégation de Tau. Il est également fluide à température ambiante, de même que le POPS, avec une température de fusion de -11°C (Koynova and Tenchov, 2013). Comme DOPS et POPS sont souvent utilisés indifféremment dans les différentes études, nous avons souhaité voir si Tau possédait le même impact sur une bicouche de DOPS ou de POPS.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que les organisations membranes des deux bicouches étaient comparables. Les spectres ATR-FTIR des bicouches POPS et DOPS aux polarisations *s* et *p* sont présentées sur la **Figure III-12**.

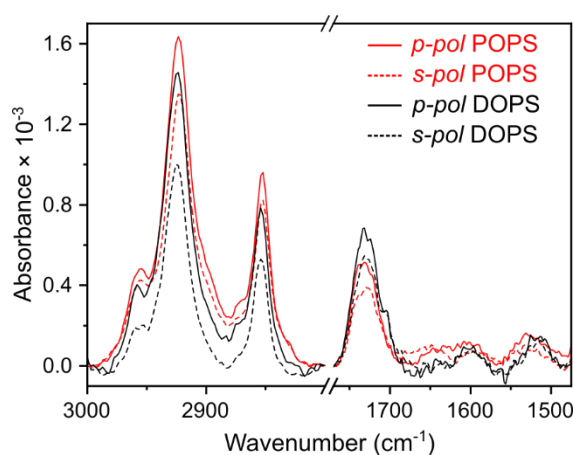


Figure III-12. Spectres ATR-FTIR des bicouches POPS (rouge) et DOPS (noir) seules aux polarisations *s* (lignes pointillées) et *p* (lignes continues).

Les spectres ATR-FTIR des deux bicouches mettent en évidence une légère différence de ratio dichroïque des chaînes CH_2 . Le désordre augmentant avec le nombre d'insaturations, on observe en effet une bicouche DOPS plus désorganisée comparée au POPS, avec respectivement des ratios dichroïques de 1,46 et 1,21. Cependant, la fluidité à température ambiante est confirmée par la position du pic de vibrations antisymétriques, $\text{vas}(\text{CH}_2)$ centré à 2923 cm^{-1} . Cela confirme que les 2 lipides se comportent de la même manière.

Nous avons également vérifié que l'interaction de Tau-P301L avec la membrane DOPS était similaire à l'interaction Tau / POPS par ATR-FTIR. Les spectres ATR-FTIR de la bicouche DOPS avant et après addition de protéine sont présentés **Figure III-13**.

De la même manière que pour la bicouche POPS, la bicouche DOPS ne semble pas significativement impactée, avec 92 % des lipides restants après incubation de Tau pour le réplicat présenté. En comparaison avec les résultats obtenus précédemment pour POPS, où il restait 80 ± 8 % de lipides après incubation de Tau-P301L et 87 ± 16 % en condition contrôle, la déplétion lipidique n'est donc pas significativement différente.

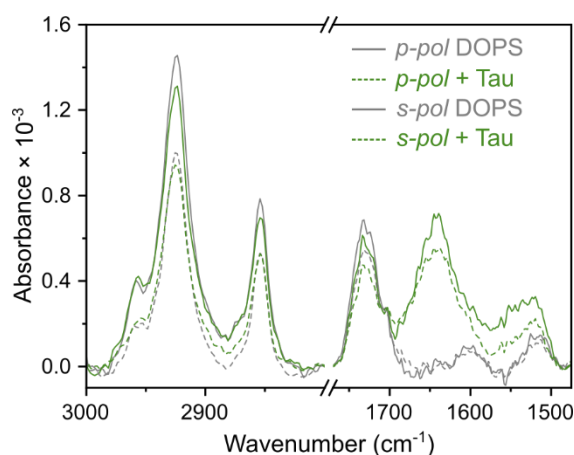


Figure III-13. Spectres ATR-FTIR de la bicouche DOPS avant (gris) et après (vert) incubation de Tau-P301L à $1 \mu\text{M}$ pendant 3h aux polarisations s (lignes pointillées) et p (lignes continues).

De plus, les spectres révèlent également la présence d'une accumulation de protéine, comme observé avec POPS, indiqué par l'intensité de la bande amide II qui atteint 3×10^{-4} . Une déconvolution de cette bande amide I, présentée **Figure III-14**, indique des similitudes par rapport à Tau-POPS présenté précédemment, avec des proportions plus intermédiaires. Pour Tau-POPS, le pourcentage de structure en feuillets- β parallèles était de $26 \pm 1\%$, et celui de β -turn était de $16 \pm 2\%$, alors que pour Tau-DOPS, ces pourcentages sont respectivement de $15 \pm 0,5\%$ et de $17 \pm 4\%$. Ainsi les contributions de toutes les structures autres que les feuillets- β et les β -turn sont similaires entre ces deux conditions (de même que pour la protéine native ou sous forme de fibres), en revanche, Tau-DOPS possède une contribution en feuillets- β parallèles moindre que Tau-POPS, et très intermédiaire entre la protéine native et les fibres.

Ces résultats indiquent que la protéine Tau-P301L a adopté une structuration partielle au contact de DOPS, similairement à POPS mais avec une plus faible proportion de feuillets- β parallèles. Combinés aux résultats de déplétion lipidique, les données suggèrent un comportement similaire de Tau-P301L par rapport aux bicouches DOPS et POPS.

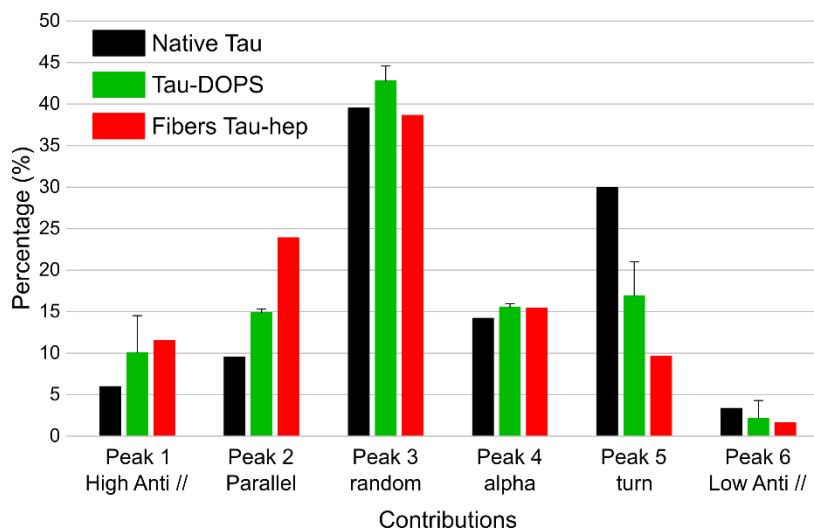


Figure III-14. Les contributions de chaque structure est présentée (B) pour Tau-P301L incubée sur DOPS (vert), avec les contributions pour la protéine native (rouge) et pour les fibres Tau-héparine (noir) pour référence. Les contributions de deux répliquats sont présentées pour la condition Tau-DOPS.

2.4. Imagerie en temps réel et à l'échelle nanométrique de l'interaction Tau-PS

Pour observer le type d'accumulation de la protéine sur la bicouche POPS à l'échelle nanométrique et vérifier la présence de dommages locaux éventuels, non détectables par des méthodes globales comme la PWR ou l'ATR, nous avons utilisé la microscopie à force atomique (AFM).

2.4.1. Obtention d'une bicouche de phosphatidylsérine homogène et reproductible

- POPS

Pour les expériences d'imagerie AFM, nous avons commencé par utiliser des bicouches de POPS en lien avec les expériences de PWR et d'ATR. La bicouche supportée est déposée par fusion des SUVs de POPS en présence de calcium sur du mica fraîchement clivé. L'échantillon est incubé 60 min dans une chambre humide à 60°C, pour permettre un dépôt homogène, d'après des protocoles précédemment décrits (Lv et al., 2018). Les images de 3 bicouches indépendantes sont présentées **Figure III-15**.

Il est directement visible que les bicouches n'ont pas des morphologies similaires en fonction de l'expérience. En effet malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas obtenu des conditions reproductibles avec l'obtention de bicouches incomplètes, comme on le voit sur les images (A) et (B), où le mica n'est pas totalement recouvert (indiqué par les étoiles bleues sur les images). Des phénomènes de séparation de phase et l'apparition de multicouches (indiquées par des flèches vertes), rendant les bicouches très hétérogènes.

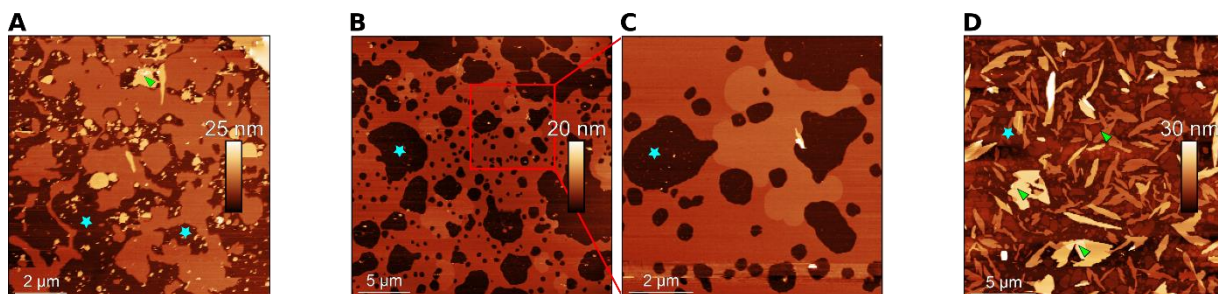


Figure III-15. Images AFM de bicouches POPS, pour 3 expériences indépendantes (A, B, D). Les étoiles bleues indiquent du mica, que la bicouche ne recouvre pas, et les flèches vertes indiquent des multicouches. L'image (C) est un zoom sur la partie indiquée par un carré rouge sur l'image (B).

L'obtention d'une bicouche homogène sans présence de multicouches ayant été très difficile dans nos conditions à partir du POPS, et fort des résultats obtenus en ATR-FTIR ne montrant pas de différences de comportement entre POPS et DOPS, nous avons choisi le DOPS pour conduire ces expériences d'AFM.

- **DOPS**

Le dépôt de DOPS pour les expériences AFM a permis d'obtenir une bicouche homogène, avec peu de défauts et de multicouches (**Figure III-16** avec 4 bicouches indépendantes). Les mesures d'épaisseur effectuées au niveau des défauts (trous dans les bicouches) donnent des valeurs de $3,4 \pm 1,1$ nm ($n = 6$) (**Figure III-16**). Cette valeur est cohérente avec l'épaisseur attendue pour une bicouche lipidique fluide par AFM, généralement comprise entre 3 et 5 nm (Azouz et al., 2021; Lee et al., 2017; Lv et al., 2018).

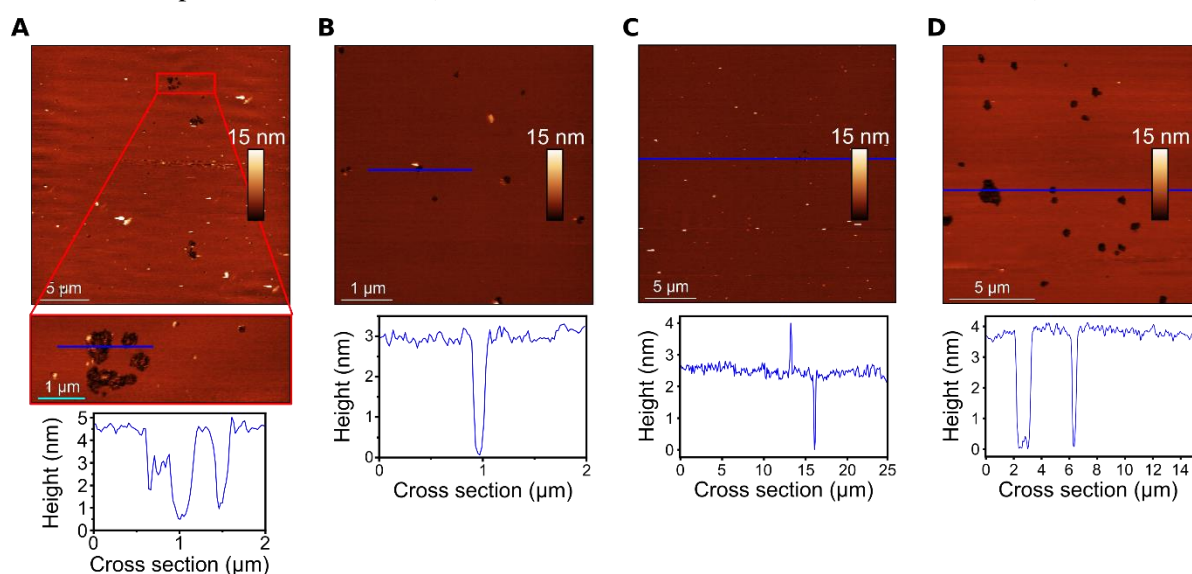


Figure III-16. Images AFM de 4 bicouches DOPS indépendantes, montrant des défauts permettant de déterminer leurs épaisseurs. Des sections transversales passant par les défauts permettent d'avoir l'épaisseur des bicouches.

- **Stabilité dans le temps de la bicouche de DOPS**

Pour garantir la stabilité de la membrane, les mêmes zones sont imagées plusieurs heures pour s'assurer qu'aucune perturbation n'est induite par la pointe AFM (**Figure III-17**). Les bicouches DOPS sont restées stables pendant toute la durée expérimentale de 1h20, ne montrant ni trous supplémentaires ni modifications significatives.

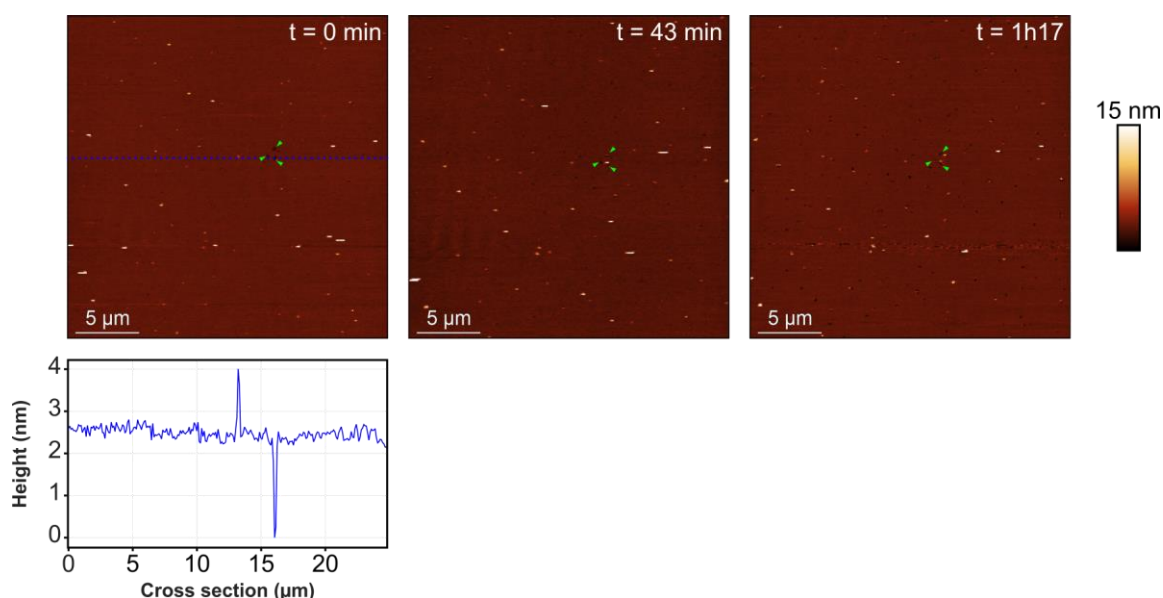


Figure III-17. Suivi au cours du temps par AFM d'une bicouche de DOPS imagée pendant plus d'1h pour vérifier sa stabilité. La section transversale de la première image correspond au profil de hauteur en dessous. Les flèches vertes indiquent des défauts présents dès le début, qui n'ont pas évolué après 1h17. L'échelle verticale est commune à toutes les images.

2.4.2. Interaction Tau-DOPS par AFM en temps réel

Après avoir confirmé, par AFM, la stabilité et l'homogénéité de la bicouche DOPS, nous avons étudié l'impact de Tau-P301L à l'échelle nanométrique et en temps réel. Différentes concentrations de Tau-P301L ont été ajoutées sur les bicouches, afin d'évaluer une éventuelle dépendance de l'effet observé par rapport à la concentration protéique.

- **Injection de Tau-P301L à 300 nM**

Dans un premier temps, nous avons injecté une concentration faible de 300 nM de protéines en solution. On peut noter que l'injection se faisant via une seringue dans la solution et comme les images sont obtenues très localement, il est difficile d'avoir une concentration homogène de protéines sur l'entièreté de la surface de la bicouche, ce qui peut amener à des variations de comportement. Des images de la même zone d'une bicouche DOPS avant ($t = 0$ min) et après plusieurs minutes d'incubation de Tau-P301L sont présentées sur la **Figure III-18**. Ces images mettent en évidence des défauts présents initialement, qui semblent s'élargir au cours du temps (indiqués par des flèches vertes), avec de nouveaux dommages qui apparaissent. Même si après 1h, la bicouche ne semble pas perturbée de façon importante, le mica étant encore majoritairement recouvert de la bicouche, ces résultats sont cohérents à ceux d'ATR-FTIR, avec une bicouche ne présentant pas de dommages drastiques. En revanche, contrairement à ce que nous aurions pu attendre aucune accumulation protéique n'est visible sur la bicouche (mais peut-être plutôt dans les défauts).

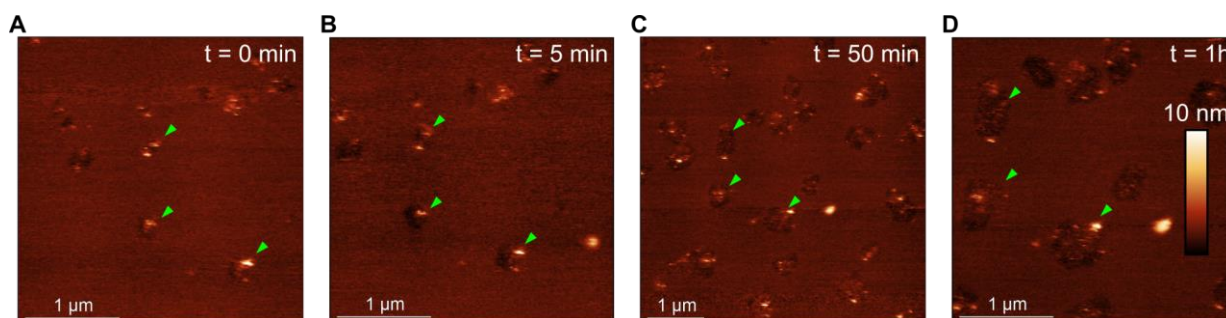


Figure III-18. Séquence d'images AFM d'une bicouche DOPS avant (A) et après addition de protéine Tau-P301L à 300 nM pour différents temps d'incubation : 5mn (B), 50mn (C), 1h (D). Les triangles verts indiquent les mêmes défauts à tous les temps. L'échelle est de 1 µm, les échelles verticales sont de 10 nm pour toutes les images.

2.4.3. Injection de Tau-P301L à 400 nM

Nous avons ensuite injecté sur une bicouche différente une concentration finale de 400 nM de Tau-P301L, dont une séquence d'image est présentée sur la **Figure III-19**. Après l'ajout de Tau-P301L à 400 nM dans le volume expérimental, des changements significatifs sont immédiatement observés. Après 6 minutes (B, E), les défauts préexistants dans la bicouche se sont élargis, suggérant une solubilisation partielle de la membrane aux bords des défauts initiaux. Il est intéressant de noter qu'après incubation avec Tau-P301L, la différence de hauteur entre le mica et la couche lipidique restante n'est que de $1,8 \pm 0,3$ nm, au lieu des 3-3,5 nm attendus pour l'épaisseur de la SLB, comme indiqué par une flèche bleue sur la **Figure III-19B, E**.

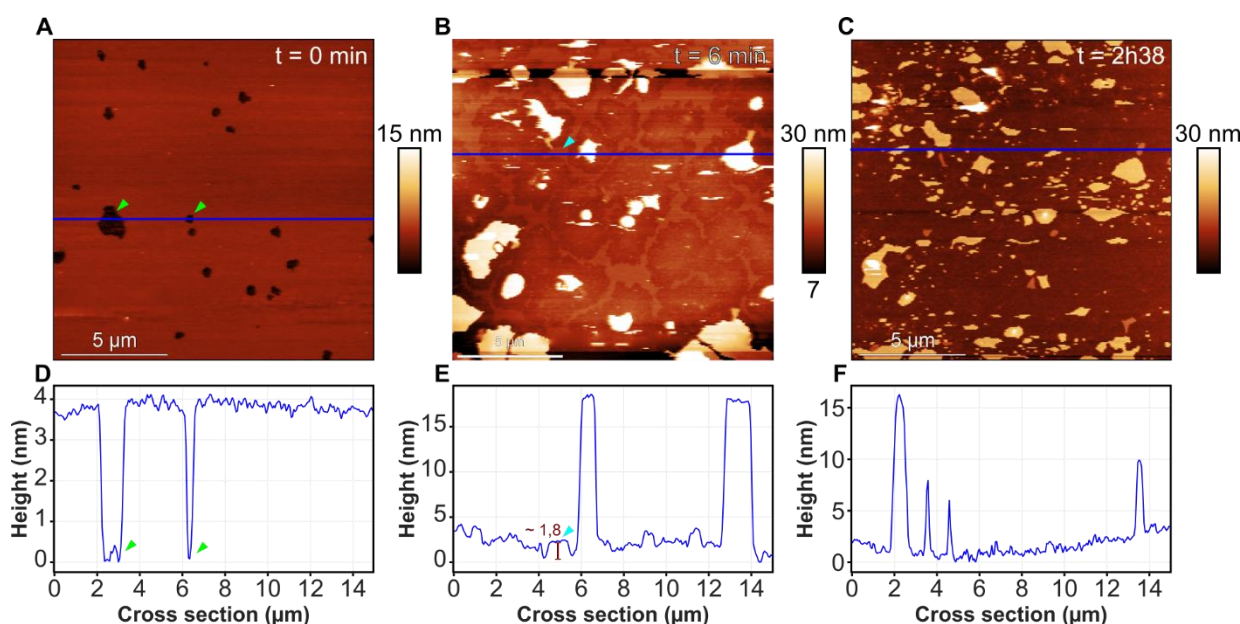


Figure III-19. Séquence d'images AFM d'une bicouche DOPS avant (A) et après addition de protéine Tau-P301L à 400 nM à différents temps d'incubation : 6mn (B), et 2h38 (C). Les lignes bleues sur (A), (B) et (C), indiquent les sections transversales présentées en (D), (E) et (F). Les triangles verts indiquent les défauts sur (A) et (D) ; les bleus montrent un reste de bicouche sur (B) et (E), avec une différence de hauteur d'environ 1,8 nm. L'échelle latérale est de 5 µm, les échelles verticales sont précisées à droite de chaque image.

En plus d'une perturbation apparente de la membrane et d'une perte de lipides, l'apparition rapide de larges patches plats d'environ 15 nm d'épaisseur a été observée, se déposant sur la membrane lipidique restante et rappelant des multicouches lipidiques. Cela suggère un possible re-dépôt des phospholipides solubilisés,

associés ou non à la protéine, sur le mica et la membrane restante. Au fil du temps, les patches déposés semblent se fragmenter et se réorganiser, car de nouveaux patches plus petits sont observés après 2 heures (C). L'effet majeur de Tau-P301L sur la membrane s'est produit au cours des 30 premières minutes d'interaction, puis s'est rapidement stabilisé sans autre changement (C).

- **Injection de Tau-P301L à 500 nM**

Enfin, une séquence d'images d'une bicouche de DOPS après injection de 500 nM de Tau-P301L est présentée sur la **Figure III-20**. Ces images mettent en évidence des changements significatifs suite à l'incubation de la protéine, différents de ceux observés à 300 et à 400 nM. Initialement, la membrane apparaît homogène (A). Après 15 minutes d'incubation avec Tau-P301L à 500 nM, des patches plats et épais de 15-20 nm sont observés, ainsi que des structures allongées semblant s'étendre à partir de ces patches (flèches vertes, images (B) et (C)). De plus, ces structures fibrillaires ont montré une croissance rapide, significative en 8 minutes, comme le montrent les flèches sur l'image (C).

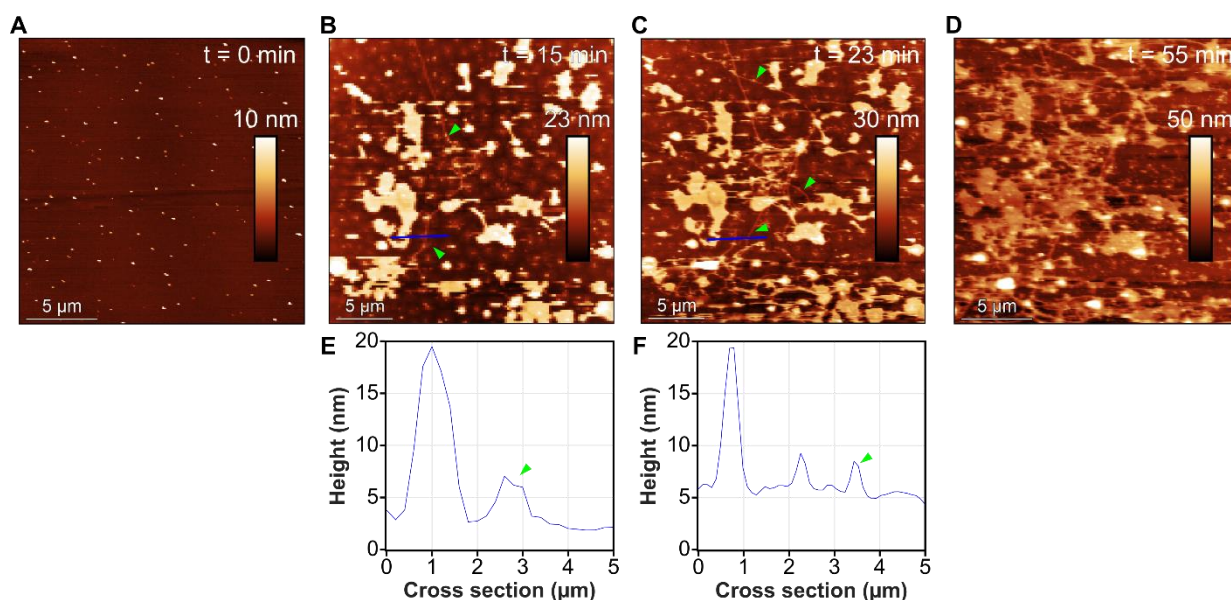


Figure III-20. Séquence d'images AFM d'une bicouche DOPS avant (A) et après addition de protéine Tau-P301L à 500 nM pour différents temps d'incubation : 15mn (B), 23mn (C), 55mn (D). Les lignes bleues en (B) et (C) indiquent les sections transversales présentées en (E) et (F). Les triangles verts indiquent des structures fibrillaires. L'échelle est de 5 μm, les échelles verticales sont précisées sur chaque image.

Un zoom sur les structures fibrillaires est présenté en **Figure III-21**, avec des sections (C) tracées le long des fibres de (B). Ces sections révèlent une taille de $6,4 \pm 0,7$ nm, avec des hétérogénéités de hauteurs, illustrées par une fibre atteignant 11 nm (section 4, image (C)). Dans le chapitre consacré à l'agrégation de Tau en présence de différents cofacteurs, nous avons identifié des fibres formées avec DOPS d'une taille moyenne de $9,3 \pm 1,4$ nm. Les structures fibrillaires observées ici sont donc en moyenne plus fines que celles rapportées dans le chapitre précédent. Il est également possible que les fibres observées ici soient encore en cours d'agrégation, et qu'après un temps d'incubation plus long, des structures plus épaisses puissent se former.

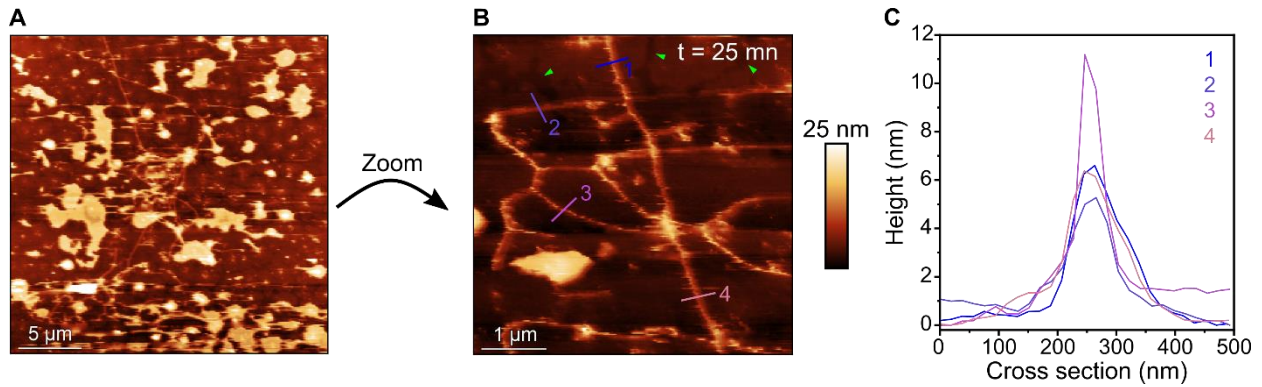


Figure III-21. Images AFM de la bicouche DOPS après incubation de Tau-P301L à 500 nM, zoomant sur les structures fibrillaires. Une image présentée précédemment (A) sert de référence au zoom sur les structures fibrillaires (B), acquise 25 minutes après addition de Tau. Les flèches vertes de (B) indiquent des affinements de la bicouche. Les 4 sections des structures fibrillaires en (B) sont indiquées en (C). La barre d'échelle est de 5 μm pour (A) et 1 μm pour (B).

• **Addition de Tau de manière incrémentielle**

Enfin, pour vérifier que l'impact de Tau sur la bicouche DOPS pourrait être dépendant de la concentration, nous avons observé l'effet de Tau-P301L après addition successive de protéine, présenté **Figure III-22**.

Tau-P301L est ajoutée pour atteindre une concentration de 400 nM (B), condition pour laquelle on observe le dépôt de patches épais et plats, dont des structures fibrillaires semblent croître. A une concentration finale de 500 nM (D), on observe la croissance des structures fibrillaires, comme pour la **Figure I-20**.

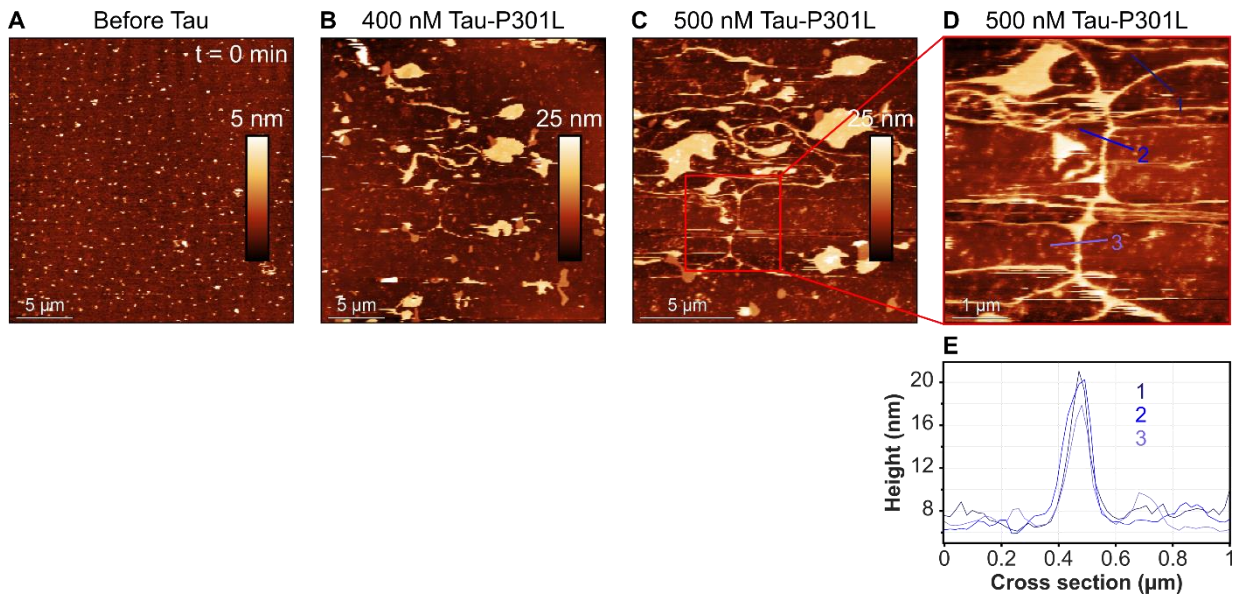


Figure III-22. Séquence d'images AFM d'une bicouche DOPS avant injection (A) et après augmentation progressive de la concentration de Tau-P301L, à 400 nM avec une incubation de 30 min à 1 h (B), et à une concentration finale de 500 nM sur une période de 1 heure (C). Zoom sur les structures fibrillaires de C (D) et coupes transversales de trois d'entre elles (E).

Plusieurs types de filaments sont observés après injection de Tau-P301L sur les bicouches DOPS, avec des épaisseurs de ~ 5 nm (**Figure III-20C, F**), de ~ 7 nm (**Figure III-21B, C**) ou de ~ 13 nm (**Figure III-22D, E**). En comparaison avec les filaments de Tau présentés dans le chapitre sur l'agrégation qui montraient une

épaisseur de $9,3 \pm 1,4$ nm, les filaments observés en interaction avec les bicouches supportées de DOPS présentent donc une plus importante polymorphie, avec des filaments plus fins, et d'autres plus épais. Cette diversité dans les épaisseurs, avec des tailles comprises entre les plus petites observées (de Tau-polyA, avec une épaisseur de $4,7 \pm 1,0$ nm) et les plus épaisses (de Tau-POPS, avec une épaisseur de $16,1 \pm 5,8$ nm) pourraient donc correspondre à des protofibrilles, susceptibles de s'assembler en filaments plus épais ultérieurement dans le processus de fibrillation, comme abordé précédemment.

Dans l'ensemble, les données AFM suggèrent que l'incubation de Tau-P301L sur la bicouche supportée de phosphatidylsérine (DOPS) conduit à une solubilisation partielle de la membrane, avec un dépôt de divers agrégats, sous la forme de patches épais et plats, ou de structures fibrillaires ressemblant à des protofibrilles de fibres amyloïdes.

3. Discussion

L'intérêt pour l'étude de l'interaction entre la protéine Tau et les membranes lipidiques n'a cessé d'augmenter ces dernières années, en raison de son implication dans divers aspects de sa pathogenèse, comme son agrégation, sa sécrétion et sa translocation à travers la membrane plasmique (Bok et al., 2021; Brunello et al., 2020; Sallaberry et al., 2021). Dans les cellules, Tau est capable d'interagir avec certains lipides membranaires (Arrasate et al., 2000; Brandt et al., 1995; Katsinelos et al., 2018; Merezhko et al., 2020; Pooler et al., 2012). *In vitro*, elle peut former des fibres amyloïdes après incubation avec des vésicules anioniques (Chirita et al., 2003; El Mammeri et al., 2023; Elbaum-Garfinkle et al., 2010; Yao et al., 2022). Cependant, les mécanismes d'interaction entre la protéine Tau et les lipides anioniques restent encore méconnus. De plus, les études existantes utilisent souvent des formes tronquées de la protéine Tau (K18, K19, les domaines de répétition, le peptide PHF6...) qui possèdent une densité de charges positives plus élevée que les protéines entières, telles que l'isoforme 2N4R (charge globale +2). Les lipides utilisés sont également variés, avec notamment l'utilisation de PG (phosphatidylglycérol) ou de PS (phosphatidylsérine) sous forme de micelles, vésicules, monocouches à l'interface air-eau, ou bicouches supportées.

Parmi les aspects de l'interaction Tau-lipides, on retrouve notamment des études portant sur la formation de fibres amyloïdes (El Mammeri et al., 2023), la structuration de la protéine au contact des lipides (Georgieva et al., 2014), ou encore son effet sur l'intégrité membranaire (Azouz et al., 2021). Ces aspects sont généralement traités séparément. Dans ce chapitre, nos objectifs étaient de déterminer si la capacité de Tau à former des fibres amyloïdes en présence de phospholipides anioniques était maintenue lorsque ces derniers étaient intégrés à des membranes planes et supportées, et d'observer l'impact de cette interaction, ainsi que la possible extraction lipidique, sur l'intégrité de la membrane lipidique. Pour cela, nous avons choisi des modèles pertinents pour simuler des conditions physiopathologiques. Nous avons utilisé l'isoforme le plus long de la protéine Tau, 2N4R, présentant une mutation impliquée dans les démences fronto-temporales, ainsi que les PS, en particulier le POPS et le DOPS, qui représentent 10-20% des lipides de la membrane interne des cellules neuronales et constituent donc les lipides anioniques majoritaires (Ingólfsson et al., 2014; Kim et al., 2014; Wells et al., 1995).

Les méthodes biophysiques utilisées nous permettent d'évaluer l'effet de la protéine Tau sur les membranes PS à différentes échelles spatiales et temporelles.

3.1. Interaction et affinité Tau-POPS

Au cours de ce chapitre, nous avons démontré que Tau-P301L était capable d'interagir fortement avec la phosphatidylsérine, et en particulier avec POPS sous forme de liposomes et de bicouches supportées.

