

**EA3842 – Laboratoire Homéostasie Cellulaire et Pathologies
Groupe de Neurobiologie Cellulaire**

Thèse N° []

Thèse
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Spécialité : Biologie Cellulaire et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue par

Ludovic MARTIN

Le 15 juin 2010

**Kinases et phosphatases de la protéine tau :
stratégies de neuroprotection**

Thèse dirigée par Monsieur le Docteur Faraj TERRO

Soutenue devant le jury composé de :

**Monsieur le Professeur Jean-Pierre CLEMENT
Monsieur le Docteur Jacques TRETON
Monsieur le Professeur Marc BLONDEL
Monsieur le Docteur Benoît FUNALOT
Monsieur le Docteur François GALLET
Monsieur le Docteur Faraj TERRO**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Membre invité
Directeur**

A ma fiancée,

Remerciements

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Pierre CLEMENT (Centre Mémoire de Ressources et de Recherche, CH Esquirol, Université de Limoges) d'avoir accepté d'être le Président de ce jury.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Docteur Jacques TRETON (UMR 872, Université de Paris René Descartes) d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je suis très honoré de sa présence.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Marc BLONDEL (Unité INSERM 613, Université de Bretagne Occidentale) d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie également Monsieur le Docteur Benoît FUNALOT (Service de biochimie et génétique moléculaire, CHU Dupuytren, Université de Limoges) d'avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie de ce jury.

Je remercie particulièrement Monsieur le Docteur François GALLET (UMR1061, Université de Limoges) d'avoir accepté d'être membre invité de ce jury. Merci de m'avoir permis de finir cette thèse dans de bonnes conditions professionnelles.

J'exprime mes sincères remerciements au directeur de cette thèse, Monsieur le Docteur Faraj TERRO (EA3842, Université de Limoges), pour sa patience, son soutien et sa grande disponibilité durant ces trois années. Ses conseils avisés ont contribué à faire avancer mon travail dans la bonne direction.

Je tiens à remercier le Conseil Régional du Limousin et le Fond Social Européen pour leur soutien financier.

Merci à Madame le Professeur Catherine YARDIN et Madame le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU de m'avoir accueilli au sein de l'EA3842.

Merci à Monsieur le Docteur Eric Pinaud, pour son aide concernant la biologie moléculaire. J'ai apprécié de travailler avec toi pour tes qualités scientifiques et humaines. Merci pour le regard ô combien avisé sur mes résultats.

Merci aux personnes que j'ai côtoyées avant cette thèse et qui n'ont fait qu'accroître mon envie de faire cette thèse et de devenir chercheur. Merci à Monsieur le Docteur François BOUSSIN (Directeur de stage de mon Master 2 Recherche, CEA, Fontenay-aux-Roses), à Monsieur le Docteur Jacques TRETON (Directeur du Master 2 Biologie Cellulaire du Vieillissement, Université René Descartes - Paris V) et à Monsieur le Professeur Jean-Yves LE GUENNEC (Directeur du Master 1 Biologie Cellulaire Physiologie et Physiopathologie, Université François Rabelais de Tours).

Merci à Monsieur le Docteur Daniel RONDELAUD pour sa relecture méticuleuse de ce manuscrit et ses conseils qui m'ont été très utiles.

Merci à Madame le Docteur Françoise ESCLAIRE et à Mademoiselle le Docteur Sylvie BOURTHOUMIEU pour leurs conseils au cours de cette thèse. Merci à Sylvie d'évoquer les « stratégies » à mettre en œuvre pour l'après thèse.

Merci à Madame le Docteur Cornelia WILSON pour les conseils sur les hsiRNA.

Merci à Madame Françoise FORESTIER d'améliorer au quotidien le fonctionnement du laboratoire et pour sa relecture attentive du manuscrit de thèse.

Merci à Amandine pour ta bonne humeur et ta présence quotidienne pendant ces trois années. Merci à Marion (pour les PCRs des souris tau) et Charlotte (pour les composés 5, 9, 18...), respectivement « thésarde » et stagiaire au laboratoire. Merci aux « thésards » du 2^{ème} étage qui ont toujours pu nous dépanner d'un réactif ou deux : Cynthia, Elodie, Marie-Claude, Mathilde...

Merci à ma famille pour son soutien et sa compréhension vis-à-vis de mon domaine et l'intérêt de mon travail. Merci d'avoir cru en moi, ainsi qu'en mes projets passés, actuels et à venir...

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
Abréviations.....	6
PRESENTATION GENERALE.....	10
INTRODUCTION	13
I. Maladie d'Alzheimer	14
A. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer.....	14
B. Facteurs influençant la maladie d'Alzheimer.....	14
1. Facteurs de risque	14
2. Facteurs protecteurs	15
C. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer	15
D. Traits histopathologiques de la maladie d'Alzheimer.....	16
E. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.....	18
1. Hypothèse de la cascade β -amyloïde	18
2. Hypothèse de la dégénérescence du cytosquelette neuronal.....	19
3. Vision intégrée des 2 hypothèses de la maladie d'Alzheimer	19
II. Protéine tau	21
A. Régulations de tau	23
1. Interactions protéiques de tau	23
2. Modifications post-traductionnelles de tau	23
➤ Phosphorylation.....	24
➤ Glycosylation.....	25
➤ Clivage.....	26
➤ Nitration.....	27
➤ Ubiquitinylation	28
➤ Glycation	28
➤ Polyamination	29
➤ Prolyl-isomérisation	29
B. Tau et neurotoxicité.....	30
C. Tau et maladie d'Alzheimer	31
D. Agrégation de tau	32
E. Souris transgéniques pour tau	34
F. Stratégies thérapeutiques contre la maladie d'Alzheimer	37
1. Stratégies thérapeutiques contre l'A β	37
➤ Approche pharmacologique	37
➤ Approche immunologique	37
2. Stratégies thérapeutiques modulant l'A β	38
3. Stratégies thérapeutiques basées sur le blocage de la pathologie de tau.....	38
III. Kinases de tau.....	40
A. Proline-Directed Protein Kinase.....	41
1. Glycogen Syntase Kinase-3 β	41
➤ Régulations de la GSK3 β	43
➤ Tau, substrat de la GSK3 β	49

➤	GSK3β, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	50
➤	Inhibition pharmacologique de la GSK3β	52
2.	Cyclin-Dependent Kinase 5	55
➤	Tau, substrat de la CDK5	56
➤	CDK5, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	57
➤	Inhibition pharmacologique de la CDK5	58
3.	Mitogen-Activated Protein Kinases	60
A.	p38.....	60
➤	Tau, substrat de la p38	61
➤	p38, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	61
➤	Inhibition pharmacologique de la p38.....	62
B.	Erk1/2.....	62
➤	Tau, substrat d'Erk1/2.....	62
➤	Erk1/2, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer.....	63
➤	Inhibition pharmacologique d'Erk1/2.....	63
C.	JNK1/2/3.....	64
➤	Tau, substrat de la JNK1/2/3.....	64
➤	JNK1/2/3, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	64
➤	Inhibition pharmacologique des JNK1/2/3	65
B.	Non-Proline-Directed Protein Kinase	65
1.	Tau-TuBulin Kinase 1/2	66
➤	Tau, substrat des TTBK1/2	66
➤	TTBK1/2, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer.....	67
➤	Inhibition pharmacologique des TTBK1/2	67
2.	Casein Kinases 1α/1δ/2.....	67
➤	Tau, substrat des CK1α/1δ/2	68
➤	CK1α/1δ/2, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	69
➤	Inhibition pharmacologique des CK1α/1δ/2	70
3.	Dual-specificity tYrosine phosphorylation and Regulated Kinase 1/2.....	71
➤	Tau, substrat des DYRK1/2.....	72
➤	DYRK1/2, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	73
➤	Inhibition pharmacologique des DYRK1/2.....	74
4.	Microtubule Affinity-Regulating Kinase.....	74
➤	Tau, substrat des MARKs	75
➤	MARKs, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	76
➤	Inhibition pharmacologique des MARKs.....	76
5.	Kinase Phosphorylase	76
➤	Tau, substrat de la KP	77
➤	KP, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	77
➤	Inhibition pharmacologique de la KP.....	77
6.	Protein Kinases A/B/C/N.....	78
➤	Tau, substrat des PKA/B/C/N.....	79
➤	PKA/B/C/N, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	81
➤	Inhibition pharmacologique des PKA/B/C/N	83
7.	Ca ²⁺ Calmodulin-dependent protein Kinase II.....	84
➤	Tau, substrat de la CaMKII	84
➤	CaMKII, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	85
➤	Inhibition pharmacologique de la CaMKII	85
C.	Tyrosine-specific Protein Kinases.....	86
1.	Src Family Kinases	86
➤	Tau, substrat des kinases des SFKs	87

➤	SFKs, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	88
➤	Inhibition pharmacologique des SFKs.....	89
2.	c-Abl	89
➤	Tau, substrat de c-Abl	90
➤	C-Abl, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer.....	90
➤	Inhibition pharmacologique de c-Abl	91
D.	Conclusions sur les kinases de tau et l'hyperphosphorylation de tau	92
IV.	Phosphatases de tau	93
A.	PhosphoProtein Phosphatases	94
1.	Protein Phosphatase-1	94
➤	Tau, Substrat de la PP1	95
➤	PP1, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	95
➤	Inhibition pharmacologique de la PP1.....	95
2.	Protein Phosphatase-2A	96
➤	Tau, substrat de la PP2A	98
➤	PP2A, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	98
➤	Inhibition pharmacologique de la PP2A	100
3.	Protein Phosphatase-2B	101
➤	Tau, substrat de la PP2B	101
➤	PP2B, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	102
➤	Inhibition pharmacologique de la PP2B.....	102
4.	Protein Phosphatase-5	103
➤	Tau, substrat de la PP5	103
➤	PP5, apoptose et maladie d'Alzheimer.....	103
➤	Inhibition pharmacologique de la PP5.....	104
B.	Protein Tyrosine Phosphatases.....	104
1.	Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10	104
➤	Tau, substrat de PTEN.....	105
➤	PTEN, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer	105
➤	Inhibition pharmacologique de PTEN	105
2.	Cell Division Cycle 25	106
➤	Tau, substrat de la Cdc25.....	106
➤	Cdc25, apoptose neuronale et maladie d'Alzheimer.....	106
➤	Inhibition pharmacologique de la Cdc25	107
C.	Conclusions sur les phosphatases de tau et l'hyperphosphorylation de tau	107
V.	Kinases et phosphatases de tau : interconnections.....	109
VI.	Objectifs de l'étude	111
MATERIEL ET METHODES.....		112
I.	Cultures corticales d'embryons de rattes et de souris.....	113
II.	Cultures des neuroblastomes.....	114
A.	Neuroblastome de rat B104.....	114
B.	Neuroblastome humain SH-SY5Y	114
III.	Transfections des lignées de neuroblastomes.....	115
A.	Vecteurs utilisés	115
1.	Vecteurs permettant la sur-expression moléculaire de GSK3 β	115
2.	Vecteurs permettant l'inhibition moléculaire de GSK3 β	116
3.	Vecteur permettant la co-transfection	117
B.	Transformations vectorielles	118
1.	Vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β : transformation par choc thermique.....	118
2.	Vecteurs mU6-pro-GSK3 β : transformation par électroporation	118
C.	Amplification et extraction des ADN plasmidiques	119

1.	Vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β	119
2.	Vecteurs mU6-pro-GSK3 β et de co-transfection.....	120
D.	Restriction enzymatique des ADN plasmidiques.....	120
1.	Vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β	121
2.	Vecteurs mU6-pro-GSK3 β et de co-transfection.....	122
E.	Extraction et précipitation des ADN plasmidiques linéarisés.....	123
1.	Vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β	123
2.	Vecteurs mU6-pro-GSK3 β et de co-transfection	123
F.	Transfections stables et transitoires des lignées de neuroblastome.....	124
G.	Lignées monoclonales stables	125
IV.	Traitements pharmacologiques	125
V.	Western-blotting	126
A.	Extraction protéique	126
B.	Dosage et dénaturation protéiques	126
C.	Electrophorèse protéique sur gel de polyacrylamide	126
D.	Transfert protéique semi-sec sur membrane de polyfluorure de vinylidène.....	127
E.	Saturation des sites antigéniques aspécifiques et immunomarquage.....	128
F.	Immunodétection.....	129
VI.	Immunofluorescence	129
VII.	Souris invalidées pour tau	130
A.	Production des souris	130
B.	Génotypage des souris invalidées pour tau	131
1.	Extraction d'ADN.....	131
2.	Réaction en Chaîne par Polymérase : PCR.....	131
RESULTATS	133
I.	La régulation des niveaux de tau dans les cultures corticales primaires de rats embryonnaires est dépendante de la GSK3 β	134
A.	Le lithium et le 6-BIO diminuent de façon dose-dépendante le niveau de protéines tau totales.....	135
B.	Le lithium inhibe de façon dose-dépendante l'activité de la GSK3 β <i>via</i> la phosphorylation en S9.....	137
C.	L'inhibition de la CDK5 par la (<i>R</i>)-roscovitine déphosphoryle tau sans affecter le niveau total de protéines tau.....	138
D.	L'inhibition de la PP2A par l'OKA prévient la diminution de tau induite par le lithium	139
E.	L'inhibition de la PP2B par le FK506 ne bloque pas la diminution de tau induite par le lithium	140
F.	L'inhibition moléculaire de la GSK3 β par hsiRNA induit la diminution des niveaux de tau	142
G.	La sur-expression moléculaire de la GSK3 β induit une augmentation des niveaux de tau	145
H.	Conclusions : la GSK3 β et la PP2A sont sélectivement impliquées dans la régulation des niveaux protéiques de tau	148
II.	La suppression endogène de tau bloque l'apoptose induite par l'OKA.....	149
III.	La phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par le blocage de la PP2A impliquent sélectivement la GSK3 β , et non la CDK5 ou la DYRK1A	151
A.	L'OKA induit la phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale	152
B.	Le lithium prévient les augmentations de la phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA	155

