

# Des modifications post-traductionnelles de la protéine tau soluble distinguent la maladie d'Alzheimer des autres tauopathies

Nathalie Kyalu Ngoie Zola<sup>1,2</sup>, Clémence Balty<sup>2</sup>, Emilien Boyer<sup>1,4</sup>, Adrian Ivanoiu<sup>1,4</sup>, Didier Vertommen<sup>3</sup>, Bernard Hanseeuw<sup>\*1,4</sup>, Marc Gobert<sup>\*5</sup>

Specific modifications of the soluble tau protein distinguish Alzheimer's disease from other tauopathies

Neurodegenerative diseases are progressive, acquired brain disorders affecting a growing number of people as populations age. Clinically, these conditions can be distinguished by different symptoms, depending on the brain region affected. Biologically, these disorders are characterized by the aggregation of certain cerebral proteins, thus being called proteinopathies. In Alzheimer's disease, amyloid proteins aggregate without causing symptoms, though this promotes symptomatic tau protein aggregation that takes place in the mesiotemporal lobe, responsible for encoding new memory information. More rarely, in atypical Alzheimer's disease, tauopathy can occur in other brain regions, inducing diverse symptoms. These atypical Alzheimer's disease cannot be diagnosed clinically without biological confirmation.

Tau protein aggregation is a hallmark shared by other neurodegenerative diseases, collectively called tauopathies. Typically, tauopathy initially occurs in brain regions distinct from the mesiotemporal lobe, which occasionally resembles Alzheimer's disease. Due to imperfect concordance between the pathology type and affected brain regions, the development of biological tools (=biomarkers) is most critical for clinical research in neurodegenerative diseases. Distinct etiological treatments may be required to cure these diseases, given that different diseases exhibit varied tau modifications leading to different aggregates upon histological analysis. Though Alzheimer's disease can now be diagnosed in vivo based on cerebrospinal fluid analysis, this is not yet the case for other tauopathies.

Cerebral histological abnormalities have enabled the classification of tauopathies based on the observation of abnormal phosphorylated 3R or 4R tau protein aggregates (3R vs. 4R denomination corresponding to the type of

**Les maladies neuro-dégénératives sont des affections cérébrales acquises et progressives touchant un nombre croissant de personnes suite au vieillissement de la population. Sur le plan clinique, elles se distinguent par différents symptômes selon les régions cérébrales touchées. Sur le plan biologique, il s'agit de protéinopathies, c'est-à-dire que ces maladies se définissent par l'aggrégation de certaines protéines cérébrales. Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine amyloïde s'agrège sans donner de symptômes, mais elle favorise l'aggrégation de la protéine tau, qui est symptomatique. Même si la tauopathie de la maladie d'Alzheimer commence typiquement dans le lobe méso-temporal responsable de l'encodage des nouvelles informations en mémoire, cette tauopathie peut rarement débiter dans d'autres régions cérébrales et donner alors d'autres symptômes. On parle de maladie d'Alzheimer atypique, dont le diagnostic clinique est impossible sans confirmation biologique.**

**D'autres maladies neuro-dégénératives se caractérisent par l'aggrégation de la protéine tau. Le terme « tauopathie » regroupe l'ensemble de ces maladies. Typiquement, elles commencent dans d'autres régions cérébrales que le lobe méso-temporal, mais rarement elles peuvent mimer une maladie d'Alzheimer. La concordance entre le type de pathologie et les régions cérébrales touchées étant imparfaite, le développement d'outils biologiques (=biomarqueurs) est critique pour la recherche clinique sur les maladies neuro-dégénératives. Cela est d'autant plus vrai que des traitements étiologiques distincts devront être vraisemblablement proposés pour guérir ces maladies car les modifications biologiques survenant sur la protéine tau diffèrent d'une maladie à l'autre (conduisant à des agrégats différents lors d'analyse histologique). Si la maladie d'Alzheimer peut maintenant être diagnostiquée « in vivo » sur base d'une étude du liquide céphalo-rachidien, cela n'est pas encore le cas des autres tauopathies.**

**Les anomalies histologiques cérébrales ont permis de distinguer les tauopathies sur base de l'observation d'agrégats de protéine tau anormale phosphorylée 3R ou 4R (cette dénomination 3R vs 4R correspondant au type d'isoforme de la protéine tau). Dans la maladie d'Alzheimer, tous les isoformes s'agrègent, alors que dans les autres tauopathies un seul type d'isoforme s'agrège. Malheureusement, il n'a jamais été possible de distinguer les tauopathies sur base de mesures des isoformes de tau dans le liquide céphalo-rachidien.**

tau protein isoform). In Alzheimer's disease, all isoforms do aggregate, whereas in other tauopathies only one isoform type does. Nevertheless, the distinction of tauopathies based on the sole measurement of tau isoforms in cerebrospinal fluid remains elusive.