La capacité d'agrégation de Tau en présence de liposomes anioniques, et en particulier de POPS ou DOPS démontrée dans le **Chapitre 2**, ou de BPS (phosphatidylsérine totale extraite de cerveaux de porcs) utilisée dans d'autres études (Ait-Bouziad et al., 2017; El Mammeri et al., 2023; Yao et al., 2022), met en évidence l'existence d'une interaction, confirmée par les résultats de fuite de calcéine. Ces derniers ont également apporté des informations quantitatives, avec la présence d'une très forte fuite induite par la protéine. Cette fuite est liée à la perturbation des vésicules, et indique ainsi l'existence d'une interaction entre les liposomes et Tau-P301L. Cette perturbation n'est pas spécifique à POPS, comme le révèlent les résultats de Dicke et al., qui montrent les capacités lytiques des domaines R1, R2, R3, et R4, vis à vis de vésicules de DOPC:DOPG (4:1) (Dicke et al., 2017). Toutefois, les résultats de Künze et al. (Künze et al., 2012) effectués avec K19 et des liposomes DMPC:DMPS (4:1) ou DMPS purs, révèlent une capacité lytique bien plus importante avec des vésicules purement anioniques. Cela suggère l'existence d'une interaction électrostatique, entre les têtes polaires anioniques lipidiques, et les résidus basiques (58 résidus d'arginine et de lysine) de la protéine Tau (ou de ses fragments), en particulier dans la région d'interaction avec les microtubules (MTBR, charge globale +10).

Ces interactions semblent être conservées sur bicouches supportées. En effet, les résultats de PWR indiquent la présence d'une forte accumulation protéique sur la surface de POPS, et les augmentations successives de la masse à la surface du prisme après chaque addition protéique a permis de déterminer un K_D apparent sub-micromolaire, de $0,14 \pm 0,04 \mu\text{M}$. Cette valeur est cohérente à celle de précédentes études utilisant la méthode de fluorescence à la tyrosine. Künze et al., reportent un K_D $0,22 \pm 0,04 \mu\text{M}$ pour l'interaction entre K19 (un fragment de Tau fortement chargé positivement) et DMPS, et de $0,93 \pm 0,08 \mu\text{M}$ entre K19 et des liposomes POPC:POPS (4:1) (Künze et al., 2012). Yao et al. ont eux déterminé un K_D de $0,32 \pm 0,12 \mu\text{M}$ pour l'interaction entre le DMPS pur et la protéine Tau (hTau40, 2N4R) (Yao et al., 2022). Cela semble suggérer que la protéine entière est suffisamment dépliée pour que ses parties fortement positives (+10) (MTBR) soient en contact avec les têtes négatives du PS, sans que les résidus non structurés ("*fuzzy coat*") ne limitent l'interaction. De même, la présence de la région N-terminale chargée négativement de 2N4R ne semble pas avoir un impact significatif sur la force de l'interaction Tau-lipide. Ceci est en accord avec la comparaison des capacités d'interaction de la protéine Tau entière et de K18 avec des vésicules de phosphatidylsérine de cerveau de porc (BPS), qui a suggéré que la région N-terminale n'est pas essentielle mais peut moduler la capacité de Tau à former des complexes Tau-lipides (Ait-Bouziad et al., 2017).

En conclusion, la forte interaction observée entre Tau et POPS peut suggérer le rôle de phosphatidylsérine dans la pathogénicité de la protéine Tau, comme suggéré par Hellén et al. (Hellén et al., 2021).

3.2. Perturbation des bicouches de phosphatidylsérine

Nos résultats de fuite de calcéine montrent que Tau-P301L interagit avec les LUVs de POPS, entraînant l'agrégation de Tau-P301L et la destruction des liposomes. Des dommages membranaires induits par Tau ont été observés pour d'autres formes de Tau, par exemple avec ses fragments (K19 et les domaines de répétitions) qui possèdent des capacités lytiques importantes vis à vis des vésicules anioniques DMPS et DOPC:DOPG (4:1) (Dicke et al., 2017; Künze et al., 2012), ou avec l'isoforme 0N4R sur les LUVs de PIP2 (Katsinelos et al., 2018). Dans l'ensemble, ces résultats semblent confirmer que la protéine Tau et ses fragments ont la capacité à perméabiliser la membrane sous forme de liposomes.

Nos résultats d'ATR-FTIR et de PWR soutiennent l'idée que la protéine Tau-P301L induit une perturbation plutôt qu'une destruction de la membrane de POPS. Ils indiquent également une forte liaison et accumulation de la protéine à la surface de la bicouche, mais sans dommages significatifs de la membrane ni perte de lipides. Comment peut-on expliquer la différence entre l'impact de la protéine sur des liposomes, par rapport à des bicouches supportées ?

Une première explication pourrait venir de l'interprétation des expériences de fuite de liposomes. La fuite détectée pourrait être causée non pas par une destruction des liposomes, mais par une perturbation de la bicouche de ces derniers suite à l'interaction avec la protéine, causant une fuite de la calcéine, à travers la membrane. Pour vérifier ce point, des images de cryoEM permettraient d'identifier la présence, ou l'absence de ces liposomes, avant et après incubation de Tau, comme réalisé pour Tau et K18 avec des vésicules de BPS (Ait-Bouziad et al., 2017).

Une autre caractéristique pouvant expliquer les différences entre liposomes et bicouches supportées pourrait venir de la courbure de la membrane. Si on compare à des études portant sur une autre protéine amyloïde, l' α -synucléine, l'effet de la courbure de la membrane a été étudié avec différentes compositions de vésicules lipidiques (Middleton and Rhoades, 2010), révélant une affinité beaucoup plus forte de la protéine pour les petites vésicules de POPS:POPC (1:1) par rapport aux grandes.

Enfin, nous avons également identifié des perturbations locales des bicouches DOPS par AFM, sous la forme d'agrandissements de défauts existants (notamment observés à des concentrations de 300 nM). Cette perturbation est cohérente avec des rapports précédents sur l'interaction de fragments plus courts de Tau (K18) avec des membranes mixtes POPC:POPS ou POPC:PIP2 (Azouz et al., 2021). Dans le cas des membranes contenant du PIP2, en particulier, de grandes portions de la membrane montraient un amincissement similaire à celui observé dans l'interaction Tau-P301L/DOPS après incubation avec la protéine (Azouz et al., 2021). La diminution de l'épaisseur observée localement après incubation avec la protéine pourrait correspondre à une monocouche lipidique restante dans les deux cas. Lorsque des défauts sont présents dans la bicouche, la solubilisation semble commencer au niveau des défauts, pouvant indiquer un effet de bord. Le fait que nous n'observons pas de structures de type pore sur les bicouches, contrairement à une précédente étude utilisant des solutions de protéoliposomes Tau(2N4R) / DOPS, tend à suggérer que la fuite de membrane observée dans les liposomes est liée à l'accumulation de la protéine à leur surface.

3.3. Structuration de Tau au contact des bicouches anioniques

Nos résultats d'ATR-FTIR indiquent que la structure adoptée par Tau-P301L au contact des bicouches de phosphatidylsérine (PS), de POPS ou de DOPS, diffère de celle de la protéine native (complètement désordonnée), et n'est pas totalement identique à une structure agrégée sous la forme de fibres amyloïdes. En effet les spectres de la bande amide I de la protéine, au contact des bicouches POPS et DOPS après incubation à 1 μM montre un maximum d'absorbance à 1643 cm^{-1} , soit à une longueur d'onde plus basse que la protéine native dont le maximum d'absorbance est à 1650 cm^{-1} , mais plus élevée que le maximum pour les fibres à 1636 cm^{-1} . Dans toutes les conditions, la bande amide I de la protéine, qu'elle soit native, agrégée, ou en interaction avec les PS, reste large, ce qui suggère la présence de plusieurs éléments de structures secondaires (coude, hélices α , feuillets β). Cependant la déconvolution des spectres nous a indiqué une diminution des contributions des β -turn au profit de feuillets β parallèles, pour les fibres ainsi que la protéine Tau-P301L incubée sur POPS et DOPS, en comparaison avec la protéine native. Ces résultats suggèrent une structuration partielle de Tau au contact des bicouches de phosphatidylsérine.

Nos résultats sont en accord avec d'autres études comparant des formes similaires de Tau (entière) et des systèmes lipidiques contenant de la phosphatidylsérine. Dans leur étude, Yao et al. ont détecté une forme étendue de Tau en contact avec des vésicules de DMPS en utilisant la FRET pour détecter les distances intramoléculaires entre les parties de la protéine (Yao et al., 2022). Ils ont également établi que le contact entre la protéine et le DMPS se situait dans le domaine de liaison aux microtubules (Yao et al., 2022). L'étude des interactions entre des formes tronquées (K19) et des lipides anioniques a montré la formation d'hélices α transitoires, observée par Dichroïsme Circulaire (Barré and Eliezer, 2006) et par spectroscopie de résonance de spin électronique (Georgieva et al., 2014). Georgieva et al. ont présenté un modèle d'interaction pour K19 avec 3 courtes hélices α appartenant aux domaines de répétition (253-251, 315-323 et 346-355) se trouvant à la surface des membranes lipidiques PC-PS. Ce sont les mêmes domaines qui sont impliqués dans la liaison aux microtubules (Ait-Bouziad et al., 2017; Barré and Eliezer, 2006; Georgieva et al., 2014; Jones et al., 2012; Künze et al., 2012; Wegmann et al., 2010; Yao et al., 2022). Ait-Bouziad et al. ont incubé K18 pendant 48 heures avec des vésicules de BPS pour pouvoir détecter une structuration du peptide par CD, avec une augmentation du contenu en structure secondaire, sans déterminer le type (Ait-Bouziad et al., 2017). Une structuration n'a été observée que pour des constructions plus courtes de Tau (K18, K19, P2R...) (Ait-Bouziad et al., 2017; Barré and Eliezer, 2006; El Mammeri et al., 2023; Georgieva et al., 2014; Künze et al., 2012). Cependant, la protéine Tau entière et en particulier son isoforme le plus long 2N4R, possède une portion significative de régions désordonnées (Limorenko and Lashuel, 2022; Wang and Mandelkow, 2016). Nos résultats indiquent en effet que la protéine native est désordonnée, mais qu'elle peut présenter une faible structuration dans sa forme agrégée, et une forme intermédiaire, partiellement structurée au contact des bicouches PS. Les autres éléments de structuration transitoires (notamment les hélices α) sont plus difficiles à identifier précisément, du fait de l'importante portion désordonnée dans la protéine.

3.4. Formation d'agrégats polymorphiques

Au cours de ce chapitre, nous avons mis en évidence par différentes méthodes la capacité de Tau à s'accumuler sur la bicouche anionique composée de PS. Cependant, une question demeure quant à la forme adoptée par la protéine au contact de cette membrane, ainsi que les détails de son mécanisme d'interaction. Par ATR-FTIR, aucune variation du ratio dichroïque après incubation de la protéine n'est observée, indiquant l'absence d'une insertion de la protéine au sein de la bicouche. En PWR, aucune résonance supplémentaire n'est identifiée qui pourrait être attribuée à la formation d'hétérogénéités, comme c'est observé dans le cas du peptide A β ₁₋₄₀ dans une bicouche DOPC/SM/cholestérol (1:1:1) (Devanathan et al., 2006) ou du mutant M8 du peptide HET-s dans une bicouche DOPG (Harté et al., 2014). Ces observations suggèrent la création d'une adsorption uniforme à la surface, soutenue par les décalages importants des valeurs de résonance observées après l'ajout de Tau, indicatives d'un épaissement important sur la bicouche.

Des informations à l'échelle nanométrique et en temps réel ont pu être obtenues grâce à l'AFM, et mettent en évidence un auto-assemblage de Tau à la surface du DOPS. Deux types d'agrégats sont observés : des patches plats et épais ainsi que des structures fibrillaires émanant de ces patches. Nos résultats suggèrent un dépôt initial sous forme de patches, alors que les structures fibrillaires semblent croître à des concentrations protéiques plus élevées (500 nM), et mettre plus de temps à apparaître. La formation de patches similaires a déjà été rapporté précédemment par Mari et al., sur des bicouches supportées composées d'extraits totaux de lipides, après addition de protéine Tau (2N4R) allant de 100 à 300 nM (Mari et al., 2018). La surface de ces patches augmente avec le temps et dépend de la concentration protéique. Cependant, ces derniers étaient plus minces que ceux que nous avons observés, avec des épaisseurs d'environ 2 nm, et présentaient des protrusions. Ces différences pourraient être expliquées par la composition lipidique des membranes supportées considérées. En effet, l'utilisation d'extraits lipidiques totaux, bien que globalement chargés négativement, sont hétérogènes dans leur composition. Par conséquent, une interaction médiée par les charges de Tau avec les membranes serait beaucoup plus forte dans des membranes entièrement anioniques (comme ici avec DOPS), et pourrait conduire à des agrégats plus importants.

De plus, nos observations de structures fibrillaires sur des membranes PS sont cohérentes avec les observations précédentes des interactions de K18 sur des bicouches POPC:PIP2 (4:1) (Azouz et al., 2021), où des fibres apparaissaient après 6 heures d'incubation et semblaient également émerger d'agrégats en plaques sur les membranes. Cependant, les fibres semblent apparaître plus rapidement dans le cas de l'interaction de Tau-P301L avec le DOPS, c'est-à-dire en 15 minutes d'incubation, avec une croissance des fibres observable à une échelle de temps de 1 heure, bien que la concentration de protéines soit deux fois plus faible (500 nM contre 1 μ M dans l'étude précédente (Azouz et al., 2021)). La croissance plus rapide que nous avons observée dans le cas de Tau-P301L pourrait être attribuée à l'utilisation de membranes purement anioniques, qui pourrait accélérer l'impact de Tau sur la membrane, par opposition aux bicouches mixées avec des lipides zwitterioniques. La formation de ces structures fibrillaires à la surface des membranes lipidiques anioniques, qui montrent également une perturbation membranaire avec solubilisation potentielle de lipides par extraction, suggère que ce sont des processus liés, en accord avec des rapports précédents indiquant le recrutement de PIP2 à l'intérieur de fibres amyloïdes de K18 (Talaga et al., 2018).

4. Conclusion

Après avoir confirmé la capacité de Tau-P301L à s'agréger en présence de POPS, nous avons observé des fuites de calcéine des liposomes de POPS, traduisant une perturbation significative et dépendante de la concentration protéique. Cette perturbation, liée aux capacités d'agrégation de Tau en présence de POPS, indique une forte interaction entre la protéine et ce lipide, interaction qui est également maintenue sous forme de bicouche supportée. En effet, les résultats de PWR ont révélé une forte affinité entre Tau-P301L et une bicouche de POPS, avec un K_D apparent sub-micromolaire. Cette interaction entraîne une accumulation substantielle de la protéine à la surface de la bicouche, avec une structuration intermédiaire entre l'état désordonné natif de la protéine et une forme agrégée en fibres amyloïdes. Cette structuration au contact des bicouches de POPS et de DOPS est cohérente avec les observations en AFM, montrant des dépôts sous forme de patches et de structures fibrillaires. La formation de ces structures est dépendante de la concentration en protéine, et l'imagerie en temps réel a révélé leur croissance, en accord avec les épaisseurs polymorphiques observées, pouvant correspondre à un mélange de protofibrilles en maturation. Cependant, la quantification des lipides restants dans la bicouche après incubation de Tau n'a pas montré de déplétion lipidique significative, même à des concentrations plus élevées. Des perturbations locales à l'échelle nanométrique ont néanmoins été détectées par AFM, se traduisant par une augmentation du nombre et de la taille des défauts présents sur la bicouche DOPS. Enfin, la nature des dépôts observés sur les bicouches de DOPS pourrait être caractérisée par des techniques comme la microscopie à force atomique couplée à la spectroscopie infrarouge (NanoIR ou AFM-IR), et permettrait de déterminer la présence éventuelle de phospholipides au sein de ces structures.

Principaux Résultats

- ▶ Tau induit une perturbation des liposomes, sans déplétion lipidique significative
- ▶ Tau s'accumule de façon importante sur les bicouches de POPS, avec une interaction forte et irréversible
- ▶ Tau se structure au contact des bicouches POPS et DOPS, avec une augmentation des feuilletts β
- ▶ Cette structuration conduit à la formation de structures fibrillaires sur DOPS, similaires à des fibres amyloïdes



CHAPITRE

4

Table des matières

Introduction	143
<hr/>	
Résultats	144
Impact de Tau-P301L sur l'intégrité de liposomes POPC	144
Impact de la protéine Tau-P301L sur des bicouches de POPC	145
Impact de fibres amyloïdes de Tau sur une bicouche POPC	150
Impact de Tau-P301L sur des bicouches de DOPC	151
Impact de Tau-P301L sur des bicouches de DPPC	155
Impact de Tau-P301L sur des bicouches avec séparation de phase	159
Effet du cholestérol	163
<hr/>	
Discussion	170
<hr/>	
Conclusion	178



Chapitre 4. Interaction de Tau avec les membranes zwitterioniques

Dans le Chapitre précédent, nous nous sommes intéressés à l'interaction de la protéine Tau avec des bicouches lipidiques anioniques, et en particulier POPS et DOPS. Nous avons conclu que l'interaction électrostatique entre les têtes chargées négativement des lipides et les résidus basiques de la protéine entraînait son accumulation sur la membrane. La membrane neuronale est constituée majoritairement de cholestérol, et de phospholipides, dont les phosphatidylcholines (PC) sont les plus communs. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à l'étude de l'interaction de Tau avec différentes bicouches de phosphatidylcholine.

1. Introduction

La phosphatidylcholine est le lipide zwitterionique majoritaire de la membrane plasmique, représentant entre 30 et 40% des phospholipides totaux de la membrane (Ingólfsson et al., 2014; Luckey, 2008; van Meer et al., 2008). La phosphatidylcholine existe en une diversité de longueur de chaînes et de nombre d'insaturations, lui conférant des propriétés différentes. Au sein des membranes cellulaires, on retrouve principalement des formes asymétriques avec une ou deux insaturations, sur l'un des deux acides gras comme par exemple 16:0-18:2 et 16:0-18:1 qui sont majoritaires (Pabst and Keller, 2024; Svennerholm, 1968).

Les propriétés d'organisation membranaire sont dépendantes des longueurs des chaînes d'acides gras, et du nombre d'insaturations des chaînes. Ces caractéristiques influencent directement les températures de transition de phase des phospholipides, déterminant la phase à laquelle ils se trouvent à température ambiante, c'est-à-dire sous forme fluides ou rigides. Le POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine, 16:0-18:1) possède une seule insaturation sur l'une de ses deux chaînes, sa température de fusion est de -2°C à pression ambiante (Koynova and Tenchov, 2013). En revanche, le DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 18:1), qui est symétrique, présente une insaturation sur chacune de ses chaînes, sa température de fusion est plus basse soit -18°C à pression ambiante (Koynova and Tenchov, 2013) (**Figure IV-1A**). DOPC et POPC sont donc fluides à température ambiante. En comparaison, le DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 16:0), n'a aucune insaturation, sa température de fusion est de 41°C , ce qui le maintient en phase gel à température ambiante (Koynova and Tenchov, 2013).

In vitro, les lipides POPC et DOPC sont souvent utilisés comme lipides modèles s'organisant sous forme de bicouches fluides (Liquide-désordonné, Ld), alors que le DPPC est souvent utilisé pour mimer un état rigide, sous la forme d'une phase gel (solide ordonné, So) (Nelson et al., 2013) (**Figure IV-1B**). La coexistence de ces deux domaines au sein d'une même bicouche peut également être observée, comme c'est le cas pour une membrane DOPC:DPPC (1 :1) (**Figure IV-1D**). Le cholestérol, représentant environ 30% de la composition totale des membranes plasmiques, rigidifie les phases liquide-désordonnées (Ld) et fluidifie les membranes rigides, les transformant en phases liquide-ordonnées (Lo) (Nelson et al., 2013; van Meer et al., 2008) (**Figure IV-1C**).

Chapitre 4. Interaction de Tau avec les membranes zwitterioniques

Dans ce chapitre, nous décrivons l'impact de Tau-P301L sur plusieurs modèles de bicouches zwitterioniques étudiés par ATR-FTIR polarisé et AFM. Les différentes compositions membranaires permettront d'identifier le ou les mécanismes d'interaction entre la protéine Tau et les membranes composées de phosphatidylcholine, en s'intéressant particulièrement au rôle de la fluidité membranaire.

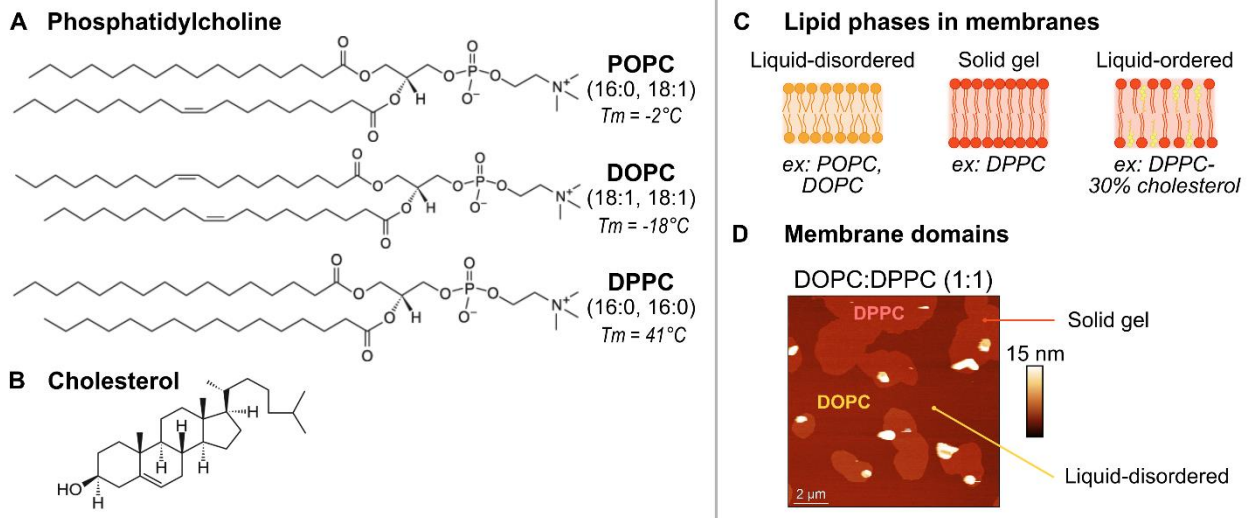


Figure IV-1. Structure des phospholipides utilisés dans ce chapitre (A) avec le POPC, le DOPC, et le DPPC, dont les températures de fusion sont indiquées (Koynova and Tenchov, 2013). Structure du cholestérol (B). Principales organisations membranaires des lipides sous la forme liquide-désordonnée (exemple : POPC ou DOPC à température ambiante), solide gel (DPPC à température ambiante) ou liquide-ordonnée (DPPC-30% cholestérol à température ambiante) (C). Une image AFM d'une bicouche mixte DOPC:DPPC (1:1) est présentée (D) et met en évidence la coexistence des phases gel et liquide-désordonnée adoptée respectivement par le DPPC et par le DOPC.

2. Résultats

2.1. Impact de Tau-P301L sur l'intégrité de liposomes POPC

Dans le chapitre consacré aux capacités d'agrégation de Tau en présence de différents cofacteurs, nous avons observé que la co-incubation de Tau-P301L avec des liposomes POPC n'entraînait pas d'augmentation de la fluorescence de la ThT, ce qui indique l'absence de fibrillation de Tau dans ces conditions. Nous nous sommes donc demandé si cette absence d'agrégation reflétait également une absence d'interaction entre Tau et les liposomes POPC. Pour vérifier cela, nous avons mené des expériences de fuite à la calcéïne. Les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les vésicules POPS ont été appliquées aux vésicules POPC.

Les résultats de la cinétique de fuite (**Figure IV-2A**), ainsi que les taux de fuite pour chaque ratio Tau : POPC au temps $t = 3\text{h}$ (**Figure IV-2B**), confirment dans un premier temps qu'en l'absence de protéine, les liposomes demeurent stables pendant toute la durée de l'expérience, soit 18 heures. Pour les conditions avec protéine, aucune fuite n'est observée, même à des concentrations élevées (1 : 2, Tau : POPC), et ce, même après 18 heures.

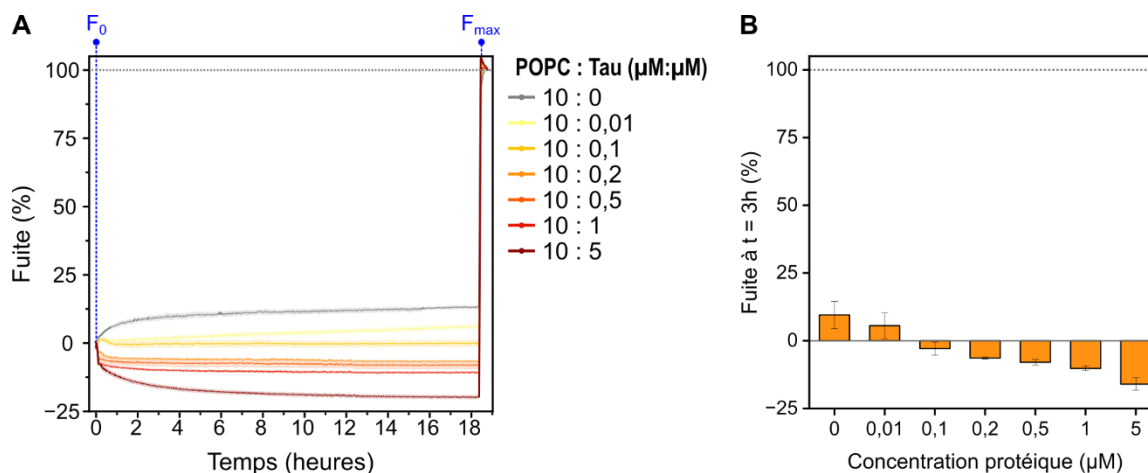


Figure IV-2. Cinétiques de fuite d'une concentration fixe de liposomes de POPC ($10 \mu\text{M}$) en présence de concentrations croissantes ($0,01$; $0,1$; $0,2$; $0,5$; 1 ; $5 \mu\text{M}$) de protéine Tau-P301L (A). Fuite après 3h pour 3 réplicats indépendants (B).

Les résultats de fuite de calcéïne indiquent donc l'absence de perturbations des bicouches des liposomes de POPC en présence de Tau-P301L, même à des concentrations importantes ($5 \mu\text{M}$) et des temps longs (18 h). Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de Tau-P301L sur d'autres systèmes membranaires, à savoir des bicouches planes de POPC.

2.2. Impact de la protéine Tau-P301L sur des bicouches de POPC

2.2.1. Etude par spectroscopie ATR-FTIR de l'interaction Tau-P301L avec POPC

Dans un premier temps, l'impact de la protéine Tau-P301L a été évalué sur une membrane entièrement zwitterionique de POPC pur, par ATR-FTIR, dans les mêmes conditions que pour l'étude de l'interaction Tau-POPS.

Les spectres ATR-FTIR du dépôt de POPC seule (en gris, **Figure IV-3A**) aux deux polarisations confirment la formation d'une bicouche fluide. La bande caractéristique du mode d'élongation antisymétrique des groupements CH_2 , $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, est centrée à 2923 cm^{-1} , avec une absorbance de $1,5 \times 10^{-3}$ (Castano and Desbat, 2005; Goormaghtigh et al., 1999). Le ratio dichroïque p/s de $1,30 \pm 0,10$ ($n = 11$) indique que la bicouche est orientée comme attendu pour une membrane fluide (Scheibe and Hauser, 2018). L'intensité du pic à 2923 cm^{-1} étant directement proportionnelle à la quantité de lipides en surface, elle permet de quantifier toute perte éventuelle de lipides après incubation. La stabilité de la bicouche de POPC après 3 heures est confirmée par une quantification des lipides restant à $94,8 \pm 11,7 \%$ ($n = 5$, **Figure IV-3B**), indiquant une absence de perte lipidique significative dans des conditions contrôles.

Après addition et incubation pendant 3h de Tau-P301L à $1 \mu\text{M}$, on observe un changement drastique des spectres (**Figure IV-3A**, orange) avec une disparition presque totale des bandes correspondant aux lipides (chaînes acyles dans la région $3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$ et liaison ester à 1740 cm^{-1}). La quantification des lipides restants sur la surface du cristal après 3h d'incubation par rapport à la quantité initiale (**Figure IV-3B**) est de seulement $12,8 \pm 7,6\%$ ($n = 3$) après incubation de Tau. Ceci indique une importante déplétion lipidique en présence de la protéine à $1 \mu\text{M}$ après 3h.

Chapitre 4. Interaction de Tau avec les membranes zwitterioniques

La présence des bandes amides I et II sur les spectres après incubation de Tau avec des intensités importantes, traduit l'accumulation de la protéine Tau sur la surface du cristal. Du fait de la disparition de la bicouche POPC après incubation, l'accumulation protéique à la surface ne traduit pas une accumulation protéique sur la bicouche, comme nous l'avons observée pour l'accumulation de Tau-P301L sur les bicouches POPS ou DOPS, mais plutôt un dépôt directement sur le cristal ATR.

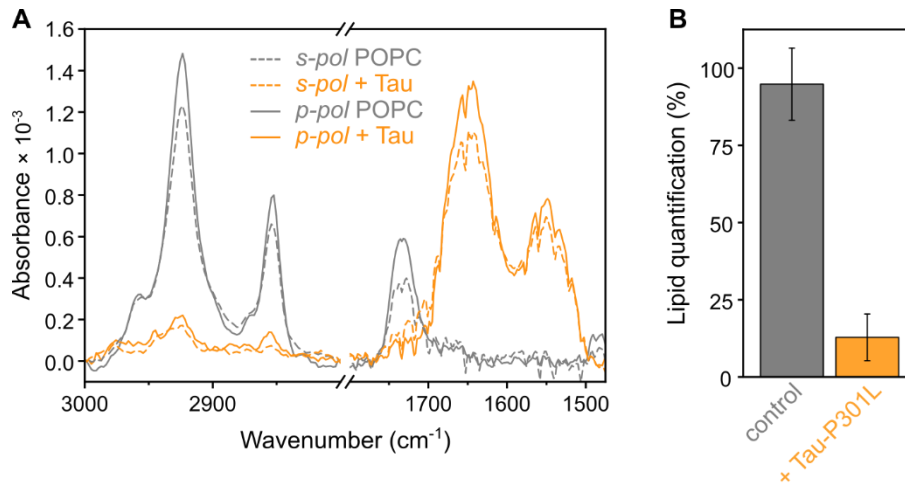


Figure IV-3. Spectres ATR-FTIR d'une bicouche de POPC aux polarisations *s* (ligne pointillée) et *p* (ligne continue) avant (gris) et après (orange) incubation de la protéine à 1 μ M pendant 3h (A). Quantification de la quantité de lipides restants à la surface du cristal pour les conditions contrôles (gris) et après incubation de Tau-P301L (orange), pour respectivement 5 et 3 réplicats, après moyenne des polarisations *s* et *p*.

Une analyse de la structuration de la protéine Tau-P301L au contact du cristal ATR (et non de la bicouche car celle-ci n'est plus détectable) est présentée **Figure IV-4**. La bande amide I est centrée autour de 1650 cm⁻¹, comme la protéine native. La bande est large et symétrique, indiquant la présence de plusieurs éléments de structure secondaire. Une déconvolution de la bande (B) indique plusieurs similitudes entre la protéine après incubation sur la bicouche de POPC, et la protéine native, sauf pour le second pic correspondant aux feuillets β . En effet, contrairement à la protéine sous sa forme de fibre, une contribution de 22% est déterminée pour Tau-POPC. Ainsi, la protéine présente un ensemble d'éléments de structures secondaires après incubation sur la bicouche POPC, bien que la bicouche ait été largement perturbée jusqu'à sa disparition.

Les spectres après incubation de Tau-P301L sur des bicouches planes de POPC révèlent l'existence d'une interaction entre Tau et le POPC, aboutissant à une destruction complète de la bicouche. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de fuite de calcéine, pour lesquels aucune fuite n'était observée. Il est donc possible que l'impact de Tau sur les membranes soit dépendant du modèle membranaire.

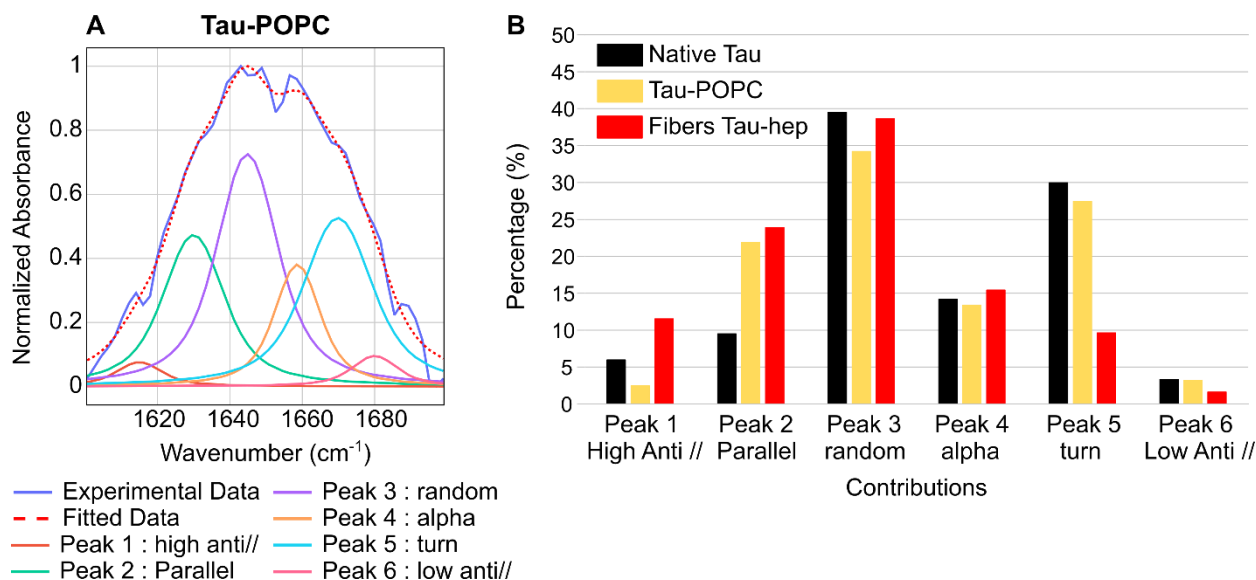


Figure IV-4. Résultats de déconvolution des bandes amides I de Tau-P301L après incubation sur une bicouche de POPC 3h à 1 μ M (A). Les données expérimentales sont présentées en violet, les différentes contributions des éléments de structures secondaires correspondent aux pics (courbes de Voigt) numérotées de 1 à 6, et les données corrigées sont indiquées en rouge. Les contributions de chaque structure sont représentées (B) pour Tau-P301L incubée sur POPC (jaune), avec les contributions pour la protéine native (rouge) et pour les fibres Tau-héparine (noir) pour référence. Les contributions d'un seul réplicat sont présentées.

Afin de mieux comprendre l'origine de cette interaction, mais également d'avoir plus d'informations sur le processus de destruction de la bicouche, nous avons réalisé des expériences AFM.

2.2.2. Etude par microscopie à force atomique de l'interaction Tau-P301L avec POPC

Similairement à l'ATR, la bicouche de POPC est formée par fusion des SUVs à la surface d'une surface de mica fraîchement clivée, et déposée dans une chambre humide à 60°C pendant 1h pour permettre un dépôt homogène. La bicouche est ensuite rincée plusieurs fois pour enlever toutes les vésicules non fusionnées.

Avant d'étudier l'interaction de Tau avec POPC par AFM, nous avons d'abord contrôlé que le dépôt des SUVs permettait d'obtenir des bicouches homogènes, mais aussi stables dans le temps.

- **Imagerie de la bicouche POPC seule**

L'imagerie de la bicouche POPC seule est présentée avant (**Figure IV-5A**) et après 3h30 d'imagerie continue (**Figure IV-5B**). La présence de défauts (étoiles A, B), permet de confirmer l'épaisseur de cette dernière (**Figure IV-5C**), d'environ 3,5 nm, comme attendu pour une membrane fluide de phosphatidylcholine, dont l'épaisseur est généralement comprise entre 3,5 et 5 nm (Zhang, 2020).

À partir de 3h30 d'imagerie, les défauts initiaux sont toujours visibles, et de nouveaux apparaissent mais avec des dimensions faibles de l'ordre de quelques nanomètres. Cette légère déstabilisation de la membrane aux temps longs pourrait être liée à des scans en continu sur cette zone. Néanmoins, pour éviter les possibles artefacts d'apparition de défauts, nous avons été vigilants sur les temps d'expérience pour rester sur des temps plus courts.

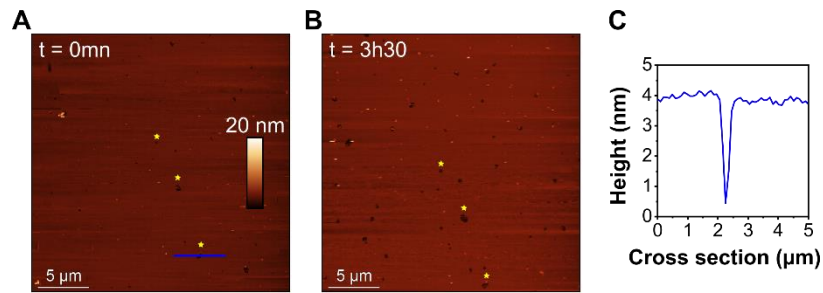


Figure IV-5. Images AFM d'une bicouche de POPC seule avant (A) et après 3h30 d'imagerie continue (B). Les étoiles jaunes représentent des défauts dans la bicouche, toujours présents après 3h30. La présence d'une bicouche de 3,5 nm est confirmée grâce au profil de hauteur (C) d'un des défauts de la bicouche présent sur l'image (A). La barre d'échelle latérale vaut 5 μm , l'échelle verticale est identique pour les deux images.

• **Impact de Tau-P301L à 1 μM sur la bicouche de POPC**

Une fois la stabilité de la bicouche de POPC confirmée, l'expérience peut être reproduite en présence de la protéine Tau-P301L. Dans un premier temps, afin de pouvoir comparer les expériences AFM à celles d'ATR-FTIR, elle est ajoutée à une concentration finale de 1 μM . La **Figure IV-6** présente les images avant ($t = 0 mn$), et après incubation de 30 min de Tau-P301L à 1 μM , pour deux expériences indépendantes (A, B).

Pour la première bicouche (A), l'image après 30 minutes d'incubation est très différente de celle avant addition de Tau, avec les défauts présents initialement qui ne sont plus visibles, et le dépôt de structures de taille intermédiaire ($\sim 6 nm$, indiqués par des flèches vertes), ou plus épais ($\sim 13 nm$, indiqués par une flèche magenta).