C.	Le 6-BIO prévient les augmentations de la phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA	157
D.	Le 6-BIBE0, un dérivé non toxique de 6-BIO, prévient les augmentations de la phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induite par l'OKA.....	159
E.	Les inhibitions de DYRK1A par l'harmine et celles de CDK5 par la (<i>R</i>)-roscovitine ou par son dérivé (<i>R</i>)-CR8 ne bloquent pas l'apoptose neuronale induite par l'OKA..	161
F.	L'inhibition moléculaire de la GSK3 β par hsiRNA induit le blocage de l'apoptose neuronale induite par l'OKA.....	163
G.	Conclusions : la GSK3 β est spécifiquement impliquée dans l'apoptose neuronale induite par l'OKA.....	165
IV.	6-BIDECO et 6-BIMYEO, deux nouvelles indirubines bloquent la phosphorylation de tau et l'apoptose induite par l'inhibition de la PP2A.....	166
A.	6-BIDECO bloque l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA.....	167
A.	6-BIMYEO bloque l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA.....	169
B.	6-BIMYEO est plus efficace que 6-BIDECO pour bloquer l'apoptose induite par l'OKA.....	171
C.	Conclusions : l'utilisation des dérivés du 6-BIO, 6-BIDECO et 6-BIMYEO est efficace dans le blocage de l'apoptose induite par l'OKA.....	173
	DISCUSSION	174
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	180
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	182
	ANNEXES.....	236

ABRÉVIATIONS

A.a. : Acides aminés

AATYK1A : Apoptosis-Associated TYrosine Kinase 1A

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGE : Age End Products

AICD : A β PP IntraCellular Domain

AINS : Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens

AIP : Autocatmide-related Inhibitory Peptide

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

APC : Adenomatous Polyposis Coli

APH-1 : Anterior PHarynx-defective 1

APP : Amyloid Precursor Protein

APS : Ammonium Per-Sulfate

ARN : Acide RiboNucléique

ARNi : ARN interférents

ARNm : ARN messenger

ASP1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1

ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated-kinase

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATR : ATM/rad 3 Related Kinase

BACE1 : β -site APP-Cleaving Enzyme 1

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BCR : Breakpoint Cluster Region

BET : Bromure d'ETHidium

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BSA : Bovine Serum Albumine

CalyA : Calyculine A

CaMKII : Ca²⁺/CalModulin Kinase II

CaMKK : CalModulin Kinase Kinase

Cdc25A/B : Cell division cycle 25A/B

CDK1/2/5 : Cyclin-Dependent Kinase 1/2/5

CI50 : Concentration d'inhibition à 50 %

CK1 α /1 δ /2 : Casein Kinase 1 α /1 δ /2

COS-7 : African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell line

CREB : cAMP Response Element Binding

CsA : Cyclosporine A

DARPP-32 : Dopamine and cAMP-Regulated PhosphoProtein of 32 kDa

DHA : Acide DocosaHéxaénoïque

DLT : Dépression à Long Terme

DMAT : 2-diméthylamino-4,5,6,7-tétrabromo-1H-benzimidazole

DMEM/F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12

DMSO : DiMéthyl SulfOxide

DNA-PK : DNA-dependent ser/thr Protein Kinase

DNF : Dégénérescences NeuroFibrillaires

DO : Densité Optique

Dsh : Dishevelled

DSM IV : Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, fourth edition

DTT : 1,4 DiThioeryThritol

DYRK1A : Dual-specificity tYrosine phosphorylated and Regulated Kinase 1A

EDTA : Ethylène diamine tétraacétique

EiF2B : Eukaryotic initiation Factor 2B
Erk1/2 : Extracellular signal-regulated kinase1/2

F_{K506} : Tacrolimus

Frat/GBP : Frequently rearranged in T-cell lymphomas/GSK-3-Binding Protein
FST : Fostriécine
FTDP-17 : Démence Fronto-Temporale avec syndrome Parkinsonien liée au chromosome 17

GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase

GFP : Green Fluorescent Protein
GS : Glycogène Synthétase
GSK3 β : Glycogène Synthétase Kinase-3 β

H₂O₂ : Péroxyde d'hydrogène

Hip-1 : Huntingtin-interacting protein-1
HRP : Horse Radish Peroxydase
hsiRNA : hairpin short interference RNA

I_{1/2}^{PP2A} : Inhibiteur endogène 1/2 de la PP2A

IR : Insulin Receptor
IRS : Insulin Receptor Substrate
IkB α : Inhibitor of NF κ B α
IkK : IkB Kinase

J_{NK} : c-Jun N-terminal Kinase

k_{Da} : kiloDaltons

KO : Knock-out
KP : Kinase phosphorylase

L_B : Luria Broth

LCMT1 : Leucine Carboxyle MéthylTransférase 1
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LRP : Low density lipoprotein Receptor-related Protein

M_{AP} : Microtubule-Associated Protein

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK : MAPK Kinase
MAPKKK : MAPKK Kinase
MAPP : Mitogen-Activated Protein Phosphatase
MARK : Microtubule Affinity-Regulating Kinase
MARKK : MARK kinase
MBD : Microtubule Binding Domain
MEK : MAP/Erk Kinase
MMAC : Mutated in Multiple Advanced Cancers
MSK : RSK-related Mitogen and Stress-activated protein Kinase
MyPhoNE : Myosin Phosphatase N-terminal Element

N_{FAT} : Nuclear Factor of Activated T-cells

NF κ B : Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells
NGF : Nerve Growth Factor
NIMA : Never In Mitosis gene A
NLS : Nuclear Localization Signal
NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

OKA : Acide OKAdaique

P70S6K : p70-S6 Kinase

p85S6K : p85-S6 Kinase

p90RSK : p90-Ribosomal S6 Kinase

PAK5 : p21-Activated Kinase 5

PAQUID : Quid des Personnes Agées

pB : Paires de Bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDPK : Proline-directed protein kinase

PEN2 : Presenilin Enhancer 2

PHF : Paire Hélicoïdale de Filaments

pI : Points Isoélectriques

Pin1 : Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1

PI3K : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PIP₂ : Phosphatidylinositol-(4,5)-diPhosphate

PIP₃ : Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triPhosphate

PKA : Protein Kinase cAMP-dependent

PKB : Protein Kinase B

PKC : Protein Kinase C

PKN : Protein Kinase N

PLT : Potentialisation à Long Terme

PME-1 : Phosphatase MéthylEstérase-1

PP1/2A/2B/3/4/5/7 : Protein Phosphatase-1/2A/2B/3/4/5/7

PPIase : Peptidyl-Prolyl Isomérase

PPM : Protéines Phosphatases dépendantes des Métaux

PPP : Protéines phosphatases à sérines-thréonines/Protéines Phosphatases à Phosphoprotéines

pRb : Protéine du rétinoblastome

PSEN1/2 : Présénilines1/2

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10

PTP : Protéines phosphatases à tyrosine

PVDF : PolyFluorure De Vinyldène

RCAN1 : Regulator of Calcineurin 1

SAMP10: Senescence- Accelerated Mouse Prone 10

SAPK : Stress-Activated Protein Kinase

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SFK : Src Family Kinase

siRNA : small interfering RNA

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

SGK : Serum/glucocorticoid-Regulated Kinase

STK11 : Serine/Threonine protein Kinase 11

SVF : Sérum de veau foetal

SV40 : Simian virus 40

TAE : Tris-acétate-EDTA

TAO : Thousand-and-one amino acid

Tau : Tubulin-associated unit

TBB : 4,5,6,7-TétraBromoBenzotriazole

TBCA : Acide TétraBromoCinnamique

TBS : Tris Buffered Saline

Tcf/Lef : T cell factor/Lymphoid enhancer factor transcription

TEMED : N,N,N',N' TETraMéthylEthylèneDiamine

TG : TransGlutaminases
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TOR : Target Of Rapamycin
TPK : Tau Protein Kinase
TPR : TétratricoPeptides Répétés
TSS : Transformation on Storage Solution
TTBK1/2 : Tau-Tubulin Kinase 1/2
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling

U_{BA} : UBiquitine-Associated domain

β -TrCP : β -Transducin repeat Containing Protein

δ CF : δ Catalytic Fragment

3_{xtg}-AD : 3x-transgenic Alzheimer's Diseases

6-BIO : 6-bromoindirubine-3'-oxime

6-BIBEO : 6-bromoindirubine-3'-(2-bromoéthyl)oxime

6-BIDECO : 6-bromoindirubine-3'-[O-(N,N-diéthylcarbamyloxy)]-oxime

6-BIMYEO : Hydrochlorure de 6-bromoindirubine-3'-[O-(2-morpholin-1-yléthyl)-oxime]

PRESENTATION GENERALE

La maladie d'Alzheimer est une pathologie dont les étiologies sont encore inconnues. Etroitement liée au vieillissement de la population, elle est caractérisée par la présence de deux traits neurohistopathologiques : les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) et les plaques séniles. Les DNFs sont des agrégats intraneuronaux composés essentiellement de protéines tau anormalement phosphorylées. Les plaques séniles sont, quant à elles, des agrégats extracellulaires de peptides β -amyloïdes.

Les facteurs influençant la maladie d'Alzheimer, les traits histopathologiques puis une vision intégrée des deux hypothèses étiologiques de la maladie d'Alzheimer (hypothèse de la cascade β -amyloïde et de la dégénérescence du cytosquelette neuronal) ainsi que les stratégies thérapeutiques de la maladie seront évoqués dans ce manuscrit.

Aujourd'hui, la plupart des stratégies thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer se sont focalisées sur le blocage de la pathologie amyloïde, alors que celles visant à interférer avec la pathologie de tau ont reçu peu d'intérêt de la part des industries pharmaceutiques. Notre travail a concerné surtout la pathologie de tau.

Dans ce manuscrit, nous avons réalisé une synthèse bibliographique concernant la protéine tau, ses modifications post-traductionnelles (en particulier la phosphorylation) et son caractère neurotoxique *per se*. Comme la phosphorylation est la modification post-traductionnelle prépondérante de tau, cette synthèse bibliographique s'intéresse en premier lieu aux acteurs de la phosphorylation : les kinases et les phosphatases de tau, leurs régulations et leurs implications dans la maladie d'Alzheimer. Plus particulièrement, nous nous intéresserons à la glycogène synthétase kinase-3 β (GSK3 β) qui phosphoryle plus de 50 % de ses sites de phosphorylation de tau.

Précédemment, le laboratoire avait montré que le lithium provoque une diminution du niveau global de tau. Cette diminution a été proposée comme stratégie thérapeutique en raison du caractère délétère de la protéine tau *per se*.

Le premier objectif de ce travail a été de déterminer si l'action du lithium est dépendante ou non de la GSK3 β et si la suppression de tau était neuroprotectrice.

Le second objectif a été de mettre au point un modèle simple *in vitro* de pathologie de tau, reproduisant l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale. Ce modèle a été basé sur l'inhibition de la phosphatase PP2A. Le but a été d'identifier la ou les kinases(s) impliquée(s) dans l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale ;

Après avoir déterminé, la ou les kinases(s) impliquée(s) dans l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale, le troisième objectif était de cribler des inhibiteurs de kinases de tau (notamment des dérivés d'indirubines, inhibiteurs de la GSK3 β) qui auraient un potentiel neuroprotecteur dans notre modèle *in vitro* de pathologie de tau.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé des approches pharmacologique et moléculaire dans des cultures de neurones primaires en culture, de lignées de neuroblastome ou de souris invalidées pour tau.

Suite à la présentation de résultats significatifs, nous discuterons ensuite les résultats et de leur intérêt dans la proposition de nouvelles stratégies thérapeutiques contre la maladie d'Alzheimer et les autres tauopathies. Enfin, nous proposons quelques perspectives quant aux suites de ce travail.

INTRODUCTION

I. MALADIE D'ALZHEIMER

A. EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer, décrite le 4 novembre 1906 lors de la « 37^{ème} conférence des psychiatres allemands du sud-ouest » à Tübingen par le Docteur Aloïs Alzheimer (Alzheimer, 1907, 1911), est une pathologie liée à l'avancée vers le grand âge (Maurer et al., 1997).

Près de 99 % des cas de maladie d'Alzheimer sont des formes sporadiques (survenue de la maladie après 65 ans). Seulement 1 % des formes sont familiales avec une transmission autosomique dominante. A ce jour, les gènes à pénétrance complète identifiés sont : le gène *APP* (« *Amyloid Precursor Protein* », codant pour le précurseur du peptide β -amyloïde, APP), porté par le chromosome 21 (Goate et al., 1991) et ceux de la *préséniline 1* (*PSEN1*) et de la *préséniline 2* (*PSEN2*), portés respectivement par les chromosomes 14q23.2 et 1q31-q42 (Levy-Lahad et al., 1995, Rogaev et al., 1995, Sherrington et al., 1995). Les formes sporadiques et familiales ne diffèrent que par la survenue précoce de la maladie dans les formes familiales (entre 35 et 60 ans). La maladie d'Alzheimer se développe pendant plusieurs années, mais sa progression est variable d'un individu à l'autre. Une fois déclarée, l'espérance de vie est de 8 à 12 ans.

B. FACTEURS INFLUENÇANT LA MALADIE D'ALZHEIMER

Des facteurs influençant la maladie d'Alzheimer ont été identifiés et ce, principalement par l'étude PAQUID (Quid des Personnes Agées ; (Dartigues et al., 1992)).

1. FACTEURS DE RISQUE

Les facteurs de risque de maladie d'Alzheimer sont uniquement des indices pronostiques et ne peuvent en aucun cas être utilisés comme biomarqueurs. Parmi eux figurent :

- L'avancée vers le grand âge (Letenneur et al., 1993),
- Les faibles niveaux d'études et d'activités sociales (Dartigues et al., 1992, Fabrigoule, 2002),
- Le célibat (Helmer et al., 1999),

- Les facteurs de risques cardiovasculaires (hypertension artérielle, diabète, obésité) (Forette et al., 1998, Vogel et al., 2006),
- Le sexe, les femmes ont plus de risque d'être atteintes de la maladie d'Alzheimer après 80 ans (Letenneur et al., 1999),
- Les antécédents familiaux de maladie d'Alzheimer,
- La présence de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E, protéine transportant le cholestérol (cet allèle influence plus particulièrement le niveau cognitif durant la vie entière) (Corder et al., 1993, Strittmatter et al., 1993, Winnock et al., 2002),
- La consommation d'eau contenant des fortes teneurs en aluminium et en silice (Rondeau et al., 2009).