The article focuses on a biochemical study of the tau protein and its post-translational modifications. It paves the way for confirming the diagnosis of non-Alzheimer's tauopathies during the patient's lifetime, thereby establishing a biological diagnosis. This advancement provides a better clinical understanding of these diseases, their evolution, and prognosis, both for patients and their families. In terms of research, this approach should enable the inclusion of patients into therapeutic trials at an early disease stage. This breakthrough could also provide insights into the exact role of the tau protein, linking it with genetic advancements in these diseases, for diagnosis at a pre-clinical stage. Through this study, tauopathies are entering a new era, transitioning from a post-mortem clinical-histological classification to an *in vivo* clinical-biological classification.

#### KEYWORDS

tau protein, aggregation, tauopathy, Alzheimer's disease, isoforms

La protéine tau, physiologiquement présente dans les neurones, stabilise les microtubules de leur cytosquelette axonal. Cependant, il importe également de conserver une flexibilité de ce cytosquelette afin d'assurer des capacités d'apprentissage tout au long de la vie. Deux processus sont impliqués dans cet équilibre entre stabilité et flexibilité des connexions neuronales (**Figure 1a**) : (a) la proportion variable des isoformes de la protéine tau possédant trois (tau 3R) ou quatre (tau 4R) domaines se liant aux microtubules ; par exemple, le fœtus n'exprime que des isoformes tau 3R, privilégiant ainsi la flexibilité à la stabilité ; (b) la protéine tau va être modifiée, notamment phosphorylée, après sa traduction, ce qui va la détacher des microtubules ; l'équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation de cette protéine permet de maintenir les connexions neuronales importantes, et de réorganiser celles qui le nécessitent lors d'apprentissages (1).