Dans la 2^{ème} expérience (B), une zone réduite a pu être imagée sur des temps intermédiaires pour voir les évolutions de manière plus fine (0, 5, 7 minutes). Ces expériences mettent en évidence l'agrandissement de trous présents initialement avant addition de Tau (pour une meilleure visibilité, les contours des défauts à 5' sont reportés sur le temps 0', pour confirmer qu'il s'agit d'un agrandissement des trous initiaux). Après seulement 7', les défauts ne sont plus visibles, et les dépôts épais observés pour la première expérience sont également présents.

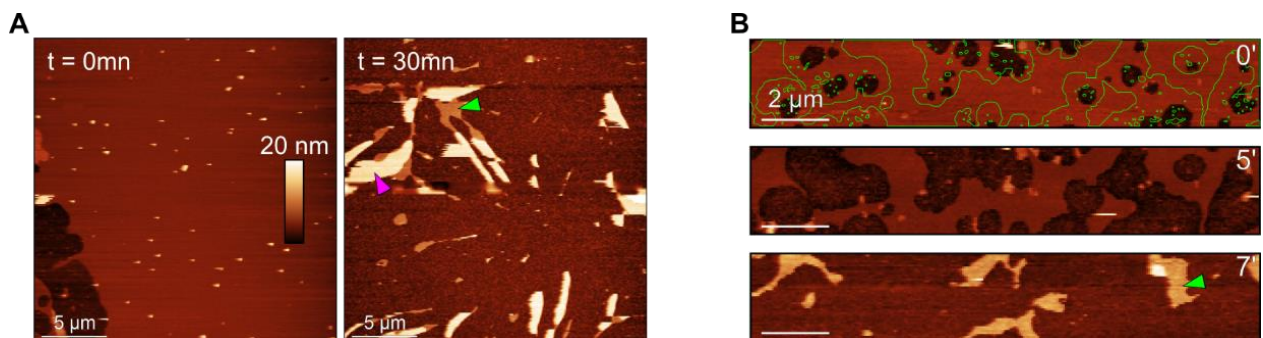


Figure IV-6. Images AFM d'une bicouche de POPC après addition de 1 μM de Tau-P301L, pour deux expériences indépendantes (A, B). Dans la première expérience (A), l'image après 30 mn d'incubation de la protéine est très différente de celle avant addition ($t = 0mn$). Dans la seconde expérience (B), une zone réduite a pu être imagée à l'échelle de quelques minutes ($t = 0mn, 5 mn, 7mn$) : les trous initiaux (0') s'élargissent (5') avant d'obtenir un état semblable à l'image après incubation de la première expérience (A). Les flèches vertes indiquent des dépôts intermédiaires de $\sim 6 nm$, et les magenta d'environ 13 nm.

Ces images semblent indiquer un processus qui conduit à la dégradation de la bicouche (**Figure IV-6A**) de manière très rapide. La déstabilisation complète de la bicouche apparaît en moins de 10 minutes (**Figure IV-6B**). Afin d'essayer d'obtenir une évolution plus lente, nous avons choisi une concentration plus faible de protéine 500 nM pour la suite de nos expériences.

- **Impact de Tau-P301L à 500 nM sur POPC**

Une séquence d'images d'une bicouche POPC avant ($t = 0$ mn) et après incubation de la protéine Tau-P301L à 500 nM est présentée **Figure IV-7**. L'obtention d'une bicouche homogène est confirmée par la présence de défauts (A), dont les sections révèlent une épaisseur de ~ 3 nm.

La protéine est ensuite ajoutée, et les mêmes zones sont imagées en continu. Après seulement 11 minutes, le défaut présent avant addition de la protéine semble s'agrandir (B). Un élargissement de ces trous est ensuite observé, après 38 mn (C). De nouveaux trous apparaissent ensuite et progressent rapidement, jusqu'à disparition complète de la membrane, atteinte en environ 1h30.

Après disparition de la bicouche (F), on observe des épais patches d'environ 15 nm, qui semblent se déplacer d'une image à une autre (B, C). Ces dépôts pourraient être dus au re-dépôt de lipides et/ou de protéine non structurée. Ces patches peuvent donc correspondre à des multicouches lipidiques, suite à la déplétion de lipides depuis la bicouche, qui se réorganisent sous cette forme et dont la hauteur de 10-15 nm peut correspondre à 3 ou 4 bicouches, organisées les unes sur les autres, comme déjà observé pour d'autres compositions lipidiques (Connell and Smith, 2006).

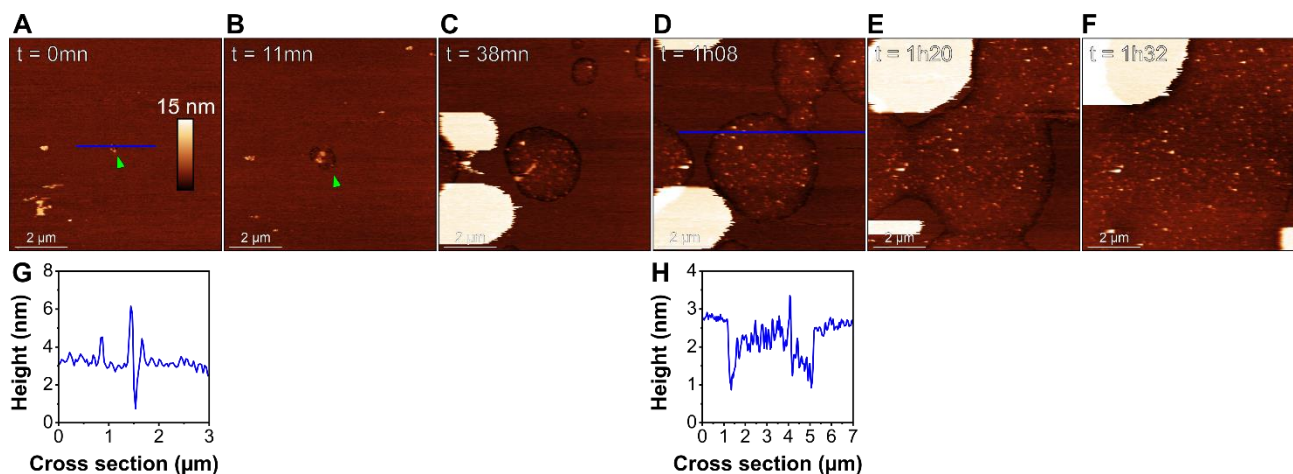


Figure IV-7. Séquence d'images par AFM de bicouches supportées de POPC avant (A) et après injection de Tau-P301L à 500 nM à différents temps (B-F). Les sections (G, H) sont réalisées au niveau des lignes sur les images correspondantes. Les flèches vertes indiquent la présence d'un trou (A) qui s'élargit à l'image suivante (B). La barre d'échelle latérale est de 2 µm, et l'échelle de hauteur est de 15 nm.

En conclusion, les résultats d'AFM mettent en évidence une perturbation importante de la membrane, avec une disparition de la bicouche après 1h30 d'incubation de Tau-P301L à 500 nM. Cette perturbation est dépendante de la concentration en protéine puisqu'à 1 µM la disparition de la membrane ne se fait qu'en quelques minutes. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en ATR-FTIR, où une disparition de la bicouche avec seulement $12,8 \pm 7,6\%$ de lipides restants dans la bicouche était également observée après incubation de 1 µM de Tau-P301L.

2.3. Impact de fibres amyloïdes de Tau sur une bicouche POPC

Dans la littérature, la toxicité des amyloïdes en fonction de leur structure sous forme de monomères, d'oligomères solubles, d'oligomères insolubles ou de fibres matures a souvent été discutée. Comme nous l'avons introduit précédemment, on impute généralement la toxicité aux espèces oligomériques, capables d'une meilleure diffusion que les fibres matures (Henry et al., 2015; Riek and Eisenberg, 2016).

Nous avons vu que sur POPC, Tau-P301L sous sa forme monomérique entraîne des perturbations importantes, avec une déplétion lipidique importante (~ 87 %), et l'apparition de nombreux défauts à l'échelle nanométrique. Afin de vérifier si les fibres matures de Tau induisaient les mêmes effets de perturbation sur les bicouches zwitterioniques, nous avons étudié par AFM leur impact sur une bicouche de POPC, dont les images sont présentées **Figure IV-8**.

Les fibres matures sont obtenues par incubation de Tau-P301L avec héparine à un ratio 4:1 dans un tampon 20 mM HEPES pH7, pendant 72h sous agitation à 37°C. La présence de fibres a été confirmée par microscopie électronique à transmission (A). Une bicouche POPC a ensuite été imagée avant (A) et après (B-H) addition d'un volume de 7,5 µl de fibres préformées dans 100 µl de volume total d'observation, soit une concentration finale de 1,5 µM (si on considère que la concentration de fibres injectée correspond à la concentration initiale de protéines mises à incuber pour les obtenir).

Avant injection, la bicouche POPC est homogène et la présence de défauts permet de confirmer sa hauteur d'environ 3 nm (A). Après 8 minutes d'incubation, des trous apparaissent sur la bicouche, avec un dépôt de matériel dans ces derniers. De larges patches de 10-15 nm d'épaisseur (attribués comme décrit précédemment à des multicouches lipidiques) apparaissent également. Après 2h, la présence de défauts et de patches a augmenté, mais sans disparition complète de la bicouche, comme c'était le cas après incubation de monomères (**Figure IV-7**). Un zoom sur un des défauts (**Figure IV-8D**) montre une fibre dans un trou, dont le contour de la bicouche semble épouser la forme de la fibre, confirmé par une section (E). Des dépôts sous la forme de petits agrégats sont également présents dans les défauts (G, H) en plus des fibres. Après plus de 2h, les défauts n'ont pas drastiquement changé (G, H).

Ces résultats préliminaires indiquent que les fibres préformées de Tau-P301L en présence d'héparine ont un effet délétère moins prononcé sur une bicouche POPC que les monomères de Tau-P301L. En effet, on observe une déplétion lipidique moins marquée et un dépôt de fibres et d'agrégats plus petits, de forme globulaire, localisés dans des défauts de la membrane.

Ces défauts pourraient être causés par la présence de monomères en équilibre avec les fibres formées. Les fibres matures ne seraient, elles, pas responsables de la dégradation de la bicouche. De plus, les dégradations n'apparaissent qu'au moment du dépôt, et ne progressent plus ensuite. Elles pourraient être causées par le dépôt des structures sur la bicouche (**Figure IV-8D**).

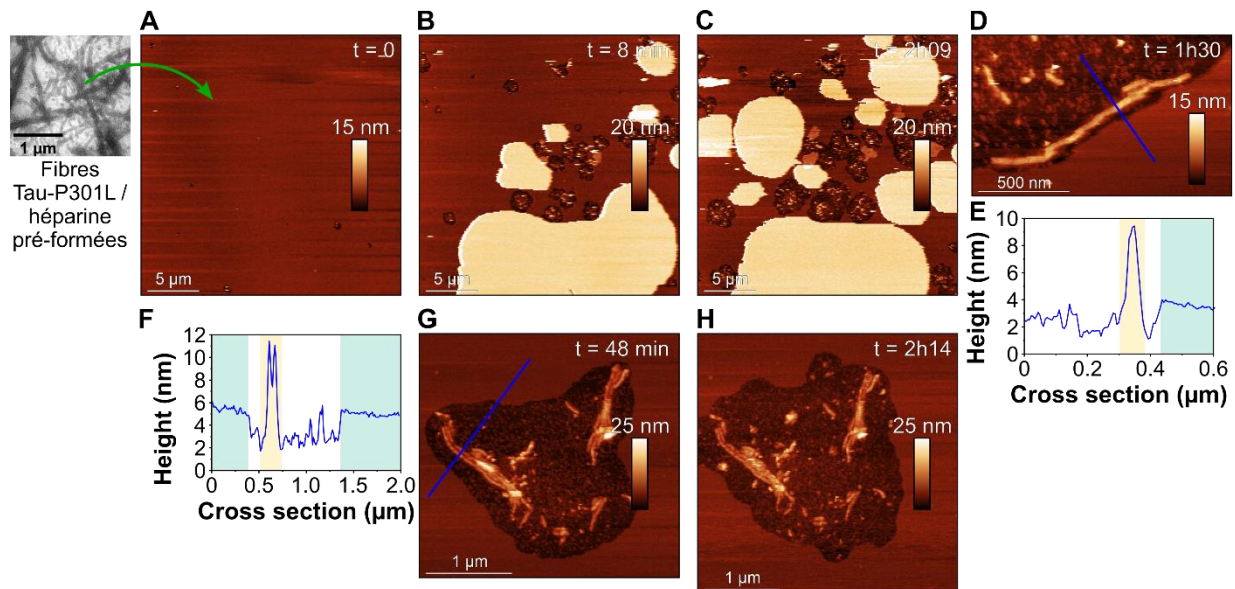


Figure IV-8. Images AFM d'une bicouche de POPC avant (A) et après (B-H) addition de fibres Tau-P301L/héparine préformées, incubées à un ratio de 4:1 (tau : héparine) pendant 72 heures à 37°C sous agitation. Une image de microscopie électronique est présentée. Les sections sur les images D et G, au niveau des fibres déposées sur la bicouche, correspondent aux profils de hauteur respectifs E et F, et mettent en évidence le dépôt de fibres (jaune) dans des défauts, entourés de bicouches restantes (bleu).

2.4. Impact de Tau-P301L sur des bicouches de DOPC

Dans l'optique de pouvoir comparer à des bicouches de DPPC, nous avons étudié l'impact de Tau-P301L sur une bicouche de DOPC, elle aussi s'organisant de manière désorganisée ou fluide (Liquide-désordonnée) comme POPC.

2.4.1. Comparaison POPC / DOPC

Dans un premier temps, nous avons vérifié que, dans nos conditions, les bicouches DOPC se comportaient de manière similaire aux bicouches POPC, et que Tau-P301L exerçait un effet comparable sur ces deux lipides. Pour cela, nous avons comparé les spectres polarisés d'ATR-FTIR pour les deux bicouches seules, présentés sur la **Figure IV-9**. Les spectres ATR-FTIR aux polarisations *s* et *p* de la bicouche DOPC montrent une organisation similaire à celle de POPC. Les vibrations antisymétriques des groupements CH₂, $\nu_{as}(\text{CH}_2)$, présentent un maximum d'absorbance à 2923 cm⁻¹ pour les deux bicouches. Le ratio dichroïque *p/s* des $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ est de 1,2 dans les deux cas (pour un seul réplicat), et l'intensité du pic en polarisation *p* est comprise entre 1,2 et 1,6 × 10⁻³, ce qui correspond aux valeurs attendues pour une bicouche unique (Castano and Desbat, 2005; Goormaghtigh et al., 1999). Ces observations confirment que la bicouche DOPC se comporte de manière similaire à celle de POPC, avec une organisation homogène, correctement orientée, et une structure fluide à température ambiante.

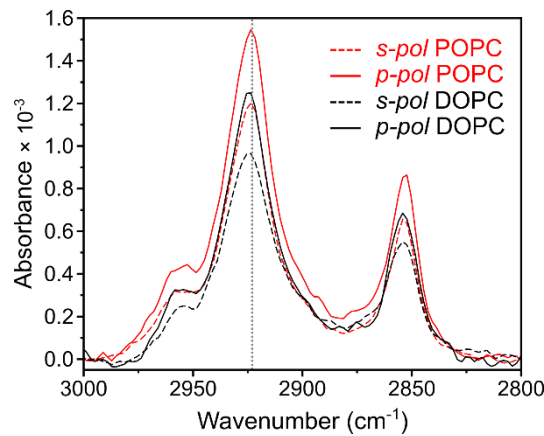


Figure IV-9. Spectres d'ATR-FTIR en mode polarisé dans les hauts nombres d'ondes des bicouches POPC (rouge) et DOPC (noir) seules, aux polarisations *p* (lignes continues) et *s* (lignes pointillées).

Comme décrit précédemment pour le POPC, nous avons vérifié la stabilité de la bicouche de DOPC seule après 3 heures et quantifié les lipides restants à la surface pour les comparer à la condition en présence de 1 μM de Tau-P301L, résultats présentés sur la **Figure IV-10**. Comme pour le POPC, les spectres après incubation de la protéine sont très différents de ceux de la bicouche seule, avec une diminution drastique des bandes spécifiques des lipides dans les hauts nombres d'ondes ($2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$), ainsi que dans la région du groupement ester C=O ($1700\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$). La quantification des lipides restants à proximité du cristal montre une déplétion très importante en présence de Tau-P301L, avec seulement $13,2 \pm 16,2\%$ ($n = 3$) des lipides restants après incubation contre $89 \pm 9\%$ en conditions contrôles sans la protéine (après 1h d'incubation).

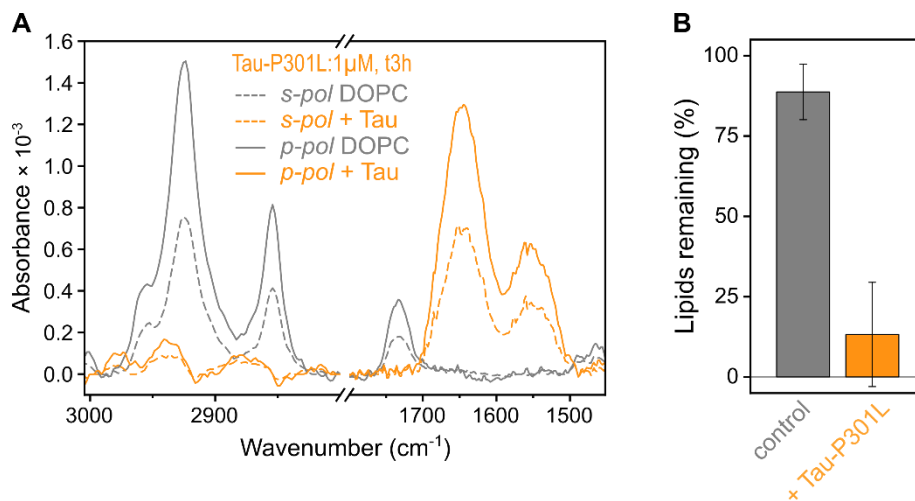


Figure IV-10. Spectres ATR-FTIR de la bicouche DOPC aux polarisations *s* (ligne pointillée) et *p* (ligne continue) avant (gris) et après (orange) incubation de la protéine à 1 μM pendant 3h (A). Quantification de la quantité de lipides restants à la surface du cristal après 1h pour les conditions contrôles (gris) et après 3h d'incubation de Tau-P301L (orange).

De même que pour POPC, bien que la bicouche DOPC soit complètement perturbée, la protéine est détectée sur le cristal. Une déconvolution de la bande amide I, centrée autour de 1650 cm^{-1} , indique une structuration similaire à POPC, mais encore plus proche de la structuration de la protéine native. En effet, la contribution des feuillets- β parallèles qui étaient de 22% pour Tau-P301L incubée sur POPC, n'est plus que de $11,5 \pm 3\%$, soit très similaire à la protéine native (9,5%). Les contributions des β -turn sont les mêmes que

pour Tau-POPC (27%), avec pour Tau-DOPC $29 \pm 1\%$. Ainsi la protéine Tau-P301L ne se structure pas différemment d'une protéine native après incubation sur la bicouche DOPC, similairement à Tau-POPC mais avec encore moins de feuillets- β .

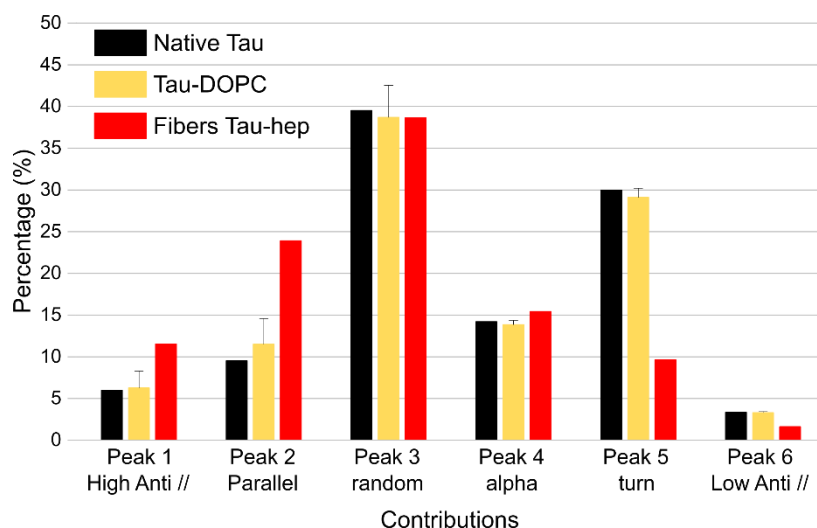


Figure IV-11. Contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale de la protéine Tau-P301L dans différentes conditions : native (noir), après incubation sur la bicouche DOPC (orange) ou dans des fibres Tau-héparine (rouge). Pour les conditions Tau native et Fibres Tau-héparine, les contributions ne correspondent qu'à un seul réplicat, et pour Tau-DOPC, les contributions de 3 réplicats sont présentées.

Combinés, les résultats de déplétion lipidique par ATR-FTIR et de déconvolution de l'amide I indique que Tau-P301L se comporte similairement avec DOPC qu'avec POPC.

2.4.2. Impact de Tau-P301L à 500 nM sur DOPC

Pour les expériences d'ATR-FTIR suivantes, nous avons choisi une concentration de 500 nM et un temps plus court de 1h d'incubation au lieu de 3h afin de comparer les résultats obtenus à ceux d'AFM. En effet, les images AFM de POPC après incubation de Tau-P301L à 500 nM que nous avons décrites précédemment mettaient en évidence un phénomène rapide, avec destruction complète de la bicouche (à l'échelle locale) en 1h30.

Pour s'assurer qu'une concentration plus faible et un temps d'incubation plus court entraînaient les mêmes effets sur DOPC, nous avons acquis les spectres avant et après addition de Tau-P301L à 500 nM et 1h d'incubation, et quantifié les lipides restants à la surface (**Figure IV-12**). Dans ces conditions, on observe toujours un changement drastique des spectres après incubation de Tau-P301L, mais la hauteur des pics dans la région $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ semble moins impactée qu'à $1\ \mu\text{M}$ et 3h d'incubation. La quantification des lipides pour 3 réplicats, indique qu'il reste $29,2 \pm 20\%$ après incubation de la protéine, qui n'est pas significativement différent des $13,2 \pm 16,2\%$ obtenus à $1\ \mu\text{M}$. Ces résultats confirment que Tau-P301L possède un effet délétère sur les membranes fluides DOPC à une concentration faible de 500 nM après seulement 1h.

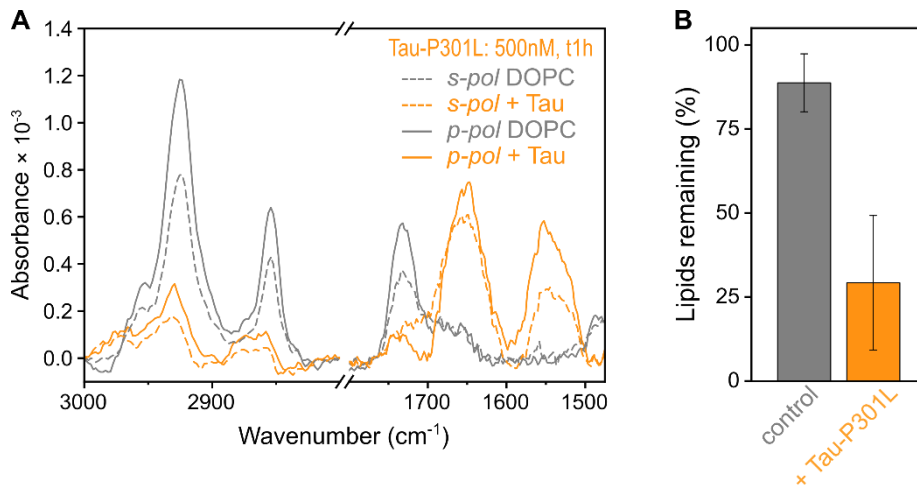


Figure IV-12. Spectres ATR-FTIR de la bicouche DOPC aux polarisations *s* (ligne pointillée) et *p* (ligne continue) avant (gris) et après (orange) incubation de la protéine à 500 nM pendant 1h (A). Quantification de la quantité de lipides restants à la surface du cristal après 1h pour les conditions contrôles (gris) et après incubation de Tau-P301L (orange) (B).

Nous avons ensuite évalué par AFM la stabilité de la bicouche DOPC, puis l'impact de Tau-P301L à 500 nM. Une séquence d'images AFM d'une bicouche DOPC avant ($t = 0$ mn) et après addition est présentée **Figure IV-13**. Initialement, les bicouches de DOPC sont très homogènes, et ne présentent aucun défaut qui permettrait de déterminer leur épaisseur. Cette homogénéité pourrait être attribuée à la température de fusion très basse du DOPC (-17°C), qui lui confère une fluidité élevée à température ambiante. Des défauts sont généralement plus difficilement observables dans des bicouches très fluides (Leonenko et al., 2004). En comparaison, les bicouches de POPC, ayant une température de fusion plus élevée (-2°C), présentent davantage de défauts après dépôt.

Après injection de Tau-P301L sur les bicouches, des trous apparaissent à plusieurs endroits, après seulement 16 minutes (B). Ces derniers progressent, jusqu'à entraîner la destruction complète de la bicouche, en environ 1h20 (E). Ces défauts sont similaires à ceux observés après addition de Tau sur des bicouches de POPC précédemment décrits. En plus de ces défauts, on observe également des dépôts sur la membrane, sous la forme de grands patches mobiles épais, d'environ 10-15 nm d'épaisseur, dont la surface augmente au cours du temps (C, D, E). De plus petites structures d'environ 6-7 nm sont également observées (D, E).

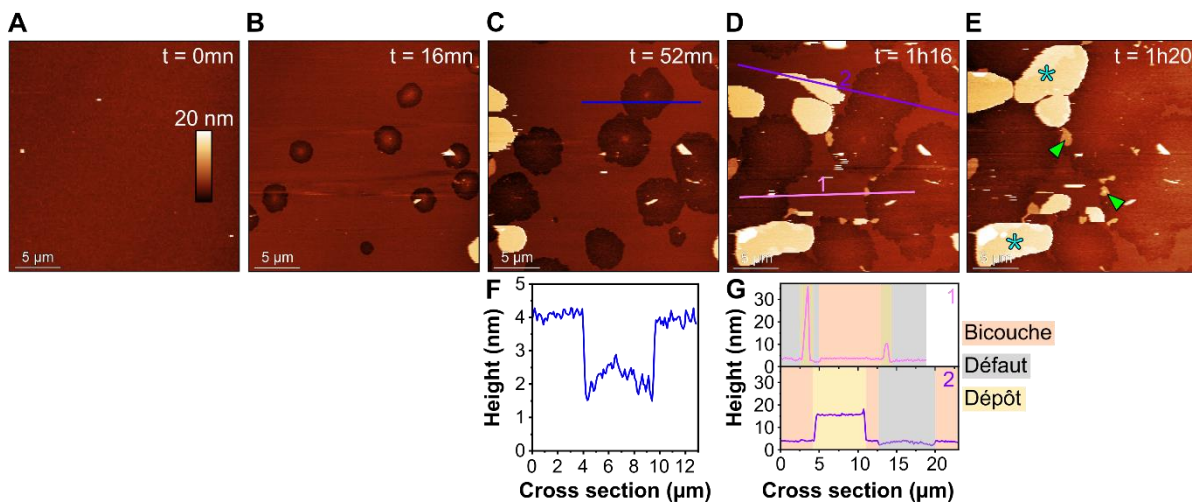


Figure IV-13. Séquence d'images AFM d'une bicouche supportée de DOPC avant (A) et après injection de Tau-P301L à 500 nM à différents temps (B-G). Les sections (F, G) sont réalisées au niveau des lignes sur les images correspondantes (C, D). Sur les sections (G) sont indiquées les hauteurs correspondant à la bicouche (orange), aux défauts (gris) et aux dépôts (jaune). L'astérisque cyan indique une multicouche, la flèche verte un dépôt de ~ 6 nm (E). Les barres d'échelle latérale et verticale sont communes à toutes les images et valent respectivement 5 μm et 20 nm.

L'impact de Tau-P301L sur la bicouche DOPC est donc similaire à celle observée sur POPC, avec une apparition de trous dans la bicouche après seulement quelques minutes. Ces défauts progressent jusqu'à disparition complète de la bicouche en environ 1h20, avec l'apparition de dépôts.

2.5. Impact de Tau-P301L sur des bicouches de DPPC

Après avoir étudié l'interaction de Tau avec des bicouches s'organisant de manière fluide (c'est-à-dire Liquide-désordonnée) avec en particulier le POPC puis le DOPC, nous nous sommes intéressés à un système membrane s'organisant en phase gel. Pour cela nous avons utilisé du DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 16:0), dont la température de fusion est de 41°C du fait de l'absence d'insaturation. A température ambiante (~ 20°C), les chaînes acyles du DPPC s'organisent de manière compacte, conférant à la bicouche une organisation rigide (Leonenko et al., 2004; Redondo-Morata et al., 2016).

2.5.1. Etude par ATR-FTIR de l'interaction Tau-P301L avec DPPC

- Spectres ATR bicouches DPPC versus DOPC

Dans un premier temps, nous avons comparé les spectres d'une bicouche seule de DPPC avec celle d'une bicouche DOPC, pour mettre en évidence les différences d'organisation membranaire. Les spectres des deux bicouches seules aux deux polarisations DPPC et DOPC dans la région des hauts nombres d'ondes sont présentés sur la **Figure IV-14**. Comparée aux bicouches fluides DOPC et POPC, la bicouche DPPC présente des différences notables liées à son organisation. La différence de rigidité est indiquée par la position des bandes des modes de vibrations antisymétriques et symétriques des CH_2 ($\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), respectivement centrés à 2917 et 2850 cm^{-1} , contre 2923 et 2854 cm^{-1} pour les bicouches fluides. Ce décalage vers des nombres d'onde plus bas, accompagné de la réduction de la largeur des pics est caractéristique d'une bicouche aux chaînes lipidiques compactes et d'une structure plus homogène, avec des chaînes acyles orientées perpendiculairement à la surface (Goormaghtigh et al., 1990).

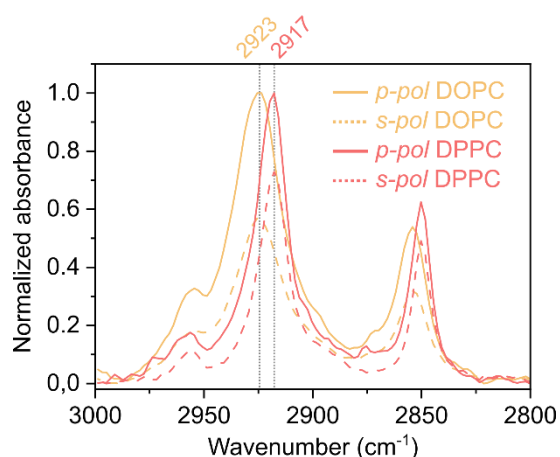


Figure IV-14. Spectres ATR-FTIR normalisés des bicouches DOPC (orange) et DPPC (rouge) aux polarisations *p* (ligne continue) et *s* (ligne pointillée). Le spectre à la polarisation *s* est normalisé tel que le ratio *p/s* à 2923 cm^{-1} est conservé.

- **Impact de Tau-P301L à 500 nM sur DPPC évalué par ATR-FTIR**

Les spectres ATR-FTIR de la bicouche DPPC seule et après incubation pendant 1h de Tau-P301L à 500 nM, ainsi que la quantification des lipides restants dans les conditions de contrôle et avec protéines, sont présentés dans la **Figure IV-15**. La quantification des lipides restants à la surface après 1h confirme la stabilité de la bicouche seule, avec $104,4 \pm 3,5\%$ de lipides après incubation (**Figure IV-15B**). En présence de Tau-P301L, la quantification des lipides indique $79,4 \pm 21,7\%$, soit une différence non significative par rapport à la bicouche seule. Globalement, la bande spécifique des lipides ne montre pas de différences par rapport à la bicouche seule, avec aucun changement dans l'organisation de la membrane (maximum d'absorbance des pics des $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$), ni de modifications significatives des ratios dichroïques, avec $1,44 \pm 0,15$ avant incubation contre $1,43 \pm 0,28$ après incubation de Tau.

L'absence de déplétion lipidique, de changements dans la position des pics $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ et $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ et des ratios dichroïques, indique que la protéine ne perturbe pas la bicouche DPPC, à l'inverse de l'importante déplétion observée pour POPC et DOPC. La présence des bandes correspondant aux amides I et II, respectivement dans la région $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ et $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, indique la présence de protéines accumulées sur la bicouche, même après rinçage. Leur intensité est faible, et se trouve au niveau du seuil de détection avec une absorbance de $4,3 \times 10^{-4}$ pour l'amide I et de $2,2 \times 10^{-4}$ pour l'amide II, cohérent avec la faible concentration protéique pouvant indiquer une interaction avec DPPC.

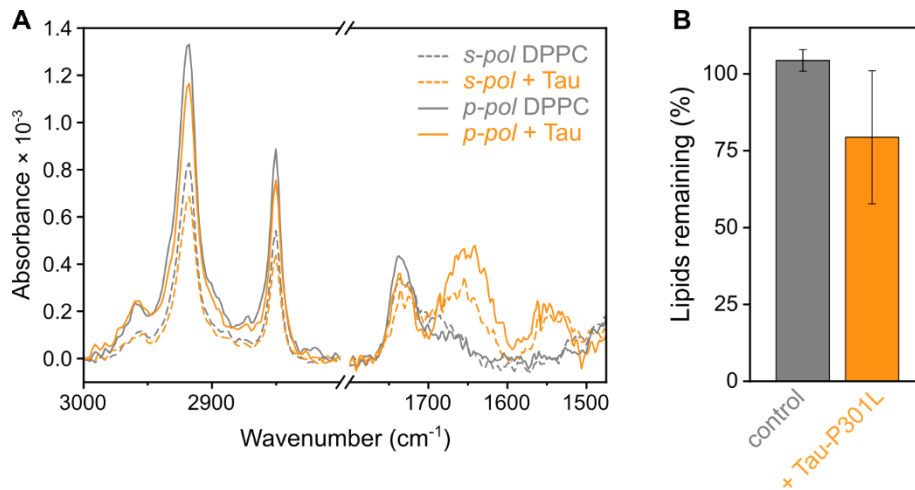


Figure IV-15. Spectres ATR-FTIR de la bicouche DPPC aux polarisations *s* (ligne pointillée) et *p* (ligne continue) avant (gris) et après (orange) incubation de la protéine à 500 nM pendant 1h (A). Quantification de la quantité de lipides restants à la surface du cristal pour les conditions contrôles (gris) et après incubation de Tau-P301L (orange), pour 3 réplicats aux moyennes des polarisations *s* et *p*.

La bande large de l'amide I, centrée autour de 1650 cm⁻¹, indique la présence de différents éléments de structures secondaires qui coexistent, en l'absence d'une structuration prédominante. La déconvolution de la bande amide I de la protéine Tau-P301L incubée sur du DPPC pour trois réplicats indépendants est présentée en **Figure IV-16**. Une comparaison avec les déconvolutions effectuées pour la protéine native (désordonnée) et pour les fibres Tau-héparine confirme l'absence de structuration de Tau après 3 heures d'incubation sur DPPC. En effet, les feuilletts β sont présents en faible proportion, les feuilletts parallèles contribuant à 11 ± 7 % de la structure, tandis que les β -turns représentent 30 ± 8 %. Cette distribution est donc très similaire à celle de la protéine native. Ainsi, malgré son accumulation sur la bicouche, Tau semble conserver une conformation désordonnée, similaire à celle observée en solution.

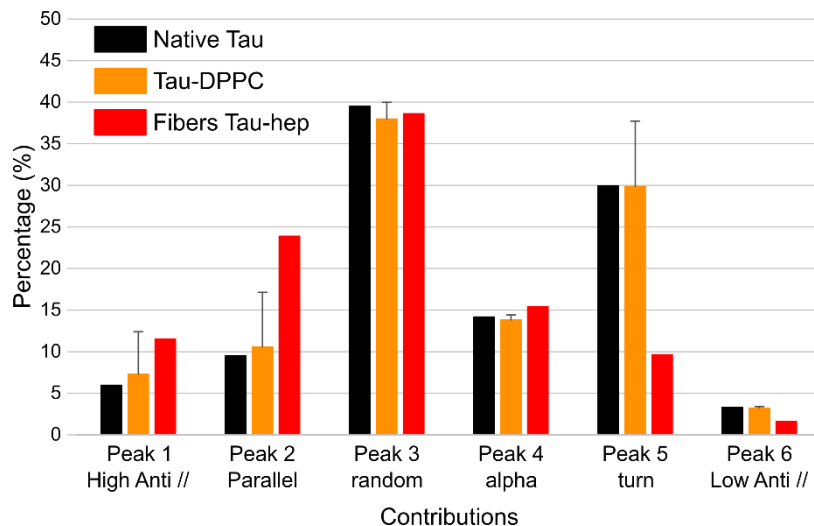


Figure IV-16. Contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale de la protéine Tau-P301L dans différentes conditions : native (noir), après incubation sur la bicouche DPPC (orange) ou dans des fibres Tau-héparine (rouge). Pour les conditions Tau native et Fibres Tau-héparine, les contributions ne correspondent qu'à un seul réplicat, et pour Tau-DPPC, les contributions de 3 réplicats sont présentées.

2.5.2. Etude par AFM de l'interaction Tau-P301L à 500 nM avec DPPC

La bicouche de DPPC est ensuite observée avant et après incubation de Tau-P301L à 500 nM, par AFM et les images sont présentées **Figure IV-17**. Avant l'ajout de Tau-P301L, la bicouche apparaît hétérogène, mais présente des petits dépôts soit sous la forme de zones hétérogènes avec des épaissements de 10-15 nm (**Figure IV-17B**), soit sous la forme de petits patches d'environ 6 nm d'épaisseur (**Figure IV-17E**). Ces structures peuvent correspondre à des vésicules non fusionnées formant de petits agrégats désorganisés. Son organisation en phase gel peut expliquer cette hétérogénéité, et a déjà été observée précédemment (Attwood et al., 2013; Leonenko et al., 2004; Zhang, 2020).