2. FACTEURS PROTECTEURS

D'autres facteurs ont été étudiés et observés comme protecteurs de la maladie d'Alzheimer. Parmi ceux-ci, figurent :

- La consommation modérée d'alcool (250 à 500 mL de vin rouge par jour), probablement *via* un effet antioxydant ou un effet sur le métabolisme lipidique (Orgogozo et al., 1997, Lemeshow et al., 1998),
- La consommation accrue de flavonoïdes (présents dans le vin, le thé, les fruits et les légumes), *via* un effet antioxydant (Commenges et al., 2000).

C. DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Cette maladie d'évolution lente et progressive est caractérisée par 3 phases : une première phase asymptomatique, avec apparition des lésions neuropathologiques. Lui fait suite une seconde phase préclinique caractérisée par la survenue de troubles modérés de la mémoire. Enfin survient une phase de maladie avérée au cours de laquelle les troubles mnésiques s'accompagnent de troubles cognitifs d'intensité variable. A ce jour, les critères diagnostiques de la maladie d'Alzheimer sont principalement basés sur ceux du DSM IV (« Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders, fourth edition »). Outre les troubles mnésiques, l'apraxie (perte de la compréhension de l'usage des objets usuels), l'aphasie (impossibilité de traduire la pensée par les mots) et l'agnosie (trouble de la reconnaissance) constituent la triade des signes cliniques de la maladie d'Alzheimer. Lors de

l'examen neuropathologique *post mortem*, le diagnostic certain de la maladie d'Alzheimer est porté par la mise en évidence de protéines tau hyperphosphorylées. La mesure de concentrations élevées de peptides β -amyloïdes 1-42 (peptides $A\beta$) et de protéines tau hyperphosphorylées dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) peut participer au diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

D. TRAITS HISTOPATHOLOGIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Un des traits neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer est l'accumulation intraneuronale de protéines tau anormalement phosphorylées sous forme de

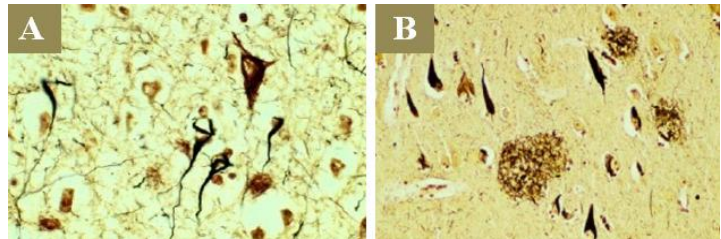


Figure 1. **Traits histopathologiques de la maladie d'Alzheimer.**
A : dégénérescences neurofibrillaires. B : plaques séniles.

dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) (Figure 1A), des filaments appariés en hélice, dits paires hélicoïdales de filaments (PHFs) (Kidd, 1963). Les protéines tau anormalement phosphorylées n'interagissent plus avec les neurofilaments et les microtubules perturbant ainsi la stabilité du cytosquelette neuronal.

Les plaques séniles (Figure 1B) sont l'autre trait neuropathologique de la maladie d'Alzheimer. Ces plaques sont extracellulaires et constituées majoritairement d'agrégats insolubles de peptides $A\beta_{42/43}$. La présence de ces protéines fibrillaires disposées en feuillets plissés pour former les plaques séniles fait de la maladie d'Alzheimer, une amylose.

L'APP est clivée par des α -, β - et γ -sécrétases (Figure 2). En conditions physiologiques, l'APP peut subir un clivage intramembranaire au sein du domaine $A\beta$ par une α -sécrétase associée à la membrane plasmique. Ce clivage de l'APP produit deux fragments : l' α -APPs (s pour soluble) en N-terminal et le fragment C83 au niveau de l'extrémité C-terminale. C83 est ensuite clivé par une γ -sécrétase, ce qui génère respectivement des fragments en C- et N-terminal nommés p3 et AICD (« $A\beta$ PP Intracellular Domain »). Cette voie est dite non-amyloïdogène car elle prévient la formation de peptide $A\beta$.

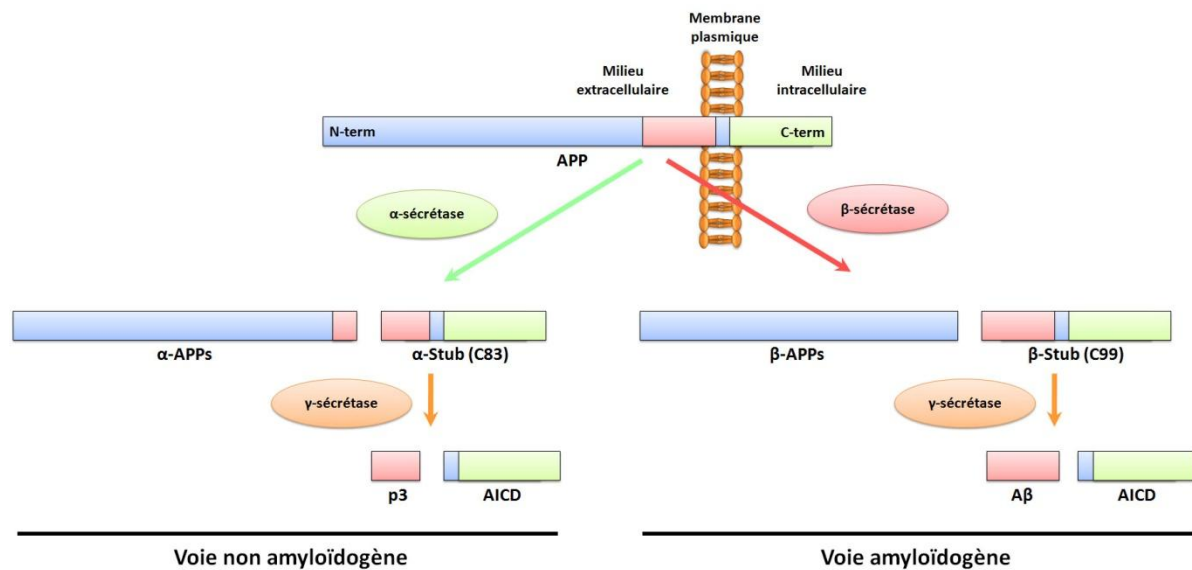


Figure 2. **Clivage protéolytique de l'APP par les sécrétases.** La voie non amyloïdogène fait intervenir 2 clivages successifs de l'APP par les α - et γ -sécrétase générant les fragments p3 et AICD. La voie amyloïdogène fait également intervenir 2 clivages successifs, mais par les β - et γ -sécrétase ce qui conduit à la formation des peptides A β et AICD. Les peptides intermédiaires α -APPs et β -APPs sont solubles et non toxiques. Ils sont libérés, comme les peptides A β , dans l'espace extracellulaire.

A *contrario*, un clivage de l'APP peut également intervenir dans la voie endolysosomale qui est dite amyloïdogène. Dans cette voie, le clivage séquentiel de l'APP est réalisé par une β -sécrétase transmembranaire nommée BACE-1 (« β -site APP-Cleaving Enzyme 1 »). Ce clivage génère la sécrétion de 2 fragments : β -APPs pour l'extrémité N-terminale et le fragment C99 pour l'extrémité C-terminale. Ce dernier est alors clivé par la γ -sécrétase, un complexe protéique composé d'au moins 4 protéines, la PSEN1, la nicastrine, l'APH-1 (« Anterior Pharynx-defective 1 ») et la PEN2 (« Presenilin Enhancer 2 »). Ce second clivage génère la sécrétion du peptide A β dans le milieu extracellulaire et le fragment AICD. Ce clivage par la γ -sécrétase est critique puisqu'il détermine la longueur du peptide A β . Selon la nature de la γ -sécrétase, elle libère, soit un peptide physiologique de 40 acides aminés (peptide A β 40), soit un peptide toxique de 42 ou 43 acides aminés (peptide A β 42/43). L'A β 42/43 est moins commun que l'A β 40 et est plus fibrillogène et neurotoxique.

Les PSEN1 et PSEN2, facteurs génétiques connus de la maladie d'Alzheimer, interagissent avec une glycoprotéine, la nicastrine, qui influence l'activité de la γ -sécrétase mais aussi de la protéine tau (Yu et al., 2000). De plus, des études ont montré que la PSEN1 s'associait avec la protéine tau (Takashima et al., 1998) ainsi qu'avec une kinase de tau, la GSK3 β (glycogène synthétase kinase-3 β). D'autre part, la mutation de la PSEN1 déstabilise la β -caténine et sensibilise les neurones à l'apoptose (Czech et al., 1998, Zhang et al., 1998).

Les étiologies précises de la maladie d'Alzheimer n'ont pas encore été établies. Cependant, deux hypothèses ont été émises : celle de la « cascade β -amyloïde » et celle de la « dégénérescence du cytosquelette neuronal ». Selon ces hypothèses, les origines de la maladie d'Alzheimer sont la conséquence d'un âge élevé, d'altérations métaboliques, de polymorphisme ou encore de facteurs génétiques tels que les mutations des gènes codant pour l'APP et les PSEN1 et 2. Celles-ci conduiraient à la perturbation de l'homéostasie cellulaire par dysfonctionnement de l'équilibre kinase-phosphatase, ce qui génère une hyperphosphorylation des protéines tau. Les protéines tau anormalement phosphophorylées n'interagissant plus avec les neurofilaments et les microtubules, perturberaient la stabilité du cytosquelette neuronal et provoqueraient une perte neuronale ainsi que les traits neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer (Figure 1).

E. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

1. HYPOTHESE DE LA CASCADE B-AMYLOÏDE

Dans l'hypothèse de la cascade β -amyloïde, le clivage de l'APP interviendrait avant l'hyperphosphorylation de tau et entraînerait une surproduction de peptides amyloïdes $A\beta_{42/43}$.

Selon cette hypothèse, le clivage de l'APP induit la surproduction toxique de peptides $A\beta_{42/43}$, provoquant une mort neuronale, une perte synaptique et l'apparition de plaques séniles. Les plaques séniles seraient une réponse adaptative de la cellule nerveuse et permettraient de séquestrer les peptides toxiques $A\beta_{42/43}$ sous forme d'agrégats insolubles, les

rendant inactifs. La présence de DNFs serait un effet périphérique de la surproduction de peptides β -amyloïde. Lorsque la cinétique de formation des plaques séniles, séquestrant les

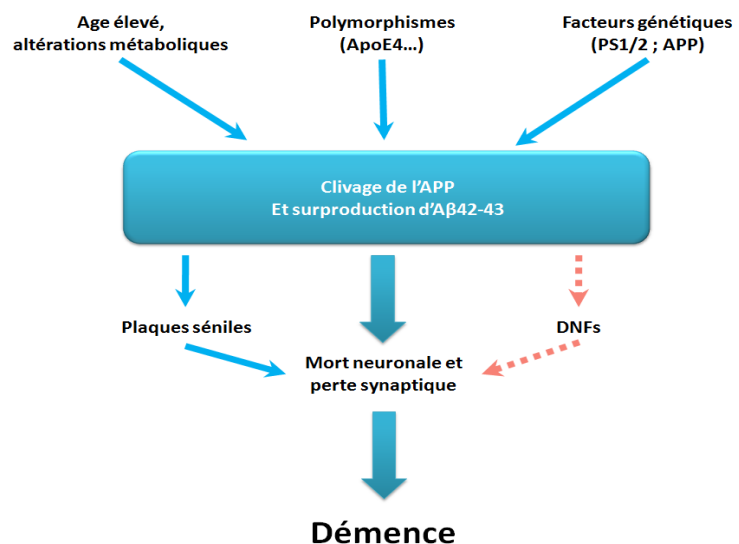


Figure 3. **Hypothèse de la cascade β -amyloïde.** Le clivage de l'APP induit la surproduction toxique de peptides $A\beta_{42/43}$, provoquant une mort neuronale, une perte synaptique et l'apparition de plaques séniles. Ces 3 phénomènes seraient à l'origine de la démence. D'après (Schenk, 2004).

peptides A β , est insuffisante pour la cellule, la mort neuronale et la perte synaptique interviendraient et génèreraient une démence (Figure 3).

2. HYPOTHESE DE LA DEGENERESCENCE DU CYTOSQUELETTE NEURONAL

Dans l'hypothèse de la dégénérescence du cytosquelette neuronal, l'inducteur initial serait une perturbation de l'équilibre entre kinases et phosphatases de tau (activation des kinases et/ou inhibition des phosphatases), ce qui génère une hyperphosphorylation des protéines tau, ce qui conduit à une déstabilisation du cytosquelette neuronal. La déstabilisation du cytosquelette provoquerait une perte synaptique, la survenue de DNFs et de plaques séniles. Les DNFs seraient une réponse adaptative de la cellule nerveuse qui permettrait de séquestrer les protéines tau anormalement phosphorylées, ce qui les empêcheraient ainsi de réguler la dynamique du cytosquelette neuronal. Lorsque la cinétique de formation des DNFs, séquestrant les protéines tau hyperphosphorylées, est insuffisante pour la cellule, la mort neuronale et la perte synaptique interviendraient et conduiraient à une démence (Figure 4).

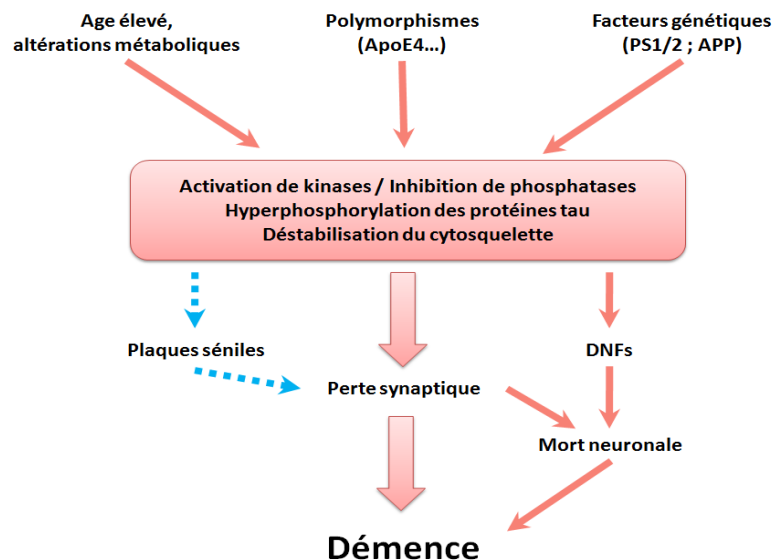


Figure 4. **Hypothèse de la dégénérescence du cytosquelette neuronal.** La perturbation de l'équilibre kinases-phosphatases induit une déstabilisation du cytosquelette neuronal, provoquant une perte synaptique et la survenue de DNFs. Ces 2 phénomènes seraient à l'origine de la mort neuronale et de la démence. Parallèlement à la perturbation de l'homéostasie cellulaire, les plaques séniles apparaîtraient. D'après (Schenk, 2004).