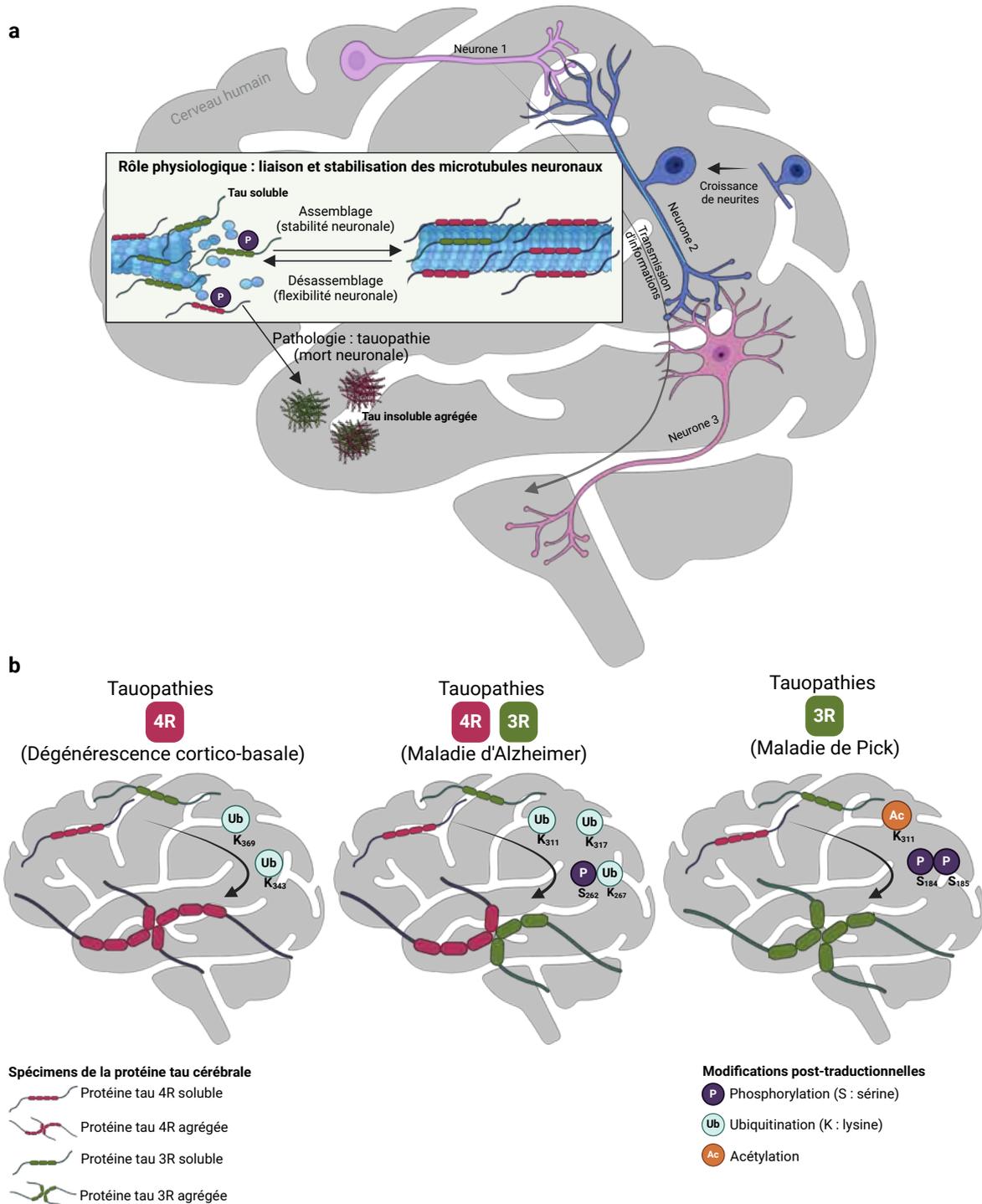
Les tauopathies représentent une vingtaine de maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation anormale de la protéine tau sous forme d'agrégats insolubles à l'intérieur des neurones et des cellules gliales du cerveau. Ces agrégats entraînent la mort des neurones atteints, aboutissant à un déclin cognitif irréversible. Bien qu'elles aient en commun l'agrégation de la protéine tau, les tauopathies diffèrent considérablement quant aux caractéristiques des agrégats (conformation, localisation

**L'article ci-dessous présente une étude biochimique de la protéine tau et de ses modifications post-traductionnelles. Elle ouvre la voie à une confirmation du diagnostic des tauopathies non-Alzheimer du vivant du patient et ainsi d'établir un diagnostic biologique. Du point de vue clinique, cela permettrait de mieux connaître ces maladies, leurs évolutions et leurs pronostics respectifs tant pour le patient lui-même que pour sa famille. Sur le plan de la recherche, elle devrait permettre de faire précocement rentrer ces patients dans des essais thérapeutiques. Cette avancée pourrait également permettre de mieux comprendre le rôle exact de la protéine tau et de l'associer aux autres avancées notamment génétiques de ces maladies afin de pouvoir peut-être les diagnostiquer ultérieurement à un stade pré-clinique. Par le biais de cette étude, les tauopathies entrent donc dans une nouvelle ère, passant progressivement d'une classification clinico-histologique post-mortem à une classification clinico-biologique « in vivo ».**

tissulaire et subcellulaire, etc.) et des régions cérébrales où la maladie prend naissance (1). En fonction des régions cérébrales touchées, les symptômes cliniques varient, et vont souvent se superposer aux stades tardifs de la maladie, ne permettant que difficilement de différencier ces tauopathies du vivant des personnes qui en sont atteintes.