Après 1h50 d'incubation avec la protéine, aucune différence significative n'est observée. Les défauts qui étaient observés pour les bicouches fluides (DOPC et POPC) ne sont pas observés dans le cas de DPPC. Des dépôts apparaissent soit au niveau des zones hétérogènes sous la forme d'épaissements irréguliers d'environ 5 nm (**Figure IV-17B, D**), soit sous la forme de dépôts épais sur la bicouche d'environ 40 nm (flèche bleue **Figure IV-17F, H**). Ces derniers peuvent provenir de l'agrégation de lipides libres sur les vésicules non fusionnées, et/ou d'une accumulation protéique, comme observé par ATR-FTIR. Ces accumulations ne forment pas de structures spécifiques, notamment fibrillaires, comme observé dans le chapitre précédent.

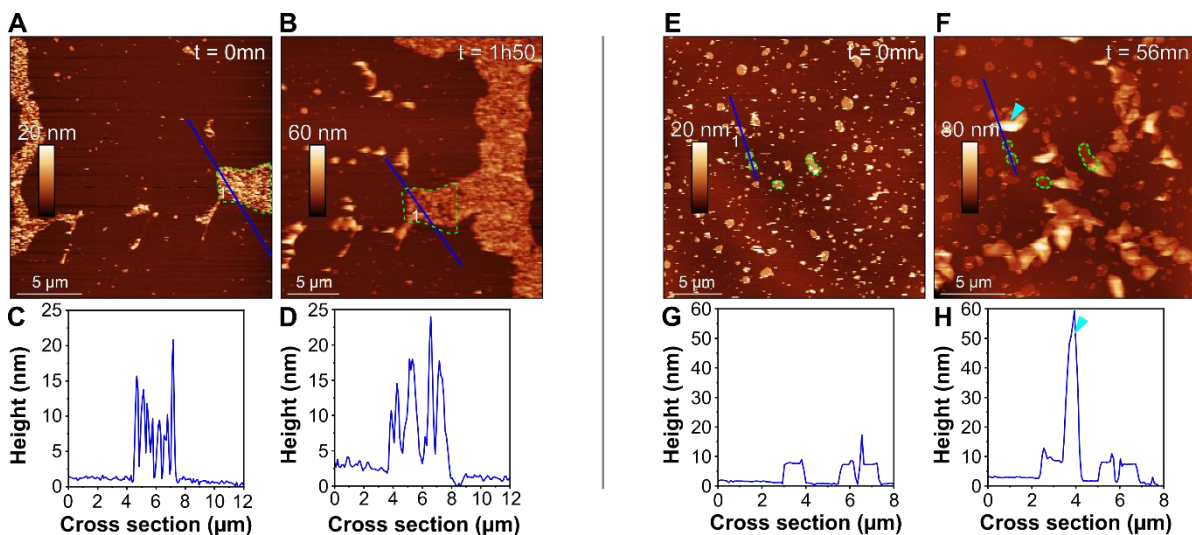


Figure IV-17. Séquence d'images AFM de deux bicouches DPPC avant (A, E) et après incubation de Tau-P301L à 500 nM pendant 1h50 (B) et 1h (F). Les sections transversales (C, D et G, H) correspondent aux lignes sur les images correspondantes. Les zones entourées servent de repère entre (A) et (B), et entre (E) et (F). La barre d'échelle est de 5 μm. La flèche bleue sur (F) et (H) montre un épaissement.

En résumé, nous avons observé que Tau a un impact délétère sur les bicouches de DOPC et de POPC, qui sont organisées de manière fluide, tandis que les bicouches de DPPC, plus organisées et rigides, ne semblent pas affectées. Ces résultats ont été obtenus sur des bicouches lipidiques pures, et ne reflètent donc pas la complexité des mélanges de lipides présents dans les membranes biologiques. Pour approfondir l'étude du rôle de la fluidité membranaire sur l'impact de la protéine Tau sur les bicouches zwitterioniques, nous avons donc examiné des mélanges binaires à séparation de phase.

2.6. Impact de Tau-P301L sur des bicouches avec séparation de phase

Pour permettre l'apparition d'une séparation de phase au sein d'une bicouche, c'est-à-dire l'apparition de deux domaines distincts avec des organisations membranaires différentes, nous avons utilisé un mélange de deux phospholipides avec des températures de fusion très différentes. Pour cela nous avons choisi le DOPC et le DPPC, dont les températures de fusion sont respectivement de -17°C et de 41°C . Ainsi, dans un mélange DOPC:DPPC (1:1), la bicouche supportée présentera deux domaines, ou deux phases : une phase fluide composée de DOPC et une phase sous forme de gel composée de DPPC (van Meer et al., 2008). Le domaine de DPPC sera également plus épais en raison de l'étirement de ses chaînes acyles dans le cadre d'une organisation plus compacte. La différence de hauteur entre ces domaines est généralement de l'ordre de 0,8 à 1 nm (Redondo-Morata et al., 2016).

2.6.1. Impact de Tau sur une bicouche de DOPC-DPPC

L'effet de Tau-P301L sur les bicouches de phosphatidylcholine varie considérablement en fonction de leur fluidité. Nous avons donc étudié un mélange biphasique DOPC:DPPC (1:1) afin de déterminer si les différences observées entre DOPC et DPPC se maintiennent au sein d'une même bicouche. En préambule, et contrairement aux études précédentes, nous n'avons pas commencé par les études en ATR-FTIR. En effet, les bandes de DOPC et de DPPC coïncidant fortement, il n'est pas possible de discriminer l'effet des protéines sur l'un ou l'autre des lipides directement. Nous avons donc commencé par les expériences AFM pour voir si nous mettions en évidence des différences de comportement.

Les images AFM de la bicouche DOPC:DPPC (1:1) avant et après addition de Tau sont présentées **Figure IV-18**. Avant l'addition de la protéine, les domaines de DOPC et de DPPC sont clairement identifiables. La phase gel de DPPC apparaît plus haute que la phase fluide de DOPC, avec une différence de hauteur de $1,15 \text{ nm} \pm 0,27$, comme attendu pour la séparation de phase de ce mélange lipidique (Redondo-Morata et al., 2016). De plus, la hauteur de la bicouche au niveau des phases DOPC, mesurée à 3,5 nm, est confirmée grâce à un défaut et est cohérent pour une bicouche fluide (Zhang, 2020).

Après 20 minutes d'incubation avec la protéine Tau-P301L, nous observons l'apparition de défauts uniquement dans la phase DOPC (hauteur plus faible), similaire aux trous observés pour les bicouches de DOPC pur (B). Ces derniers progressent uniquement dans la phase fluide, s'arrêtant à l'interface avec le DPPC (D). Les zones qui correspondent au DPPC semblent intactes, mais des épaisissements au niveau de ses bordures de 10-15 nm sont observés après 40 minutes. Des dépôts de 10-15 nm sont également observés, similaire à ceux que l'on retrouve sur les précédentes bicouches, qui peuvent correspondre à des multicouches lipidiques (E). Ces dernières semblent se déposer de manière privilégiée sur les bicouches restantes, et en particulier sur certains des domaines de DPPC. La destruction complète de la phase DOPC est observée après 40 minutes d'incubation dans cette expérience.

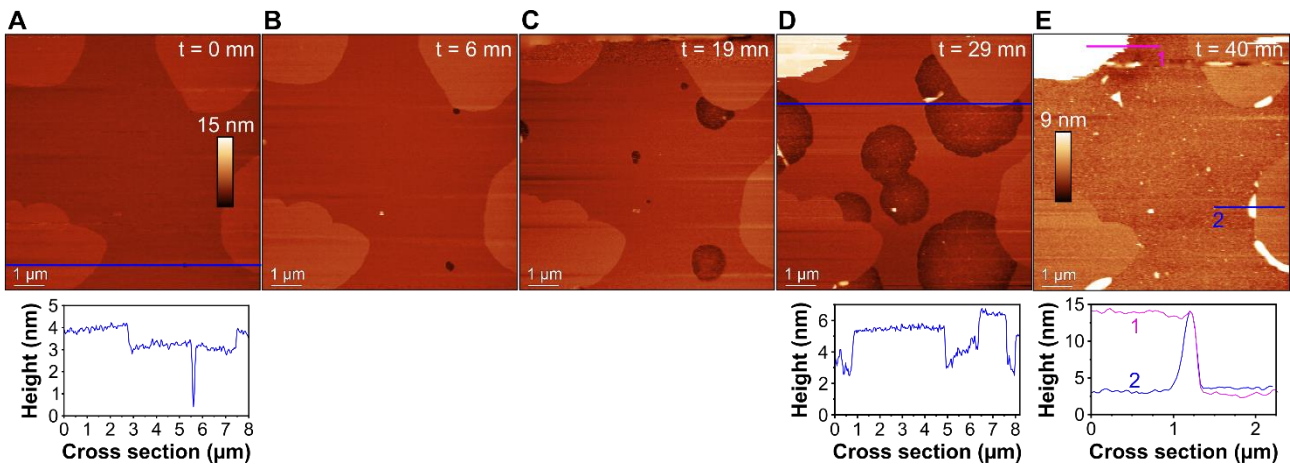


Figure IV-18. Séquence d'images AFM d'une bicouche DOPC-DPPC (1 :1) avant ($t = 0$ mn) et après addition de 500 nM de protéine Tau-P301L, et sections transversales associées aux lignes continues des images correspondantes. La première section montre un défaut présent dans la phase DOPC et confirmant l'obtention d'une bicouche de 3,5 nm d'épaisseur. La seconde met en évidence deux trous apparus dans la phase DOPC, d'une hauteur d'environ 2,4 nm. Les barres d'échelle latérales sont toutes de 2 μm , et l'échelle verticale de 20 nm.

Pour permettre une meilleure visibilité des différences de hauteur entre chaque structure, un schéma est présenté **Figure IV-19**. Le trou correspond à ceux observés initialement avant addition de la protéine (**Figure IV-18A**), et qui permettent de confirmer la hauteur de la phase de DOPC, d'environ 3,5 nm. Les domaines de DPPC sont plus épais que ceux de DOPC, avec une différence de 1 nm.

Après addition de Tau, les défauts créés correspondent à des trous dont la différence d'épaisseur par rapport à la bicouche n'est que de 1-2,5 nm, qui correspondraient à la déplétion d'une monocouche, et/ou au dépôt de matériel dans ces derniers. Les patches épais de 10-15 nm correspondraient à des multicouches de type lipidiques, dont l'épaisseur correspondrait à environ 3 bicouches.

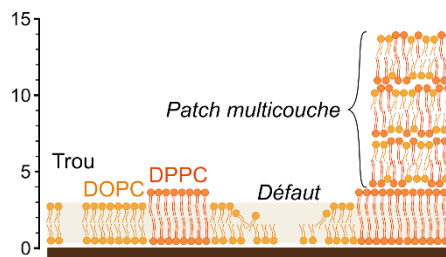


Figure IV-19. Schéma interprétatif des hauteurs des différentes structures observées sur la bicouche DOPC:DPPC (1:1) après addition de Tau-P301L, au vu des différences observées en AFM. Le mica est représenté en marron, un défaut dans la phase de DOPC permet de confirmer sa hauteur de 3,5 nm, et la phase de DPPC est environ 1 nm plus épaisse. Les défauts dus à l'injection de Tau ont une différence de hauteur de 1 à 2 nm par rapport à la bicouche, et les patches de 10-15 nm peuvent correspondre à l'accumulation de multicouches, de 2 à 3 bicouches.

À l'échelle locale, des effets distincts de Tau-P301L sur DOPC et DPPC sont donc observés au sein d'une bicouche biphasique présentant ces deux phases, fluide et gel. L'effet délétère de Tau avec l'apparition de trous déstabilisant uniquement le DOPC fluide est donc maintenu même en présence de DPPC rigide.

2.6.2. Quantification par ATR-FTIR des déplétions lipidiques sur bicouche DOPC:DPPC-d62

Au vu des effets observés en AFM, nous avons donc essayé d'obtenir des informations par ATR-FTIR. Pour éviter la superposition des bandes, il est possible d'utiliser des lipides deutérés. En effet, les modes de vibrations des chaînes CD_2 vont ainsi apparaître dans la région spectrale $2000-2200\text{ cm}^{-1}$ au lieu de $2800-3000\text{ cm}^{-1}$, permettant d'identifier spécifiquement le lipide deutéré (Torok et al., 1993).

Nous avons utilisé un mélange DOPC:DPPC-d62 (1:1). Dans ce mélange, tous les hydrogènes des chaînes aliphatiques du DPPC sont remplacés par des deutériums. Nous pouvons ainsi quantifier indépendamment le DOPC et le DPPC restants après incubation de Tau-P301L.

Les spectres ATR-FTIR polarisés de la bicouche DOPC:DPPC-d62 (1:1) acquis avant et après incubation de Tau-P301L, à $1\text{ }\mu\text{M}$ pendant 3h, sont présentés dans la **Figure IV-20**. Les bandes observées à 2215 cm^{-1} , 2196 cm^{-1} , 2155 cm^{-1} et 2090 cm^{-1} sont attribuées respectivement aux modes $\nu_{as}(CD_3)$, $\nu_{as}(CD_2)$, $\nu_s(CD_3)$ et $\nu_s(CD_2)$. Les CH_2 du DOPC ont les mêmes modes de vibrations que ceux observés précédemment. On peut donc différencier le DPPC-d62 du DOPC, au sein d'une même bicouche.

Après incubation de Tau-P301L, on observe une diminution de l'intensité des bandes des phospholipides des deux massifs : la quantification de l'intensité de $\nu_{as}(CH_2)$ de DOPC à 2923 cm^{-1} donne un pourcentage de lipides restants de $39,8 \pm 13,7\%$ après incubation de Tau-P301L, contre $37,7 \pm 7,8\%$ de lipides restants pour DPPC-d62, basé sur l'intensité de $\nu_{as}(CD_2)$ à 2196 cm^{-1} , valeurs traduisant une déplétion significative dans les 2 cas, même si elle n'est pas totale. Pour rappel, la déplétion était quasi-totale pour DOPC ($13,2 \pm 16,2\%$) et non significative pour DPPC ($79,4 \pm 21,7\%$) seuls.

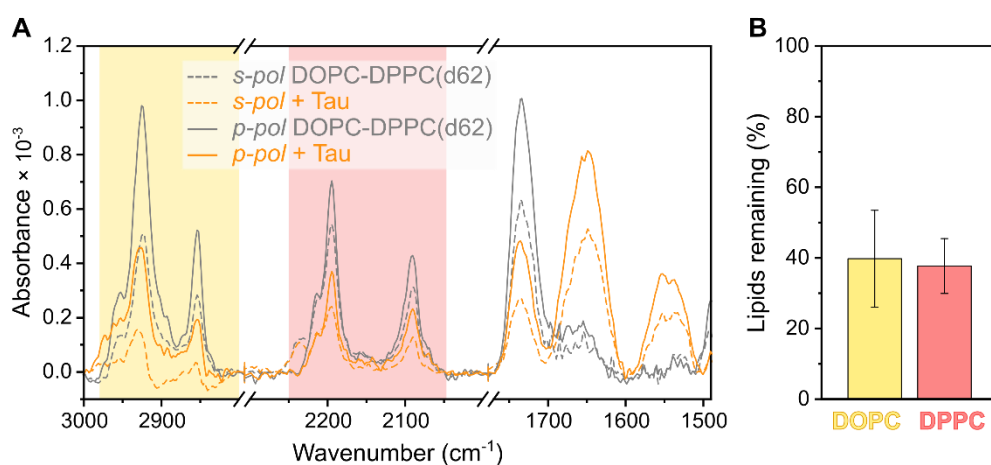


Figure IV-20. Spectres ATR-FTIR d'une bicouche DOPC:DPPC-d62 aux polarisations *s* (ligne pointillée) et *p* (ligne continue) avant (gris) et après (orange) incubation de la protéine à $1\text{ }\mu\text{M}$ pendant 3h (A). Les pics des chaînes acyles correspondant au DOPC sont encadrés en jaune, ceux du DPPC-d62 en rouge. (B) Quantification de la quantité de lipides restants à la surface du cristal après 3h d'incubation à $1\text{ }\mu\text{M}$ de Tau-P301L (en jaune pour DOPC, en rouge pour DPPC-d62), à la moyenne des polarisations *s* et *p* pour 4 réplicats.

En outre, de même que pour la bicouche DPPC, la protéine est détectée via son amide I centrée à 1650 cm^{-1} , dont la déconvolution est présentée **Figure IV-21**. Comme pour DPPC mais également pour DOPC même si la protéine était plutôt accumulée sur le cristal et non sur la bicouche, du fait de sa perturbation presque totale, la structure de la protéine est très similaire à la protéine native.

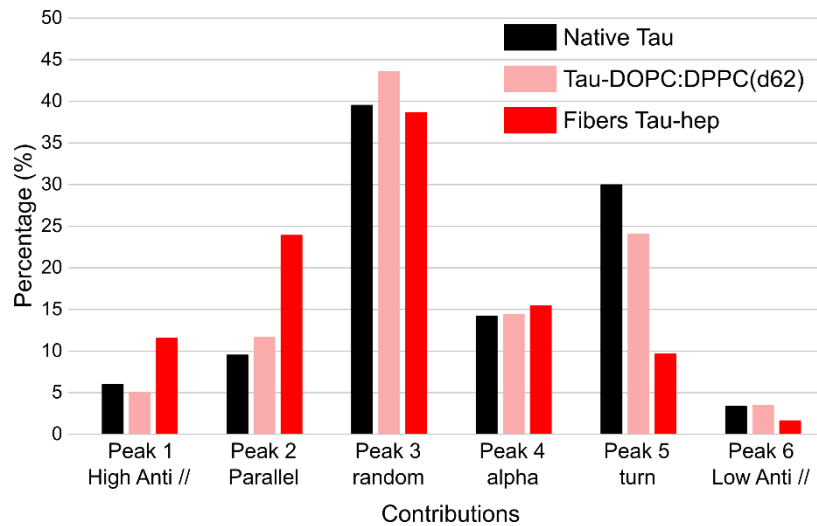


Figure IV-21. Contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale de la protéine Tau-P301L dans différentes conditions : native (noir), après incubation sur la bicouche DOPC:DPPC-d62 (rose) ou dans des fibres Tau-héparine (rouge). Les contributions d'un réplikat sont présentées pour les 3 conditions.

Nous avons ensuite vérifié par AFM que la bicouche DOPC-DPPC(d62) se comportait de manière similaire à la bicouche DOPC-DPPC. Les images AFM (**Figure IV-22**) mettent en évidence une organisation avec une séparation de phase similaire à une bicouche DOPC:DPPC (1:1). Ainsi en dépit de la présence de lipides deutérés, la bicouche s'organise initialement de la même manière, avec une différence de hauteur de $1,09 \pm 0,08$ nm ($n = 6$) entre les 2 phases, i.e. du même ordre de grandeur que pour la bicouche DOPC:DPPC (1:1) où la différence de hauteur observée était de $1,15$ nm \pm $0,27$ nm.

Après addition de 500 nM de Tau-P301L, l'impact sur la bicouche apparaît similaire à l'effet observé sur les bicouches de DOPC : DPPC, avec apparition de trous dans la phase DOPC qui s'élargissent jusqu'à perturbation totale de cette phase fluide, alors que le domaine DPPC ne semble pratiquement pas impacté. Des patches épais de 15 nm sont également observés, et s'accumulent sur la bicouche comme observé précédemment. Les images AFM suggèrent donc que le DPPC n'est pas affecté par la déplétion lipidique, ce qui contraste avec les résultats d'ATR-FTIR, qui ne permettaient pas de différencier une déplétion lipidique sur DOPC rapport à DPPC.

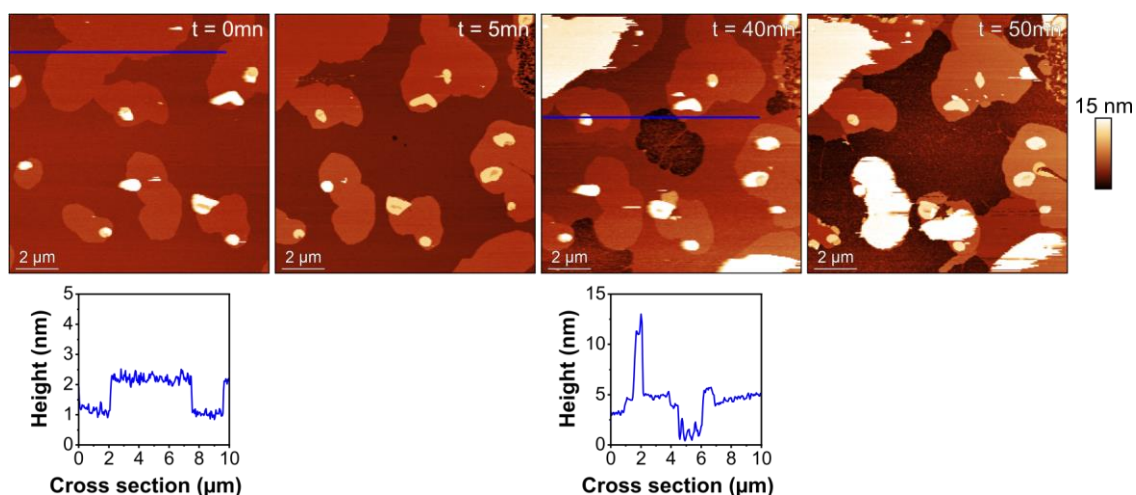


Figure IV-22. Séquence d'images AFM d'une bicouche DOPC-DPPC(d62) avant ($t = 0$ mn) et après addition de 500 nM de Tau-P301L à différents temps. La barre d'échelle est de $2 \mu\text{m}$, l'échelle verticale est commune à toutes les images.

2.7. Effet du cholestérol

2.7.1. Rôle du cholestérol dans les membranes lipidiques

Les expériences précédentes ont montré que Tau-P301L a un effet délétère sur les membranes fluides, tandis que les bicouches en phase gel, comme celles de DPPC, sont très peu impactées. Afin de confirmer que ces effets dépendent réellement de la fluidité membranaire mais également dans l'optique de se rapprocher de la composition de membranes biologiques, nous avons souhaité tester l'effet de la présence de cholestérol. Nous avons précédemment discuté du rôle du cholestérol dans les membranes biologiques, et en particulier son rôle de modulateur de la fluidité. L'intégration de cholestérol dans une bicouche de DPPC d'induire un changement de phase, depuis une phase gel, à une phase mixte gel / liquide-ordonnée, avant d'atteindre une organisation totalement ordonnée lorsqu'une proportion critique de cholestérol est atteinte (et qui dépend de la température) (Koynova and Tenchov, 2013).

Pour nos expériences, nous avons choisi deux concentrations de cholestérol dans une bicouche de DPPC : 10% (dans laquelle la membrane se trouve dans un mélange d'organisation phase gel et liquide-ordonnée), et 30% (dans laquelle la phase liquide-ordonnée est majoritaire). Une proportion de 30% de cholestérol correspond à la concentration physiologique des membranes neuronales (Casares et al., 2019; Luchini and Vitiello, 2020; Mouritsen and Zuckermann, 2004). Nous avons ensuite utilisé l'ATR-FTIR et l'AFM pour vérifier si l'ajout de cholestérol dans une bicouche initialement rigide modifiait l'impact de Tau.

Les spectres d'ATR-FTIR polarisés des bicouches de DPPC avec 10 et 30 % de cholestérol sont présentés en **Figure IV-23**, et sont semblables à ceux obtenus pour des bicouches de DPPC pur, avec le pic $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ centré à 2917 cm^{-1} . Cependant, en présence de cholestérol, la largeur à mi-hauteur de la bande $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ augmente avec le pourcentage de cholestérol, indiquant une plus grande hétérogénéité dans l'orientation des chaînes par rapport au DPPC pur (Lewis and McElhaney, 2013). Pour les trois conditions examinées, les largeurs à mi-hauteur des bandes de $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ sont de $17,6 \text{ cm}^{-1}$ pour le DPPC, $19,5 \text{ cm}^{-1}$ pour le DPPC avec 10% de cholestérol, et $22,1 \text{ cm}^{-1}$ pour le DPPC avec 30% de cholestérol. Bien que ces valeurs soient fournies

à titre indicatif, elles montrent un élargissement des pics dès 10% de cholestérol, avec un élargissement plus marqué à 30% de cholestérol. Cela indique que ces concentrations croissantes de cholestérol entraînent une désorganisation progressive de la bicouche. En effet, en s'intercalant entre les chaînes acyles des phospholipides, le cholestérol induit une perturbation dans l'organisation latérale des chaînes d'acides gras du DPPC, réduisant ainsi leur compaction comparativement à l'absence de cholestérol. Le désordre est toutefois moindre comparé à un phospholipide en phase fluide, il n'y a pas de déplacement du nombre d'onde ($\nu_{as}(\text{CH}_2)$ DOPC est à 2923 cm^{-1})

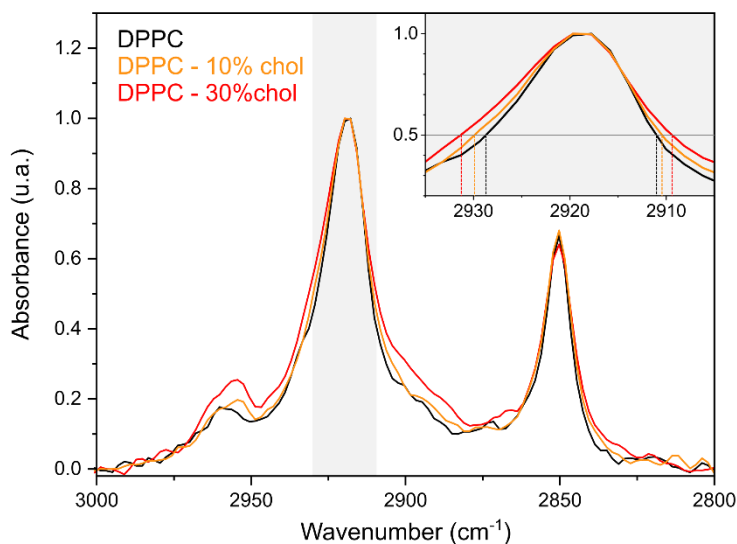


Figure IV-23. Spectres ATR-FTIR normalisés des bicouches supportées DPPC (noir), DPPC-30% cholestérol (rouge), et DPPC-10% cholestérol (orange), à la polarisation p et dans les hauts nombres d'ondes. La normalisation est effectuée en fonction de la hauteur maximale de bande à 2917 cm^{-1} . Cette normalisation met en évidence les différences de largeur des trois bandes. L'encadré en haut à droite montre les largeurs des bandes FWHM pour les trois conditions.

2.7.2. Impact de Tau-P301L sur des bicouches DPPC-10% cholestérol

Pour évaluer l'importance du degré de fluidité au sein de la bicouche DPPC vis-à-vis de l'impact de Tau, nous avons débuté en intégrant une faible concentration de cholestérol, à 10 %. Les spectres ATR-FTIR et la quantification des lipides sont présentés dans la **Figure IV-24**.

Après incubation, la quantification des lipides restants dans la bicouche seule indique $99,8 \pm 2,7 \%$, contre $81,5 \pm 5,3 \%$ en présence de Tau-P301L à 500 nM (**Figure IV-24B**). Cette différence montre une faible déplétion lipidique par rapport au contrôle.

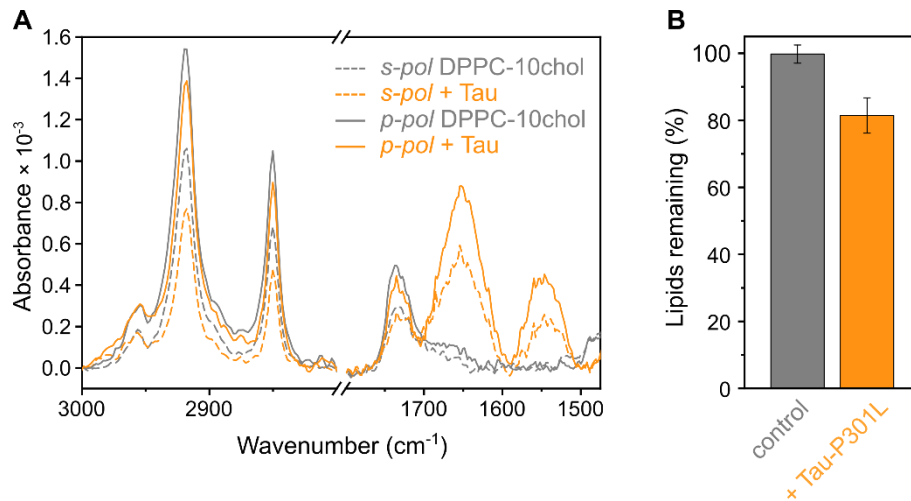


Figure IV-24. Spectres ATR-FTIR de la bicouche DPPC-10% cholestérol aux polarisations *s* (ligne pointillée) et *p* (ligne continue) avant (gris) et après (orange) incubation de la protéine à 500 nM pendant 1h (A). Quantification de la quantité de lipides restants à la surface du cristal pour les conditions contrôles (gris) et après incubation de Tau-P301L (orange), pour les moyennes de 3 réplicats des polarisations *s* et *p* (B).

De même que pour les autres bicouches DOPC et DPPC, la bande amide I est centrée à 1650 cm⁻¹, et sa largeur indique la présence de nombreux éléments de structure secondaire. Sa déconvolution (**Figure IV-25**) indique une structuration protéique majoritairement désordonnée, similaire à la protéine native, sans contribution majoritaire de feuillets-β.

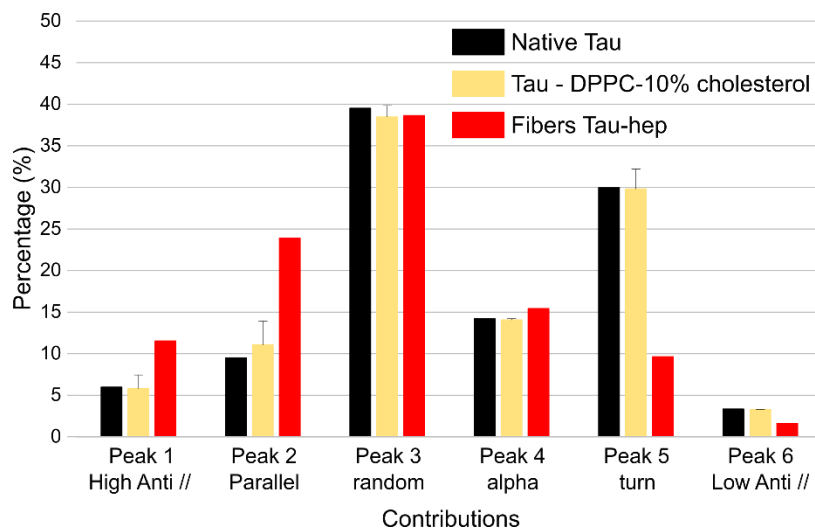


Figure IV-25. Contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale de la protéine Tau-P301L dans différentes conditions : native (noir), après incubation sur la bicouche DPPC-10% cholestérol (jaune) ou dans des fibres Tau-héparine (rouge). Les contributions d'un réplicat sont présentées pour les 3 conditions.

Les résultats obtenus par ATR-FTIR indiquant une déplétion lipidique faible, nous avons utilisé l'AFM pour évaluer la morphologie de la bicouche DPPC-10% cholestérol. L'observation de la bicouche seule, avant l'ajout de la protéine (**Figure IV-26**), révèle une grande hétérogénéité, marquée par la présence de nombreux patches de 10 à 15 nm (**Figure IV-26A**), qui semblent correspondre aux multicouches observées précédemment. Des défauts permettent de mesurer l'épaisseur de la bicouche, d'environ 6 nm (**Figure IV-26E**). Un agrandissement de la zone montre une séparation de phase différente des domaines observés pour les

membranes DOPC:DPPC (**Figure IV-26C, D**). Cette séparation semble plus locale, prenant la forme d'ondulations ou « ripples ».

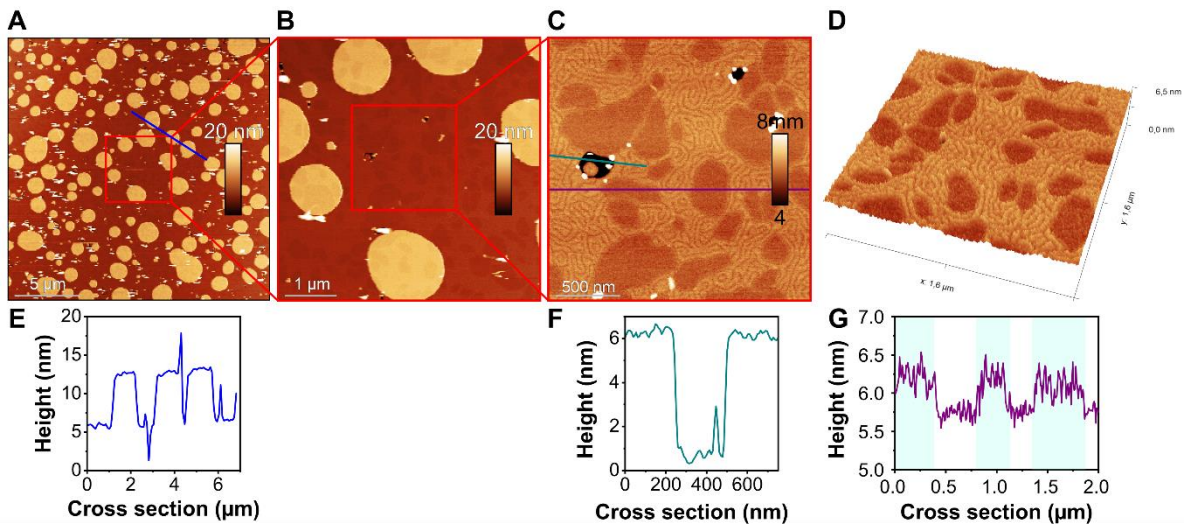


Figure IV-26. Images AFM d'une bicouche de DPPC-10% cholestérol. Les images (B) et (C) sont des zooms des images (A) et (B) respectivement. La section (E) correspond à la ligne de l'image (A). Les sections de l'image (C) mettent en évidence un défaut (F)(section en vert) et la séparation de phase sous forme d'ondulations, dont les phases hautes est soulignée (section en violet) (G). L'image D est une vue topographique 3D des ripples.

Cette configuration est cohérente avec de précédentes observations où une séparation de phase similaire a été rapportée pour des bicouches contenant 10 % de cholestérol (**Figure IV-27**) (Redondo-Morata et al., 2012). Nos observations pourraient être dues à la formation de domaines DPPC riches en cholestérol, plus fluides et donc moins épais, et de domaines pauvres en cholestérol organisés en phase gel, qui correspondent aux parties hautes des ondulations (Koyanova and Tenchov, 2013).

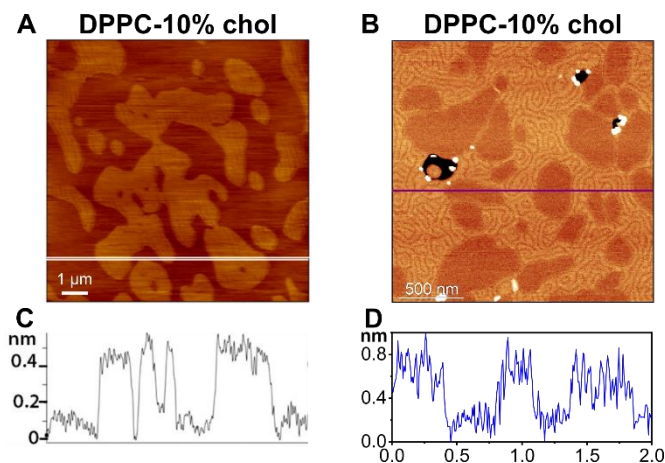


Figure IV-27. Images AFM de comparaison de différentes bicouches issues de la littérature et de cette étude. Bicouche DPPC-10% cholestérol (B) et section (C) montrant une séparation de phase (Redondo-Morata et al., 2012). Bicouche DPPC-10% cholestérol (D) et section (E) de cette étude.

Une séquence d'images AFM de la même bicouche DPPC-10% cholestérol, avant et après l'addition de Tau-P301L à 500 nM, est présentée dans la **Figure IV-28**. Immédiatement après l'addition, la zone observée (**Figure IV-28A**) subit un changement drastique (**Figure IV-28B**). La bicouche est toujours présente, avec une séparation de phase faiblement visible, ainsi que des patches identifiés comme des multicouches (indiqués par

sur la section). Cependant, des trous apparaissent, non seulement aux emplacements des défauts préexistants (indiqués par * sur le profil de hauteur), mais aussi à d'autres endroits de la bicouche. Des épaissements d'environ 4 nm au-dessus de la bicouche apparaissent autour de chaque trou (surlignés en jaune sur les sections). Ces trous et épaissements semblent s'étendre progressivement sur la bicouche (**Figure IV-28C**). Par la suite, les trous semblent être progressivement comblés (voir l'exemple indiqué par un triangle vert **Figure IV-28 C, D, E**). Les épaissements, en revanche, continuent de s'étendre, jusqu'à recouvrir entièrement la bicouche après 2 heures.