3. VISION INTEGREE DES 2 HYPOTHESES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Parmi les 2 hypothèses, plusieurs éléments ont été démontrés et il est fort probable que la connaissance de la maladie d'Alzheimer nécessitera une vision intégrée de ces 2 hypothèses.

Dans leur ouvrage « Du vieillissement cérébral à la maladie d'Alzheimer » (Schenk, 2004), Schenk, Leuba et Büla ont proposé une vision intégrée des 2 hypothèses de la maladie d'Alzheimer (Figure 5). Dans ce modèle, l'influence de l'environnement associée à l'avancée en âge (réduisant le seuil de tolérance à des facteurs endogènes et exogènes) sur les facteurs génétiques et le polymorphisme génétique (facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer) génèreraient le clivage de l'APP, la surproduction de peptides A β 42/43, l'hyperphosphorylation de tau, la déstabilisation du cytosquelette, une perte synaptique ainsi qu'une mort neuronale. L'ensemble de ces éléments semblent être à l'origine de la démence observée dans la maladie d'Alzheimer.

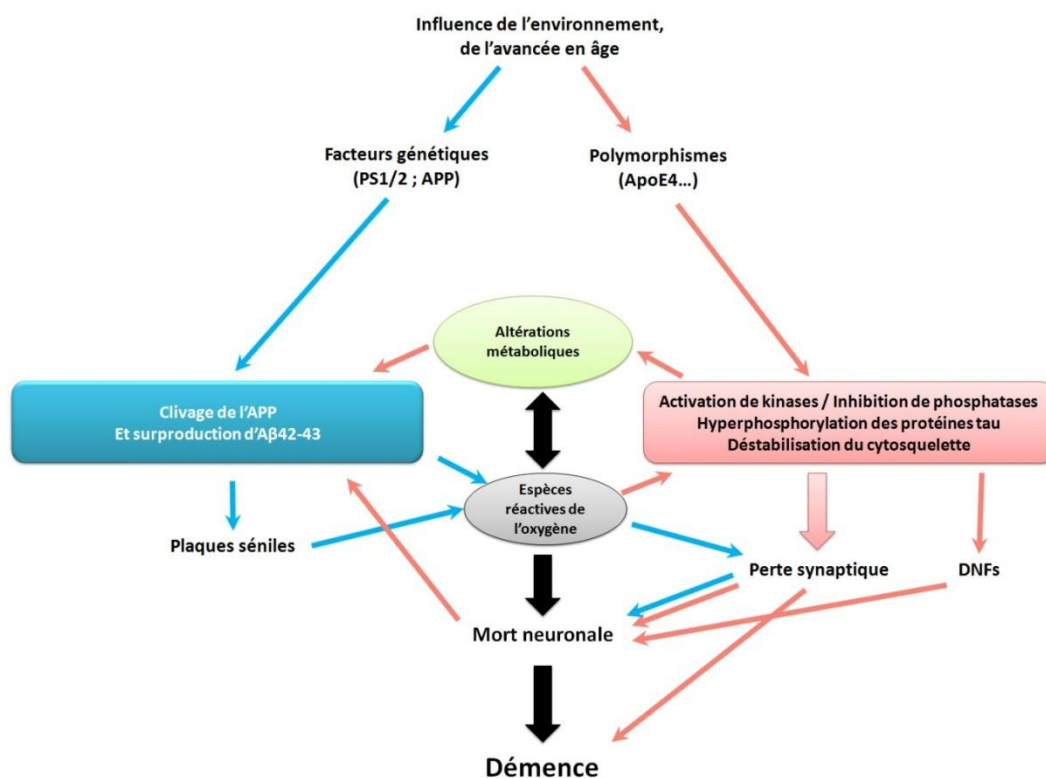


Figure 5. **Vision intégrée de la cascade neuropathologique de la maladie d'Alzheimer**. Sont représentés en bleu, les éléments appartenant à l'hypothèse de la cascade β -amyloïde et en rose, les éléments appartenant à l'hypothèse de la dégénérescence du cytosquelette neuronal. D'après (Schenk, 2004).

Selon ces hypothèses, cette vision intégrée et les connaissances actuelles concernant la maladie d'Alzheimer, il devient essentiel d'identifier les kinases et les phosphatases impliquées dans la régulation du niveau de phosphorylation de la protéine tau et de voir si certaines d'entre elles peuvent provoquer la mort cellulaire neuronale.

Ce manuscrit s'intéressera donc plus particulièrement à la protéine tau, aux kinases et phosphatases de tau ainsi qu'aux connections entre ces différentes enzymes dans la maladie d'Alzheimer.

II. PROTEINE TAU

La protéine tau (« tubulin-associated unit ») (Weingarten et al., 1975, Cleveland et al., 1977) est hautement conservée et trouvée exclusivement chez les animaux eucaryotes (Goedert et al., 1989, Cambiazo et al., 1995, Goedert et al., 1996). Tau est une protéine du cytosquelette associée aux microtubules (MAP : « Microtubule-Associated Protein »). Dans la maladie d'Alzheimer, comme la protéine tau est anormalement phosphorylée, la connaissance de sa structure, de ses modes de régulation ainsi que ses fonctions sont importantes pour appréhender cette pathologie.

La protéine tau est une phosphoprotéine découverte en 1975 (Weingarten et al., 1975). Elle est principalement exprimée dans les cellules neuronales et codée par un gène unique localisé chez l'Homme dans le locus 17q21.1 (Neve et al., 1986). Ce gène comporte 16 exons (numérotés : -1 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 4A ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13 et 14) (Andreadis et al., 1992, Andreadis et al., 1995, Buee et al., 2000). Les exons 2, 3 et 10 subissent un épissage alternatif, tandis que les exons 4A, 6 et 8 sont uniquement transcrits dans le système nerveux périphérique (SNP) (Panda et al., 2003). Chez l'Homme, dans le système nerveux central (SNC), l'épissage alternatif du transcrit primaire de tau génère 6 isoformes de 352 à 441 acides aminés ayant un poids moléculaire apparent compris entre 60 et 74 kDa (kiloDaltons) (Figure 7). La plus courte de ces isoformes est la seule exprimée chez le fœtus. Son expression persiste à l'âge adulte (Buee et al., 2000). La structure de la protéine tau est une suite de 4 domaines bien définis. La partie N-terminale est acide et constitue le domaine de projection. Elle est suivie d'une région riche en proline, d'une région basique contenant 3 ou 4 domaines de liaison aux microtubules, nommés MBDs (« Microtubule-Binding Domains »), et enfin une région basique en C-terminale (Sergeant et al., 2008).

L'absence de site donneur d'épissage sur l'exon 3 fait que celui-ci n'est transcrit que lorsque l'exon 2 est présent (Figure 6 et Figure 7). Ces exons 2 et 3 codent pour 2 inserts N-terminaux de 29 acides aminés. Le domaine de projection est un médiateur des interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette (Brandt et al., 1995) et est responsable dans la détermination du diamètre de l'axone (Chen et al., 1992). L'épissage alternatif de l'exon 10, codant pour un des MBDs, entraîne la formation d'isoformes composées de 3 ou 4 MBDs et dites 3R ou 4R (Butner and Kirschner, 1991, Buee et al., 2000). Ces domaines R (R pour répétés) sont codés individuellement par les exons 9 (R1),

10 (R2), 11 (R3) et 12 (R4). Tous contiennent un motif consensus conservé KXGS qui peut être phosphorylé sur la sérine (Lewis et al., 1988, Butner and Kirschner, 1991,

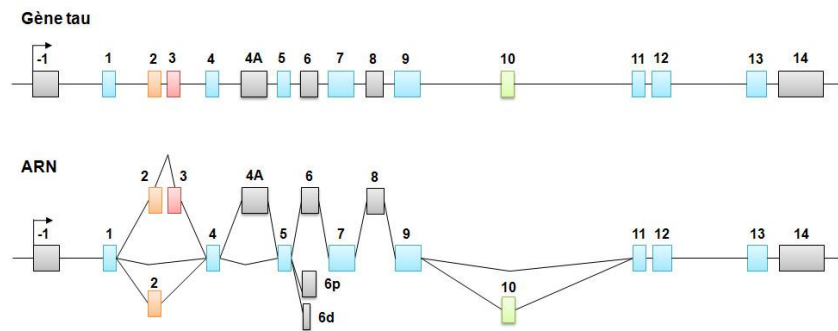


Figure 6. **Epissage alternatif de tau.** Les exons représentés en bleu sont toujours transcrits dans le SNC. Les exons figurés en noir ne sont jamais transcrits dans le SNC. Les exons 2, 3 et 10 sont soumis à l'épissage alternatif. D'après (Sergeant et al., 2008).

Drewes et al., 1995, Ozer and Halpain, 2000). Ces MBD interagissent avec les microtubules et la PP2A (Protéine Phosphatase-2A) (Buee et al., 2000).

Lors de la traduction, l'exon -1 n'est jamais présent et la séquence intronique entre les exons 13 et 14 est toujours conservée. Cette séquence fait apparaître prématurément un codon stop empêchant la traduction de l'exon 14.



Figure 7. **Schéma des 6 isoformes de la protéine tau dans le SNC.** Les 6 isoformes sont composés de 352 à 441 acides aminés (a.a.) et ont des poids moléculaires compris entre 60 et 74 kDa. En orange et marron sont respectivement représentés les exons 2, 3. En violet est indiqué le domaine de liaison aux microtubules de l'exon 10. Ces 3 exons sont soumis à un épissage alternatif. En rouge sont figurés les domaines répétés de liaison aux microtubules. En fonction de la présence de 3 ou 4 domaines répétés, les isoformes de tau sont nommées 3R ou 4R. En fonction de l'épissage ou non des exons 2 et 3, les isoformes de tau sont dites 0N (aucun insert N-terminal n'est présent), 1N (seulement l'exon 2 est présent) ou 2N (les exons 2 et 3 sont présents). D'après (Sergeant et al., 2008).

Une des particularités de tau est d'avoir des points isoélectriques (pI) de charges opposées pour ses régions N- et C-terminales ($pI_{N-term} = 3,8$ et $pI_{C-term} = 10,8$; Figure 8). Le pI des protéines tau est généralement compris entre 6,5 et 9,5 en fonction de la présence des exons 2, 3 (ce qui augmente le caractère acide de la protéine tau) ou 10 (ce qui augmente le caractère basique de la protéine tau). Comme pour toutes les autres protéines, les

différentes modifications post-traductionnelles agissent sur le pI des protéines tau (Butler and Shelanski, 1986, Sergeant et al., 2008).

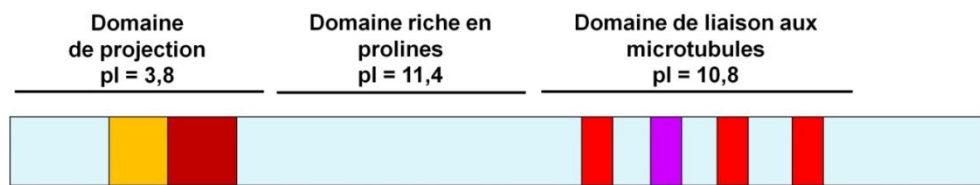


Figure 8. **Points isoélectriques de la protéine tau en fonction des domaines particuliers.** Selon la nature des domaines de projection, riches en prolines ou de liaison aux microtubules, les points isoélectriques varient et confèrent un caractère acide à la partie N-terminale et un caractère basique dans la partie C-terminale de la protéine tau. D'après (Buee et al., 2000).

A. REGULATIONS DE TAU

Les régulations de la protéine tau s'effectuent principalement par des interactions protéiques et par des modifications post-traductionnelles.

1. INTERACTIONS PROTEIQUES DE TAU

Tout comme les autres protéines associées aux microtubules (MAP1 et 2), la protéine tau régule la polymérisation et la stabilité du cytosquelette neuronal. La protéine tau est fortement exprimée dans les axones où elle régule la stabilité et l'assemblage des microtubules, par interactions avec l'actine et les microtubules (Cleveland et al., 1977, Fulga et al., 2007). Tau interagit également avec des protéines de signalisation cellulaire (Sontag et al., 1996, Agarwal-Mawal et al., 2003, Vega et al., 2008), favorise la croissance axonale et module le transport des vésicules et organelles, permettant ainsi la neurotransmission et la propagation des signaux nerveux le long du réseau formé avec les microtubules (Gendron and Petrucelli, 2009). La plus longue des isoformes humaines de tau perturbe le transport antérograde axonal et non le transport rétrograde (LaPointe et al., 2009). Cette régulation du transport axonal *via* tau est régulée par la kinase GSK3 β et la PP1 (Protéine Phosphatase-1).

2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE TAU

Les huit types de modifications post-traductionnelles de tau sont : la phosphorylation, la glycosylation, le clivage, la nitration, l'ubiquitinylation, la glycation, la polyamination et la prolyl-isomérisation.

➤ PHOSPHORYLATION

La phosphorylation est l'ajout de groupement phosphate, fourni par l'ATP, par estérification d'une sérine, thréonine ou tyrosine.