Le traitement des tauopathies nécessiterait des médicaments empêchant l'agrégation de la protéine tau, ou qui induiraient l'élimination des protéines tau anormales. Or, les mécanismes biochimiques à l'origine de l'agrégation de la protéine tau ne sont toujours pas élucidés (2). Néanmoins, ils sont vraisemblablement divers, car la conformation de la protéine dans les agrégats diffère selon la tauopathie (3). Les médicaments ciblant un mécanisme hypothétique d'agrégation devront être administrés à des patients dont la maladie est déterminée avec précision, une condition difficile à remplir pour les tauopathies dites primaires (*i.e.*, autres que celle de la maladie d'Alzheimer) en raison de l'absence actuelle de biomarqueurs spécifiques. Le succès des essais thérapeutiques dépend donc d'un diagnostic différentiel non-biaisé des tauopathies, à l'échelle moléculaire et *in vivo*, ce qui permettrait de classer les patients de manière appropriée et de déterminer l'efficacité biologique de chaque médicament testé.

**FIGURE 1. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA PROTÉINE TAU CÉRÉBRALE SOLUBLE SPÉCIFIQUES DU TYPE D'AGRÉGATS DANS LES TAUOPATHIES**



**a)** La protéine tau est physiologiquement présente dans les neurones, où elle est directement impliquée dans la stabilisation et la polymérisation des microtubules, nécessaire à la croissance des neurites établissant des connections inter-neuronaux pour la transmission des influx nerveux. Il existe deux groupes d'isoformes de la protéine, 4R et 3R, les isoformes 4R étant plus affines pour le microtubule, qu'elles stabilisent davantage, tandis que les isoformes 3R favorisent la flexibilité axonale. Une tauopathie implique le détachement de la protéine tau des microtubules, suivi de l'accumulation de celle-ci sous la forme d'agrégats insolubles, qui provoquent la mort des neurones. **b)** Les tauopathies sont classifiées en fonction des isoformes de la protéine tau qui s'agrègent : 4R-exclusives, mixtes 4R/3R ou 3R-exclusives. L'analyse post mortem, par spectrométrie de masse, des protéines tau solubles et agrégées après leur isolement et ségrégation à partir de cerveaux de personnes atteintes de tauopathies a montré que certaines modifications post-traductionnelles de la protéine tau soluble étaient spécifiques des tauopathies 4R (Ub-K<sub>369</sub> et Ub-K<sub>343</sub>), 3R (Ac-K<sub>311</sub> et P-S<sub>184</sub>+P-S<sub>185</sub>) et mixte 3R/4R (Ub-K<sub>267</sub>+P-S<sub>262</sub>, Ub-K<sub>317</sub> et Ub-K<sub>311</sub>), malgré des quantités d'isoformes 4R et 3R de la protéine soluble similaires dans tous les types de tauopathies.