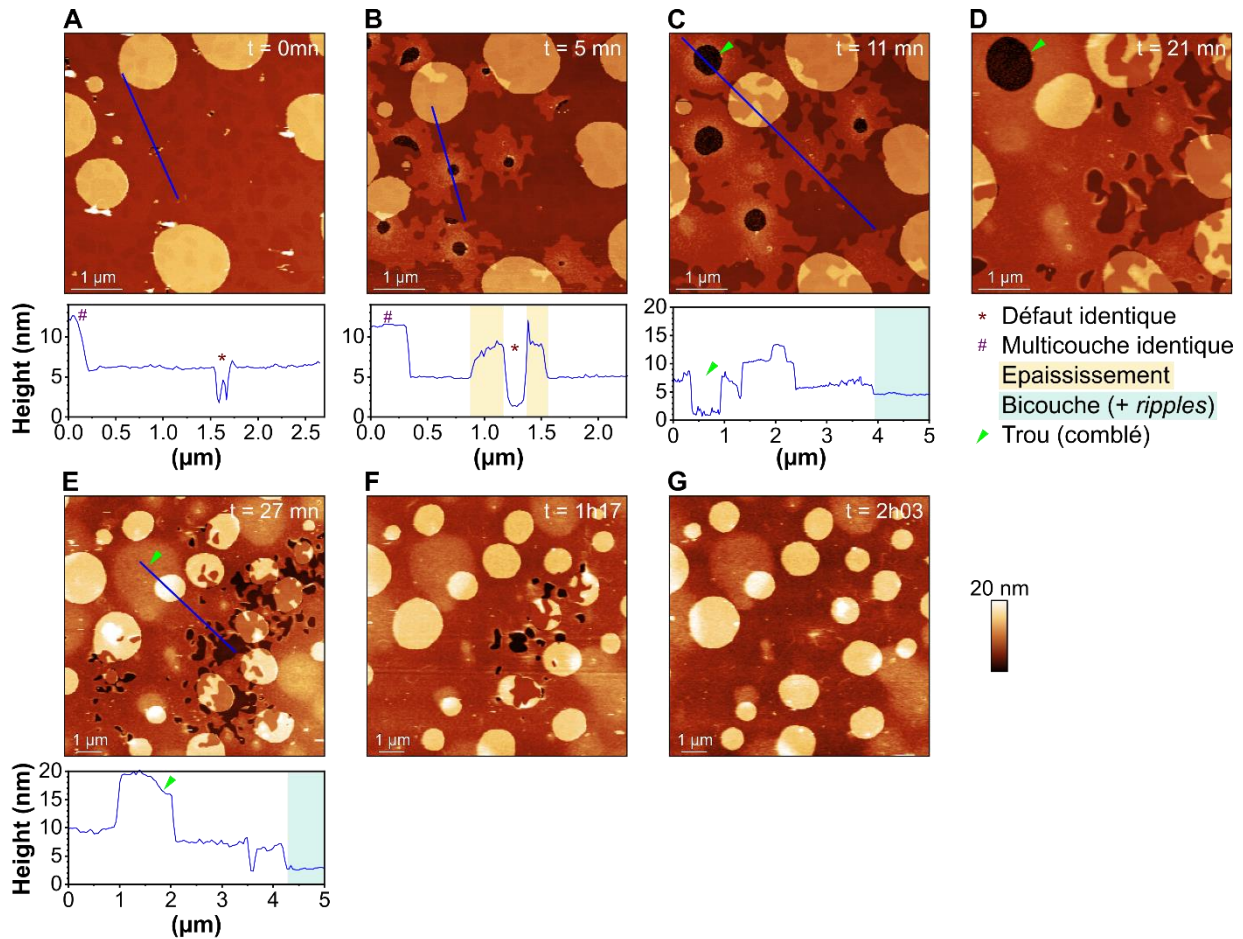


Figure IV-28. Séquence d'images AFM d'une bicouche de DPPC-10% cholestérol avant (A) et après addition de Tau-P301L) 500 nM (B-G). Les lignes bleues correspondant aux sections sous les images (A-C, E). Sur les sections, plusieurs structures sont mises en évidence : * défaut de la bicouche présent sur l'image (A), et sur l'image (B) ; # patch de l'image (B), présent sur l'image (B) ; épaisseur surlignée en jaune (B), bicouche à hauteur d'origine surlignée en bleu (C, E) ; un triangle vert indique un trou (C, D) qui est comblé et présente un épaisseur (E). L'échelle verticale est commune et est de 20 nm.

Ces résultats révèlent un phénomène complexe, marqué par plusieurs types de perturbations. Les épaissements observés pourraient avoir diverses origines, telles que le décollement de la bicouche autour des trous formés, l'insertion de matériel ou encore le re-dépôt de protéines ou de lipides. La présence initiale de multicouches et d'ondulations complique également l'interprétation des données. En outre, les résultats d'ATR-FTIR indiquaient une déplétion lipidique faible pour cette composition, qui nous ont fait nous intéresser à une composition plus riche en cholestérol, avec l'intégration de 30% dans une bicouche DPPC.

2.7.3. Impact de Tau sur les membranes de DPPC-30% cholestérol

Après 1 heure d'incubation de Tau-P301L à 500 nM, les spectres de la bicouche DPPC-30% cholestérol aux deux polarisations changent de manière drastique (**Figure IV-29**). Les bandes correspondant aux modes de vibrations des groupements CH₂ et CH₃, et groupement C=O ester, disparaissent presque entièrement. La quantification des lipides restants après incubation révèle une forte déplétion lipidique suite à l'incubation avec Tau, avec $25,8 \pm 25,0$ % ($n = 3$) de lipides restants en présence de Tau-P301L. La présence de la protéine sur le cristal est confirmée par la présence des bandes amide I et II après incubation. Ces résultats indiquent une importante perturbation des lipides de la membrane DPPC-30% de cholestérol, bien que l'on note une importante variabilité entre les réplicats. Cela contraste fortement avec la membrane de DPPC seul, où $79,4 \pm 21,7$ % des lipides restaient après incubation d'1h avec cette concentration de Tau-P301L.

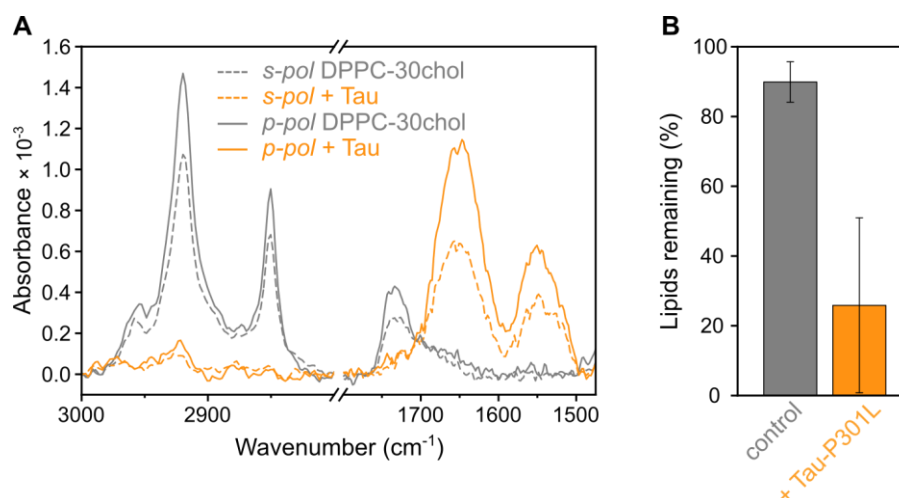


Figure IV-29. Spectres ATR-FTIR de la bicouche DPPC-30% cholestérol aux polarisations *s* (ligne pointillée) et *p* (ligne continue) avant (gris) et après (orange) incubation de la protéine à 500 nM pendant 1h (A). Quantification de la quantité de lipides restants à la surface du cristal après 1h pour les conditions contrôles (gris) et après incubation de Tau-P301L (orange), pour les moyennes de 3 réplicats des polarisations *s* et *p* (B).

La déconvolution de la bande amide I (**Figure IV-30**) indique de même que pour les autres bicouches une structuration semblable à la protéine native, avec une prédominance de structures désordonnées et l'absence d'une augmentation de la contribution des feuillets- β .

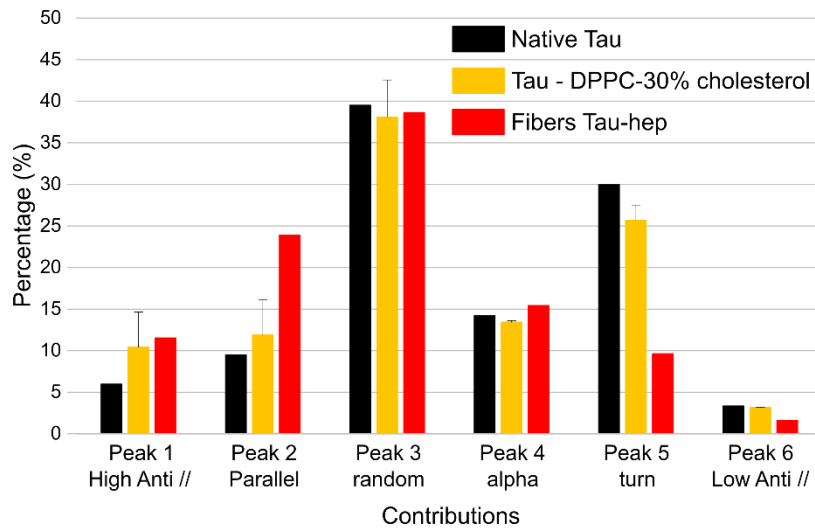


Figure IV-30. Contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale de la protéine Tau-P301L dans différentes conditions : native (noir), après incubation sur la bicouche DPPC-10% cholestérol (jaune) ou dans des fibres Tau-héparine (rouge). Les contributions d'un réplicat sont présentées pour les 3 conditions.

La morphologie de la bicouche DPPC-30% cholestérol est également imagée par AFM (**Figure IV-31**). Initialement, elle apparaît homogène, mais présente des trous ainsi que de petits patches circulaires de 10 à 15 nm, semblables à des multicouches lipidiques comme vues précédemment. Les trous (**Figure IV-31A, F**) confirment une épaisseur de la bicouche d'environ 5 nm, conforme aux observations pour cette composition (Zhang, 2020). Après 32 minutes d'incubation avec Tau-P301L, les défauts présents initialement s'agrandissent, et de nouvelles irrégularités apparaissent (**Figure IV-31B**). Comme observé précédemment pour les bicouches DOPC et POPC, ces trous s'élargissent jusqu'à disparition complète de la bicouche, ainsi que des patches épais de 10-15 nm présents initialement. Comparé aux bicouches fluides de DOPC et POPC, la bicouche DPPC-30% cholestérol semble disparaître en plus de temps, la dernière image étant enregistrée après 2h20 d'incubation, contre généralement 1h30 pour DOPC et POPC.

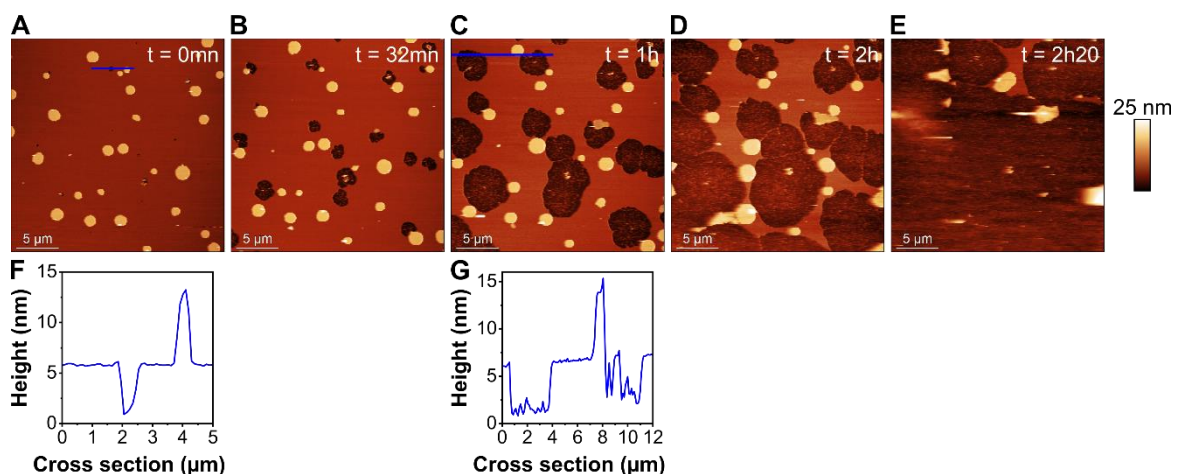


Figure IV-31. Séquence d'images AFM d'une bicouche DPPC-30% cholestérol avant (A) et après addition de Tau-P301L à 500 nM. Les sections (F, G) correspondent aux lignes continues des images correspondantes (A, C). La section (F) met en évidence un défaut confirmant l'obtention d'une bicouche de ~ 5 nm. Les barres d'échelle sont de 5 μm, les échelles verticales de 25 nm.

3. Discussion

En raison de l'incapacité de la phosphatidylcholine à induire la fibrillation de Tau, très peu d'études se sont intéressées à ces modèles membranaires, contrairement à ceux basés sur des lipides anioniques (PG, PS, etc.). Dans ce chapitre, nous avons examiné l'effet de Tau-P301L sur plusieurs modèles membranaires zwitterioniques, notamment des bicouches POPC, DOPC, DOPC:DPPC (1:1), DPPC-10% cholestérol, et DPPC-30% cholestérol, en utilisant les techniques d'ATR-FTIR et d'AFM. Les résultats ont révélé que Tau-P301L induit des modifications importantes de ces bicouches. Cette perturbation se manifeste, dans les bicouches POPC, DOPC et DPPC-30% cholestérol, par une déplétion lipidique très marquée, mise en évidence par ATR-FTIR, ainsi que par l'apparition de défauts importants observés par AFM, entraînant la destruction de la membrane en un temps relativement court (environ 1h30). En revanche, les domaines et bicouches DPPC semblent relativement peu affectés par la protéine, avec une absence notable de déplétion lipidique ou d'apparition de trous. Toutefois, une accumulation protéique et un épaissement de la bicouche ont été respectivement observés par ATR-FTIR et AFM.

Ces résultats suggèrent que Tau-P301L est capable d'interagir de manière significative avec les bicouches planes zwitterioniques étudiées, entraînant des perturbations qui varient en fonction de l'organisation des bicouches.

3.1. Déplétion lipidique en fonction du modèle membranaire

Les déplétions lipidiques détectées par ATR-FTIR et l'apparition de défauts observées par AFM mettent en évidence des différences entre les bicouches lipidiques. Pour permettre une comparaison entre les différents modèles membranaires DOPC, DPPC, DPPC-10% cholestérol et DPPC-30% cholestérol quant à l'effet de la protéine Tau-P301L, la quantification des lipides après 1h d'incubation (pour les conditions contrôle et avec Tau-P301L à 500 nM) est présentée dans la **Figure IV-32**.

Nos résultats montrent une différence significative de déplétion en présence de Tau-P301L par rapport au contrôle, pour les systèmes membranaires DOPC, DPPC-10% cholestérol, et DPPC-30% cholestérol. La bicouche DPPC, organisée en phase gel rigide, ne montre pas de déplétion significative.

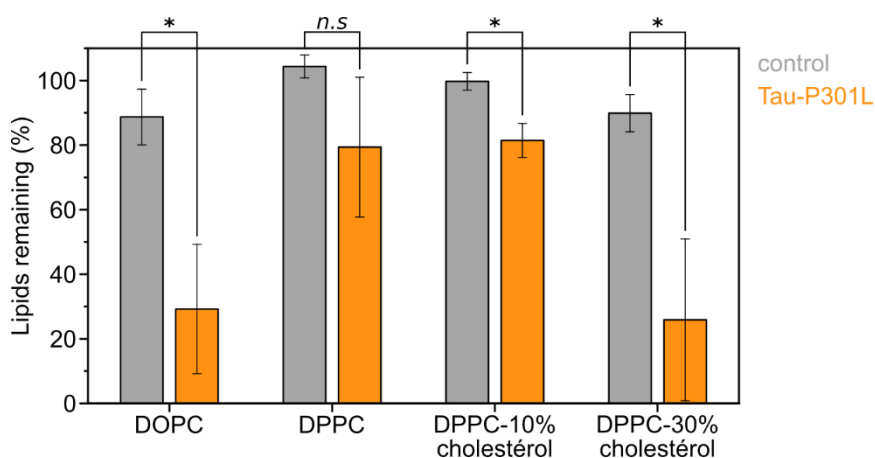


Figure IV-32. Quantification des lipides restants à la surface du cristal pour les conditions contrôles (gris) et après incubation de Tau-P301L à 500 nM après 1h (orange) sur les bicouches DOPC, DPPC, DPPC-10% cholestérol et DPPC-30% cholestérol (* $p < 0,05$).

Il est notable que la déplétion observée pour le DPPC-30% cholestérol est comparable à celle du DOPC, avec respectivement $25,8 \pm 25$ % et $13,2 \pm 16,2$ % de lipides restants après incubation. Ces conclusions sont confirmées par les observations en AFM, qui montrent un effet similaire, avec l'apparition de défauts qui s'élargissent jusqu'à déstabilisation totale de la bicouche. Pour DPPC-10% cholestérol, bien que la différence par rapport au contrôle soit significative, elle est bien moindre que pour DOPC et DPPC-30% cholestérol.

Nous avons abordé le rôle du cholestérol comme modulateur de fluidité, en particulier lorsqu'il est intégré à des bicouches qui s'organisent en phase gel. Nos résultats suggèrent donc une fluidification de la membrane DPPC en présence de 30% de cholestérol suffisante pour transformer une membrane DPPC initialement insensible à l'impact de Tau-P301L en une membrane presque entièrement détruite après incubation de cette protéine. En revanche, un taux de 10% de cholestérol ne fluidifie pas suffisamment la membrane.

Ces données sont en accord avec de précédentes études s'intéressant à l'influence du cholestérol dans la transition de phase du DPPC. L'intégration de 10% de cholestérol diminue la température de transition du DPPC d'environ 1°C (Redondo-Morata et al., 2012), et induit l'apparition d'une séparation de phase de 0,6 nm visible par AFM, semblable à nos observations (**Figure IV-27B, C**). Au sein de ces bicouches, les données de spectroscopie de force des auteurs révèlent la présence d'une phase comparable à une bicouche de DPPC pure, pauvre en cholestérol, organisée sous forme de phase gel, ainsi qu'une phase plus épaisse et riche en cholestérol, correspondant à une organisation en phase liquide ordonnée (Redondo-Morata et al., 2012). Au-delà d'un seuil critique de cholestérol, situé entre 20 et 40 %, la bicouche devient très homogène et le phénomène de transition de phase disparaît, suggérant une organisation en phase liquide ordonnée dans l'intervalle de températures étudié (entre 20 et 65°C).

Ce changement d'organisation induit par le cholestérol rend ainsi la bicouche DPPC plus sensible à l'impact de Tau-P301L, ce qui suggère que l'effet de cette protéine dépend de l'état d'organisation membranaire, qu'il soit sous forme de gel, de phase liquide-ordonnée, ou de phase liquide-désordonnée. La déplétion des bicouches décrites comme fluides par Tau témoigne d'une interaction spécifique.

3.2. Mécanisme de perturbation membranaire

Les modifications des bicouches induites par la présence de Tau, ainsi que son accumulation indique une interaction entre Tau et les PC. Avec les bicouches et les lipides anioniques, cette interaction semble majoritairement électrostatique, même si le mécanisme semble plus complexe. En raison de l'absence de charges négatives sur les PC, le mécanisme d'interaction entre Tau et les bicouches zwitterioniques ne peut être électrostatique. Quel autre mécanisme peut expliquer les résultats que nous observons ?

La déplétion lipidique induite par Tau-P301L, l'absence d'insertion ou de structures spécifiques observées par ATR-FTIR et AFM, ainsi que l'influence de la fluidité membranaire sur la déplétion induite par Tau, suggèrent que l'effet observé pourrait être dû à des interactions de type hydrophobe entre la protéine et la bicouche, indépendamment du mécanisme électrostatique qui peut éventuellement avoir lieu localement. En effet bien que la phosphatidylcholine soit globalement zwitterionique, elle porte une charge positive sur sa tête hydrophile (groupe ammonium quaternaire) et une charge négative sur son groupement phosphate. Des interactions électrostatiques entre les acides aminés basiques (domaine MTBR de Tau) et le groupe phosphate

de PC, ou bien entre les acides aminés acides (riches dans le domaine N-terminal de Tau) et la tête positive de PC pourrait exister. Cependant ces interactions n'expliquent pas la haute solubilisation de la bicouche que nous observons par ATR-FTIR et AFM, pour les bicouches fluides, organisées de manière Liquide-ordonnée ou Liquide-désordonnée. Ce mécanisme de solubilisation correspond ainsi à un effet de type détergent. En effet dans ce dernier, comme discuté en introduction, le peptide ou la protéine interagit avec la surface membranaire, et lorsqu'une concentration critique est atteinte, la bicouche phospholipidique est perturbée, éventuellement par formation de micelles lipidiques (Berthelot et al., 2013; Sato and Feix, 2006).

3.2.1. Accumulation protéique

Bien qu'aucune accumulation protéique ne soit visible sur les bicouches par AFM avant perturbation, les données d'ATR-FTIR révèlent une présence de Tau sur les bicouches qui ne sont pas totalement détruites, à savoir celles de DPPC, DOPC:DPPC, et DPPC-10% cholestérol. Cette accumulation se fait sans insertion dans les membranes, comme l'indique l'absence de modification des ratios dichroïques des lipides observée par ATR-FTIR. De plus, aucune structuration n'est identifiée, avec une proportion majoritaire de portions désordonnées (*random coil*) et de β -turn, comme la protéine native intrinsèquement désordonnée, ainsi que l'absence d'agrégats structurés observée en AFM.

Un récapitulatif des résultats de déconvolution est présenté en **Figure II-35**, comparant les contributions des éléments de structure secondaire de Tau-P301L après incubation sur les bicouches de PC analysées dans ce chapitre et sur les bicouches de PS étudiées au chapitre précédent. Ces résultats mettent en évidence une différence de structuration de Tau-P301L après incubation sur les bicouches de PC par rapport à celles de PS. En effet, pour POPS et DOPS, une diminution des β -turns et une augmentation des feuillets- β parallèles avaient été observées, accompagnées d'un décalage du maximum d'absorbance de 1650 cm^{-1} (protéine désordonnée native) à 1643 cm^{-1} . En revanche, pour toutes les bicouches de PC analysées dans ce chapitre, quelle que soit leur organisation membranaire, la bande amide I reste centrée autour de 1650 cm^{-1} , sans augmentation significative des contributions des feuillets- β ni diminution des β -turns. Ces résultats confirment que, contrairement à l'interaction entre Tau et PS, qui est principalement électrostatique et induit une structuration de la protéine, l'interaction entre Tau et PC n'entraîne pas de structuration significative de la protéine.

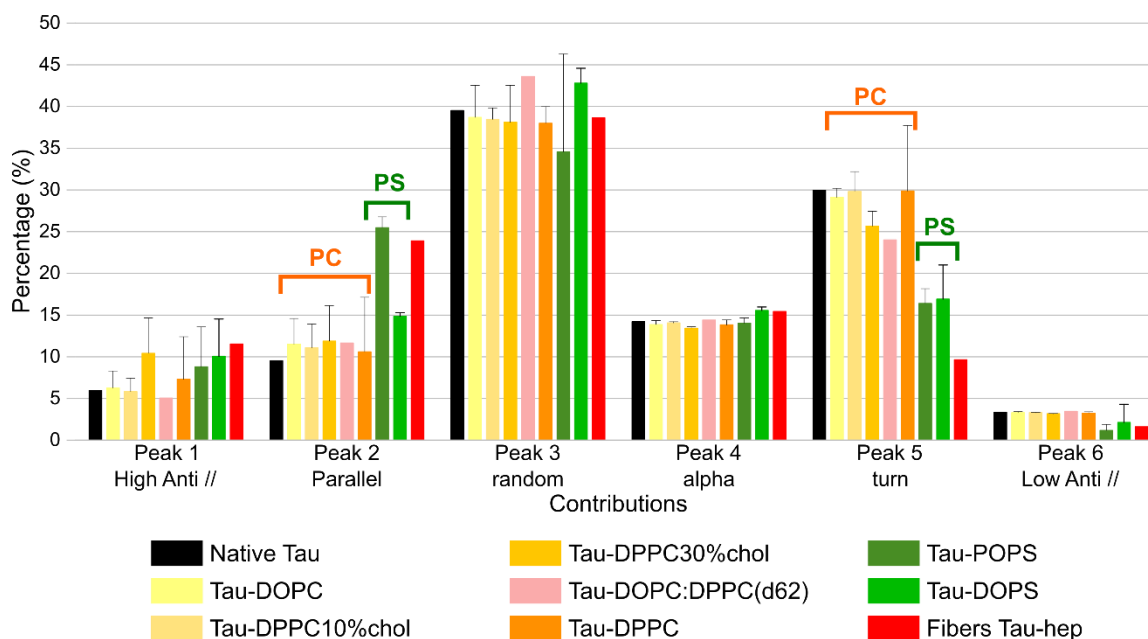


Figure II-35. Comparaison des contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale de la protéine Tau-P301L dans les différentes conditions analysées dans les chapitres 3 et 4 : native (noir), après incubation sur les bicouches DOPC (jaune), DPPC-10% cholestérol (jaune orangé), DPPC-30% cholestérol (orange), DOPC:DPPC(d62) (rouge clair), DPPC (orange foncé), POPS (vert foncé), DOPS (vert), ainsi que par rapport à des fibres Tau-héparine (rouge). PS : phosphatidylsérine ; PC : phosphatidylcholine.

Ces différences sont en outre confirmées par les observations à l'échelle nanométrique par AFM, où un dépôt sous forme de patches et de structures fibrillaires similaires à des fibres amyloïdes était observé sur les bicouches de DOPS, alors que sur les bicouches de PC, une solubilisation des membranes fluides est observé, et qu'un épaissement et un dépôt amorphe et en faible proportion est observé sur les membranes gel (DPPC). Ces résultats suggèrent donc un dépôt non structuré sans insertion à la surface des bicouches zwitterioniques.

3.2.2. Absence de perturbation des liposomes

Nos expériences de fuite de liposomes entre Tau-P301L et POPC suggèrent l'absence de fuite et donc d'une absence de perturbation des bicouches de DOPC sous la forme de liposomes en solution. Des études similaires réalisées précédemment avec des vésicules purement zwitterioniques telles que le DOPC (Dicke et al., 2017) ou le PC (Katsinelos et al., 2018), ont montré une absence d'interaction avec des fragments de Tau en solution. Les mesures des constantes d'affinité corroborent cette faible interaction, avec une valeur très élevée de 53,3 μM pour le fragment K19 en interaction avec des liposomes de POPC, contre 0,93 μM pour un mélange POPC:POPS (4:1) (Künze et al., 2012). Cela suggère que si une interaction existe entre Tau (ou ses fragments) et les lipides PC, elle est très faible, mais pourrait néanmoins expliquer l'accumulation observée à la surface des bicouches supportées, bien que les modèles utilisés (protéine et système membranaire) diffèrent.

3.2.3. Déplétion lipidique

Les résultats obtenus par ATR-FTIR révèlent une disparition des lipides à proximité de la surface des bicouches fluides après incubation avec Tau-P301L. De même, l'AFM montre non seulement cette disparition lipidique, mais aussi la présence de dépôts plats et hétérogènes, sans morphologie particulière. Ces

observations soulèvent des questions sur les mécanismes d'extraction des lipides de la bicouche, ainsi que sur leur forme.

L'effet détergent, impliquant une extraction des lipides sous forme de micelles potentiellement liées à la protéine, est documenté pour les peptides antimicrobiens (Sato and Feix, 2006). Toutefois, ces micelles sont difficiles à détecter avec les méthodes employées. En ATR-FTIR, la solution en contact avec la bicouche est rincée après incubation, rendant les espèces solubilisées non mesurables. Il serait possible de redéposer cette solution sur le cristal d'ATR-FTIR pour observer un éventuel dépôt de lipides, confirmant leur extraction ; cependant, cette technique, en étant surfacique, ne reproduit pas l'organisation des lipides en solution. L'AFM ne permet pas de détecter les espèces en solution, mais révèle des dépôts qui pourraient correspondre à des dépôts de phospholipides, bien que leur nature purement lipidique ou mixte reste indéterminée.

D'autres techniques de biophysique, comme la DLS (*Dynamic Light Scattering*), pourrait fournir des informations sur les particules en solution, en particulier sur leur taille et leur distribution, mais la présence de la protéine nécessite des contrôles rigoureux pour distinguer les espèces protéiques, lipidiques et mixtes. Par ailleurs, l'observation de ces micelles est rendue difficile par des méthodes d'imageries conventionnelles comme la microscopie électronique ou l'imagerie de fluorescence, du fait de leur petite taille et de leur possible faible abondance. L'utilisation de marquages spécifiques des lipides et de la protéine, ainsi que le couplage de méthodes de fluorescence avec des techniques de purification biochimique, pourraient potentiellement fournir des informations plus précises sur la composition des micelles et la nature des dépôts observés sur la bicouche. L'utilisation du NanoIR pourrait également permettre de mieux caractériser les différents dépôts observés sur les bicouches.

3.2.4.Mécanisme d'extraction lipidique

Précédemment, nous avons abordé les effets délétères des peptides antimicrobiens et amyloïdes sur les membranes, en particulier lipidiques. Dans le cas des amyloïdes, nous avons discuté de la toxicité des différentes espèces, notant que les oligomères sont généralement considérés comme les plus toxiques (Henry et al., 2015). Les effets délétères observés dans ce chapitre sont dus à l'incubation de la protéine sous sa forme monomérique, en l'absence d'une agrégation possible avec la phosphatidylcholine (comme démontré précédemment). Dès lors, il est pertinent de se demander par quel mécanisme la protéine seule peut induire un effet délétère similaire à un effet détergent, et donc potentiellement extraire les lipides de la membrane.

En comparaison avec les peptides antimicrobiens, qui présentent des similarités avec les amyloïdes, notamment en ce qui concerne leur mode de perturbation, il est intéressant d'examiner les structures responsables de leur effet détergent (Zelezetsky and Tossi, 2006). En effet, une classe de peptides antimicrobiens possède une structure en hélice α . Malgré leurs séquences spécifiques, ces peptides partagent une organisation commune : une face de l'hélice principalement composée d'acides aminés hydrophobes, et l'autre face avec une majorité de résidus polaires (**Figure IV-33**).

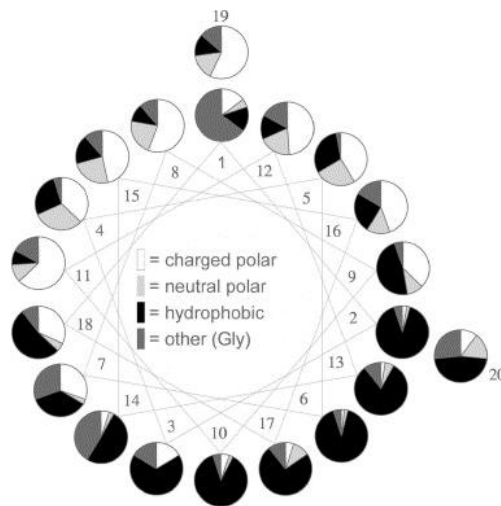


Figure IV-33. Fréquence des types de résidus en fonction de leur position au sein des hélices α de peptides antimicrobiens (Zeluzetsky and Tossi, 2006).

Cette organisation est cruciale pour le mécanisme détergent, car elle permet aux peptides de se lier à la membrane et de pénétrer plus profondément dans les chaînes acyles des phospholipides, entraînant leur resolubilisation sous forme de micelles. Bien que Tau soit intrinsèquement désordonnée en solution, nous avons discuté en introduction / dans le chapitre 1 de sa structuration faible mais présente lorsqu'elle interagit avec des lipides et/ou des membranes. Généralement, cette structuration a été observée principalement avec des lipides anioniques (ou mixtes), mais il est plausible que Tau adopte une structuration locale en hélices transitoires lorsqu'elle interagit avec des liposomes POPC:POPS (Georgieva et al., 2014; MacAinsh and Zhou, 2023). L'analyse des coefficients de pénétration des résidus en fonction de leur position dans l'hélice a permis de déterminer leur interaction avec la membrane lipidique. Il a ainsi été observé que les résidus hydrophobes sont orientés vers les chaînes acyles des phospholipides, tandis que les résidus polaires se trouvent sur la face opposée (voir **Figure IV-34** également présentée dans le Chapitre 1). Par analogie, il est possible de proposer que l'extraction lipidique observée pour Tau suit un mécanisme similaire à celui des peptides amphiphiles structurés en hélices α .

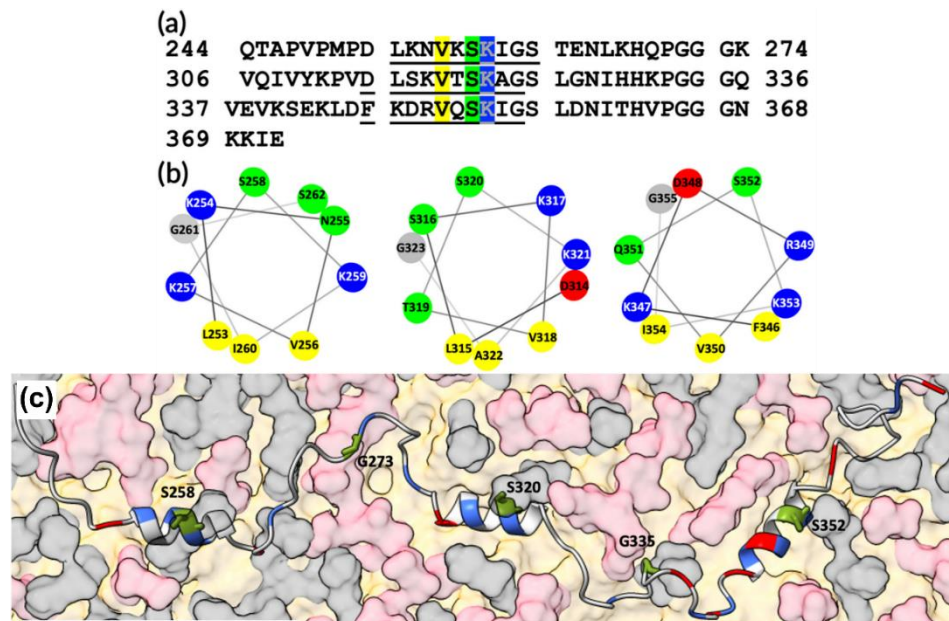


Figure IV-34. Séquence (a) et représentation (b) des 3 régions hélicoïdales (253–261, 315–323 et 346–355), précédemment identifiées par résonance de spin électronique (ESR ou RPE) par Georgieva et al. (Georgieva et al., 2014). Représentation d’une simulation de dynamique moléculaire (MD), de la protéine tau K19 liée à une membrane POPC:POPS (1:1), en vue du dessus (c). Les têtes polaires de POPC sont grises, celles de POPS sont roses, et les chaînes acyles sont jaunes. Les chaînes latérales des résidus protéiques apolaires, polaires, acides et basiques, sont respectivement jaunes, verts, rouges, et bleus. Modifiés de (MacAinsh and Zhou, 2023).

3.2.5. Région responsable de l’effet détergent

De plus, l’utilisation de divers modèles membranaires purement zwitterioniques dans une étude AFM avec le fragment K18 a révélé une forte capacité de solubilisation des membranes POPC, ainsi que des phases fluides des membranes DOPC:DPPC (1:1) et DOPC:DPPC:cholestérol (1:1:1) (Azouz et al., 2021). Ces résultats sont cohérents avec les nôtres même si des paramètres expérimentaux diffèrent. Ainsi, si les résultats sont similaires entre le fragment K18 et la protéine Tau entière, on peut en déduire que la séquence protéique responsable de l’effet délétère se situe au sein de la séquence de K18, tout en laissant ouverte la possibilité que le reste de la protéine, notamment les domaines N-terminaux, contribue à l’interaction (Brandt et al., 1995).

3.3. Quelle est l’espèce amyloïde impliquée dans l’interaction délétère ?

Nos résultats révèlent un effet délétère induit par l’incubation de monomères de la protéine Tau. Les tests préliminaires réalisés avec des fibres de Tau préformées en présence d’héparine montrent une solubilisation des membranes moins prononcée qu’en présence de monomères. De plus, la perturbation observée pourrait également provenir de la présence de monomères, en équilibre dans la solution de fibres Tau-héparine. En introduction, nous avons discuté du fait que les espèces oligomériques sont généralement considérées comme les plus toxiques. Il est donc probable que la solubilisation que nous observons, qui pourrait avoir un impact délétère sur les cellules dans un contexte cellulaire, soit provoquée par des espèces monomériques. Nos résultats suggèrent que Tau pourrait solubiliser les membranes plasmiques par interaction avec des lipides zwitterioniques et organisés sous forme fluide.

Cependant, il est important de souligner que nos modèles membranaires ne sont pas représentatifs de la composition réelle des membranes cellulaires. L'incorporation d'autres lipides, ainsi que de protéines et de sucres dans la membrane, pourrait modifier de manière significative la manière dont Tau interagit avec cette dernière. Par exemple, l'étude d'Azouz et al. (Azouz et al., 2021) a montré que des bicouches mixtes (anioniques et zwitterioniques) présentent des solubilisations moindres comparée à des modèles purement zwitterioniques.

3.4. Modèle proposé

D'après les résultats de la littérature et les nôtres, nous pouvons proposer un modèle expliquant l'interaction de Tau avec des modèles membranaires zwitterioniques. Les études antérieures sur les séquences de Tau, son repliement au contact des membranes, ainsi que les analogies avec les peptides antimicrobiens ou d'autres protéines amyloïdogènes, peuvent notamment expliquer les déplétions lipidiques observées.

Le fait que nos résultats avec la protéine entière soient similaires à ceux obtenus avec le fragment K18 (Azouz et al., 2021) implique que les domaines présents dans ce fragment sont majoritairement responsables de l'interaction. C'est précisément dans ces domaines que des repliements faibles et transitoires ont été identifiés au contact de vésicules ou de micelles lipidiques (Barré and Eliezer, 2006; Georgieva et al., 2014). Les courtes hélices amphipathiques situées dans les régions des domaines de répétition, en particulier au niveau des résidus 253–261, 315–323 et 346–355, correspondant respectivement aux domaines R1, R3 et R4, pourraient être à l'origine de la déplétion lipidique des membranes fluides zwitterioniques, par une interaction de type détergent (Georgieva et al., 2014; MacAinsh and Zhou, 2023).

Le modèle proposé dépend donc des compositions lipidiques (**Figure IV-35**). Lorsque Tau interagit avec une bicouche supportée organisée en phase fluide (**A, B**), elle s'accumule à la surface membranaire, notamment via son domaine de répétition. Dans ce domaine, des hélices transitoires présentes dans les domaines R1, R3 et R4 pourraient interagir avec les phospholipides par des interactions hydrophobes entre les résidus hydrophobes sur une face des hélices et les chaînes acyles des phospholipides, permettant ainsi une insertion plus profonde de la protéine au sein de la membrane (**1**).

Lorsqu'une concentration critique est atteinte, ici inférieure à 500 nM, l'insertion d'un grand nombre de protéines dans la bicouche supportée conduit à une déstabilisation et à une solubilisation sous forme de micelles (**2**), qui peuvent être associées ou non à la protéine. Ces micelles peuvent également fusionner pour former des multicouches lipidiques ou se redéposer sur le mica ou sur les patchs restants de la bicouche.