L'affinité de tau pour les microtubules est régulée par des phosphorylations au niveau de ces 3 types d'a.a. (Tableau 1 ; Figure 9). La phosphorylation de tau au niveau de la sérine

	Types de résidus			Totaux	Pourcentages
	Sérine	Thréonine	Tyrosine		
Région acide	6	13	2	21	27%
Région riche en prolines	11	8	2	21	27%
Domaines répétés	17	3	0	20	26%
Extrémité C-terminale	10	5	1	16	21%
Totaux	44	29	5	78	
Pourcentages	56%	37%	6%		

Tableau 1. **Nombres et pourcentages des sites de phosphorylation de tau selon la région ou le domaine protéique.**

du motif KXGS engendre le détachement de tau des microtubules. Les sérines impliquées sont respectivement contenues dans les domaines R1, R2, R3 et R4 et sont S262, S293, S324 et S356 (Drewes et al., 1995, Dickey et al., 2007).

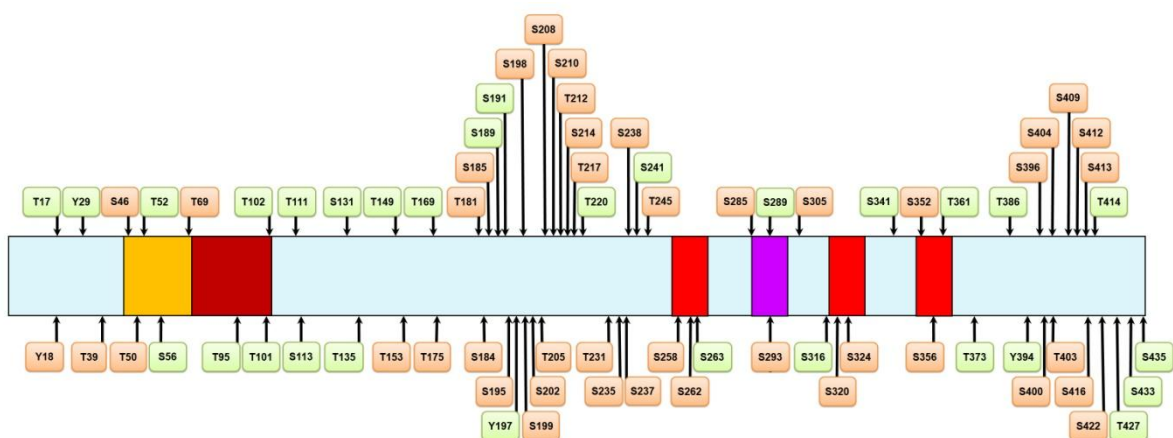


Figure 9. **Sites de phosphorylation de la protéine tau.** S : résidu sérine, T : résidu thréonine, Y : résidu tyrosine. Sont figurés en vert, les sites de phosphorylation de tau dits physiologiques ; ceux en orange sont ceux trouvés hyperphosphorylés dans les cerveaux Alzheimer et par conséquent dits pathologiques.

La phosphorylation pathologique (par opposition à la phosphorylation physiologique) de tau est un des évènements précoces de la maladie d'Alzheimer, puisqu'elle survient avant l'apparition des NFTs (Braak and Braak, 1995). La présence de phosphorylations sur les sites T231, S235 et S262 de la protéine tau contribuent respectivement à la dissociation de tau des microtubules pour 26 %, 9 % et 33 % (Sengupta et al., 1998). Les phosphorylations de tau en T231, S396 et S422 favorisent l'auto-agrégation de tau (Abraha et al., 2000, Haase et al., 2004). Particulièrement, la région

C-terminale de tau, lorsqu'elle est hyperphosphorylée, comparée aux autres régions hyperphosphorylées (domaines R et région riche en prolines) tend à augmenter considérablement l'auto-agrégation de tau (Liu et al., 2007). D'autre part, l'expression d'une protéine tau pseudo-phosphorylée (les sites de phosphorylation sont remplacés par des acides glutamiques, c'est-à-dire ne pouvant pas se lier aux microtubules), génère une apoptose neuronale (Fath et al., 2002). Ceci suggère fortement que la phosphorylation de tau est impliquée dans la mort neuronale. Parmi les nombreuses phosphorylations de tau, essentiellement celles en S199, S202, T205, T212, T231, S235, S262, S356 et S422 sont critiques pour la pathologie de tau (Gong and Iqbal, 2008, Zhang et al., 2009). Chacun des sites de tau est soumis à l'action d'une ou plusieurs protéines kinases, les sites ciblés par ces kinases seront développés dans la seconde partie de ce manuscrit.

➤ GLYCOSYLATION

La glycosylation est l'attachement covalent d'oligosaccharides aux chaînes peptidiques. Il existe 2 types de glycosylation : la N-glycosylation et l'O-glycosylation. La N-glycosylation résulte de l'attachement d'un sucre sur le groupement amine d'une asparagine.

Les protéines tau contenues dans les cerveaux Alzheimer sont essentiellement soumises à la N-glycosylation (Takahashi et al., 1999). *A contrario*, aucun résidu glycane n'est retrouvé ancré aux protéines tau des témoins (Wang et al., 1996). La glycosylation de tau inhibe la déphosphorylation de tau par la PP2A et la PP5 (Protéine Phosphatase-5) (Liu et al., 2002c). Ces données suggèrent qu'une glycosylation aberrante de tau favorise et maintient tau dans un état hyperphosphorylé, et ceci, en particulier dans les NFTs (Liu et al., 2002b).

L'O-glycosylation résulte, quant à elle, d'une fixation d'un sucre au niveau d'un groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Par conséquent, l'O-glycosylation (notamment l'O-GlcNAcylation : greffe de N-acétyl-glucosamine) régule et réduit par compétition la phosphorylation de tau (Liu et al., 2004a). Inversement à la N-glycosylation, l'O-glycosylation est retrouvée réduite chez les patients Alzheimer comparé aux témoins (Liu et al., 2004a, Gong et al., 2006). D'autre part, l'O-GlcNAcylation, induite par le Thiamet-G, un inhibiteur d'O-glycanase, réduit l'hyperphosphorylation de tau, au niveau du cortex et de l'hippocampe, aux sites T231, S396 et S422 (Yuzwa et al., 2008).

➤ CLIVAGE

Le clivage de tau en son extrémité C-terminale par la caspase-3 *in vivo* et *in vitro* génère une forme tronquée de la protéine tau au niveau d'E391 ou de D421 (Figure 10). Ces clivages augmentent

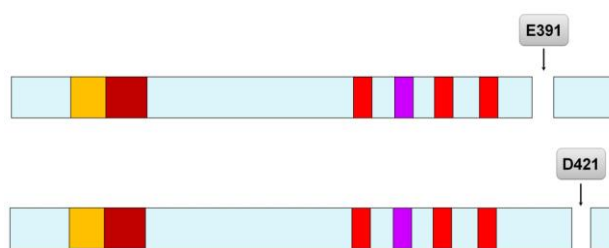


Figure 10. **Clivage protéolytique de la protéine tau.**
E391 : acide glutamique 391 ; D421 : acide aspartique 421.

la capacité d'agrégation de tau et contribue à l'exécution de l'apoptose neuronale (Chung et al., 2001, Fasulo et al., 2005, Garcia-Sierra et al., 2008).

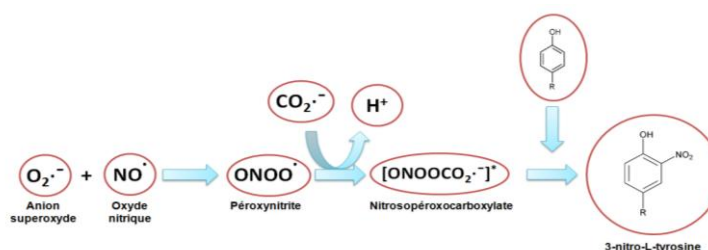
Ce clivage protéolytique de tau en D421, conduisant à la formation d'un fragment de 17 kDa, est corrélé à la déphosphorylation de l'épitope Tau-1 dans les neurones cérébelleux (Canu et al., 1998), hippocampiques (Park and Ferreira, 2005) et corticaux (Rametti et al., 2004). Ce fragment correspond aux acides aminés 45 à 230 de la partie N-terminale de tau. L'agrégation en granules de protéines tau tronquées au niveau de E391 est détectée chez les patients Alzheimer et non chez les témoins (Ugolini et al., 1997). Des protéines tau clivées en E391 sont également retrouvées dans les PHFs de patients Alzheimer (Mena et al., 1996). De même, la protéine tau clivée au niveau de D421 est associée à la neurofibrillogénèse dans les cerveaux des patients Alzheimer (Gamblin et al., 2003, Rissman et al., 2004). Ces clivages en E391 et D421 accélèrent *in vitro* la pathologie de tau (Yin and Kuret, 2006). Cependant, la cinétique d'apparition du clivage de tau dans la formation des NFTs (apparition avant ou après l'agrégation de tau) reste controversée (Guillozet-Bongaarts et al., 2005, Gendron and Petrucelli, 2009).

Outre l'activation des caspases-6, -8 et -9 (Rohn et al., 2002) chez les patients Alzheimer, le clivage de tau par les caspases effectrices, caspase-3 et caspase-7 est associé aux marqueurs précoces et tardifs des NFTs et est corrélé avec le déclin cognitif (Fasulo et al., 2000, Rissman et al., 2004). La troncation de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer entraîne plus tardivement la glycation (voir plus loin) (Ledesma et al., 1994) et l'ubiquitinylation (voir plus loin) (Perry et al., 1987, Morishima-Kawashima et al., 1993). De façon générale, l'activation des caspases, en particulier la caspase-3, aboutissant au clivage de tau et de l'APP dans les cerveaux Alzheimer, semble contribuer à la formation des peptides A β , à la perte synaptique et aux changements associés à la maladie d'Alzheimer (Gervais et al., 1999, Rohn and Head, 2009). Ce clivage de tau est également associé à

l'activation des calpaïnes (des protéines calcium-dépendantes) (Park et al., 2007, Sinjoanu et al., 2008), en particulier la calpaïne 2 est co-localisée avec les filaments de tau dans la maladie d'Alzheimer et les démences fronto-temporales (Adamec et al., 2002, Corsetti et al., 2008).

➤ NITRATION

La nitration est l'ajout du radical NO_2 (dioxyde d'azote) sur une molécule organique.



La réaction de nitration fait intervenir un anion

Figure 11. **Réaction de nitration sur une tyrosine.** D'après (Reynolds et al., 2005).

superoxyde avec un radical oxyde nitrique pour former le radical peroxy-nitrite. Après réaction avec le dioxyde de carbone, celui-ci se transforme en nitrosopéroxy-carboxylate. Ce dernier va alors ajouter un groupement NO_2 à une tyrosine (appelée alors une 3-nitrotyrosine) (Figure 11).

La nitration de tau est suggérée pour être impliquée, au même titre que l'hyperphosphorylation,

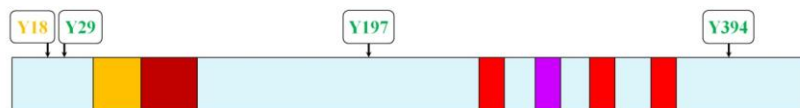


Figure 12. **Localisation des sites de nitration de tau.** Figuré en orange, site de phosphorylation pathologique de tau. Figurés en vert, sites de phosphorylation dits « normal » de tau.

dans l'agrégation de tau (Horiguchi et al., 2003). La Y29 de la protéine tau est trouvée nitrée dans la maladie d'Alzheimer (Reynolds et al., 2005). Cette nitration intervient sur les protéines tau solubles et insolubles contenues dans les PHFs (Reynolds et al., 2006b) (Figure 12). L'utilisation du peroxy-nitrite sur la lignée de neuroblastome Neuro-2A de souris entraînant à la fois la nitration et l'oxydation de ses substrats, semble indiquer que la nitration inhibe la capacité de tau à promouvoir l'assemblage de la tubuline (Reynolds et al., 2006a) et provoque l'oligomérisation de tau (Zhang et al., 2005b). De même, des injections bilatérales de 3-morpholino-sydnonimine, une source de peroxy-nitrite, dans les hippocampes de rats provoquent la nitration, l'hyperphosphorylation et l'accumulation de tau. Simultanément, la GSK3 β et la p38 sont activées (Zhang et al., 2006b). Une nitration en Y18 est également présente, mais elle est détectée aussi bien chez les patients Alzheimer que

chez les témoins (Reyes et al., 2008). Deux autres types de nitration aux Y197 et Y394 sont également observés *in vitro* sur la protéine tau (Figure 12). Elles inhibent la polymérisation mais pas l'agrégation de tau (Reynolds et al., 2005).

➤ UBIQUITINYLATION

L'ubiquitinylation est la fixation spécifique d'ubiquitine(s) sur une protéine. La protéine tau peut être ubiquitinylée et prise en charge par le système ubiquitine-protéasome (David et al., 2002). Des niveaux élevés de protéines tau ubiquitinylées sont présents dans les PHFs des cerveaux Alzheimer ainsi que dans le LCR (Iqbal and Grundke-Iqbal, 1991, Iqbal et al., 1998). Dans ces cerveaux, le niveau d'ubiquitinylation de tau est corrélé à l'accumulation protéique de tau (Riederer et al., 2009). Ce niveau d'ubiquitinylation intervient au niveau des PHFs après l'hyperphosphorylation et la glycosylation de tau (Morishima and Ihara, 1994, Iqbal et al., 1998), ce qui suggère que l'ubiquitinylation intervient secondairement dans le mécanisme physiopathologique. De plus, l'ubiquitinylation des PHFs augmente avec la maturation de ceux-ci.

➤ GLYCATION

La glycation, facteur de vieillissement accéléré des tissus, est la réaction entre un glucide et une protéine. Les protéines glyquées ne peuvent ni être détruites, ni libérées de la cellule dans laquelle elles s'accumulent. Ces protéines glyquées ne sont plus sensibles à l'oxydation et favorisent la production de radicaux libres.