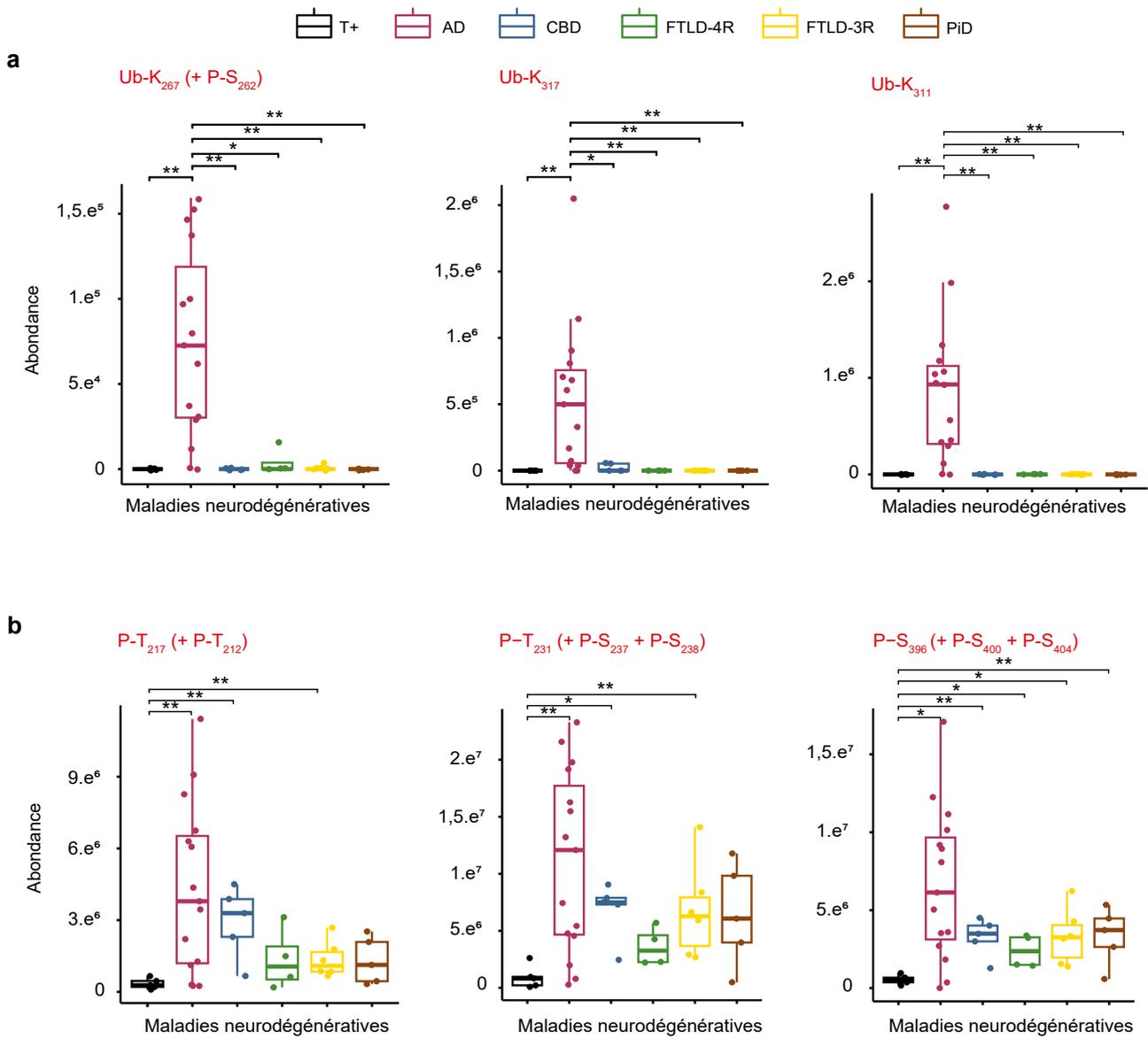
La maladie d'Alzheimer peut être diagnostiquée *in vivo* par la détection d'une diminution de la concentration en peptide amyloïde  $\beta$  et d'une augmentation des concentrations en protéine tau et en protéine tau phosphorylée sur son résidu thréonine en position 181 (P-T<sub>181</sub>) dans le liquide cébrospinal. Dans les autres tauopathies, l'augmentation des concentrations en protéine tau dans le liquide cébrospinal est variable (4), et le diagnostic final repose actuellement sur l'examen neuropathologique du cerveau *post mortem*. À l'autopsie, les tauopathies sont classifiées en fonction des isoformes de la protéine tau présentes dans les agrégats. En effet, le cerveau humain adulte présente six isoformes différentes de cette protéine, dont trois sont qualifiées de « tau-3R » et trois autres de « tau-4R » (5) selon le nombre de répétitions du domaine de liaison aux microtubules. Dans la maladie d'Alzheimer, les agrégats sont constitués d'isoformes 3R et 4R : elle est donc classifiée comme tauopathie 3R/4R. La dégénérescence cortico-basale et la paralysie supra-nucléaire progressive sont des tauopathies 4R, tandis que la maladie de Pick est une tauopathie 3R. Enfin, dans les démences fronto-temporales dues à la protéine tau, les agrégats sont le plus souvent soit 3R, soit 4R (6).

Plusieurs chercheurs ont tenté de différencier les tauopathies par la mesure des isoformes 3R et 4R de la protéine tau dans le liquide cébrospinal, mais cette stratégie s'est avérée inopérante (7, 8). De plus, depuis la découverte de la protéine tau, les seuls travaux ayant mis en évidence des différences moléculaires entre les tauopathies ont été réalisés sur la protéine tau insoluble (*i.e.*, sur les agrégats) provenant du cerveau des personnes après leur décès. En faisant l'hypothèse que ce sont les caractéristiques moléculaires de la protéine tau cérébrale soluble, et non des agrégats, qui représenteraient le mieux celles de la protéine tau dans le liquide cébrospinal, et que les processus pathologiques conduisant à l'agrégation sont à rechercher sur la protéine soluble, nous avons analysé des échantillons de tissu cérébral prélevés *post mortem* sur des sujets témoins et des sujets atteints de tauopathie mixte 3R/4R (maladie d'Alzheimer), 3R (maladie de Pick), 4R (dégénérescence cortico-basale), ou de démence fronto-temporale due à la protéine tau, en utilisant la chromatographie en

phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour la distinction des protéines tau soluble et insoluble. Après ségrégation des protéines solubles et insolubles, ces fractions ont été analysées par spectrométrie de masse, et nous y avons déterminé les quantités des isoformes 3R et 4R, et les modifications post-traductionnelles de la protéine tau (9).

Cette analyse a d'abord montré que la différence de quantités des isoformes 3R et 4R de la protéine tau dans les agrégats selon les tauopathies, que nous avons confirmée, n'existe pas pour la protéine soluble (**Figure 1b**). Pour celle-ci, il n'y avait pas de différence significative entre les tauopathies, ni avec le groupe témoin, ce qui explique l'échec des tentatives précédentes de différenciation 3R/4R des tauopathies par l'analyse du liquide cébrospinal (qui ne contient pas d'agrégats de la protéine). Nous nous sommes alors intéressés aux modifications post-traductionnelles de la protéine tau, principalement dans la fraction soluble, afin de déterminer si elles pouvaient permettre de prédire le type d'isoformes retrouvées dans les agrégats, et donc de caractériser la maladie. Nous avons ainsi mis en évidence l'existence de modifications post-traductionnelles de la protéine tau soluble spécifiques des tauopathies 4R (ubiquitination sur les résidus lysine 343 [Ub-K<sub>343</sub>] et 369 [Ub-K<sub>369</sub>]) et des tauopathies 3R (acétylation sur le résidu lysine 311 [Ac-K<sub>311</sub>] et double-phosphorylation sur les résidus sérine 184 et 185 [P-S<sub>184</sub>+P-S<sub>185</sub>]). Cette analyse a également révélé qu'il existe des modifications post-traductionnelles de la protéine tau soluble spécifiques de la maladie d'Alzheimer, et qu'on ne retrouve pas dans d'autres tauopathies (**Figure 2a**), contrairement à d'autres modifications post-traductionnelles récemment utilisées comme biomarqueurs de cette maladie (P-T<sub>217</sub>, P-T<sub>231</sub>, P-S<sub>396</sub>), qui permettent effectivement de distinguer les personnes atteintes de la maladie des personnes qui ne le sont pas, mais pas des personnes atteintes d'autres tauopathies (**Figure 2b**). Toutes ces modifications post-traductionnelles de la protéine tau nouvellement identifiées constituent donc autant de marqueurs moléculaires à analyser dans le liquide cébrospinal des patients pour un diagnostic différentiel *in vivo* des tauopathies, incluant la maladie d'Alzheimer.

FIGURE 2. BIOMARQUEURS SPÉCIFIQUES ET NON-SPÉCIFIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER DANS LA PROTÉINE TAU SOLUBLE