Dans des compositions membranaires plus complexes, telles que les bicouches DOPC:DPPC, la membrane est organisée en domaines fluides (liquide-désordonnée) et rigides (gel). En raison de la compaction des chaînes de DPPC dans les phases gel, Tau interagit moins efficacement par des interactions hydrophobes, ce qui entraîne une déplétion lipidique sélective au niveau des phases fluides DOPC à l'échelle nanométrique. La protéine et/ou les lipides peuvent également se redéposer et s'accumuler sur le DPPC, conduisant à un épaissement (**3**), comme observé par AFM.

L'ajout de cholestérol dans une bicouche DPPC modifie la fluidité de la bicouche, la faisant passer d'une phase gel à une phase liquide-ordonnée. En fonction de la concentration en cholestérol, cette fluidification peut

varier et influencer l'impact de Tau. À faible concentration de cholestérol (10%, **D**), les chaînes acyles des phospholipides deviennent plus accessibles aux résidus hydrophobes de Tau, permettant une pénétration faible, et entraînant une déplétion lipidique significative (comme observé par ATR-FTIR) mais non totale (comme observé par AFM). Avec une concentration plus élevée de cholestérol (30%, **E**), la bicouche est perturbée de manière similaire aux bicouches DOPC (ou POPC), entraînant une resolubilisation de la majorité de cette dernière.

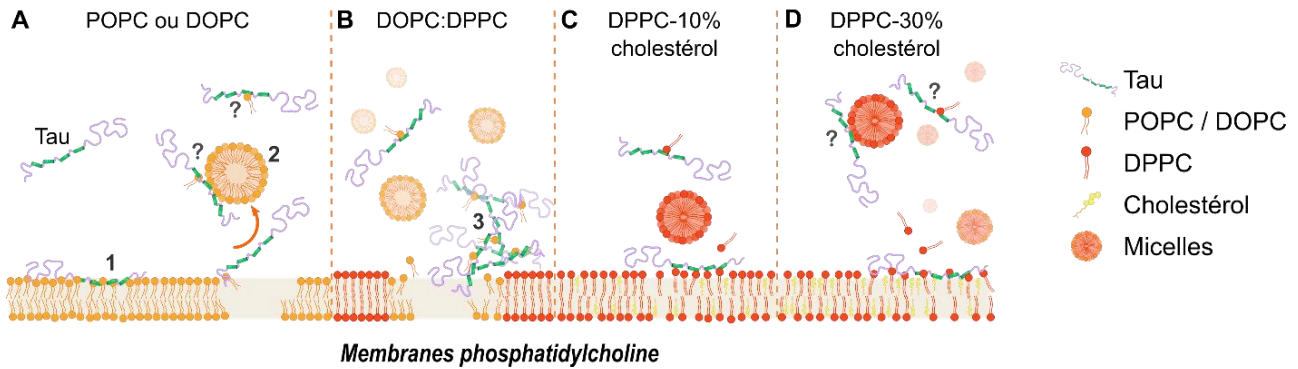


Figure IV-35. Modèle d'interaction de Tau avec des modèles membranaires de phosphatidylcholine. Les bicouches fluides de DOPC ou de POPC (A) sont significativement perturbées après incubation de Tau, via des interactions hydrophobes (1) entraînant un effet détergent (2). Les bicouches mixtes DOPC:DPPC (C) présentent un effet plus complexe, avec une déplétion sélective des domaines fluides de DOPC, tandis que les domaines organisés en phase gel de DPPC ne sont pas affectés. L'intégration de cholestérol (D, E) dans les bicouches de DPPC facilite l'interaction de Tau avec les chaînes acyles de DPPC, entraînant une déplétion lipidique significative mais modérée à faible taux de cholestérol (D), ou quasi-totale dès 30 % de cholestérol (E). Les lipides solubilisés après extraction depuis la bicouche pourraient se retrouver sous forme de micelles (2), avec ou sans protéine (représentés par des « ? »).

4. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié par ATR-FTIR et AFM l'impact de la protéine Tau (2N4R-P301L) sur des bicouches supportées de phosphatidylcholine avec des compositions variées. Ces techniques ont permis notamment d'observer des déplétions lipidiques et des accumulations protéiques sans insertion, en fonction des compositions membranaires. Nos résultats indiquent que les bicouches s'organisant de manière Liquide-ordonnée ou Liquide-désordonnée, étaient perturbées par un mécanisme que nous proposons être de type détergent, par interaction hydrophobe des résidus hydrophobes de la protéine avec les chaînes acyles des phospholipides. Cet effet détergent se traduit par une solubilisation importante, voire totale des bicouches, mesurée par diminution des bandes spécifiques de lipides en ATR-FTIR, et par apparition de défauts observés à l'échelle locale et en temps réel par AFM. Pour les bicouches ou domaines s'organisant en phase gel, cet effet n'est pas observé, possiblement par un manque d'accessibilité des chaînes acyles par la protéine. L'ajout de cholestérol en revanche permet de moduler cette accessibilité, se traduisant par une déplétion à 30% de cholestérol similaire aux bicouches initialement organisée en Liquide-désordonnée.

Nos résultats mettent en évidence un impact significatif de Tau sur les membranes fluides zwitterioniques, un aspect peu exploré dans la littérature, qui s'intéresse principalement aux phospholipides capables d'induire la fibrillation de Tau, directement liée à sa pathogénicité. Bien que nos résultats révèlent un mécanisme peu décrit, suggérant une toxicité potentielle des formes monomériques de Tau vis-à-vis des membranes,

généralement considérées comme non responsables des effets toxiques, ils ne permettent pas d'expliquer directement certains processus pathologiques en raison de l'utilisation de modèles *in vitro* peu représentatifs. En effet, les modèles membranaires étudiés *in vitro* sont pour le moment très simples, et il serait intéressant de les complexifier afin de se rapprocher davantage d'une membrane biologique. Toutefois, ces résultats apportent de nouvelles informations sur les mécanismes d'interaction de Tau, potentiellement pertinents dans un contexte physiologique, comme son rôle dans la différenciation neuronale ou bien dans d'autres phénomènes, notamment de sécrétion ou d'internalisation directe à travers la membrane, ou même l'association de phosphatidylcholine dans des extraits d'agrégats pathologiques de Tau (Gellermann et al., 2006). Ils soulignent également l'importance de l'organisation membranaire et de sa dynamique, où les membranes, en fonction de leur composition, pourraient concentrer Tau via une interaction hydrophobe initiale, avant d'établir des interactions spécifiques, électrostatiques ou autres, avec des composants membranaires tels que des lipides anioniques, des protéines, voire des sucres.

Principaux Résultats

- ▶ Tau n'induit pas de fuite des liposomes de POPC
- ▶ Tau entraîne une perturbation presque totale des bicouches fluides POPC et DOPC, par formation de défauts entraînant une déplétion lipidique significative
- ▶ Tau ne perturbe pas les bicouches ou les domaines rigides de DPPC, mais s'accumule à la surface de manière non structurée, similaire à la structure d'une protéine native
- ▶ L'intégration de cholestérol dans les bicouches de DPPC les fluidifie, les rendant plus susceptible à l'effet délétère de Tau
- ▶ Les membranes de PC subissent un effet détergent après incubation de Tau, dépendant de leur organisation en termes de fluidité.



CONCLUSION

Conclusion

Les fibres amyloïdes pathogènes de Tau ont été identifiées dans de nombreuses maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer qui est la plus fréquente et répandue. Ces pathologies majoritairement liées à l'âge sont amenées à se développer avec le vieillissement de la population mondiale, avec une prévalence qui ne cesse de croître. La compréhension des mécanismes d'agrégation de la protéine Tau, ainsi que de ses mécanismes de toxicité sont essentiels afin de permettre l'établissement de nouveaux diagnostics précoces et traitements curatifs efficaces.

Depuis sa première identification dans des agrégats pathologiques en 1985, les recherches sur la protéine Tau ont permis d'identifier des mécanismes communs aux tauopathies, notamment son désassemblage des microtubules, son accumulation et son agrégation insoluble. Cependant, de nombreuses questions demeurent quant aux mécanismes qui conduisent à cette agrégation. En effet, le repliement de Tau dans ces agrégats, qui varie en fonction des différentes pathologies, est à la fois polymorphe et polydisperse, soulevant des interrogations sur l'origine d'une spécificité dans ce repliement. La colocalisation de certaines biomolécules, telles que des ARN ou des lipides, à proximité ou au sein des agrégats de Tau, ainsi que leur identification en tant que partenaires d'interaction dans les cellules et inducteurs de la fibrillation *in vitro* (notamment avec l'héparine, en plus des ARN et des lipides), soulève la question de l'existence de cofacteurs similaires *in vivo* capables d'influencer l'agrégation de la protéine.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de thèse ont conduit à la caractérisation de fibres amyloïdes polymorphiques de Tau, obtenues en présence de molécules anioniques de nature variée, en particulier avec héparine, ARN sous la forme d'homopolymères polynucléotidiques, ou de phosphatidylsérine. Les résultats d'agrégation indiquent un mécanisme plus complexe que la seule interaction électrostatique entre Tau et ces molécules, avec des différences d'agrégation même entre des cofacteurs de même nature, notamment entre les ARN. La caractérisation des fibres révèle des épaisseurs variables, cohérentes avec l'hypothèse d'une intégration des cofacteurs dans la structure des fibres. Cette intégration dans les fibres perturbe l'émission de fluorescence de la Thioflavine T, usuellement utilisée pour identifier les fibres amyloïdes. Nos travaux démontrent que cette fixation est différente en fonction du cofacteur. Nous avons pu révéler la présence des fibres en utilisant des méthodes d'imagerie par microscopie à force atomique (AFM) et microscopie électronique à transmission (TEM). Des études de nos collaborateurs ont permis d'identifier les cofacteurs au sein de la structure de la fibre par imagerie TERS.

L'intégration de cofacteurs dans les fibres amyloïdes a suscité des interrogations quant à l'impact de Tau sur les membranes. Ces dernières, principalement composées de phospholipides, pourraient être perturbées par l'interaction avec Tau, qui serait capable d'extraire les phospholipides anioniques, tels que les phosphatidylsérines. Outre leur rôle potentiel de centre de nucléation pour l'agrégation de Tau, ces phospholipides anioniques pourraient être impliqués dans des fonctions physiologiques, comme la

Conclusion

différenciation neuronale, mais aussi dans des processus pathologiques, tels que la sécrétion et la transmission d'espèces pathologiques de Tau. Par ailleurs, les études utilisant des modèles de membranes lipidiques dans la littérature ont révélé plusieurs mécanismes de perturbation membranaire, variant en fonction des modèles, des lipides et des fragments de Tau employés.

Dans ce projet de thèse, des modèles membranaires simplifiés ont été sélectionnés, ainsi que l'une des isoformes les plus longues de Tau et son mutant pathogène, afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction selon les différentes organisations membranaires. Deux types de membranes lipidiques ont été utilisés : des bicouches supportées de phosphatidylsérine anioniques et des bicouches zwitterioniques de phosphatidylcholine. Pour étudier ces interactions, un ensemble de méthodes biophysiques, incluant principalement l'ATR-FTIR et l'AFM, a été mis en œuvre.

Les résultats obtenus avec les membranes anioniques montrent une perturbation de la bicouche sans déplétion lipidique majeure, causée par une accumulation irréversible de Tau à la surface des bicouches de phosphatidylsérine, avec une constante d'affinité apparente de l'ordre des centaines de nanomolaires. Au contact de la membrane, Tau adopte une structuration partiellement enrichie en feuillettes- β , suggérant une amorce de fibrillation amyloïde. La formation de structures fibrillaires à l'échelle nanométrique semblables aux fibres amyloïdes a été observée, témoignant du potentiel de la bicouche de phosphatidylsérine à servir de surface de nucléation pour la fibrillation de Tau.

À l'inverse, Tau présente un effet distinct sur les bicouches zwitterioniques, suggérant un mécanisme de type détergent. Sur les bicouches fluides de PC (POPC, DOPC), Tau induit des défauts nanométriques et une déplétion lipidique marquée. Ce phénomène de solubilisation ne se manifeste pas dans des bicouches rigides (DPPC), où Tau s'accumule sans structuration en feuillettes- β , dans une conformation proche de son état natif. L'ajout de cholestérol à des concentrations physiologiques (30 %) dans les bicouches de DPPC modifie leur organisation membranaire, les rendant plus sensibles à l'action de Tau. Cet effet de solubilisation, sensible à la fluidité membranaire, évoque un mécanisme de type « *carpet-like detergent* », similaire à celui des peptides antimicrobiens ou d'autres amyloïdes.

Ces résultats suggèrent que Tau possède des mécanismes d'interaction différenciés selon l'organisation membranaire, avec des implications pathologiques potentielles, non seulement pour la formation de fibres amyloïdes dans les tauopathies, mais aussi pour des processus de sécrétion, d'internalisation ou d'éventuels effets cytotoxiques. Bien que ce projet de thèse apporte un éclairage sur les mécanismes pathogènes de Tau, il est important de souligner la nature *in vitro* des échantillons et modèles, qui ne reflètent pas entièrement la complexité des membranes et des processus cellulaires. Des perspectives de recherche sont envisageables pour complexifier les modèles et approfondir la compréhension des interactions entre Tau, ses cofacteurs, et les membranes.

Perspectives

Plusieurs perspectives s'ouvrent à la suite de ce projet de thèse. Concernant l'agrégation de la protéine Tau, nos résultats suggèrent des différences morphologiques, avec des fibres de tailles variées en fonction du cofacteur utilisé, mais des études plus approfondies seraient nécessaires pour confirmer ces observations. Cette caractérisation pourrait être enrichie par des techniques de détermination de structure, comme la cryoEM. À ce jour, aucune étude structurale n'a exploré la fibrillation de Tau en présence de phospholipides anioniques, contrairement aux fibres obtenues *in vivo* en 2017 (Fitzpatrick et al., 2017), avec l'héparine en 2019 (Zhang et al., 2019), ou avec l'ARN en 2022 (Abskharon et al., 2022). L'identification des phospholipides à l'intérieur des fibres Tau-PS pourrait être affinée par des techniques de spectroscopie Raman (TERS), comme pour les fibres Tau-héparine et Tau-polyA, ou par spectroscopie infrarouge (AFM-IR ou NanoIR).

Les interactions entre Tau et les membranes lipidiques pourraient également être approfondies par l'utilisation de modèles membranaires plus complexes. Ces modèles intégreraient des compositions lipidiques plus diversifiées, par exemple avec des lipides capables de former des domaines (rafts) tels que la sphingomyéline, les gangliosides GM1, ou d'autres phospholipides anioniques comme le PIP2. Des membranes intégrant également d'autres biomolécules constitutives, telles que des sucres ou des protéines, offriraient une complexité accrue et une vision plus globale. Dans notre étude, nous avons opté pour des modèles membranaires simplifiés afin d'identifier des mécanismes spécifiques, mais une approche plus complexe permettrait une meilleure extrapolation vers des systèmes biologiques réels.

Ensuite, une question demeure quant au devenir des lipides PC après leur solubilisation en présence de Tau sur des bicouches fluides de PC. On pourrait s'attendre à une resolubilisation sous forme de micelles, mais il reste à déterminer si ces lipides demeurent attachés à la protéine ou sous quelle forme ils se présentent. Leur petite taille, leur faible quantité, et leur éventuelle hétérogénéité compliquent leur détection.

Enfin, plusieurs méthodes complémentaires, initiées de manière exploratoire dans cette thèse, pourraient être développées pour affiner notre compréhension du mécanisme d'interaction entre Tau et les lipides au sein des membranes. Dans ce projet, l'AFM a été employée en mode imagerie pour visualiser en temps réel et à l'échelle nanométrique l'impact de Tau sur les bicouches. Toutefois, l'AFM peut également permettre la mesure de forces d'interaction entre la pointe et la surface, par spectroscopie de force.

Une approche pourrait consister à fonctionnaliser la pointe AFM avec Tau, afin de sonder directement la force d'interaction entre la protéine et les lipides à la surface de la bicouche. Initialement, cela permettrait de comparer les forces d'interaction entre Tau et des lipides anioniques de type PS, par rapport aux interactions entre Tau et des lipides zwitterioniques de type PC, sur des bicouches constituées uniquement de PS ou de PC. Cette approche pourrait aider à distinguer les deux mécanismes observés : l'un reposant principalement sur des interactions électrostatiques avec PS, l'autre sur des interactions hydrophobes avec PC. Une fois cette comparaison réalisée, il serait pertinent d'explorer des bicouches mixtes présentant des séparations de phase

Perspectives

(par exemple, DOPS/DPPC) pour bien identifier les domaines majoritairement anioniques ou zwitterioniques, puis de tester des bicouches où PS et PC seraient homogénéisés, en phase fluide ou rigide. Une complexification progressive pourrait intégrer les composants majeurs identifiés comme capables d'interagir avec Tau dans la membrane plasmique (PIP2, protéines, protéoglycanes de type héparane sulfate). Toutefois, ces expériences de spectroscopie de force poseraient des défis en termes d'immobilisation efficace de la protéine Tau (son isoforme 2N4R ou un fragment plus court).



MATERIEL & METHODES

Table des matières

Production et purification de la protéine Tau	189
Préparation des ARN	190
Tests d'agrégation à la Thioflavine T	190
Microscopie électronique à transmission	190
Microscopie à force atomique (AFM)	191
Préparation des liposomes	192
Expérience de fuite de liposomes	194
Interaction Tau-POPS par PWR	197
Interaction Tau-bicouches lipidiques par ATR-FTIR	201



Matériel & Méthodes

1. Production et purification de la protéine Tau

L'expression de la protéine est réalisée dans des cellules d'*Escherichia coli* BL21 (DE3) transformées avec les plasmides pet28 contenant soit le gène codant pour Tau(2N4R)-WT, soit celui codant pour Tau(2N4R)-P301L, tous les deux tagués au niveau du N-terminal avec un tag poly-histidine.

Les cellules sont inoculées dans 1 L de milieu LB avec une supplémentation de kanamycine à 50 µg/mL. Les cultures sont maintenues à 37°C avec agitation à 200 rpm jusqu'à ce qu'elles atteignent une densité optique (OD) à 600 nm entre 0,6 et 0,8. L'expression de la protéine est induite en ajoutant 1 mM d'isopropylβ-D-488 thiogalactoside (IPTG, Sigma Aldrich), suivi d'une incubation supplémentaire à 37°C et 200 rpm pendant 3 heures.

Les cellules sont isolées par centrifugation à 5000 g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots cellulaires sont resuspendus dans un tampon de lyse (50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole, 0,5 mM de DTT, 0,1 mM d'EDTA), complété avec 1 mM de PMSF, 20 µg/ml de DNase, 10 mM de MgCl₂, et 1 comprimé inhibiteur de protéase Pierce (Thermo Fisher EDTA-Free, Sigma 88266), puis stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

La lyse cellulaire est initiée par l'ajout de lysozyme (2 mg/ml), et la suspension cellulaire est agitée sur une plate-forme orbitale à température ambiante pendant 30 minutes. Pour rompre les cellules, un cycle de congélation-décongélation est répété trois fois en utilisant de l'azote liquide. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est chauffé à 90°C pendant 12 minutes, suivi d'un refroidissement sur glace pendant 20 minutes avant une autre centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les protéines précipitées. Le surnageant, contenant la protéine Tau, est chargé sur une colonne d'agarose Ni-NTA de 5 ml pré-équilibrée avec un tampon A (20 mM de phosphate de sodium pH 7,0, 500 mM de NaCl, 10 mM d'imidazole, 100 µM d'EDTA). La colonne est lavée successivement avec 10 volumes de colonne (CV) de tampon A, 8 CV de tampon B (20 mM de phosphate de sodium pH 7,0, 1 M de NaCl, 20 mM d'imidazole, 100 µM d'EDTA), et 2 CV de tampon A avant l'élution avec 8 CV de tampon C (20 mM de phosphate de sodium pH 7,0, 500 mM d'imidazole, 0,5 mM de DTT, 100 mM de NaCl). La progression de l'élution est suivie par mesure d'absorbance à 280 nm et par SDS-PAGE.

Les fractions correspondant aux pics d'absorbance sont combinées et concentrées à travers des filtres (MWCO 10 kDa, Sigma) pour une chromatographie d'exclusion par la taille sur une colonne Superdex 200 pg HiLoad 16-600 équilibrée avec un tampon final (20 mM de HEPES pH 7,0, 100 mM de NaCl).

Les fractions contenant la protéine purifiée sont ensuite concentrées, et la concentration finale en protéine est déterminée par absorption UV-visible à 274 nm, en utilisant un coefficient d'extinction de 7500 M⁻¹.cm⁻¹. Les protéines sont aliquotées en fractions de 100 µL et stockées à -20°C pour une utilisation future.

2. Préparation des ARN

Les ARN (homopolynucléotides) utilisés sont des séquences polymorphiques de longueur variable, variant selon les ARN et les lots, entre une centaine et plusieurs milliers de nucléotides. Les ARN employés dans nos études incluent l'acide adénylique ou polyA (Sigma-Aldrich, P9403), l'acide polyuridylique ou polyU (Sigma-Aldrich, P9528), l'acide polyguanylique ou polyG (Sigma-Aldrich, P4404), l'acide polycytidylique ou polyC (Sigma-Aldrich, P4903) et un ARN double brin composé d'acide polycytidylique et d'acide inosinique (PolyI-PolyC) (Sigma-Aldrich, I3036).

Ces ARN sont reçus sous forme lyophilisée et, pour les expériences, ils sont resuspendus dans de l'eau milliQ dans un environnement sans RNase, puis aliquotés dans des tubes RNase-free à une concentration de 10 mg/ml et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les aliquots décongelés et ouverts sont systématiquement jetés à la fin de l'expérimentation afin d'éviter toute dégradation.

3. Tests d'agrégation à la Thioflavine T

Les tests d'agrégation à la Thioflavine T (ThT) sont réalisés dans des plaques 384 puits (Corning® 384 well microplate, low volume, Merck CLS3821) dans un volume total de 20 μl . Les protéines (Tau-WT ou Tau-P301L) sont ajoutées à une concentration finale de 20 μM , en présence de 20 μM de ThT (Sigma-Aldrich, T3516) dans un tampon 20 mM HEPES pH7, 5 mM DTT, avec ou sans NaCl en fonction des expériences (la concentration de NaCl est précisée lors de la description des résultats). L'agrégation est initiée par l'addition des cofacteurs, qui peut être réalisée avec 5 μM d'héparine, des ARN sous forme d'homopolynucléotides (dont plusieurs concentrations sont testées et précisées dans les résultats), ou des petits liposomes unilamellaires (SUVs) de POPS ou de DOPS (dont les concentrations sont également variables et précisées lors de la description des résultats). Les cofacteurs sont ajoutés en dernier dans les puits avant que la fluorescence soit mesurée pour ne pas lancer l'agrégation trop tôt, et ainsi manquer les premiers points de la cinétique.

Les mesures de fluorescence sont effectuées à l'aide d'un lecteur de plaques TECAN Infinite M1000 pro, avec une longueur d'onde d'excitation de 450 nm, et l'émission de fluorescence est mesurée à 485 nm. Pendant toute la durée de l'expérience (entre 40 et 70 heures), la plaque est maintenue à 37°C sous agitation (30 secondes d'agitation avant chaque mesure), avec des points de mesure pris toutes les 10 minutes. Le gain et l'optimisation de la hauteur de lecture sont ajustés pour chaque expérience afin d'éviter toute saturation.

4. Microscopie électronique à transmission

Pour les observations en microscopie électronique à transmission, les échantillons sont déposés sur des grilles de cuivre maillées à 300 mesh recouvertes d'un film de carbone (Sigma 931519), préalablement traitées par décharge UV. Un volume de 4 μl est déposé sur la grille, incubé pendant 5 minutes avant d'être séché, puis coloré avec de l'acétate d'uranyle à 1% (4 μl) pendant 2 minutes avant d'être à nouveau séché.

L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope électronique Philips CM120 à 80 kV (plateforme de microscopie électronique du CBMN, Bordeaux). Les images sont collectées à l'aide d'une caméra CCD Gatan $2\text{K} \times 2\text{K}$.

5. Microscopie à force atomique (AFM)

5.1. Principe général

La microscopie à force atomique (AFM) est une méthode d'imagerie à haute résolution permettant de visualiser la surface d'échantillons nanométriques, en milieu liquide et sur des durées variant de quelques secondes à plusieurs heures (Hammond et al., 2021). Elle repose sur l'utilisation d'une pointe nanométrique montée sur un levier flexible, qui scanne la surface de l'échantillon (**Figure S-1**). La déflexion du levier au contact de l'échantillon est mesurée à l'aide d'un laser réfléchi sur la surface du levier vers une photodiode. La déflexion de la pointe en fonction des coordonnées x et y de l'échantillon permet de générer une image topographique de celui-ci.

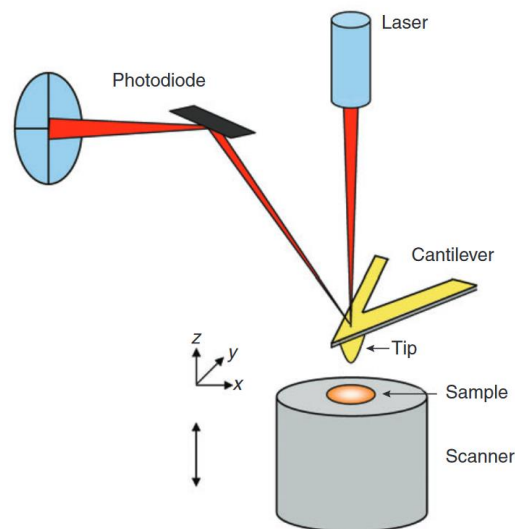


Figure S-1. Schéma du fonctionnement général de la microscopie à force atomique (AFM). Une pointe nanométrique montée sur un levier flexible scanne la surface d'un échantillon. La déflexion de la pointe est détectée par la déviation d'un laser réfléchi sur le levier vers une photodiode, permettant ainsi de reconstruire une image topographique de l'échantillon. Issu de (Hinterdorfer and Dufrêne, 2006).

5.2. Paramètres expérimentaux

L'imagerie AFM est réalisée sur un AFM Dimension FastScan (Bruker) en mode PeakForce Quantitative Nano-Mechanics (PF-QNM) en milieu liquide à température ambiante ($\sim 20^\circ\text{C}$). Les pointes utilisées sont des SNL-C (Bruker, pointes en silicium sur des leviers en nitrure de silicium) et ont été calibrées individuellement pour chaque expérience, avec une constante de raideur nominale de $0,24\text{ N/m}$, une fréquence de résonance de 56 kHz et un rayon de pointe variant de 2 à 12 nm .

Les échantillons sont imagés avec une vitesse de balayage de $0,8$ à 1 Hz , une résolution de 256×256 pixels et une force constante comprise entre $0,5\text{ nN}$ (pour les bicouches en particulier) et $0,8\text{ nN}$ (pour les fibres, plus résistantes).

Toutes les expériences d'AFM sont réalisées dans un tampon 20 mM HEPES pH7 , 100 mM NaCl , même pour les échantillons qui se trouvaient dans un tampon différent (notamment les échantillons d'agrégation sans NaCl), le sel facilitant leur imagerie.

Les images sont traitées à l'aide du logiciel Gwyddion, où les données sont d'abord remises à niveau en soustrayant le plan moyen, puis les lignes sont alignées par la méthode de la médiane des différences. Pour la majorité des images, le point minimal est fixé à 0, et l'échelle de couleur est ajustée de manière à placer le mica au niveau 0 (lorsque cela est possible, notamment en présence de défauts sur la bicouche).

5.3. Caractérisation des fibres par AFM

Pour la caractérisation des fibres, un volume de 5 μl d'un échantillon d'agrégation est déposé sur du mica fraîchement clivé et incubé dans une chambre humide pendant 15 minutes. Le mica est ensuite rincé très délicatement au moins 5 fois à l'aide de 100 μl de tampon 20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl.

Les fibres sont ensuite imagées et leur épaisseur est déterminée à partir des hauteurs maximales sur des profils perpendiculaires à l'axe des fibres. Le nombre de profils, d'images et d'échantillons analysés est précisé dans les résultats.

Pour la comparaison des épaisseurs en fonction du cofacteur, la normalité des distributions des épaisseurs pour chaque condition n'étant pas respectée, les différences de taille sont évaluées à l'aide des tests statistiques de Mann-Whitney U, réalisés avec Python. Les seuils de significativité sont précisés dans les résultats.

5.4. Interaction Tau-bicouches lipidiques par AFM

Les bicouches supportées (SLB) sont préparées par dépôt d'une solution de SUVs à 1 mg/ml sur du mica fraîchement clivé, puis incubé à 60°C dans une chambre humide. Pour les bicouches de phosphatidylsérine (DOPS et POPS), 1 mM de CaCl_2 est ajouté dans la solution de SUVs juste avant dépôt pour assurer la fusion. Pendant l'incubation à 60°C, du tampon (20 mM HEPES pH7, 100 mM NaCl) est ajouté sur la bicouche toutes les 15 minutes pour éviter le séchage. Après incubation la bicouche est refroidie à température ambiante pendant 30 minutes, puis rincé plusieurs fois (~10 fois) avec du tampon avant l'observation dans un volume totale de 100 μL .

Pour garantir la stabilité des SLB, une même zone est d'abord imagée entre 1 et 3 heures avant d'injecter la protéine à la concentration désirée, directement à l'intérieur du volume expérimental. Les images sont enregistrées immédiatement après l'injection de la Tau et toutes les 3-5 minutes jusqu'à ce que le système se stabilise, généralement dans un délai de 1 à 2 heures. Les concentrations utilisées pour les expériences sont précisées dans les résultats.

6. Préparation des liposomes

Dans nos études, deux types de liposomes sont utilisés, les petites vésicules unilamellaires (SUVs, small unilamellar vesicles) et les grandes vésicules unilamellaires (LUVs, large unilamellar vesicles).

6.1. Films lipidiques

Plusieurs lipides ont été utilisés : le **POPS** (1-Palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phospho-L-sérine, 16:0, 18:1, Avanti polar lipids 840034) ; le **DOPS** (1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phospho-L-sérine, 18:1 Δ^9 -cis, Avanti polar lipids 840035) ; le **POPC** (1-palmitoyl-2-oléoyl-glycero-3-phosphocholine, 16:0, 18:1, Avanti polar lipids 840035).

lipids 850457C) ; le **DOPC** (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 18:1 Δ^9 -cis, Avanti polar lipids 850375) ; le **DPPC** (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 16:0, Avanti polar lipids 850355) ; et le **cholestérol** (Avanti polar lipids 700100).

La première étape afin de former des liposomes consiste à former des films lipidiques. Pour cela, les lipides sous forme de poudre sont resuspendus dans du chloroforme à la concentration souhaitée, puis un volume des solutions stocks lipidiques est prélevé et ajouté dans un tube eppendorf 2 ml. Pour les mélanges lipidiques, une proportion molaire est conservée afin d'obtenir les ratios désirés. Les solutions sont ensuite séchées à l'aide d'un flux d'azote, tout en tournant le tube eppendorf, afin de créer un film mince et homogène sur la paroi interne du tube, puis placée dans un dessiccateur sous vide pendant la nuit pour éliminer toute trace résiduelle de chloroforme. Les films ainsi obtenus peuvent être conservés plusieurs semaines à -20°C , pour une utilisation future.

6.2. Formation des liposomes

6.2.1. Les SUVs (petits liposomes unilamellaires)

Pour toutes les expériences, sauf la fuite de calcéine, les films lipidiques sont ensuite resolubilisés avant utilisation à 2 mg/ml dans un tampon 20 mM HEPES pH7, avec 100 mM NaCl ou sans sel. Cette étape permet de former des vésicules multilamellaires (MLVs, *multilamellar vesicles*) hétérogènes. Pour favoriser l'homogénéisation des mélanges lipidiques (notamment ceux contenant du DPPC, qui présente une température de fusion de 41°C (Koynova and Tenchov, 2013)), une étape de chauffage à 60°C sous agitation est réalisée. Les SUVs sont obtenues par sonication, réalisée à l'aide d'une canne à ultrason plongée dans la suspension de MLV, avec au moins 3 cycles de 10 minutes et des pulses de 3 secondes à 40% de la puissance, jusqu'à obtention d'une solution transparente non turbide.

6.2.2. Les LUVs (grand liposomes unilamellaires)

Pour les expériences de fuite de calcéine, les liposomes utilisés sont des LUVs d'une taille homogène de maximum 200 nm de diamètre. Pour former des LUVs, les films lipidiques de POPC ou de POPS sont resuspendus dans un tampon 20 mM HEPES pH7, avec 70 mM de calcéine, à une concentration finale de 2 mg/ml. La suspension est chauffée à 60°C sous agitation pendant 30 minutes avant de subir cinq cycles de congélation/décongélation par une alternance de bains d'azote liquide suivis de passage au thermocycleur à une température de 50°C pour homogénéiser les vésicules en solution. Les suspensions lipidiques sont ensuite extrudées 21 fois à travers une membrane de 200 nm à l'aide d'un kit d'extrusion Avanti Polar Lipids. Cette étape permet la formation de LUVs avec des tailles homogènes de maximum 200 nm.

6.3. Dosage du phosphore inorganique

Afin de mesurer la quantité de lipides présents, les solutions de vésicules lipidiques (SUV et LUV) sont dosées à l'aide d'un protocole de dosage colorimétrique du phosphore (Itaya and Ui, 1966; Rouser et al., 1970).

Dans un premier temps, une gamme étalon de phosphates à 7 concentrations différentes est réalisée, correspondant à 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 nmoles de phosphate de monopotassium (KH_2PO_4). Un volume des solutions de vésicules lipidiques à doser permettant d'avoir une concentration comprise dans la gamme

(environ 50 nmoles) est prélevé puis ajouté dans des tubes en borosilicate indépendants en triplicats. Les solutions de la gamme étalons sont également ajoutées dans des tubes indépendants, avant d'être tous séchés dans un bloc de chaleur chauffé à 180°C pendant 10-30 minutes. Après refroidissement, 300 µl d'acide perchlorique est ajouté dans chaque tube qui sont ensuite vortexés fortement, une bille placée en haut de chaque tube pour en fermer l'ouverture. Les tubes bouchés sont placés 30 minutes dans le bloc chauffant à 180°C. Les tubes sont ensuite sortis, refroidis, et les solutions permettant de déclencher la réaction colorimétrique sont ajoutés dans l'ordre suivant, avec agitation vigoureuse après chaque ajout : 1,4 ml d'eau miliQ, 200 µl de molybdate d'ammonium à 2,5%, 200 µl de vitamine C à 10% (fraichement préparée). Les tubes sont immédiatement placés au bain marie pendant exactement 5 minutes, avant d'être refroidis dans la glace après changement de couleur. L'absorbance de chaque tube est ensuite mesurée à 797 nm.

Pour déterminer la relation entre la concentration en phosphate et l'absorbance, une courbe des absorbances de la gamme étalon en fonction de chaque concentration est tracée (**Figure S-2**). Les points sont ajustés selon une relation linéaire, permettant de déduire la concentration en phosphate des solutions lipidiques.

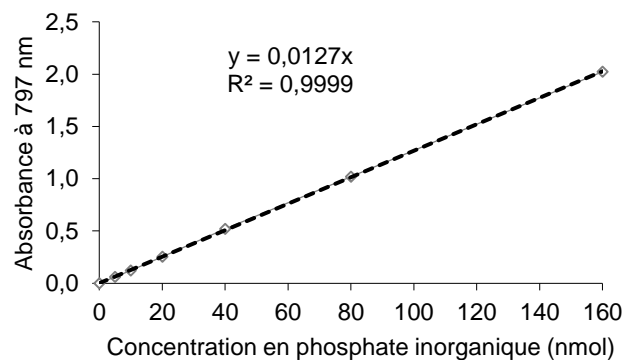


Figure S-2. Droite d'étalonnage d'un dosage du phosphate inorganique, représentant l'absorbance à 797 nm en fonction de la concentration en phosphate inorganique (dosage Rouser).

7. Expérience de fuite de liposomes

7.1. Principe général

Les expériences de fuite de liposomes permettent de détecter l'existence d'une interaction entre une molécule d'intérêt, comme une protéine, et des vésicules lipidiques. Ces liposomes bilamellaires possèdent une cavité interne aqueuse qui permet l'encapsulation de molécules hydrophiles, telles que des fluorophores (Dutta et al., 2020). La calcéine est la plus couramment utilisée, sa taille lui permettant de détecter des perturbations de la bicouche (Elenbaas et al., 2023).

Dans ces expériences, la calcéine est encapsulée à forte concentration dans des LUVs, et sa fluorescence est *quenchée* (**Figure S-3A**). Lorsqu'une molécule interagit avec les liposomes, elle induit une fuite de la calcéine à travers la bicouche. La calcéine est donc diluée et émet une fluorescence à 530 nm. L'émission de cette fluorescence est enregistrée avant addition, au cours du temps après addition de la molécule, et après addition d'un puissant détergent, le Triton, qui induit une fuite maximale à 100% (**Figure S-3B**). C'est à partir de ce 100% que le pourcentage de calcéine libérée après addition de la protéine est déterminé.

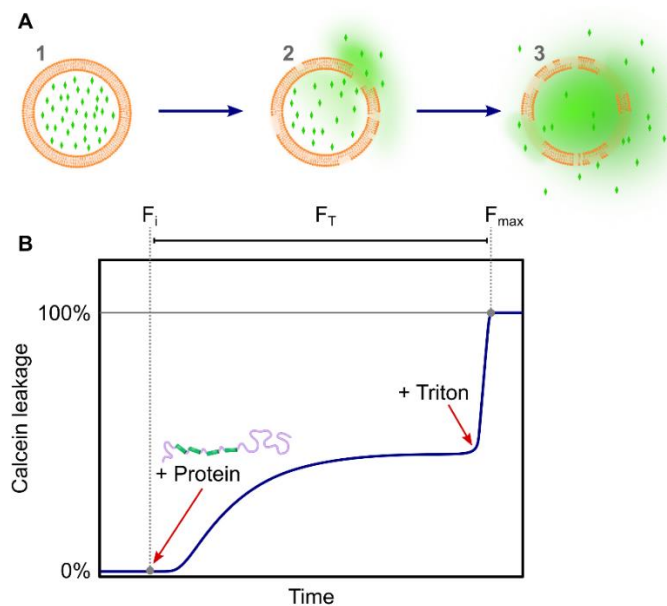


Figure S-3. Schéma d'une expérience de fuite de la calcéine. La calcéine est encapsulée à haute concentration dans des liposomes (A1) qui entraîne l'inhibition de son émission de fluorescence (quenching). Lorsqu'une molécule comme une protéine interagit avec sa bicouche (A2), elle peut perturber cette dernière entraînant une fuite de calcéine qui une fois diluée, émet de la fluorescence à 530 nm. Cette émission de fluorescence est mesurée au cours du temps (B) et la fluorescence initiale avant addition de protéine (F_i) et finale après ajout de Triton, un détergent puissant (F_{max}) servent à normaliser les valeurs de fluorescence (F_T).