Les treize sites de glycation sur les lysines de la protéine tau sont reportés dans

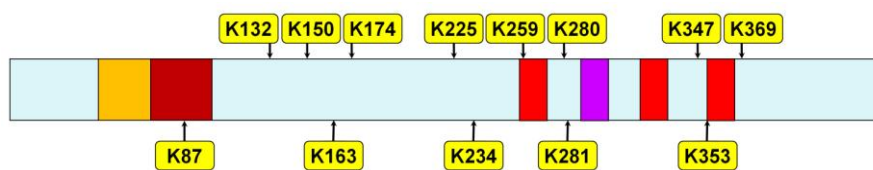


Figure 13. **Localisation des sites de glycation de la protéine tau.** K : Lysines pouvant être glyquées.

la Figure 13 (Ledesma et al., 1994, Necula and Kuret, 2004, Kuhla et al., 2007). Outre la production de radicaux libres (Yan et al., 1994), cette glycation contribue à l'absence de dégradation des protéines tau et, par conséquent, à leur accumulation pathologique ainsi que la mort neuronale (Smith et al., 1996). Des produits de glycation, AGEs : « Age End Products » sont trouvés au niveau des PHFs (Smith et al., 1994, Yan et al., 1994). Parmi les sites de glycation de la protéine tau, huit sont situés au niveau de la région des MBDs (Figure 13) (Nacharaju et al., 1997). Ces glycations diminuent l'affinité de tau pour les

microtubules. Bien que la glycation favorise la polymérisation et la stabilisation des protéines tau agrégées, celle-ci n'induit pas l'agrégation de tau (Necula and Kuret, 2004).

➤ POLYAMINATION

La réaction de polyamination ajoute plusieurs groupements amines dans une molécule organique. La polyamination d'une protéine génère un pont polypeptidique entre une glutamine et une lysine.

La polyamination par les transglutaminases (TG) est observée sur la protéine tau (Murthy et al., 1998, Tucholski et al., 1999). La formation du pont polypeptidique met en jeu un résidu donneur d'acyle, la glutamine (Q), et un résidu accepteur d'acyle, la lysine (K). Les TG co-localisent avec les NFTs (Appelt et al., 1996) et sont sur-activées dans les cerveaux Alzheimer, et ceci, plus particulièrement au niveau du cortex préfrontal (Johnson et al., 1997). Huit sites accepteurs et dix sites donneurs ont été identifiés sur la protéine tau (Figure 14). Ces sites sont respectivement localisés au niveau des Q6, Q88, Q124, Q244, Q276, Q288, Q351, Q424 et K24, K163, K174, K180, K190, K225, K234, K240, K383, K385 (Murthy et al., 1998). Le site donneur prédominant est celui en Q424 et la région acceptrice majoritaire est composée du segment K163-K240 (Figure 14).

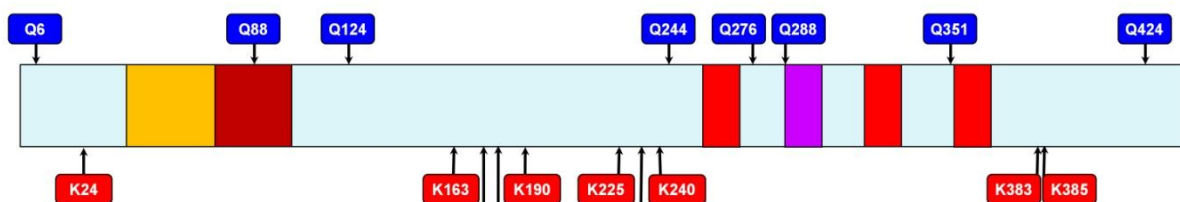


Figure 14. **Sites de polyamination de la protéine tau.** Les chiffres en bleu indiquent les glutamines donneuses d'acyle. Les chiffres en rouge indiquent les lysines acceptrices de groupement acyle. Notons qu'aucune des lysines acceptrices de groupement acyle n'est présente au niveau des domaines répétés R représentés en rouge (R1, R3 et R4) et en violet (R2). D'après (Murthy et al., 1998).

➤ PROLYL-ISOMERISATION

La prolyl-isomérisation est une réaction qui permet le réarrangement des ponts disulfures, inter-changeant ainsi la conformation de la protéine cible. Cet inter-changement se fait indifféremment d'une conformation *cis* vers une conformation *trans* ou d'une conformation *trans* vers une conformation *cis*.

La prolyl-isomérisation intervient sur un site unique de tau, le site T231 (Verdecia et al., 2000, Zhou et al., 2000, Stukenberg and Kirschner, 2001). Elle est générée par la peptidyl-prolyl-isomérase (PPIase) : Pin1 (« Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase NIMA-interacting 1 » ; NIMA : « Never In Mitosis gene A »). Pin1 reconnaît les résidus sérine ou thréonine phosphorylés suivis d'une proline (Yaffe et al., 1997), puis catalyse l'isomérisation des liaisons peptidiques (de *cis* vers *trans* ou de *trans* vers *cis*). Cette prolyl-isomérisation aurait pour but de faciliter la déphosphorylation de tau par la PP2A, qui préfère les liaisons *trans* (Zhou et al., 2000, Lavoie et al., 2003). Le seul résidu de prolyl-isomérisation situé sur la protéine tau est le premier résidu phosphorylable des MBDs (Figure 15).

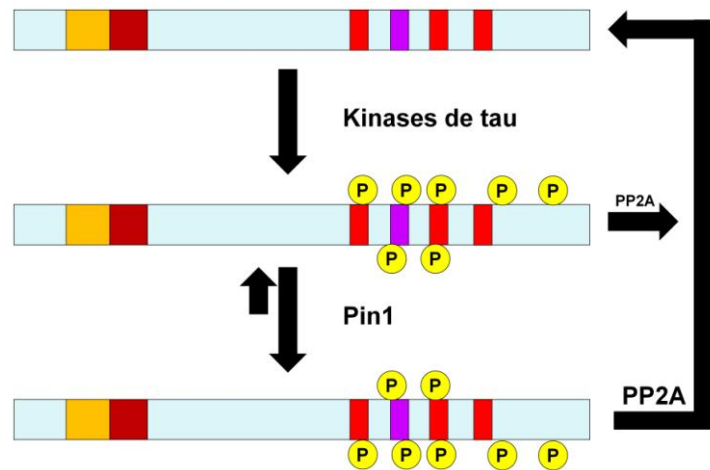


Figure 15. **Prolyl-isomérisation de tau.** Après phosphorylation de tau par diverses kinases, Pin1 tend à changer la conformation *cis* de tau en conformation *trans* pour faciliter la déphosphorylation de tau par la PP2A. D'après (Yaffe et al., 1997).

B. TAU ET NEUROTOXICITE

Indépendamment de son état de phosphorylation, la protéine tau peut être neurotoxique par elle-même. La sur-expression de protéines tau provoque une neurotoxicité *via* les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-Aspartate) (Amadoro et al., 2006). *A contrario*, la suppression de la protéine tau diminue la sensibilité à l'apoptose induite par le peptide A β (Rapoport et al., 2002). Cette suppression de tau chez des souris développant des DNFs stabilise le nombre de neurones et restaure les fonctions mnésiques (Santacruz et al., 2005). La réduction ou la suppression de la protéine tau endogène chez des souris transgéniques mimant la maladie d'Alzheimer (*via* l'expression des mutations familiales du peptide A β) prévient les déficits cognitifs sans pour autant inverser la pathologie amyloïde (Roberson et al., 2007). Ces données suggèrent que la diminution partielle du niveau de tau peut constituer une stratégie de neuroprotection, réduisant ainsi le niveau global de protéines tau et, par conséquent, celui des protéines tau hyperphosphorylées.

C. TAU ET MALADIE D'ALZHEIMER

Dans les cerveaux Alzheimer, 3 pools de protéines tau sont identifiés : une fraction cytosolique, une fraction de protéines tau anormalement phosphorylées mais solubles, et une fraction insoluble contenue dans les PHFs (Kopke et al., 1993). Ces 3 pools de protéines tau suggèrent que l'hyperphosphorylation de tau précède son agrégation en PHFs.

D'autre part, les mutations et l'hyperphosphorylation de tau tendent à augmenter la quantité d'agrégats de tau (Nuydens et al., 1995, Nacharaju et al., 1999). Lorsque la protéine tau est mutée (Figure 16), la proportion des différentes isoformes varie, ce qui a pour conséquence de diminuer la capacité de tau à se lier aux microtubules (Hong et al., 1998, Dayanandan et al., 1999), augmentant ainsi sa capacité à former des agrégats de tau (Goedert et al., 1999, Nacharaju et al., 1999, Gamblin et al., 2003). Cette combinaison de gains de fonction toxique est proposée comme cause possible de la neurodégénérescence (Yancopoulou and Spillantini, 2003). Parmi la trentaine de mutations rapportées de tau (D'Souza and Schellenberg, 2005, Deshpande et al., 2008), il existe 2 types de mutations : les mutations qui décalent le cadre de lecture et celles affectant l'épissage alternatif. Les premières génèrent des protéines tau avec des fonctions altérées, pouvant réduire la capacité de liaison de tau aux microtubules (Hasegawa et al., 1998, Hong et al., 1998, LeBoeuf et al., 2008). Les mutations affectant l'épissage alternatif (principalement celles de l'exon 10) perturbent les proportions de protéines tau contenant 3R ou 4R. Chez les patients dits « normaux », le ratio 4R/3R est de 1 tandis que chez la majorité des patients Alzheimer, ce ratio est supérieur à 1 (Hutton et al., 1998).

A l'heure actuelle, aucune mutation de gène codant pour tau n'a été identifiée dans la maladie d'Alzheimer (Gotz et al., 2007). Cependant, plusieurs mutations ont été identifiées dans certaines formes de démences, notamment les FTDP-17 (Démence Fronto-Temporale avec un syndrome Parkinsonien liée au chromosome 17). Ces mutations de tau induisent une accélération *in vitro* de l'assemblage de tau en filaments insolubles (Goedert et al., 1999, Nacharaju et al., 1999), indiquant qu'une anomalie de tau à elle seule peut être à l'origine d'une démence. Les mutations de tau répertoriées sont indiquées sur la Figure 16.

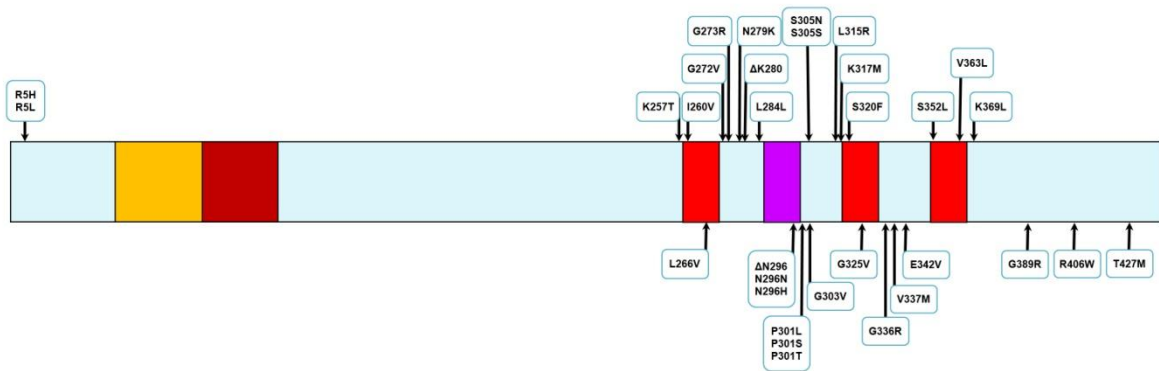


Figure 16. **Sites de la protéine tau ayant été retrouvés mutés.** D'après (Gendron and Petrucelli, 2009) et (Han and Paudel, 2009).

D. AGREGATION DE TAU

La présence d'agrégats de tau est proposée comme protecteur contre la dégénérescence neuronale. Cette neuroprotection s'effectuerait en séquestrant les protéines tau toxiques s'accumulant dans des conditions pathologiques (Lee et al., 2005). Bien que l'agrégation de tau puisse résulter de l'intervention de plusieurs kinases (Nuydens et al., 1995), la GSK3 β est requise et suffisante pour l'agrégation de tau (Rankin et al., 2007, Sahara et al., 2008). La GSK3 β est également essentielle pour induire la neurotoxicité du peptide A β (Takashima et al., 1993). De plus, la présence d'agrégats de tau sous forme de NFTs dans les cerveaux de patients Alzheimer est positivement corrélée avec la sévérité du déclin cognitif (Arriagada et al., 1992). Les agrégats protéiques de nombreuses pathologies sont régulièrement en relation avec un mauvais repliement ou des modifications conformationnelles des protéines. Ces protéines mal repliées s'associent entre elles pour former des agrégats protéiques qui sont trouvés en plus grand nombre en conditions pathologiques qu'en conditions physiologiques. Les agrégats de tau sont des médiateurs de la toxicité cellulaire et leur présence caractérise de nombreuses pathologies neurodégénératives regroupées sous le terme de « tauopathies » (Bulic et al., 2009). Les PHFs sont formés par paires de filaments de protéines tau en feuillets β enroulés l'un autour de l'autre, se croisant tous les 80 nm, et possédant une largeur allant de 8 à 20 nm (Friedhoff et al., 2000, Inouye et al., 2006). Pour la formation des PHFs, deux hexapeptides, $^{275}\text{VQJINK}^{280}$ et $^{306}\text{VQJVK}^{311}$, situés respectivement au début des domaines R2 et R3 de tau sont prépondérants dans le processus d'agrégation pour générer les structures en feuillet β (von Bergen et al., 2000, Fischer et al., 2009). La présence de PHF-tau isolés de cerveaux de patients Alzheimer ou encore la présence de protéines tau hyperphosphorylées inhibent l'activité du protéasome et perturbe l'homéostasie cellulaire (Keck et al., 2003, Ren

et al., 2007). Ceci suggère que les PHFs font partie intégrante de la régulation cellulaire et sont des intermédiaires importants dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

A l'intérieur de ces PHFs, une trentaine de sites de phosphorylation de tau, pouvant être responsables de son détachement des microtubules, ont été identifiés. Après phosphorylation de tau, les microtubules sont déstabilisés et les protéines tau nouvellement non liées s'agrègent progressivement (Kopke et al., 1993). *In vivo*, l'hyperphosphorylation de tau précède l'agrégation en PHFs et l'ubiquitinylation de tau (Iqbal and Grundke-Iqbal, 1991). Chez *Drosophila melanogaster*, la dégénérescence neuronale est induite par l'hyperphosphorylation de tau, et non par son agrégation (Wittmann et al., 2001, Steinhilb et al., 2007), ce qui suggère que l'hyperphosphorylation de tau est un des facteurs clés pour induire l'agrégation de tau, et donc la dégénérescence neuronale. Chez des souris transgéniques âgées et accumulant les NFTs (par la sur-expression de protéines tau humaines), aucun changement morphologique au niveau des neurones possédant des NFTs n'est constaté. En revanche, dans ce modèle, les neurones en apoptose possèdent un taux relativement faible de NFTs (Andorfer et al., 2005). Ces données mettent en évidence que l'agrégation de tau en NFTs n'est pas nécessairement requise pour induire une apoptose dépendante d'une pathologie de tau et que des modifications post-traductionnelles précoces, telles que la glycosylation et la phosphorylation de tau (Braak and Braak, 1995, Liu et al., 2002d), pourraient être à l'origine de la pathogénicité de la protéine tau. Celle-ci serait essentielle à la neurotoxicité (secondaire) induite par le peptide A β (Rapoport et al., 2002). En raison de la présence de NFTs et de l'hyperphosphorylation de tau dans les cerveaux Alzheimer, le niveau de tau est 8 fois plus important que dans les cerveaux « contrôles » de même âge (Khatoon et al., 1992, Kopke et al., 1993). L'hyperphosphorylation de tau à des sites spécifiques est corrélée à la sévérité de la démence (Augustinack et al., 2002). De même, de forts taux de protéines tau hyperphosphorylées sont également retrouvés dans le LCR des patients Alzheimer. Ces taux élevés semblent constituer un bon indice pronostique pour la neurodégénérescence (Hampel et al., 2004, Buerger et al., 2006, Bain et al., 2007).