Les modifications post-traductionnelles de la protéine tau cérébrale soluble spécifiques de la maladie d'Alzheimer (**a**) et celles ne permettant pas de distinguer cette maladie des autres tauopathies (**b**) sont numérotées en fonction de l'isoforme de protéine tau ayant la séquence d'acides aminés la plus longue (2N4R). Chaque « boîte à moustaches » représente une maladie neurodégénérative. La ligne horizontale au sein de la boîte marque la valeur médiane (50<sup>ème</sup> percentile), tandis que la boîte est délimitée par les 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> percentiles des données (abondances des modifications post-traductionnelles correspondant à l'aire sous la courbe des chromatogrammes d'ions extraits par la technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les « moustaches » marquent les 5<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentiles des données, et les valeurs situées en dehors de ces limites sont considérées comme aberrantes. **a**) Les modifications post-traductionnelles Ub-K<sub>267</sub> (lorsqu'associée à P-S<sub>262</sub>), Ub-K<sub>317</sub> et Ub-K<sub>311</sub> de la protéine tau soluble étaient présentes exclusivement dans le groupe « maladie d'Alzheimer » (AD) et absentes dans tous les autres groupes de tauopathies (CBD, PiD, FTLD). **b**) Les modifications post-traductionnelles de la protéine tau soluble P-T<sub>217</sub> (associée à P-T<sub>212</sub>), P-T<sub>231</sub> (associée à P-S<sub>238</sub> et/ou P-S<sub>237</sub>) et P-S<sub>396</sub> (associée à P-S<sub>400</sub> et/ou P-S<sub>404</sub>) étaient significativement plus abondantes dans toutes les tauopathies par rapport aux témoins, mais ne permettaient pas de distinguer la maladie d'Alzheimer des autres tauopathies. Les données ont été analysées par un test de Wilcoxon non-pairé (\*: P < 0,05 ; \*\*: P < 0,005 ; \*\*\*: P < 0,0005). Tous les tests statistiques étaient bilatéraux. S : sérine ; T : thréonine ; K : lysine ; Ub- : ubiquitination ; P- : phosphorylation ; Ac- : acétylation ; Me- : mono-méthylation ; AD : maladie d'Alzheimer (n = 15 échantillons biologiquement indépendants) ; CBD : dégénérescence cortico-basale (n = 5 échantillons biologiquement indépendants) ; PiD : maladie de Pick (n = 5 échantillons biologiquement indépendants) ; FTLD : dégénérescence du lobe fronto-temporal (n = 10 échantillons biologiquement indépendants comprenant des FTLD-4R, n = 4 et des FTLD-3R, n = 6) ; T+ : sujets témoins (n = 5 échantillons biologiquement indépendants).

## RÉFÉRENCES

1. Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull.* 2016 ; 126 : 238-92.
2. Seidler PM, Boyer DR, Rodriguez JA, *et al.* Structure-based inhibitors of tau aggregation. *Nat Chem.* 2018 ; 10 : 170-6.
3. Shi Y, Zhang W, Yang Y, *et al.* Structure-based classification of tauopathies. *Nature.* 2021 ; 598 : 359-63.
4. Skillback T, Farahmand BY, Rosen C, *et al.* Cerebrospinal fluid tau and amyloid- $\beta$ 1-42 in patients with dementia. *Brain.* 2015 ; 138 : 2716-31.
5. Lebouvier T, Pasquier F, Buee L. Update on tauopathies. *Curr Opin Neurol.* 2017 ; 30 : 589-98.
6. Spillantini MG, Goedert M. Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 1998 ; 21 : 428-33.
7. Luk C, Compta Y, Magdalino N, *et al.* Development and assessment of sensitive immuno-PCR assays for the quantification of cerebrospinal fluid three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies. *J Neurochem.* 2012 ; 123 : 396-405.
8. Barthelemy NR, Fenaille F, Hirtz C, *et al.* Tau protein quantification in human cerebrospinal fluid by targeted mass spectrometry at high sequence coverage provides insights into its primary structure heterogeneity. *J Proteome Res.* 2016 ; 15 : 667-76.
9. Kyalu Ngoie Zola N, Balty C, Pyr Dit Ruys S, *et al.* Specific post-translational modifications of soluble tau protein distinguishes Alzheimer's disease and primary tauopathies. *Nat Commun.* 2023 ; 14 : 3706.

---

## AFFILIATIONS

- 1 Université catholique de Louvain (UCLouvain), Institut de neurosciences (IONS), Bruxelles, Belgique.
- 2 Université catholique de Louvain (UCLouvain), Institut de Duve (DDUV), Phosphorylation des protéines (PHOS), Bruxelles, Belgique.
- 3 Université catholique de Louvain (UCLouvain), Institut de Duve (DDUV), Plateforme MASSPROT, Bruxelles, Belgique.
- 4 Cliniques universitaires Saint-Luc, Département de neurologie, Bruxelles, Belgique.
- 5 Grand Hôpital de Charleroi, Charleroi, Belgique.

\* Ces auteurs ont contribué conjointement à la publication

## CORRESPONDANCE

Pr Bernard Hanseeuw  
Université catholique de Louvain (UCLouvain), Institut de neurosciences (IONS)  
Cliniques universitaires Saint-Luc  
Département de neurologie  
Avenue Hippocrate 10  
B-1200 Bruxelles  
bernard.hanseeuw@saintluc.uclouvain.be