Les étapes préalables à l'expérience de fuite de calcéine se déroulent comme suit : préparation du film lipidique, suspension sous forme de vésicules multilamellaires dans le tampon contenant le fluorophore, cycles de congélation / décongélation permettant l'homogénéisation des lipides au sein des liposomes, extrusion à travers une membrane en polycarbonate de 200 nm pour l'obtention des LUV de taille homogène, puis purification des vésicules par chromatographie d'exclusion par la taille, dosage des fractions par méthode de détection des phosphates (Itaya and Ui, 1966; Rouser et al., 1970). Les expériences de fuite de calcéine en présence de la molécule d'intérêt (protéine) peuvent alors être menées.

7.2. Préparation du tampon contenant la calcéine

La calcéine est dissoute à une concentration finale de 70 mM dans le tampon d'expérimentation, à savoir 20 mM HEPES pH7. Cette étape est critique, la calcéine n'étant soluble que dans une certaine gamme de pH, et le respect de l'osmolalité étant nécessaire pour éviter toute perturbation des liposomes pendant l'étape de purification sur colonne.

Pour cela, la calcéine est pesée (218 mg à 622,55 g/mol pour préparer 5 ml de solution) puis resuspendue dans une partie du volume de tampon concentré (2 ml dans un tampon 50 mM HEPES pH7) avant d'être vortexée vigoureusement plusieurs minutes. La solution est orange et très opaque. Pour solubiliser la calcéine, de la soude (2M NaOH) est ajoutée progressivement (par addition successive de 50-100 μ l) et la solution vortexée plusieurs minutes entre chaque addition. La calcéine est solubilisée lorsque la solution devient rouge et transparente, sans dépôt. De l'eau est ensuite ajoutée jusqu'à atteindre le volume final. La concentration de soude ajoutée est notée et permet d'affiner la concentration en sels utilisés pendant l'élution, afin de respecter l'osmolalité des solutions.

7.3. Purification des liposomes

Les liposomes contenant de la calcéine sont purifiés par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Sephadex G-75, préparée avec 3,5 g de résine (Sigma, G751220) pour 300 mL de tampon HEPES 25 mM pH 7,4, et KCl 150 mM. La préparation est laissée à température ambiante pendant 30 minutes pour permettre l'hydratation de la résine, puis les bulles sont éliminées en plaçant la solution dans un dessiccateur pendant 2 heures. La suspension est ensuite versée dans la colonne (préalablement obturée avec du coton) et les billes de résine sont laissées sédimenter lentement afin de former un lit compact. Un volume de tampon dépassant de 1 cm le niveau de la résine est systématiquement maintenu afin d'éviter que la colonne ne se dessèche.

Après extrusion, la solution de LUVs contenant la calcéine contient un mélange de liposomes encapsulant la calcéine, de liposomes sans calcéine, et de calcéine libre. Afin de ne récupérer que les vésicules contenant le fluorophore, la solution est placée sur une résine de chromatographie d'exclusion préalablement équilibrée avec le tampon. Après incorporation totale au sein de la résine, la colonne est mise sous pression avec un flux de tampon lent mais continu, pour permettre la sortie des différentes fractions du mélange. Après quelques minutes, les différentes fractions se séparent et sont visiblement dissociées. La partie jaune claire séparée du reste par une partie incolore contient alors les liposomes encapsulant la calcéine. Celle-ci est récupérée dans plusieurs tubes avant d'être testée.

Pour tester les différentes fractions, celles-ci sont diluées au 1/100e dans des plaques 96 puits soit dans le tampon d'élution, soit dans du triton 0.5% qui entraînera la destruction totale des liposomes, et donc une intensité de fluorescence maximale. L'intensité de fluorescence est mesurée à l'aide du lecteur de plaque TECAN Infinite M1000 pro avec excitation à 485 nm et longueur d'émission à 530 nm. Le ratio des intensités de fluorescence des fractions avec triton par rapport au contrôle doit être suffisant, typiquement au-dessus de 10. Les fractions avec les intensités et les ratios les plus élevés sont regroupées avant d'être dosées par méthode de détection des phosphates (Itaya and Ui, 1966; Rouser et al., 1970). Pour indication, la perte de lipides par rapport à la concentration initiale est d'environ 85 % après les étapes d'encapsulation de calcéine et de purification par chromatographie.

7.4. Mesure de fuite de calcéine

Les mesures de fluorescence ont été effectuées à 25°C avec un lecteur de plaques TECAN Infinite M1000 pro, utilisant une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et détectant l'émission de fluorescence à 530 nm. Des liposomes ont été ajoutés à une concentration de 10 µM dans des puits en triplicata d'une plaque de 96 puits (Microfluor1), et la fluorescence initiale (F0) pour chaque puits a été enregistrée. Ensuite, des concentrations croissantes de Tau-P301L (0,01 µM, 0,1 µM, 0,2 µM, 0,5 µM, 1 µM et 5 µM) ont été ajoutées avec des volumes fixes (volume total de 100 µl), et la fluorescence a été surveillée dans le temps (FT). Après 14 heures, 10 µl de Triton X-100 (Sigma) ont été ajoutés pour obtenir une fuite complète des liposomes (Fmax). Le pourcentage de calcéine libéré (Lt %) a été calculé en utilisant l'équation suivante : $Lt \% = [(FT - F0) / (Fmax - F0)] \times 100$. La moyenne et l'écart-type ont été calculés à partir de 3 expériences indépendantes, et de 3 réplicats par expériences.

8. Interaction Tau-POPS par PWR

8.1. Principe général

La technique de résonance plasmonique de surface par ondes guidées (PWR, *plasmons waveguide resonance*) est une technique similaire à la technique de résonance plasmonique de surface (SPR), qui permet de détecter des changements de masse à proximité d'une surface en fonction de l'anisotropie du système. La PWR permet de déterminer la constante d'affinité apparente de l'interaction entre une protéine et une bicouche lipidique. Elle peut informer sur la présence de dommages membranaires, suite à une diminution de masse à proximité de la surface, mais aussi d'accumulations, d'insertions éventuelles, de formations de microdomaines, et même nous donner des informations cinétiques sur les interactions (Harté et al., 2014; Rascol et al., 2021).

Dans une expérience de PWR, une lumière incidente polarisée est dirigée vers un capteur, puis réfléchi vers un détecteur, dont un schéma est présenté (**Figure S-4**). Ce capteur est spécifique à la PWR et permet l'apparition de plusieurs phénomènes physiques en fonction de l'angle d'incidence de la lumière polarisée, qui peuvent être influencés par les échantillons biologiques à proximité. Pour faire varier l'angle d'incidence, le capteur et l'échantillon sont placés sur une platine tournante, permettant de mesurer la lumière réfléchi à plusieurs angles. Le capteur utilisé dans ces expériences est composé de plusieurs éléments essentiels pour les mesures de PWR : un prisme, en verre ; une couche d'argent ; une couche de silice pour permettre la propagation d'ondes guidées. La membrane est formée au contact dans une cellule en téflon par fusion de SUVs.

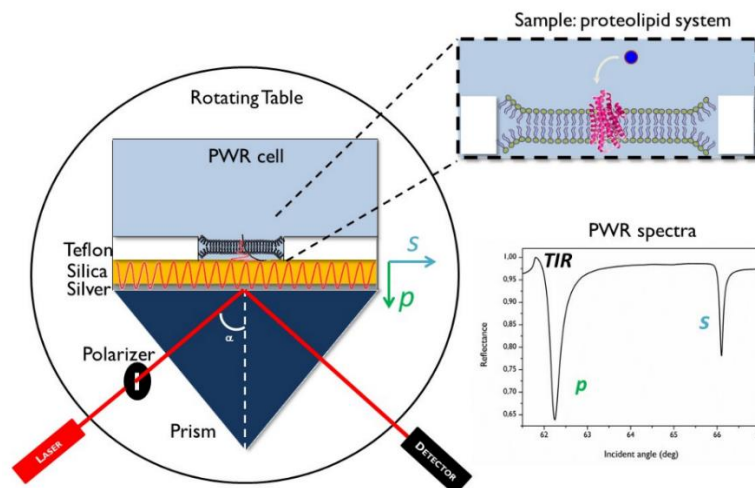


Figure S-4. Schéma du montage expérimental PWR. Le prisme et l'échantillon sont placés sur une table rotative, permettant de balayer une gamme d'angles d'incidence pour une lumière laser polarisée. À des angles spécifiques, des ondes évanescentes sont générées à l'interface d'une fine couche d'argent, se propageant sous forme d'ondes guidées dans la couche de silice. Ces phénomènes entraînent une réduction de la réflexion de la lumière, visible sous forme de pics négatifs dans le spectre pour les polarisations p- et s- (respectivement en vert et en bleu dans le spectre PWR). Issu de Rascol et al. (Rascol et al., 2021).

Au cours de l'expérience, la platine fait pivoter le capteur pour balayer les angles d'incidence. La lumière incidente traverse le prisme, et lorsque l'angle d'incidence dépasse l'angle critique à l'interface avec la couche d'argent, elle subit une réflexion totale interne. À certains angles d'incidence, la lumière polarisée crée une

onde évanescente à l'interface prisme / argent, qui est confinée à l'interface métal / diélectrique (ici argent / silice). En fonction de l'angle d'incidence, des résonances spécifiques des polarisations p- et s- de la lumière entraînent une diminution de la lumière réfléchi. Cette dernière est récupérée par un détecteur et permet de générer des spectres PWR correspondant aux variations de la réflectance en fonction de l'angle d'incidence. On y retrouve 3 pics caractéristiques : le pic de réflexion totale interne (TIR), et les pics de résonance p- et s-.

La résonance p- se produit à un angle d'incidence plus faible que la résonance s- et est généralement plus intense dans nos expériences. En plus de ces deux résonances, il est également possible d'observer l'angle de réflexion totale interne (TIR), qui entraîne un faible pic positif juste avant la résonance p-. Ce pic n'est pas dépendant de la distance de l'échantillon par rapport au capteur, contrairement aux résonances p- et s-, qui sont liées aux ondes évanescentes et décroissent exponentiellement avec la distance par rapport à l'interface.

En comparant les modifications des pics de résonance p- et s- à celles du TIR, il est possible de déterminer si un phénomène se produit uniquement à l'interface ou s'il est lié à des interactions dans le volume de l'échantillon. Les modifications des pics sont analysées en examinant les positions angulaires minimales des résonances, la profondeur des pics et la largeur spectrale. Ces paramètres peuvent être modifiés par les interactions moléculaires à la surface du capteur, dues à des changements de masse ou à des réorganisations moléculaires.

8.2. Paramètres expérimentaux

Le matériel utilisé dans nos expériences consiste en un laser continu polarisé He-Ne émettant dans la région visible aux longueurs d'onde 632,8 nm et 543 nm. Le prisme est constitué de verre borosilicate, avec une couche mince d'argent de 50 nm d'épaisseur recouvert d'une couche de silice de 460 nm. La plaque rotative permet de balayer les angles d'incidence avec une résolution ≤ 1 mdeg (Newport, Motion controller XPS).

Les expériences sont menées à température ambiante (~ 20 °C). Le spectre PWR du tampon sert de référence pour l'obtention d'une bicouche lipidique. Cette dernière est obtenue par introduction d'un volume de 250 μ l d'une suspension de SUVs de POPS à 2 mg/ml dans la cellule de PWR, en présence de 1 mM de CaCl_2 ajouté au dernier moment. La bicouche est obtenue après 30 minutes d'incubation de la solution de liposomes dans la cellule de PWR, avant d'être rincée 3 fois pour éliminer l'excès de lipides. La présence d'une bicouche lipidique est confirmée par un décalage des angles de résonance des pics p- et s- vers des valeurs plus élevées, en raison de l'indice de réfraction des lipides, qui est supérieur à celui du tampon qu'ils remplacent. Le spectre après stabilisation de la bicouche sert ensuite de référence pour l'impact de Tau sur cette dernière.

Afin de déterminer la constante d'affinité entre Tau-P301L et la bicouche POPS, la protéine est introduite dans la cellule de manière incrémentale avec des concentrations comprises entre 0,1 et 1 μ M. On mesure ensuite au cours du temps les modifications des caractéristiques de résonance plasmonique, qui reflètent les

interactions protéine/lipide. En particulier, le décalage de la position de l'angle de résonance a été analysé pour préciser les mécanismes d'interaction.

8.3. Traitement et analyse des données de PWR

Les données obtenues en PWR sont traitées à l'aide de scripts réalisés en Python, ainsi que par le logiciel Origin (OriginLab). Les positions des angles de résonance des pics p- et s- du tampon servent de référence pour contrôler le dépôt de la bicouche POPS. Les positions des pics p- et s- du spectre de la bicouche permettent d'observer les différences après addition de Tau-P301L aux différentes concentrations.

8.3.1. Analyse des contributions de changement de masse ou d'anisotropie

Des analyses graphiques des expériences d'interaction de Tau-P301L avec les bicouches POPS ont été réalisées afin de déterminer les contributions respectives des changements de masse ou de structure du système protéine/lipides, d'après l'analyse présentée dans une étude précédente (Salamon and Tollin, 2004).

Pour cela, les décalages angulaires des pics p- et s- après chaque addition de protéine par rapport à la bicouche seule sont représentés sur un graphique pour chaque réplicat. Les décalages du pic s- sont reportés sur l'axe des abscisses, tandis que ceux du pic p- sont sur l'axe des ordonnées.

Des axes représentant la masse et la structure (qui correspond aux changements d'anisotropie) sont tracés, avec des équations de droite spécifiques au système étudié, reflétant la sensibilité des variations des pics p- et s- en fonction des modifications mesurées. Les équations de ces droites ont été reproduites d'après l'étude de Salamon et Tollin, en utilisant un facteur de sensibilité (Sf) de 0,74. Cette valeur correspond au ratio des variations des décalages des pics p- et s- pour une même modification de l'échantillon. L'exemple fourni dans l'étude de référence de Salamon et Tollin est illustré en **Figure S-5**, qui montre la détermination des contributions de masse et de structure pour une bicouche de phosphatidylcholine (PC).

Les axes de référence sont tracés de sorte à satisfaire des équations représentant les ratios entre les décalages du pic p-, par rapport au pic s-. De plus, les changements de masse provoquant des altérations dans la même direction sur les axes s- et p- (c'est-à-dire des décalages soit positifs, soit négatifs), l'axe sera placée dans le 1^{er} ou dans le 3^{ème} quadrant du système de coordination s-p (Salamon and Tollin, 2004). Ainsi les deux axes de masse et de structure doivent satisfaire les équations suivantes :

- Axe de masse (Δm) : $\frac{\Delta S}{\Delta P} = Sf$; soit avec Sf = 0,74 : $y = 1,35x$
- Axe de structure (Δs) : $\frac{2\Delta S}{\Delta P} = Sf$; soit avec Sf = 0,74 : $y = -2,7x$

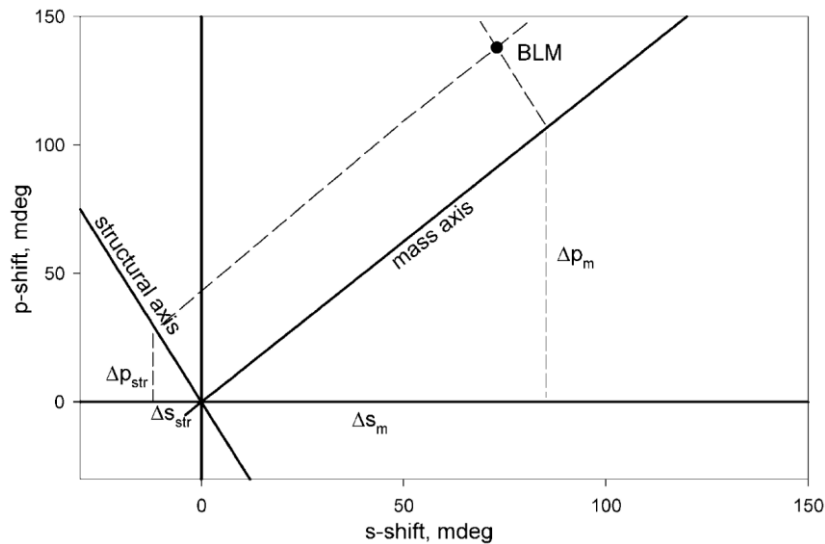


Figure S-5. Position spectrale d'une bicouche de phosphatidylcholine (point « BLM ») avec les coordonnées en décalages s (s -shift) et p (p -shift). (Δs_m) , (Δp_m) et (Δs_{str}) , (Δp_{str}) correspondent aux coordonnées respectivement en s - et en $-p$ qui décrivent les décalages liés à des changements de masse ou de structure. D'après (Salamon and Tollin, 2004).

Pour chaque point expérimental (c'est-à-dire pour chaque décalage angulaire des pics p - et s -), les intersections avec ces droites permettent de calculer deux paires de coordonnées (x, y) correspondant aux contributions de la masse et de la structure. La première paire (Δs_m) et (Δp_m) est obtenue en résolvant le système d'équations reliant l'axe de masse (Δm) au point expérimental, et représente les contributions associées à la masse. De manière similaire, la seconde paire (Δs_{str}) et (Δp_{str}) , obtenue par l'intersection avec l'axe de structure (Δs), représente les contributions liées à la structure.

Ces coordonnées sont ensuite utilisées pour calculer les contributions en termes de distance euclidienne, définie par la norme des coordonnées des intersections :

- $\Delta m = \sqrt{\Delta s_m^2 + \Delta p_m^2}$
- $\Delta s = \sqrt{\Delta s_{str}^2 + \Delta p_{str}^2}$

Ces grandeurs représentent respectivement la contribution de la masse et de la structure pour chaque point expérimental. Enfin, les contributions de masse et de structure pour chaque point expérimental sont exprimées en pourcentage en fonction de leur proportion relative. Ces valeurs sont ensuite reportées pour chaque point et permettent d'évaluer les contributions spécifiques à la masse et à la structure pour chaque addition d'une concentration de Tau-P301L sur la bicouche POPS.

8.3.2. Détermination de la constante d'affinité

Les déplacements angulaires du pic p après chaque concentration protéique, par rapport aux valeurs de la bicouche seule dans trois expériences indépendantes, ont permis de déterminer une constante d'affinité apparente (K_D), après modélisation des données expérimentales par une courbe hyperbolique similaire à celle de Michaelis-Menten, dont l'équation est : $y = \frac{V_{max} \times x}{K_D + x}$, avec :

- y correspondant à la variation de la position de l'angle de résonance p- par rapport à la bicouche seule
- V_{max} correspondant à la variation maximale de cette position
- x à la concentration protéique
- K_D à la constante d'affinité apparente et correspond à la concentration pour laquelle on observe la moitié de la variation totale

9. Interaction Tau-bicouches lipidiques par ATR-FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en réflectance totale atténuée (ATR-FTIR) est une technique de choix pour l'étude des molécules biologiques, comme les lipides, l'ARN, ou les protéines. Elle présente de nombreux avantages par rapport à d'autres techniques structurales, notamment sa rapidité, sa faible consommation de matériel, la possibilité de travailler en solution et de ne nécessiter aucun marquage.

Elle est également utilisée pour étudier les caractéristiques structurales des protéines, et a été appliquée plus particulièrement à l'étude des amyloïdes. En effet cette méthode structurale permet de distinguer les arrangements β -sheets parallèles des antiparallèles, et permet un suivi du processus d'agrégation des espèces amyloïdes (Ruysschaert and Raussens, 2018).

Le système polarisé permet également un suivi de l'orientation des molécules par rapport à la surface, et d'ainsi avoir des informations sur l'organisation des bicouches lipidiques, l'insertion de peptides ou de protéines, ou la création de pores.

9.1. Principe général

La spectroscopie vibrationnelle permet d'étudier l'énergie vibrationnelle des liaisons chimiques au sein des molécules. La FTIR repose sur la capacité des molécules à absorber la lumière infrarouge lorsque la vibration de leurs liaisons entraîne un changement du moment dipolaire. Cette interaction entre la lumière infrarouge et les vibrations moléculaires induit des transitions entre différents niveaux d'énergie vibrationnelle, permettant ainsi de détecter, de manière quantitative, les vibrations spécifiques des groupes fonctionnels présents dans la molécule (Baker et al., 2014). Cette technique est particulièrement utile pour l'étude des molécules biologiques, car elle permet de détecter les modes de vibration des groupements chimiques présents dans les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les glucides. L'ATR-FTIR est un mode particulier de mesure, il s'agit d'un mode de réflexion spéculaire interne. Les modes de vibration de ces derniers sont indiqués sur un spectre typique d'ATR-FTIR d'un échantillon biologique présenté sur la **Figure S-6**.

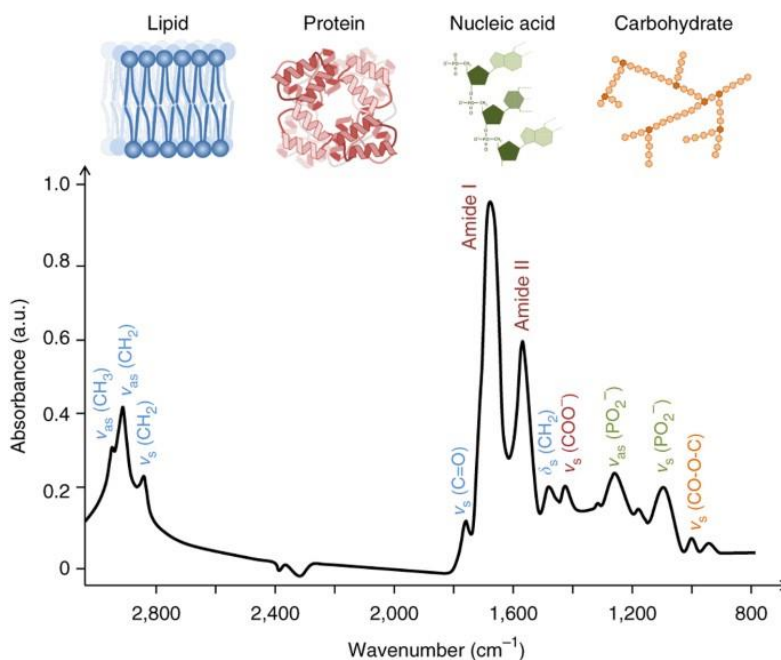


Figure S-6. Spectre ATR-FTIR typique d'un échantillon biologique montrant les différents modes de vibrations attribués aux groupements chimiques des principales biomolécules : les lipides (en bleu), les protéines (en rouge), les acides nucléiques (en vert) et les carbohydrates (en jaune). Issu de Baker et al. (Baker et al., 2014).

Dans le cadre de notre étude sur l'interaction entre la protéine Tau et les modèles membranaires (bicouches supportées), les modes de vibration d'intérêt sont :

- La région 2800-3000 cm^{-1} , spécifique aux chaînes acyles des lipides, avec les modes d'élongation symétrique et antisymétrique des groupes CH_2 ($\nu_s(\text{CH}_2)$ et $\nu_{as}(\text{CH}_2)$) et CH_3 ($\nu_s(\text{CH}_3)$ et $\nu_{as}(\text{CH}_3)$) (Baker et al., 2014) ;
- La bande à 1740 cm^{-1} , attribuée modes d'élongation $\nu(\text{C}=\text{O})$ du groupement ester des phospholipides (Baker et al., 2014) ;
- La région 1500-1700 cm^{-1} , spécifique des protéines, avec les bandes correspondantes aux mode de vibrations amide I et amide II, respectivement entre 1700 et 1600 cm^{-1} et entre 1600 et 1500 cm^{-1} (Goormaghtigh et al., 1990). L'analyse de ces bandes permet de déterminer les éléments de structure secondaire des peptides et des protéines, détaillés plus loin.

Pour les phospholipides et les protéines se trouvant directement à la surface du cristal, l'ATR-FTIR est une méthode quantitative car l'intensité des bandes est directement liée à leur quantité. Il est donc possible de comparer les intensités, et donc les quantités, par exemple en lipides, entre deux spectres.

La **Figure S-7** présente un schéma illustrant le principe général de l'ATR-FTIR. L'instrumentation comporte une source de lumière infrarouge polarisée qui traverse un cristal, aussi appelé élément de réflexion interne (IRE), avec un angle d'incidence supérieur à l'angle critique (22 degrés pour le germanium). L'indice de réfraction élevé du cristal ATR ($n=4$ pour le germanium) permet au faisceau IR incident d'être totalement réfléchi, dans des conditions de réflexion totale interne (TIR). Cela crée une onde évanescente à l'interface avec l'échantillon, capable d'interagir avec ce dernier et de pénétrer à une profondeur comprise entre 0,5 et 1 μm (Ausili et al., 2015). Lorsque le faisceau IR traverse l'échantillon, il est atténué ou absorbé en fonction de

la composition et de la morphologie de ce dernier. Le faisceau réfléchi, de moindre intensité, est ensuite détecté par un détecteur MCT, refroidis à l'azote liquide à base de Hg/Cd/Te (Ausili et al., 2015). Le signal obtenu est un interférogramme. La transformée de Fourier de l'interférogramme permet d'établir le spectre de d'absorbance qui représente l'intensité de la lumière absorbée en fonction du nombre d'onde.

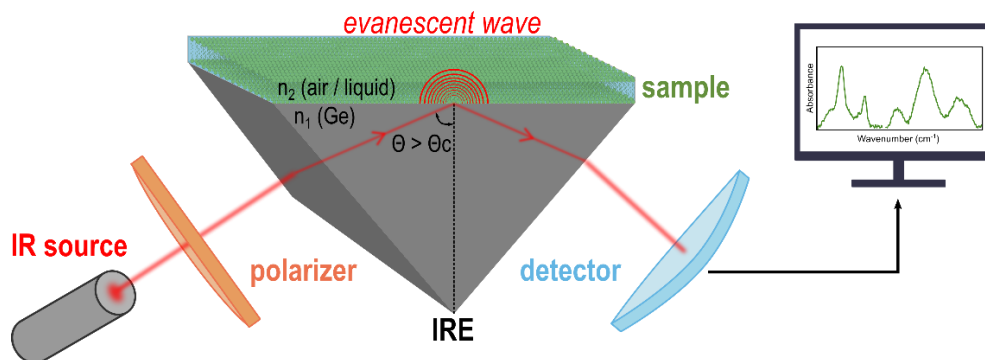


Figure S-7. Schéma du fonctionnement de l'ATR-FTIR utilisé dans ce projet. Une source infrarouge est polarisée à l'aide d'un polariseur, avant de rentrer dans un cristal ATR (IRE, ici en Germanium) avec un angle d'incidence (Θ) supérieur à l'angle critique (Θ_c). Cet angle permet de former une onde évanescente à l'interface de l'échantillon avec l'IRE, grâce au phénomène de réflexion totale atténuée. Une fois absorbée par les molécules de l'échantillon à la surface du cristal, la lumière réfléchie passe dans un détecteur qui permet de représenter les absorbances des groupes fonctionnels en fonction du nombre d'onde.

Les IRE couramment utilisés incluent le sélénure de zinc (ZnSe), le germanium (Ge), le silicium (Si), le diamant, et le bromure/iodure de thallium (KRS-5) (Kaur et al., 2021). Le choix du cristal ATR dépend des conditions expérimentales, notamment des critères tels que les dimensions, la durabilité, la solidité du matériau, le pH de l'environnement expérimental et la sensibilité de l'échantillon (Kaur et al., 2021). Plusieurs géométries existent, permettant d'obtenir une ou plusieurs réflexions de la lumière infrarouge incidente. Le montage utilisé dans cette étude consiste en un cristal de germanium à réflexion unique, possédant l'indice de réfraction le plus élevé (4), ce qui permet de travailler sur une gamme spectrale de 5500 à 780 cm^{-1} , avec la profondeur de pénétration la plus faible (0,65 μm) parmi les cristaux disponibles (Kaur et al., 2021). Cela est particulièrement avantageux pour l'étude des bicouches supportées en milieu liquide.

9.2. Applications

9.2.1. Orientation des molécules

L'addition d'un polariseur dans le montage optique de l'ATR-FTIR permet de séparer la lumière incidente en deux modes p et s. L'absorption dans l'infrarouge est maximale lorsque le moment dipolaire de la molécule est aligné parallèlement à la composante électrique de la lumière incidente (Goormaghtigh et al., 1999). En fonction de l'orientation de l'échantillon, chaque composante interagit différemment avec les molécules, entraînant des intensités d'absorption variables. Le ratio des intensités des bandes spécifiques aux groupes fonctionnels caractéristiques des molécules d'intérêt permet ainsi de fournir des informations sur leur orientation.

- **Lipides**

Une des applications de la polarisation est l'étude de l'orientation des phospholipides au sein d'une bicouche supportée, formée à la surface du cristal ATR. Les phospholipides peuvent adopter différentes orientations selon leur organisation dans la membrane. La composante de la lumière à polarisation p (90°, perpendiculaire à la surface) sera distincte de celle à polarisation s (0°, parallèle à la surface). Dans une membrane organisée, les chaînes acyles des phospholipides sont majoritairement organisées perpendiculairement à la surface, ce qui maximise l'intensité à la polarisation p et réduit celle à la polarisation s (Goormaghtigh et al., 1999). À l'inverse, dans une membrane très fluide, les chaînes des phospholipides sont moins organisées, augmentant ainsi l'intensité à la polarisation s.

Ces informations sont directement accessibles via le ratio dichroïque, qui correspond au rapport des intensités des polarisations p et s pour les groupes fonctionnels caractéristiques des molécules étudiées. Pour les phospholipides, on utilise principalement les vibrations symétriques (ou antisymétriques), telles que : $R_{ATR} = A_b (v_s CH_2 \text{ } p\text{-pol}) / A_b (v_s CH_2 \text{ } s\text{-pol})$ (Goormaghtigh et al., 1999). Un ratio élevé reflète une différence marquée entre les intensités à la polarisation p et s, indiquant une membrane organisée, tandis qu'un ratio plus faible révèle une membrane davantage désorganisée. La position de la bande $v_{as} CH_2$ est également une indication de l'organisation des chaînes : un maximum à 2920 cm^{-1} révèle une forte organisation, observée par exemple pour des phases gel, alors qu'un maximum à 2925 cm^{-1} correspond à un système plus désorganisé (phase fluide).

- **Protéines**

La notion de polarisation peut également s'appliquer aux peptides ou aux protéines, notamment lorsqu'ils interagissent avec la membrane. Cette approche est principalement utilisée pour les peptides de petite taille présentant une structuration spécifique, plutôt que pour de grandes protéines désorganisées ou comportant plusieurs éléments de structures secondaires. Cela ne sera donc pas particulièrement pertinent dans le cadre de cette étude. En revanche, pour illustrer rapidement une application, on peut, par exemple, analyser comment un peptide hélicoïdal s'insère dans la membrane en suivant le ratio dichroïque de cette hélice en fonction de différentes conditions, telles que le pH ou l'organisation membranaire (Goormaghtigh et al., 1999).

9.2.2. Utilisation d'isotopes

Le remplacement d'atomes dans des molécules d'intérêt par leurs isotopes présente des applications intéressantes en spectroscopie infrarouge. En effet, l'isotope ayant des neutrons supplémentaires au sein du noyau, contribue à une augmentation de la masse. L'augmentation de la masse entraîne une diminution du nombre d'ondes des modes de vibrations des liaisons impliquant cet isotope (Mendelsohn and Taraschi, 1978; Torok et al., 1993). Cette propriété est particulièrement utile, notamment avec l'utilisation du deutérium 2H . Par exemple, les échanges $H_2O/{}^2H_2O$ permettent d'étudier les parties exposées au solvant ou dans les régions hydrophobes des protéines (Goormaghtigh et al., 1999). De plus, des compositions mixtes, où une partie des molécules est deutérée ou marquée isotopiquement (C^{13}/N^{15}), sont utilisées pour analyser les interactions protéine/protéine ou des compositions membranaires mixtes, en combinant des phospholipides naturels et deutérés (Mendelsohn and Taraschi, 1978; Torok et al., 1993).

9.2.3. Détermination de la structure secondaire des protéines

Les bandes amides, présentes dans toutes les chaînes polypeptidiques, résultent d'un ensemble de modes de vibration. Parmi celles-ci, la bande amide I est particulièrement utile pour la caractérisation structurale des protéines, car elle résulte des contributions de différents éléments de structures secondaires. Une protéine comportant plusieurs éléments de structures secondaires génère ainsi une bande amide I asymétrique et composite (Goormaghtigh et al., 1990; Tatulian, 2019). Ces éléments, tels que les hélices α , les feuillets β , les β -turns et les segments désordonnés sous forme de « *random coil* », présentent des nombres d'ondes caractéristiques, qui sont indiqués dans le **Tableau S-1**.

Secondary structure	W H2O (cm ⁻¹)
α -Helix	1658–1647
α_{II} -Helix	1666–1658
α -Helical coiled coil	1640–1630
3_{10} -Helix	1665–1655
3_1 -Helix	1639
β -Helix	1640–1630
Parallel β -sheet	1638–1632
Antiparallel β -sheet (strong)	1638–1632 (strong)
Antiparallel β -sheet (weak)	1695–1675 (weak)
Intermolecular (aggregated) β -sheet	1627–1615
α -Pleated sheet	1653–1650
β -Turns	1685–1655
γ -Turns	1690–1650
Irregular (“unordered”) structure	1660–1652

Tableau S-1. Nombres d'ondes (*W*) caractéristiques des différentes structures secondaires protéiques dans l'eau. D'après (Tatulian, 2019).

La détermination des contributions de chaque élément de structure secondaire à la structure globale d'une protéine par ATR-FTIR peut être réalisée grâce à une déconvolution prenant en compte les contributions et les caractéristiques de chaque structure secondaire (Goormaghtigh et al., 1990; Tatulian, 2019). Cette déconvolution nécessite d'être couplée à d'autres méthodes (par exemple de dichroïsme circulaire ou de RMN), pour obtenir une vision globale de la structure et choisir des paramètres initiaux cohérents pour le fit.

9.3. Paramètres expérimentaux

Les expériences d'ATR-FTIR polarisées ont été réalisées dans une salle à température contrôlée à 25°C en utilisant un spectromètre FTIR Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific) équipé d'un détecteur au mercure-cadmium-tellurure (MCT) refroidi par azote liquide. L'élément ATR (Ge, réflexion simple) provient de Specac. Tous les spectres ont été acquis avec une résolution spectrale de 4 cm⁻¹ et 200 interférogrammes.

Les spectres backgrounds servant de référence sont acquis aux deux polarisations s et p avant chaque expérience, dans l'air. Pour chaque expérience, les spectres du tampon 20 mM de HEPES pH7, 100 mM NaCl sont mesurés après addition de 20 μ l de tampon dans un puit formé sur le cristal de Ge (accessoire Thermo).

Les spectres de la protéine Tau native sont obtenus par dépôt d'un volume de 20 μl de protéine Tau-P301L seule à 20 μM sur le cristal. Les spectres des fibres Tau-héparine sont obtenues par dépôt d'un volume de 20 μl d'une préparation Tau-P301L à 20 μM co-incubé avec de l'héparine à 5 μM pendant 3 jours à 37°C sous agitation, dans un tampon 20 mM HEPES pH7, en absence de ThT. La présence de fibres est contrôlée par microscopie électronique.

Pour les interactions entre Tau et les membranes, les bicouches supportées sont formées par dépôt d'un volume de 20 μl d'une suspension de SUVs des différents phospholipides utilisés à une concentration de 1 mg/ml. Pour le dépôt des bicouches anioniques POPS et DOPS, 1 mM de CaCl_2 est ajouté juste avant dépôt dans la solution lipidique pour faciliter la fusion des vésicules. Les suspensions sont incubées pendant 5 minutes sur le cristal ATR-FTIR pour permettre la fusion en bicouche. La cellule est ensuite rincée trois fois par du tampon pour éliminer tout liposome restant.

Les spectres ATR-FTIR aux polarisations p et s sont ensuite acquis avant addition de la protéine. Cette dernière est ensuite ajoutée dans le puit, par remplacement d'un volume de 10 μl de tampon par le même volume de Tau pour atteindre une concentration finale de protéine de 0,5, 1 ou 5 μM en fonction des expériences. Après 3 heures d'incubation de la protéine avec la membrane, 3 rinçages sont effectués avec du tampon, puis les spectres aux polarisations p et s sont de nouveau enregistrés. Un contrôle est également effectué avec la même expérience mais avec addition de tampon au lieu de la protéine. Toutes les expériences d'ATR-FTIR présentées ont été répétées trois fois, sauf mention contraire. Les spectres du tampon sont soustraits à ceux des échantillons.

9.4. Traitement des données

9.4.1. Correction des spectres

Les soustractions de spectres et corrections des lignes de base sont effectuées à l'aide du logiciel Omnic (Thermo Fisher Scientific). La ligne de base est corrigée à l'aide d'une courbe spline, en fixant à zéro les nombres d'onde suivants : 3000, 2800, 1770, et 1490 cm^{-1} . Une attention particulière est portée à la soustraction de l'eau, en se concentrant sur les régions 3000-3200 cm^{-1} et 1600-1700 cm^{-1} , qui correspondent aux bandes d'absorption de l'eau.

9.4.2. Déconvolution de la bande amide I

Les contributions de chaque élément de structures secondaires pour les différentes conditions de Tau (native, dans les fibres amyloïdes Tau-héparine, ou après incubation sur les bicouches supportées) sont obtenues par déconvolution de la bande amide I à la polarisation p, sur Origin (OriginLab) et python. Les lignes de base de toutes les bandes amides I sont d'abord corrigées avec une mise à 0 à 1600 et 1700 cm^{-1} . Pour permettre une comparaison entre conditions, les données sont ensuite normalisées (0-1).