Comme évoqué précédemment, le cerveau humain exprime 6 variants de tau, qui ont des poids moléculaires apparents de 60, 64, 69 et 74 kDa. Les différentes tauopathies sont classées en fonction de la présence ou non d'une combinaison de variants de protéines tau hyperphosphorylées (Tableau 2). Dans la FTDP-17, des mutations faux-sens de tau ont été retrouvées. Quatre de ces mutations, G272V, P301L, V337M et R406W, font de tau un substrat préférentiel *in vitro* pour l'hyperphosphorylation (Iqbal et al., 2009). Les diverses

tauopathies sont classées en fonction des isoformes de tau présentes dans les agrégats de tau. Pour plus de clarté, les tauopathies ne seront que citées dans ce manuscrit (Tableau 2).

Classes de tauopathies	Types d'isoformes concernées	Pathologies concernées
Classe I (Toutes les isoformes de tau peuvent s'agréger)	Tau74 Tau69 Tau64 Tau60	Maladie d'Alzheimer Syndrome de Down Vieillessement cérébral (>75 ans) Sclérose Latérale Amyotrophique Maladie de Parkinson avec une démence atypique de Guadeloupe Maladie de Niemann–Pick (type C) Parkinsonisme post encéphalique Démence familiale britannique Démence pugilistica FTDP-17
Classe II	Tau74 Tau69 Tau64	Dégénérescence corticobasale Paralysie supranucléaire Démence à grains argyrophiles FTDP-17
Classe III	Tau69 Tau64 Tau60	Maladie de Pick FTDP-17
Classe IV	Tau64 Tau60	Dystrophie myotonique

Tableau 2. **Classification des différentes tauopathies.** Tau74 : isoforme de tau de 74 kDa ; Tau69 : isoformes de tau de 69 kDa ; Tau64 : isoformes de tau de 64 kDa ; Tau60 : isoformes de tau de 60 kDa. D'après (Sergeant et al., 2008).

E. SOURIS TRANSGENIQUES POUR TAU

Bien avant la découverte de mutations pathogéniques de tau, les premières souris transgéniques de tau développées en 1995 (Gotz et al., 1995) sur-exprimaient la protéine tau humaine et reproduisaient certains aspects de la maladie d'Alzheimer, tels que la localisation somato-dendritique de tau hyperphosphorylée qui constitue l'étape précédent la formation des DNFs (Gotz et al., 2007). Ces agrégats de tau peuvent être facilement marqués par des anticorps anti-tau dépendants de la phosphorylation et de la conformation de la protéine (Gotz, 2001). Malgré la diminution de la solubilité de la protéine tau, aucune formation de DNFs n'était observée (Ishihara et al., 2001).

Après l'identification en 1998 des mutations de tau dans la FTDP-17, plusieurs modèles de souris transgéniques développant des DNFs dans les neurones et les cellules gliales ont été générées (Lewis et al., 2000, Kins et al., 2003, Higuchi et al., 2005). Ces souris développent un déficit moteur, des troubles du comportement, ainsi que des DNFs dans le cerveau et la moelle épinière (Lewis et al., 2000). Parmi ces modèles, les souris sur-exprimant tau mutée en P301L (Lewis et al., 2000) génèrent des DNFs indépendamment

du promoteur sous le contrôle duquel tau mutée est sur-exprimée (Gotz et al., 2001, Gotz et al., 2007). Chez les humains, la mutation P301S provoque des signes plus précoces de la FTDP-17 que la mutation P301L (Bugiani et al., 1999). Parmi ces différentes souris transgéniques pour tau, la pathologie A β est reproduite, soit par croisement avec des souris sur-exprimant l'APP humain muté, soit par injection intracérébrale de peptides A β . Les effets observés sont répertoriés dans le Tableau 3 (Gotz and Gotz, 2009).

Tau	A β	Observations	Références
P301L	Croisement avec la souris <i>APP^{sw}</i>	<ul style="list-style-type: none"> ●potentialisation de la pathologie de tau (7x plus de NFTs) ●Pas d'augmentation de la pathologie Aβ 	(Lewis et al., 2001)
P301L	Injection intracérébrale de peptides A β	<ul style="list-style-type: none"> ●5x induction de NFTs 	(Gotz et al., 2001)
	3xtg-AD	<ul style="list-style-type: none"> ●NFTs et plaques précèdent la perte synaptique et le déficit de PLT ●Blocage de l'Aβ ralentit la pathologie de tau (par immunothérapie anti-Aβ) 	(Oddo et al., 2003b, Billings et al., 2005, Oddo et al., 2008)
P301L	Injections intracérébrale de peptides A β générés par des souris mutées dans le gène de l' <i>APP</i> (souris <i>APP23</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ●Pathologie de tau induite au niveau des aires de projections des sites d'injection ●Pathologie de tau plus prononcée dans les aires contenant une forte charge en peptides Aβ 	(Bolmont et al., 2007)

Tableau 3. **Modèles de souris transgéniques mimant la pathologie de tau et de l'A β** . D'après (Gotz and Gotz, 2009).

Dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, des mutations pour 3 gènes : l'*APP*, la *PSEN1* et la *PSEN2*, et des gènes de prédisposition parmi lesquels l'*ApoE* ont été identifiés (Bertram and Tanzi, 2008). Afin de reproduire une dégénérescence neuronale avec la présence de DNFs et de plaques A β , des souris transgéniques portant ces 3 mutations [*PSEN1 M146/-* ; *APP K670N/M671L* (*APP^{sw}* : mutation suédoise) ; *tau P301L*] ont été développées et nommées 3xtg-AD (« 3x-transgenic Alzheimer's Disease ») (Oddo et al., 2003b, Gotz and Gotz, 2009). Ces souris montrent un dysfonctionnement synaptique, incluant un déficit de la PLT (Potentialisation à Long Terme). Chez ces souris, la formation des plaques séniles intervient avant celle des DNFs (Oddo et al., 2003a). Cependant la variabilité phénotypique observée chez l'ensemble des souris transgéniques pour tau est considérée comme probablement due aux différentes conditions expérimentales. La variabilité phénotypique pourrait être due à : l'utilisation de différents promoteurs pour

l'expression du transgène, à des sites différents d'intégration des transgènes, ainsi qu'à des niveaux aléatoires d'expression de la protéine tau humaine selon le fond génétique utilisé (Gotz et al., 2007). Cette variabilité des phénotypes pose problème et ne permet pas de conclure sur le mécanisme pathologique sous-jacent (Gotz et al., 2004).

Parallèlement à ces constatations, les premiers modèles de souris déficientes (« knock-out » : KO) pour tau ont été générés (Harada et al., 1994). Chez ces souris, l'inactivation du gène tau est réalisée par remplacement du premier exon par une cassette de néomycine au niveau de cellules souches embryonnaires. Cette modification génique entraîne au maximum, chez les souris mutées, la production de petits fragments de la protéine tau qui sont incapables de se lier aux microtubules. Les génotypes (souris tau+/, tau+/- et tau-/-) sont soumis à une distribution mendélienne et les phénotypes générés sont indiscernables entre eux. Afin d'identifier les conséquences de ce KO dans la protéine tau au niveau du réseau neuronal, les quantités relatives de MAP : Tau, MAP1A, MAP1B et MAP2, ainsi que de neurofilaments ont été quantifiées. Outre la déficience en protéines tau, seule la quantité relative de MAP1A est augmentée de 30 % dans les axones de gros calibre (100 à 149 nm)

chez les souris adultes (Harada et al., 1994). Le nombre et la densité des axones de petit calibre (50 à 99 nm) chez les souris invalidées pour tau sont significativement

Souris transgéniques	Effet sur tau	Effets biologiques observés	Références
développant des DNFs	Suppression	Stabilisation du nombre de neurones Récupération des fonctions de mémorisation	(Santacruz et al., 2005)
exprimant des mutations familiales APP ^{sw}	Réduction ou suppression	Prévention des déficits cognitifs Pas de réversibilité de la pathologie amyloïde	(Roberson et al., 2007)
KO pour tau	Suppression	Baisse de la sensibilité à la mort cellulaire induite par le peptide Aβ	(Rapoport et al., 2002)
sur-exprimant tau	Sur-expression	Neurotoxicité dose-dépendante	(Amadoro et al., 2006, Liang et al., 2008)

Tableau 4. **Exemples de souris transgéniques pour tau.**

réduits. D'autres modèles de souris déficientes ou sur-exprimant la protéine tau ont été utilisées, et ont montré que la protéine tau pouvait également être toxique par elle-même et ce, indépendamment de son état de phosphorylation (Tableau 4). L'ensemble de ces différents modèles de souris transgéniques pour tau est essentiel pour disséquer le mécanisme sous-jacent de la dégénérescence neuronale, et plus particulièrement celle observée dans la maladie d'Alzheimer.

F. STRATEGIES THERAPEUTIQUES CONTRE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Trois types de stratégies thérapeutiques contre la maladie d'Alzheimer sont actuellement proposées (Citron, 2004). La première a une action dirigée contre le peptide A β . Les deux autres stratégies thérapeutiques sont basées sur la modulation des niveaux de peptides A β et sur le blocage de la pathologie de tau.

1. STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES CONTRE L'AB

➤ APPROCHE PHARMACOLOGIQUE

Principalement, deux types de médicaments sont utilisés pour le blocage pharmacologique de l'agrégation des peptides A β . Des mimétiques de glycosaminoglycanes, supposés bloquer les interactions de peptides A β entre eux, sont actuellement en essais cliniques de phase III (Drews, 2000). D'autre part, le clioquinol, antibiotique chélateur de zinc (le zinc étant primordial pour l'agrégation des peptides A β), est utilisé pour réduire le taux d'agrégation des peptides A β *in vivo* (Cherny et al., 2001). Les essais cliniques de phase II ont montré une efficacité *a posteriori* sur le groupe le plus sévèrement atteint ainsi qu'une réduction de l'A β 42 plasmatique dans le groupe des patients le moins sévèrement atteint (Ritchie et al., 2003).

➤ APPROCHE IMMUNOLOGIQUE

L'approche par immunisation active, consistant en l'injection d'agrégats de peptides A β 42, a réduit la pathologie amyloïde chez différentes souches de souris transgéniques *APP* (Schenk et al., 1999, Janus et al., 2000, Morgan et al., 2000). Cependant, les essais cliniques chez l'Homme ont dû être arrêtés prématurément en raison de l'apparition d'encéphalites parmi les sujets vaccinés (Orgogozo et al., 2003).

Une immunisation passive a été réalisée dans différents modèles de souris transgéniques pour l'*APP*. Les trois approches d'immunologie passive sont basées :

- 1) sur une activation microgiale afin de phagocyter les plaques séniles (Schenk et al., 1999, Bard et al., 2000). Sur les 11 anticorps administrés à des souris transgéniques *APP*, seuls ceux dirigés contre la partie N-terminale de l'A β se sont montrés efficaces pour l'activation microgiale. Ces résultats ont été

confirmés par la vaccination avec des peptides correspondant aux épitopes des 11 anticorps précédents où seuls les peptides mimant les anticorps ciblant la partie N-terminale ont montré une activation microgliale (Bard et al., 2003).

- 2) sur la fixation directe des anticorps restreints aux acides aminés 3 à 6 du peptide A β , visant à détruire les dépôts amyloïdes (Frenkel et al., 2000). Cependant, *in vivo*, les effets observés n'ont pu être attribués aux anticorps dirigés contre les acides aminés 3 à 6 du peptide A β (Citron, 2004).
- 3) sur la capture des peptides A β solubles du SNC. L'anticorps 266, qui montre une très forte affinité pour les peptides A β solubles (de l'ordre du picomolaire), provoque une réduction de l'amyloïde sans se lier aux plaques séniles. Cet anticorps provoque un flux des peptides A β solubles du SNC vers le SNP. Ce flux permet de réduire considérablement le taux de peptides A β dans le cerveau (DeMattos et al., 2001).

2. STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES MODULANT L'AB

Afin de moduler le niveau des peptides A β (voir Figure 2), trois stratégies sont possibles :

- 1) l'inhibition de la β -sécrétase, empêchant la formation du fragment C99 (β -Stub), nécessaire à la formation des peptides A β .
- 2) l'inhibition de la γ -sécrétase, empêchant la formation des peptides A β toxiques après la formation du fragment C99. Certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) influencent le ratio de peptides A β par la modulation directe du clivage effectué par la γ -sécrétase. Ces AINS favorisent la formation de peptides A β 38 au lieu des peptides A β 40 et A β 42 (Citron, 2004).
- 3) l'activation de l' α -sécrétase, favorisant la formation du fragment C83 (α -Stub).