Matériel & Méthodes

Chaque contribution est déterminée à partir d'une courbe de Voigt, qui correspond à l'association linéaire d'une Gaussienne et d'une Lorentzienne, couramment utilisées pour les déconvolutions, le choix dépendant de la morphologie de la bande amide I (Goormaghtigh et al., 1999). Pour nos données, nous avons choisi une pondération de 25 % de Lorentzienne pour 75 % de Gaussienne. Les paramètres utilisés pour la déconvolution suivent des protocoles précédemment établis (Goormaghtigh et al., 1990). Nous avons choisi 6 contributions, pour correspondre à nos données et aux connaissances de la structure de la protéine Tau dans les différentes conditions, avec, dans l'ordre croissant des nombres d'onde : contribution intense des feuillets β antiparallèles ; feuillets β parallèles ; structure désorganisée (random coil) ; hélices α ; β -turn ; contribution faible des feuillets β antiparallèles. Les paramètres initiaux ainsi que les limites minimales et maximales de chaque paramètre (amplitude, centre, et largeur à mi-hauteur ou FWHM) de chaque courbe de Voigt correspondant à une contribution sont listées dans le tableau ci-dessous (**Tableau S-2**).

	Initial parameters			Lower bounds			Upper bounds		
	amp	centre	fwhm	amp	centre	fwhm	amp	centre	fwhm
Peak 1 : high anti//	5	1620	25	0	1615	20	$+\infty$	1625	30
Peak 2 : parallel	1	1632	25	0	1630	20	$+\infty$	1635	30
Peak 3 : random	10	1642	25	0	1640	20	$+\infty$	1645	30
Peak 4 : alpha	5	1655	25	0	1650	20	8	1660	30
Peak 5 : turn	8	1670	25	0	1670	20	$+\infty$	1672	30
Peak 6 : low anti//	0,5	1685	25	0	1685	20	2	1690	30

Tableau S-2. Déterminations des paramètres initiaux et de leurs limites inférieures et supérieures pour l'ajustement des données de déconvolution structurale de la bande amide I. Les pics 1 à 6 correspondent respectivement à la contribution intense des feuillets β antiparallèles ; feuillets β parallèles ; des régions désordonnées (random coil) ; des hélices α ; des β -turn ; et de la contribution faible des feuillets β antiparallèles. Les paramètres correspondent à l'amplitude, la position du centre de la bande et sa largeur à mi-hauteur (fwhm). La limite supérieure à $+\infty$ permet de ne pas limiter l'amplitude.

Les données ont été ajustées à l'aide de la fonction `curve_fit`, qui fait partie de la bibliothèque `SciPy` de Python. Cette fonction utilise une méthode d'optimisation des moindres carrés non linéaires, permettant de minimiser la différence entre les données expérimentales et le modèle théorique dérivé de six courbes de Voigt, pondérées à 75 % gaussiennes et 25 % lorentziennes. Le modèle s'appuie sur des paramètres initiaux, qui sont ensuite optimisés tout en respectant les bornes imposées, grâce à un algorithme de Levenberg-Marquardt. Pour cet ajustement, un maximum de 5000 itérations est défini afin d'assurer la convergence du processus d'optimisation.

Les pourcentages des contributions de chaque pic sont calculés en fonction de l'aire sous chaque courbe de Voigt ajustée. Pour chaque pic, l'aire est obtenue en intégrant la courbe à l'aide de la méthode des trapèzes, qui estime l'aire sous la courbe en multipliant la valeur de l'amplitude par la fonction de profil de Voigt correspondante. Cette méthode permet de quantifier la contribution relative de chaque pic par rapport à l'ensemble des pics ajustés. La déconvolution est appliquée à plusieurs réplicats afin de déterminer les moyennes et les écart-types de chaque contribution de structure pour chaque condition.

Bibliographie

- Abskharon, R., Sawaya, M.R., Boyer, D.R., Cao, Q., Nguyen, B.A., Cascio, D., Eisenberg, D.S., 2022. Cryo-EM structure of RNA-induced tau fibrils reveals a small C-terminal core that may nucleate fibril formation.
- Ait-Bouziad, N., Chiki, A., Limorenko, G., Xiao, S., Eliezer, D., Lashuel, H.A., 2020. Phosphorylation of the overlooked tyrosine 310 regulates the structure, aggregation, and microtubule- and lipid-binding properties of Tau. *Journal of Biological Chemistry* 295, 7905–7922. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012517>
- Ait-Bouziad, N., Lv, G., Mahul-Mellier, A.-L., Xiao, S., Zorludemir, G., Eliezer, D., Walz, T., Lashuel, H.A., 2017. Discovery and characterization of stable and toxic Tau/phospholipid oligomeric complexes. *Nat Commun* 8, 1678. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01575-4>
- Almeida, Z.L., Brito, R.M.M., 2020. Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules* 25, 1195. <https://doi.org/10.3390/molecules25051195>
- Alonso, A. del C., El Idrissi, A., Candia, R., Morozova, V., Kleiman, F.E., 2024. Tau: More than a microtubule-binding protein in neurons. *Cytoskeleton* 81, 71–77. <https://doi.org/10.1002/cm.21795>
- Arendt, T., Stieler, J.T., Holzer, M., 2016. Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin, Cytoskeletal proteins in health and neurodegenerative disease* 126, 238–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Arrasate, M., Pérez, M., Avila, J., 2000. Tau Dephosphorylation at Tau-1 Site Correlates with its Association to Cell Membrane. *Neurochem Res* 25, 43–50. <https://doi.org/10.1023/A:1007583214722>
- Attwood, S.J., Choi, Y., Leonenko, Z., 2013. Preparation of DOPC and DPPC Supported Planar Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy and Atomic Force Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 3514–3539. <https://doi.org/10.3390/ijms14023514>
- Ausili, A., Sánchez, M., Gómez-Fernández, J.C., 2015. Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 4, 159–170. <https://doi.org/10.3233/BSI-150104>
- Azouz, M., Feuillie, C., Lafleur, M., Molinari, M., Lecomte, S., 2021. Interaction of Tau construct K18 with model lipid membranes. *Nanoscale Adv.* 3, 4244–4253. <https://doi.org/10.1039/D1NA00055A>
- Baker, M.J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H.J., Dorling, K.M., Fielden, P.R., Fogarty, S.W., Fullwood, N.J., Heys, K.A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P.L., Obinaju, B., Sockalingum, G.D., Sulé-Suso, J., Strong, R.J., Walsh, M.J., Wood, B.R., Gardner, P., Martin, F.L., 2014. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc* 9, 1771–1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- Barré, P., Eliezer, D., 2006. Folding of the Repeat Domain of Tau Upon Binding to Lipid Surfaces. *Journal of Molecular Biology* 362, 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.018>
- Berthelot, K., Cullin, C., Lecomte, S., 2013. What does make an amyloid toxic: Morphology, structure or interaction with membrane? *Biochimie, Special Issue Membranes and Bioactive Lipids* 95, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.011>
- Biancalana, M., Koide, S., 2010. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochim Biophys Acta* 1804, 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Bode, D.C., Freeley, M., Nield, J., Palma, M., Viles, J.H., 2019. Amyloid- β oligomers have a profound detergent-like effect on lipid membrane bilayers, imaged by atomic force and electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry* 294, 7566–7572. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC118.007195>
- Bok, E., Leem, E., Lee, B.-R., Lee, J.M., Yoo, C.J., Lee, E.M., Kim, J., 2021. Role of the Lipid Membrane and Membrane Proteins in Tau Pathology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9.
- Boyarko, B., Hook, V., 2021. Human Tau Isoforms and Proteolysis for Production of Toxic Tau Fragments in Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.702788>
- Brandt, R., Léger, J., Lee, G., 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *Journal of Cell Biology* 131, 1327–1340. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1327>

Bibliographie

- Brundin, P., Melki, R., Kopito, R., 2010. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 301–307. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>
- Brunello, C.A., Merezhko, M., Uronen, R.-L., Huttunen, H.J., 2020. Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 1721–1744. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03349-1>
- Calderon, R.O., Attema, B., DeVries, G.H., 1995. Lipid Composition of Neuronal Cell Bodies and Neurites from Cultured Dorsal Root Ganglia. *Journal of Neurochemistry* 64, 424–429. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64010424.x>
- Casares, D., Escribá, P.V., Rosselló, C.A., 2019. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* 20, 2167. <https://doi.org/10.3390/ijms20092167>
- Castano, S., Desbat, B., 2005. Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1715, 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.07.008>
- Chirita, C.N., Necula, M., Kuret, J., 2003. Anionic Micelles and Vesicles Induce Tau Fibrillization in Vitro *. *Journal of Biological Chemistry* 278, 25644–25650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301663200>
- Clark, L.N., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D.H., Nasreddine, Z.S., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K., Andreadis, A., D’Souza, I., Lee, V.M., Reed, L., Trojanowski, J.Q., Zhukareva, V., Bird, T., Schellenberg, G., Wilhelmsen, K.C., 1998. Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13103–13107. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13103>
- Connell, S.D., Smith, D.A., 2006. The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes (Review). *Molecular Membrane Biology* 23, 17–28. <https://doi.org/10.1080/09687860500501158>
- Cooney, G.S., Talaga, D., Ury-Thiery, V., Fichou, Y., Huang, Y., Lecomte, S., Bonhommeau, S., 2023. Chemical Imaging of RNA-Tau Amyloid Fibrils at the Nanoscale Using Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* 62, e202314369. <https://doi.org/10.1002/anie.202314369>
- Despres, C., Di, J., Cantrelle, F.-X., Li, Z., Huvent, I., Chambraud, B., Zhao, J., Chen, J., Chen, S., Lippens, G., Zhang, F., Linhardt, R., Wang, C., Klärner, F.-G., Schrader, T., Landrieu, I., Bitan, G., Smet-Nocca, C., 2019. Major Differences between the Self-Assembly and Seeding Behavior of Heparin-Induced and in Vitro Phosphorylated Tau and Their Modulation by Potential Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* 14, 1363–1379. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00325>
- Devanathan, S., Salamon, Z., Lindblom, G., Gröbner, G., Tollin, G., 2006. Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid A β 1–40 peptide in solid-supported lipid bilayers. *The FEBS Journal* 273, 1389–1402. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05162.x>
- Di Paolo, G., De Camilli, P., 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Dicke, S.S., Tatge, L., Engen, P.E., Culp, M., Masterson, L.R., 2017. Isothermal titration calorimetry and vesicle leakage assays highlight the differential behaviors of tau repeat segments upon interaction with anionic lipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493, 1504–1509. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.007>
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Dartigues, J.-F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Genthon, R., Gouw, A.A., Habert, M.-O., Holtzman, D.M., Kivipelto, M., Lista, S., Molinuevo, J.-L., O’Bryant, S.E., Rabinovici, G.D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L.S., Sperling, R., Teichmann, M., Carrillo, M.C., Cummings, J., Cliff R Jack, J., Ad”, P. of the M. of the I.W.G. (IWG) A.A.A. on “The P.S. of, July 23, 2015, Washington DC, U.S.A., 2016. Preclinical Alzheimer’s disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer’s & dementia : the journal of the Alzheimer’s Association* 12, 292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>
- Dugger, B.N., Dickson, D.W., 2017. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, a028035. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>

Bibliographie

- Dutta, S., Watson, B.G., Mattoo, S., Rochet, J.-C., 2020. Calcein Release Assay to Measure Membrane Permeabilization by Recombinant alpha-Synuclein. *Bio Protoc* 10, e3690. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3690>
- El Mammeri, N., Gampp, O., Duan, P., Hong, M., 2023. Membrane-induced tau amyloid fibrils. *Commun Biol* 6, 467. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04847-6>
- Elbaum-Garfinkle, S., Ramlall, T., Rhoades, E., 2010. The role of the lipid bilayer in tau aggregation. *Biophys J* 98, 2722–2730. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.03.013>
- Elenbaas, B.O.W., Kreamsreiter, S.M., Khemtouri, L., Killian, J.A., Sinnige, T., 2023. Fibril elongation by human islet amyloid polypeptide is the main event linking aggregation to membrane damage. *BBA Advances* 3, 100083. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100083>
- Faller, P., Hureau, C., 2021. Reproducibility Problems of Amyloid- β Self-Assembly and How to Deal With Them. *Front. Chem.* 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.611227>
- Fanni, A.M., Vander Zanden, C.M., Majewska, P.V., Majewski, J., Chi, E.Y., 2019. Membrane-mediated fibrillation and toxicity of the tau hexapeptide PHF6. *J Biol Chem* 294, 15304–15317. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010003>
- Fichou, Y., Oberholtzer, Z.R., Ngo, H., Cheng, C.-Y., Keller, T.J., Eschmann, N.A., Han, S., 2019. Tau-Cofactor Complexes as Building Blocks of Tau Fibrils. *Front Neurosci* 13, 1339. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01339>
- Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M., Scheres, S.H.W., 2017. Cryo-EM structures of Tau filaments from Alzheimer's disease brain. *Nature* 547, 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature23002>
- Gellermann, G.P., Appel, T.R., Davies, P., Diekmann, S., 2006. Paired helical filaments contain small amounts of cholesterol, phosphatidylcholine and sphingolipids. *Biological Chemistry* 387. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.157>
- Georgieva, E.R., Xiao, S., Borbat, P.P., Freed, J.H., Eliezer, D., 2014. Tau binds to lipid membrane surfaces via short amphipathic helices located in its microtubule-binding repeats. *Biophys J* 107, 1441–1452. <https://doi.org/10.1073/pnas.12.5.1858>
- Ginsberg, S.D., Crino, P.B., Lee, V.M.-Y., Eberwine, J.H., Trojanowski, J.Q., 1997. Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques. *Annals of Neurology* 41, 200–209. <https://doi.org/10.1002/ana.410410211>
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J., Crowther, R.A., 1996. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383, 550–553. <https://doi.org/10.1038/383550a0>
- Gołek, F., Mazur, P., Ryszka, Z., Zuber, S., 2014. AFM image artifacts. *Applied Surface Science, Selected Papers from the 6th International Workshop on Surface Physics "Functional Materials"* 304, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.149>
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., Ruyschaert, J.-M., 1990. Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films. *European Journal of Biochemistry* 193, 409–420. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19354.x>
- Goormaghtigh, E., Raussens, V., Ruyschaert, J.M., 1999. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 1422, 105–185. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(99\)00004-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(99)00004-0)
- Haj-Yahya, M., Gopinath, P., Rajasekhar, K., Mirbaha, H., Diamond, M.I., Lashuel, H.A., 2020. Site-Specific Hyperphosphorylation Inhibits, Rather than Promotes, Tau Fibrillization, Seeding Capacity, and Its Microtubule Binding. *Angewandte Chemie International Edition* 59, 4059–4067. <https://doi.org/10.1002/anie.201913001>
- Hammond, K., Ryadnov, M.G., Hoogenboom, B.W., 2021. Atomic force microscopy to elucidate how peptides disrupt membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863, 183447. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183447>
- Harada, R., Okamura, N., Furumoto, S., Yanai, K., 2018. Imaging Protein Misfolding in the Brain Using β -Sheet Ligands. *Front Neurosci* 12, 585. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00585>

Bibliographie

- Harayama, T., Riezman, H., 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 281–296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Harté, E., Maalouli, N., Shalabney, A., Texier, E., Berthelot, K., Lecomte, S., D. Alves, I., 2014. Probing the kinetics of lipid membrane formation and the interaction of a nontoxic and a toxic amyloid with plasmon waveguide resonance. *Chemical Communications* 50, 4168–4171. <https://doi.org/10.1039/C4CC00571F>
- Hellén, M., Bhattacharjee, A., Uronen, R.-L., Huttunen, H.J., 2021. Membrane interaction and disulphide-bridge formation in the unconventional secretion of Tau. *Biosci Rep* 41, BSR20210148. <https://doi.org/10.1042/BSR20210148>
- Henry, S., Vignaud, H., Bobo, C., Decossas, M., Lambert, O., Harte, E., Alves, I.D., Cullin, C., Lecomte, S., 2015. Interaction of A β 1–42 Amyloids with Lipids Promotes “Off-Pathway” Oligomerization and Membrane Damage. *Biomacromolecules* 16, 944–950. <https://doi.org/10.1021/bm501837w>
- Hinterdorfer, P., Dufrière, Y.F., 2006. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods* 3, 347–355. <https://doi.org/10.1038/nmeth871>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S.G., Croteau, D.L., Bohr, V.A., 2019. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15, 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Huang, C.-H., 1969. Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry* 8, 344–352. <https://doi.org/10.1021/bi00829a048>
- Human Protein Atlas [WWW Document], 2003. . Human Protein Atlas proteinatlas.org. URL <https://www.proteinatlas.org/>
- Iadanza, M.G., Jackson, M.P., Hewitt, E.W., Ranson, N.A., Radford, S.E., 2018. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 755–773. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>
- Ingólfsson, H.I., Carpenter, T.S., Bhatia, H., Bremer, P.-T., Marrink, S.J., Lightstone, F.C., 2017. Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophysical Journal* 113, 2271–2280. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.10.017>
- Ingólfsson, H.I., Melo, M.N., van Eerden, F.J., Arnarez, C., Lopez, C.A., Wassenaar, T.A., Periole, X., de Vries, A.H., Tieleman, D.P., Marrink, S.J., 2014. Lipid Organization of the Plasma Membrane. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 14554–14559. <https://doi.org/10.1021/ja507832e>
- INSERM, 2017. Maladie d’Alzheimer · Inserm, La science pour la santé [WWW Document]. Inserm. URL <https://www.inserm.fr/dossier/alzheimer-maladie/> (accessed 8.24.24).
- Itaya, K., Ui, M., 1966. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clinica Chimica Acta* 14, 361–366. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(66\)90114-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(66)90114-8)
- Jeganathan, S., von Bergen, M., Brutlach, H., Steinhoff, H.-J., Mandelkow, E., 2006. Global Hairpin Folding of Tau in Solution. *Biochemistry* 45, 2283–2293. <https://doi.org/10.1021/bi0521543>
- Jones, E.M., Dubey, M., Camp, P.J., Vernon, B.C., Biernat, J., Mandelkow, E., Majewski, J., Chi, E.Y., 2012. Interaction of tau protein with model lipid membranes induces tau structural compaction and membrane disruption. *Biochemistry* 51, 2539–2550. <https://doi.org/10.1021/bi201857v>
- Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., 1996. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Letters* 399, 344–349. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01386-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01386-5)
- Katsinelos, T., Zeitler, M., Dimou, E., Karakatsani, A., Müller, H.-M., Nachman, E., Steringer, J.P., Ruiz de Almodovar, C., Nickel, W., Jahn, T.R., 2018. Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Reports* 23, 2039–2055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>
- Kaur, H., Rana, B., Tomar, D., Kaur, S., Jena, K.C., 2021. Fundamentals of ATR-FTIR Spectroscopy and Its Role for Probing In-Situ Molecular-Level Interactions, in: Singh, D.K., Pradhan, M., Materny, A. (Eds.), *Modern Techniques of Spectroscopy, Progress in Optical Science and Photonics*. Springer Singapore, Singapore, pp. 3–37. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6084-6_1
- Kellogg, E.H., Hejab, N.M.A., Poepsel, S., Downing, K.H., DiMaio, F., Nogales, E., 2018. Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science* 360, 1242–1246. <https://doi.org/10.1126/science.aat1780>

Bibliographie

- Kim, H.-Y., Huang, B.X., Spector, A.A., 2014. Phosphatidylserine in the Brain: Metabolism and Function. *Prog Lipid Res* 0, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.06.002>
- Knopman, D.S., Amieva, H., Petersen, R.C., Chételat, G., Holtzman, D.M., Hyman, B.T., Nixon, R.A., Jones, D.T., 2021. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* 7, 33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
- Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., 2014. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., Selkoe, D.J., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4044–4048. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.4044>
- Koynova, R., Tenchov, B., 2013. Phase Transitions and Phase Behavior of Lipids, in: *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1841–1854. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_542
- Künze, G., Barré, P., Scheidt, H.A., Thomas, L., Eliezer, D., Huster, D., 2012. Binding of the three-repeat domain of tau to phospholipid membranes induces an aggregated-like state of the protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 2302–2313. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.03.019>
- Lamprey, R.N.L., Chaulagain, B., Trivedi, R., Gothwal, A., Layek, B., Singh, J., 2022. A Review of the Common Neurodegenerative Disorders: Current Therapeutic Approaches and the Potential Role of Nanotherapeutics. *Int J Mol Sci* 23, 1851. <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Clos, A.L., Jackson, G.R., Kaye, R., 2011. Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Molecular Neurodegeneration* 6, 39. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-39>
- Lee, J., Kim, Y.H., T. Arce, F., Gillman, A.L., Jang, H., Kagan, B.L., Nussinov, R., Yang, J., Lal, R., 2017. Amyloid β Ion Channels in a Membrane Comprising Brain Total Lipid Extracts. *ACS Chem. Neurosci.* 8, 1348–1357. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00006>
- Leonenko, Z.V., Finot, E., Ma, H., Dahms, T.E.S., Cramb, D.T., 2004. Investigation of Temperature-Induced Phase Transitions in DOPC and DPPC Phospholipid Bilayers Using Temperature-Controlled Scanning Force Microscopy. *Biophysical Journal* 86, 3783–3793. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.036681>
- Lester, E., Ooi, F.K., Bakkar, N., Ayers, J., Woerman, A.L., Wheeler, J., Bowser, R., Carlson, G.A., Prusiner, S.B., Parker, R., 2021. Tau aggregates are RNA-protein assemblies that mislocalize multiple nuclear speckle components. *Neuron* 109, 1675-1691.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.026>
- Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., 2013. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 2347–2358. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.10.018>
- Li, B., Ge, P., Murray, K.A., Sheth, P., Zhang, M., Nair, G., Sawaya, M.R., Shin, W.S., Boyer, D.R., Ye, S., Eisenberg, D.S., Zhou, Z.H., Jiang, L., 2018. Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nat Commun* 9, 3609. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05971-2>
- Limorenko, G., Lashuel, H.A., 2022. Revisiting the grammar of Tau aggregation and pathology formation: how new insights from brain pathology are shaping how we study and target Tauopathies. *Chem. Soc. Rev.* 51, 513–565. <https://doi.org/10.1039/D1CS00127B>
- Limorenko, G., Lashuel, H.A., 2021. To target Tau pathologies, we must embrace and reconstruct their complexities. *Neurobiology of Disease* 161, 105536. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105536>
- Lövestam, S., Koh, F.A., van Knippenberg, B., Kotecha, A., Murzin, A.G., Goedert, M., Scheres, S.H., 2022. Assembly of recombinant tau into filaments identical to those of Alzheimer’s disease and chronic traumatic encephalopathy. *eLife* 11, e76494. <https://doi.org/10.7554/eLife.76494>
- Luchini, A., Vitiello, G., 2020. Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies. *Biomimetics (Basel)* 6, 3. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6010003>
- Luckey, M., 2008. *Membrane structural biology: with biochemical and biophysical foundations*. Cambridge University Press, Cambridge.

Bibliographie

- Lv, Z., Banerjee, S., Zagorski, K., Lyubchenko, Y.L., 2018. Supported Lipid Bilayers for Atomic Force Microscopy Studies. *Methods Mol Biol* 1814, 129–143. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8591-3_8
- MacAinsh, M., Zhou, H.-X., 2023. Partial mimicry of the microtubule binding of tau by its membrane binding. *Protein Science* 32, e4581. <https://doi.org/10.1002/pro.4581>
- Mardešić, I., Boban, Z., Subczynski, W.K., Raguz, M., 2023. Membrane Models and Experiments Suitable for Studies of the Cholesterol Bilayer Domains. *Membranes* 13, 320. <https://doi.org/10.3390/membranes13030320>
- Mari, S.A., Wegmann, S., Tepper, K., Hyman, B.T., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Müller, D.J., 2018. Reversible Cation-Selective Attachment and Self-Assembly of Human Tau on Supported Brain Lipid Membranes. *Nano Lett.* 18, 3271–3281. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b01085>
- Meisl, G., Kirkegaard, J.B., Arosio, P., Michaels, T.C.T., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., Linse, S., Knowles, T.P.J., 2016. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nat Protoc* 11, 252–272. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.010>
- Mendelsohn, R., Taraschi, T., 1978. Deuterated phospholipids as Raman spectroscopic probes of membrane structure: dipalmitoylphosphatidylcholine-dipalmitoylphosphatidylethanolamine multilayers. *Biochemistry* 17, 3944–3949. <https://doi.org/10.1021/bi00612a010>
- Merezhko, M., Uronen, R.-L., Huttunen, H.J., 2020. The Cell Biology of Tau Secretion. *Front Mol Neurosci* 13, 569818. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.569818>
- Middleton, E.R., Rhoades, E., 2010. Effects of curvature and composition on α -synuclein binding to lipid vesicles. *Biophys J* 99, 2279–2288. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.056>
- Mouritsen, O.G., Zuckermann, M.J., 2004. What's so special about cholesterol? *Lipids* 39, 1101–1113. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1336-x>
- Nacharaju, P., Lewis, J., Easson, C., Yen, S., Hackett, J., Hutton, M., Yen, S.-H., 1999. Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Letters* 447, 195–199. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00294-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00294-X)
- Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger, A.L., 2013. *Lehninger principles of biochemistry*, 6th edition, international edition. ed. W.H. Freeman, New York (Etats-Unis d'Amérique).
- Ottova-Leitmannova, A., 2006. *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Elsevier, Amsterdam Boston Paris.
- Pabst, G., Keller, S., 2024. Exploring membrane asymmetry and its effects on membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 49, 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2024.01.007>
- Patel, N., Ramachandran, S., Azimov, R., Kagan, B.L., Lal, R., 2015. Ion Channel Formation by Tau Protein: Implications for Alzheimer's Disease and Tauopathies. *Biochemistry* 54, 7320–7325. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00988>
- Pooler, A.M., Usardi, A., Evans, C.J., Philpott, K.L., Noble, W., Hanger, D.P., 2012. Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiology of Aging* 33, 431.e27–431.e38. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.01.005>
- Pounot, K., Piersson, C., Goring, A.K., Rosu, F., Gabelica, V., Weik, M., Han, S., Fichou, Y., 2024. Mutations in Tau Protein Promote Aggregation by Favoring Extended Conformations. *JACS Au* 4, 92–100. <https://doi.org/10.1021/jacsau.3c00550>
- Qiang, L., Sun, X., Austin, T.O., Muralidharan, H., Jean, D.C., Liu, M., Yu, W., Baas, P.W., 2018. Tau Does Not Stabilize Axonal Microtubules but Rather Enables Them to Have Long Labile Domains. *Current Biology* 28, 2181–2189.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.045>
- Rascol, E., Villette, S., Harté, E., Alves, I.D., 2021. Plasmon Waveguide Resonance: Principles, Applications and Historical Perspectives on Instrument Development. *Molecules* 26, 6442. <https://doi.org/10.3390/molecules26216442>
- Rasmussen, H.Ø., Nielsen, J., de Poli, A., Otzen, D.E., Pedersen, J.S., 2023. Tau Fibrillation Induced by Heparin or a Lysophospholipid Show Different Initial Oligomer Formation. *Journal of Molecular Biology* 435, 168194. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168194>

Bibliographie

- Redondo-Morata, L., Giannotti, M.I., Sanz, F., 2012. Influence of Cholesterol on the Phase Transition of Lipid Bilayers: A Temperature-Controlled Force Spectroscopy Study. *Langmuir* 28, 12851–12860. <https://doi.org/10.1021/la302620t>
- Redondo-Morata, L., Lea Sanford, R., Andersen, O.S., Scheuring, S., 2016. Effect of Statins on the Nanomechanical Properties of Supported Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* 111, 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.016>
- Riek, R., Eisenberg, D.S., 2016. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature* 539, 227–235. <https://doi.org/10.1038/nature20416>
- Rizzu, P., Van Swieten, J.C., Joosse, M., Hasegawa, M., Stevens, M., Tibben, A., Niermeijer, M.F., Hillebrand, M., Ravid, R., Oostra, B.A., Goedert, M., van Duijn, C.M., Heutink, P., 1999. High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *Am J Hum Genet* 64, 414–421. <https://doi.org/10.1086/302256>
- Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A., 1970. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5, 494–496. <https://doi.org/10.1007/BF02531316>
- Ruysschaert, J.-M., Raussens, V., 2018. ATR-FTIR Analysis of Amyloid Proteins, in: Nilsson, B.L., Doran, T.M. (Eds.), *Peptide Self-Assembly, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 69–81. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7811-3_3
- Salamon, Z., Devanathan, S., Alves, I.D., Tollin, G., 2005. Plasmon-waveguide Resonance Studies of Lateral Segregation of Lipids and Proteins into Microdomains (Rafts) in Solid-supported Bilayers *. *Journal of Biological Chemistry* 280, 11175–11184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411197200>
- Salamon, Z., Tollin, G., 2004. Graphical Analysis of Mass and Anisotropy Changes Observed by Plasmon-Waveguide Resonance Spectroscopy Can Provide Useful Insights into Membrane Protein Function. *Biophysical Journal* 86, 2508–2516. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74306-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74306-4)
- Sallaberry, C.A., Voss, B.J., Majewski, J., Biernat, J., Mandelkow, E., Chi, E.Y., Vander Zanden, C.M., 2021. Tau and Membranes: Interactions That Promote Folding and Condensation. *Front Cell Dev Biol* 9, 725241. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.725241>
- Santé Publique France, 2023. Maladies neurodégénératives [WWW Document]. Maladies neurodégénératives, Santé Publique France. URL <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-neurodegeneratives> (accessed 4.22.24).
- Sato, H., Feix, J.B., 2006. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758, 1245–1256. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.021>
- Scheibe, C., Hauser, K., 2018. Orientation of lipids in solid supported lipid bilayers studied by polarized ATR-FTIR spectroscopy. *BSI* 7, 17–24. <https://doi.org/10.3233/BSI-180173>
- Scheres, S.H., Zhang, W., Falcon, B., Goedert, M., 2020. Cryo-EM structures of tau filaments. *Current Opinion in Structural Biology, Biophysical and Computational Methods • Cryo EM* 64, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.05.011>
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1998. Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357, 299–309. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0813>
- Shi, Y., Zhang, W., Yang, Y., Murzin, A.G., Falcon, B., Kotecha, A., Van Beers, M., Tarutani, A., Kametani, F., Garringer, H.J., Vidal, R., Hallinan, G.I., Lashley, T., Saito, Y., Murayama, S., Yoshida, M., Tanaka, H., Kakita, A., Ikeuchi, T., Robinson, A.C., Mann, D.M.A., Kovacs, G.G., Revesz, T., Ghetti, B., Hasegawa, M., Goedert, M., Scheres, S.H.W., 2021. Structure-based classification of tauopathies. *Nature* 598, 359–363. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03911-7>
- Shusharina, N., Yuhnenko, D., Botman, S., Sapunov, V., Savinov, V., Kamyshev, G., Sayapin, D., Voznyuk, I., 2023. Modern Methods of Diagnostics and Treatment of Neurodegenerative Diseases and Depression. *Diagnostics* 13, 573. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13030573>

Bibliographie

- Svennerholm, L., 1968. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *Journal of Lipid Research* 9, 570–579. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42702-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42702-6)
- Talaga, D., Cooney, G.S., Ury-Thiery, V., Fichou, Y., Huang, Y., Lecomte, S., Bonhommeau, S., 2022. Total Internal Reflection Tip-Enhanced Raman Spectroscopy of Tau Fibrils. *J. Phys. Chem. B* 126, 5024–5032. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c02786>
- Talaga, D., Smeralda, W., Lescos, L., Hunel, J., Lepejova-Caudy, N., Cullin, C., Bonhommeau, S., Lecomte, S., 2018. PIP2 Phospholipid-Induced Aggregation of Tau Filaments Probed by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 15738–15742. <https://doi.org/10.1002/anie.201809636>
- Tatulian, S.A., 2019. FTIR Analysis of Proteins and Protein–Membrane Interactions, in: Kleinschmidt, J.H. (Ed.), *Lipid-Protein Interactions, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 281–325. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9512-7_13
- Törnquist, M., T. Michaels, T.C., Sanagavarapu, K., Yang, X., Meisl, G., A. Cohen, S.I., J. Knowles, T.P., Linse, S., 2018. Secondary nucleation in amyloid formation. *Chemical Communications* 54, 8667–8684. <https://doi.org/10.1039/C8CC02204F>
- Torok, Z., Szalontai, B., Joo, F., Wistrom, C.A., Vigh, L., 1993. Homogeneous Catalytic Deuteration of Fatty Acyl Chains as a Tool to Detect Lipid Phase Transitions in Specific Membrane Domains: A Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192, 518–524. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1446>
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Wang, Y., Mandelkow, E., 2016. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 17, 22–35. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Wegmann, S., Jung, Y.J., Chinnathambi, S., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Müller, D.J., 2010. Human Tau Isoforms Assemble into Ribbon-like Fibrils That Display Polymorphic Structure and Stability *. *Journal of Biological Chemistry* 285, 27302–27313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.145318>
- Wegmann, S., Medalsy, I.D., Mandelkow, E., Müller, D.J., 2013. The fuzzy coat of pathological human Tau fibrils is a two-layered polyelectrolyte brush. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E313–E321. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212100110>
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1858–1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>
- Wells, K., Farooqui, A.A., Liss, L., Horrocks, L.A., 1995. Neural membrane phospholipids in alzheimer disease. *Neurochem Res* 20, 1329–1333. <https://doi.org/10.1007/BF00992508>
- Williams, T.L., Serpell, L.C., 2011. Membrane and surface interactions of Alzheimer’s A β peptide – insights into the mechanism of cytotoxicity. *The FEBS Journal* 278, 3905–3917. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08228.x>
- Wilson, D.M., Binder, L.I., 1997. Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer’s disease. *Am J Pathol* 150, 2181–2195.
- Xue, C., Lin, T., Chang, D., Guo, Z., 2016. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society*. <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Yao, Q.-Q., Wen, J., Perrett, S., Wu, S., 2022. Distinct lipid membrane-mediated pathways of Tau assembly revealed by single-molecule analysis. *Nanoscale* 14, 4604–4613. <https://doi.org/10.1039/D1NR05960B>
- Zampar, S., Di Gregorio, S.E., Grimmer, G., Watts, J.C., Ingelsson, M., 2024. “Prion-like” seeding and propagation of oligomeric protein assemblies in neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci.* 18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1436262>
- Zelezetsky, I., Tossi, A., 2006. Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Membrane Biophysics of Antimicrobial Peptides* 1758, 1436–1449. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.021>

Bibliographie

Zhang, W., Falcon, B., Murzin, A.G., Fan, J., Crowther, R.A., Goedert, M., Scheres, S.H., 2019. Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases. *eLife* 8, e43584. <https://doi.org/10.7554/eLife.43584>

Zhang, Y., 2020. Effect of cholesterol on the fluidity of supported lipid bilayers.

Zwierzchowski-Zarate, A.N., Mendoza-Oliva, A., Kashmer, O.M., Collazo-Lopez, J.E., White, C.L., Diamond, M.I., 2022. RNA induces unique tau strains and stabilizes Alzheimer's disease seeds. *Journal of Biological Chemistry* 298. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102132>

Résumé

Agrégation *in vitro* de la protéine amyloïde Tau et étude de son impact sur des modèles membranaires par différentes méthodes biophysiques

Les maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, affectent les fonctions cognitives et motrices. Elles se caractérisent par une perte progressive de neurones, sans possibilité de régénération. Avec le vieillissement de la population, ces pathologies, principalement liées à l'âge, représentent un enjeu sociétal majeur. L'absence de diagnostic précoce, de traitements efficaces et la méconnaissance des mécanismes en jeu soulignent la nécessité d'en approfondir la compréhension.

Les patients atteints de ces maladies présentent des accumulations de protéines anormales sous forme d'agrégats insolubles, dans ou à proximité des cellules cérébrales. Bien que chaque protéinopathie présente des agrégats spécifiques, elles partagent des caractéristiques communes, notamment leur structure appelée amyloïde. Ces amyloïdes, formés par l'auto-assemblage de monomères protéiques mal conformés par empilement, adoptent une structure caractéristique dite en cross- β . Plusieurs protéines amyloïdes pathogènes ont été identifiées et sont associées à diverses maladies neurodégénératives.

La protéine Tau, impliquée dans la maladie d'Alzheimer et plus largement dans un groupe de démences appelées tauopathies, est principalement localisée dans les neurones, où elle stabilise les microtubules, éléments structurants du cytosquelette cellulaire. Toutefois, dans des conditions pathologiques, Tau se dissocie des microtubules, devient hyperphosphorylée et forme des agrégats amyloïdes fibrillaires. Les mécanismes exacts de cette agrégation restent mal compris.

L'étude de l'agrégation de Tau repose sur la production *in vitro* de fibres amyloïdes. En raison de sa solubilité élevée liée à sa charge positive, la formation de ces fibres nécessite l'ajout de molécules polyanioniques, appelées cofacteurs, telles que l'héparine (un polysaccharide), des ARN ou des lipides. Cependant, des incertitudes demeurent quant au rôle précis de ces cofacteurs : catalysent-ils simplement l'agrégation ou sont-ils intégrés dans la structure des fibres ? Si tel est le cas, quel impact cela a-t-il sur la morphologie des agrégats ?

La capacité de Tau à s'agréger en présence de lipides suscite des interrogations sur son comportement vis à vis des différentes membranes des neurones. L'interaction de Tau avec les membranes plasmiques a été démontrée, et pourrait jouer un rôle autant dans des processus physiologiques que pathologiques. Tau, en présence de lipides anioniques, altère-t-elle l'intégrité membranaire ? Qu'en est-il des lipides non anioniques ?

Pour répondre à ces questions, ce projet de thèse combine plusieurs approches biophysiques : spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), microscopie à force atomique (AFM), microscopie électronique à transmission (MET) et résonance plasmonique de surface par ondes guidées (PWR). L'étude est structurée autour de deux axes principaux : (i) caractériser l'agrégation de Tau en présence de différents cofacteurs anioniques (héparine, ARN, phospholipides) et étudier l'impact sur la morphologie des fibres ; (ii) évaluer l'effet de l'interaction de Tau avec des membranes lipidiques de différentes compositions sur leur intégrité. Les résultats de cette thèse apportent de nouvelles perspectives sur les mécanismes pathogéniques de Tau et pourraient contribuer à une meilleure compréhension des tauopathies, ainsi qu'au développement de stratégies thérapeutiques.

Mots clés : amyloïdes ; protéine Tau ; AFM ; ATR-FTIR ; modèles membranaires lipidiques ; protéinopathies



Unité de recherche
Institut de Chimie & Biologie des Membranes & des Nano-objets (CBMN), UMR 5248
Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14, 33600 Pessac