3. STRATEGIES THERAPEUTIQUES BASEES SUR LE BLOCAGE DE LA PATHOLOGIE DE TAU

Parmi les nombreuses modifications de tau, les connaissances actuelles indiquent que le principal caractère pathologique de tau dans la maladie d'Alzheimer et les autres tauopathies consiste en l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Pour contrer la pathologie

de tau, les stratégies proposées sont basées sur les régulations intracellulaires de la protéine tau. Les possibilités envisagées sont :

- soit d'agir sur le niveau de phosphorylation des protéines tau en inhibant les kinases de tau ou en activant les phosphatases de tau,
- soit de diminuer partiellement le niveau global de tau, diminuant ainsi le degré de protéines tau pouvant être phosphorylées,
- une idée émergente serait également de dégrader les agrégats de tau hyperphosphorylées en stimulant un mécanisme de dégradation des protéines, l'autophagie.

La thématique de ma thèse a portée sur les 2 premières stratégies et comment contrer l'hyperphosphorylation de tau, et ceci, de manière spécifique.

Les inhibiteurs des kinases de tau disponibles sont relativement spécifiques et interfèrent avec le cycle cellulaire. A ce jour, la nécessité de développer des inhibiteurs hautement spécifiques des kinases de tau est primordiale. De nouveaux composés sont synthétisés par de nombreuses équipes. L'intérêt est de trouver un ou des composé(s) diminuant le niveau de tau *per se* et/ou le niveau de phosphorylation de tau. Pour cela, la connaissance des kinases et des phosphatases de tau, agissant directement sur la phosphorylation de tau, est importante pour le criblage de composés conférant une neuroprotection.

Dans ce manuscrit, nous décrirons d'abord les kinases de tau, leurs possibles interactions avec tau (phosphorylation et liaison), leurs rôles dans la mort neuronale (notamment par apoptose) et résumerons les principales données établies quant à leur possible implication dans la maladie d'Alzheimer. Suite à la description de chaque kinase de tau, quelques inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et/ou sélectifs de la kinase étudiée seront listés et leurs modes d'action discutés. Les phosphatases de tau seront ensuite abordées sous les mêmes angles.

III. KINASES DE TAU

Les voies de signalisation cellulaires sont principalement régulées par un cycle de phosphorylation-déphosphorylation. Les kinases et phosphatases sont respectivement responsables de la phosphorylation et de la déphosphorylation.

Les kinases sont des enzymes de la famille des transférases qui catalysent le transfert d'un groupe phosphoryle (ou ion phosphate) d'une molécule à une autre. La molécule cible, appelée le substrat, peut être une protéine, un lipide ou un sucre. La phosphorylation d'un substrat par une kinase peut entraîner différents types de modifications fonctionnelles : changement de localisation cellulaire, changement structural perturbant l'association avec d'autres protéines ou encore l'activation ou l'inhibition de l'activité enzymatique. Les protéines kinases sont généralement inactives lorsqu'elles ne sont pas phosphorylées. Elles sont caractérisées par un site actif et une boucle d'activation. Le site actif est composé d'une région qui fixe le ou les substrat(s) : couramment l'ATP, donneur de phosphate, à la séquence peptidique cible, receveur de phosphate, et à une région qui catalyse la réaction de phosphorylation. La boucle d'activation est un segment interne de la protéine qui contient un ou des résidus phosphorylables (sérine, thréonine et/ou tyrosine). La fixation de phosphate sur des sites précis de cette région entraîne généralement l'activation de la kinase.

Dans les cerveaux Alzheimer, de nombreuses kinases ont été identifiées pour avoir une activité ou une expression perturbée (Tableau 5) (Chung, 2009). Ainsi, la compréhension du mécanisme physiopathologique de la maladie d'Alzheimer passe par la connaissance de l'ensemble des kinases et phosphatases qui régulent le niveau de phosphorylation de tau.

Expression ou activité dans les cerveaux Alzheimer	
Augmentée	Diminuée
GSK3 β	PKA
p25/CDK5	PKC
DYRK1A	
Erk1/2	
Jnk	
p38	
CK1	
Akt/PKB	

Tableau 5. **Modifications de l'expression ou de l'activité des kinases de tau dans les cerveaux Alzheimer.** D'après (Chung, 2009).

Près de 71 sites de phosphorylation de la protéine tau (définie par rapport à la plus longue des isoformes) peuvent être phosphorylés (Buee et al., 2000, Sergeant et al., 2008). Pour la plupart, ils sont localisés à proximité des domaines de liaison aux microtubules (cf Figure 9). Les kinases de tau ont été regroupées en 3 classes : les protéines kinases PDPK (« Proline-Directed Protein Kinase »), les protéines kinases non-PDPK et les protéines

kinases spécifiques des tyrosines. Après des généralités sur ces protéines kinases, chacune sera abordée sous 3 angles importants pour la maladie d'Alzheimer : les sites de phosphorylation de tau concernés (et connus à l'heure actuelle), puis l'apoptose neuronale et les données établies concernant la maladie d'Alzheimer. Enfin, une partie sera consacrée aux inhibiteurs les plus spécifiques ou les plus utilisés de chaque kinase.

A. PROLINE-DIRECTED PROTEIN KINASE

Les kinases PDPK phosphorylent tau sur les résidus sérine et thréonine suivis par une proline. Dans ce groupe, sont trouvées :

- la glycogène synthétase kinase-3 β (GSK3 β), également appelée « Tau Protein Kinase I » (TPKI) (Mandelkow et al., 1992, Sperber et al., 1995). Comme 39 sites (dont au moins 24 dans les MBDs) sur les 71 sites de tau peuvent être phosphorylés par la GSK3 β (soit environ 55 % des sites de la protéine tau), la GSK3 β est considérée comme la kinase de tau majoritaire,
- la kinase dépendante du cycle cellulaire CDK5 (« Cyclin-Dependent Kinase 5 ») (Baumann et al., 1993), également appelée « Tau Protein Kinase II » (TPKII) (Ishiguro et al., 1992),
- les protéines kinases activées au cours de la mitose MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinase ») telles que les kinases Erk1/2 (« Extracellular signal-regulated kinase 1/2 »), c-jun N-terminal Kinase (JNK) et p38 (Zhu et al., 2002, Chong et al., 2006). Les voies des kinases JNK et p38 peuvent également être activées *via* la voie des SAPK (« Stress-Activated Protein Kinase ») comme JKK1 (Goedert et al., 1997b, Buee-Scherrer and Goedert, 2002, Zhu et al., 2003).

1. GLYCOGEN SYNTASE KINASE-3B

Le nom de la kinase à sérines et thréonines GSK3 β provient du fait de son implication et de sa découverte dans le métabolisme du glycogène (Embi et al., 1980, Rylatt et al., 1980). A l'heure actuelle, ce nom est impropre car de nombreux substrats et fonctions sont attribués à la GSK3 β . Il s'agit de son rôle dans la prolifération cellulaire, le fonctionnement neuronal, la signalisation cellulaire de l'insuline, l'oncogenèse, le

développement embryonnaire (Rayasam et al., 2009) et la réponse immunitaire (Beurel et al., 2010).

L'homologie de séquence entre les isoformes α et β de la GSK3, respectivement de 51 kDa et 47 kDa, est de 85 % (Woodgett, 1990). Bien qu'elles soient codées par deux gènes distincts, localisés respectivement aux loci 19q13.1-13.2 et 3q13.3-q21 (Shaw et al.,

Domaines des GSK3	Pourcentage d'homologie GSK3 α -GSK3 β
Protéines entières	85 %
Domaines kinase	98 %
76 derniers acides aminés (extrémité C-terminale)	36 %

Tableau 6. Pourcentages d'homologies entre les 2 isoformes de la GSK3. D'après (Woodgett, 1990).

1998), les isoformes α et β possèdent 97 % d'homologie au niveau de leurs domaines kinases (Figure 6). Parmi les exons de la GSK3 β , les exons 9 et 11, impliqués dans la liaison aux protéines telles que l'axine ou Frat/GBP (« Frequently rearranged in T-cell lymphomas/GSK3-binding protein »), peuvent subir un épissage alternatif (Schaffer et al., 2003). L'épissage de l'exon 9 de la GSK3 β augmente sa capacité à phosphoryler la protéine tau (Mukai et al., 2002, Kwok et al., 2005). Ce polymorphisme de la GSK3 β est considéré comme impliqué dans le risque de développer la maladie de Parkinson (Kwok et al., 2005).

Deux variants de GSK3 β , résultant de l'épissage alternatif de l'exon 8A ont été identifiés : il s'agit des isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$. Ces isoformes diffèrent par la présence d'un insert de 13 acides aminés entre la L303 et la V304 dans le domaine kinase de l'isoforme GSK3 $\beta 2$ (Tableau 7). La GSK3 $\beta 2$ représente 15 % des isoformes de la GSK3 β et montre une activité réduite pour la protéine tau comparée à l'activité de la GSK3 $\beta 1$ (Mukai et al., 2002). Dans les neurones, entre ces 2 isoformes, seule la localisation intracellulaire diffère : la GSK3 $\beta 2$ est trouvée principalement dans le soma neuronal tandis que la GSK3 $\beta 1$ est présente à la fois dans le soma neuronal et au niveau axonal (Mukai et al., 2002). La régulation de ces deux isoformes s'effectue de la même manière (Mukai et al., 2002).

Isoformes de la GSK3	GSK3 α	GSK3 β	Références
Gènes	19q13.1-13.2	3q13.3-q21	(Shaw et al., 1998)
Nombres d'acides aminés	483	420 et 433	(Stambolic and Woodgett, 1994)
Isoformes connues	-	GSK3 $\beta 1$ - GSK3 $\beta 2$	(Mukai et al., 2002)
Masses moléculaires	51 kDa	46 kDa	(Woodgett, 1990)

Tableau 7. Comparaison des isoformes α et β de la GSK3.

La GSK3 α et la GSK3 β sont des kinases ubiquistes impliquées dans de nombreux processus (Hooper et al., 2008) tels que le métabolisme du glycogène (Welsh and Proud, 1993), la transcription génique (Troussard et al., 1999), l'apoptose (Turenne and Price, 2001) et la stabilité des microtubules (Brion et al., 2001). La GSK3 α et la GSK3 β sont régulées par phosphorylation respectivement en sérine 21 et sérine 9 (phosphorylations inhibitrices) (Stambolic and Woodgett, 1994, Ali et al., 2001, Cohen and Goedert, 2004), et en tyrosine 279 et 216 (phosphorylations activatrices) (Wang et al., 1994, Cole et al., 2004). En conditions physiologiques, les tyrosines 279 et 216 sont toujours phosphorylées de façon stœchiométrique (Sugden et al., 2008). Comparée à la phosphorylation (inhibitrice) sur les sérines, celle des tyrosines semble avoir beaucoup moins d'impact sur l'activité des GSK3 α et GSK3 β (Bhat et al., 2000, Bijur and Jope, 2001). Une 3^{ème} phosphorylation inhibitrice en S389 est également rapportée pour la GSK3 β (Thornton et al., 2008). Entre les 2 isoformes de GSK3, les régulations s'effectuent au niveau de la poche de liaison du substrat, où les drogues se lient en compétition avec l'ATP. A ce niveau, un simple a.a. diffère : Q196 pour la GSK3 α et D133 pour la GSK3 β , d'où la difficulté de trouver des inhibiteurs sélectifs de l'une ou de l'autre isoforme (Bhat et al., 2004).

D'autre part, les régulations de la GSK3 β en font une kinase particulière :

- la GSK3 β est constamment activée et inactivée en réponse à des stimuli cellulaires (Harwood, 2001, Doble and Woodgett, 2003) ;
- pour être phosphorylé par la GSK3 β , un substrat doit subir une pré-phosphorylation par des kinases différentes ou non de la GSK3 β sur des sites différents du site primaire ou cible de la GSK3 β . Ce phénomène est désigné sous le terme anglo-saxon : « priming ». Le « priming » est rendu nécessaire par la GSK3 β elle-même et se produit 4 acides aminés en aval du site de phosphorylation ciblé (Dajani et al., 2001, Frame and Cohen, 2001). La GSK3 β reconnaît un motif consensus S/TXXXXS/T (Figure 17) pour ses substrats, excepté deux d'entre eux : l'axine et la β -caténine, protéines impliquées dans le complexe de dégradation de la voie Wnt/ β -caténine (voir plus loin). Le « priming » rend la protéine tau meilleur substrat de la GSK3 β (Sugden et al., 2008) ;

- la GSK3 β est un régulateur négatif des voies de signalisation, excepté celle de la NF κ B.

La GSK3 β est régulée par phosphorylation par des kinases telles que la PKA (« Protein Kinase cAMP-dependent »), la PKB/Akt (« Protein Kinase B ») (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000), les p70S6K/p85S6K (« p70/p85-S6 kinase »), la p90RSK (« p90-Ribosomal S6 Kinase ») (Frodin and Gammeltoft, 1999), les SGKs (« Serum/Glucocorticoid-regulated Kinases ») (Kobayashi and Cohen, 1999) ainsi que les MSKs (« RSK-related Mitogen and Stress-activated protein Kinases ») (Frodin and Gammeltoft, 1999, Doble and Woodgett, 2003). Les kinases S6Ks sont actives en réponse à l'activation de la PKB/Akt tandis que les RSKs sont activées en réponse aux protéines MAPKs : p38 et Erk1/2. La PKA s'associe et phosphoryle les isoformes de la GSK3 sur leurs sites de phosphorylation inhibitrice (Songyang et al., 1994, Fang et al., 2000). La GSK3 β est également régulée par l'action de diverses voies de signalisation cellulaire.

Régions de la protéine tau	Exons	Séquence protéique de tau	Acides aminés
Région acide	Exon 1 :	MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLK	1-44
	Exon 2 :	E SPLQT T EDGSEEPG SET SDAKS TP TAE	45-73
	Exon 3 :	DVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHT E IPEG TT	74-102
	Exon 4 :	AAAAGIGD TPS LEDEAAG HVTQ	103-124
	Exon 5 :	ARMVSK SKDGT GSDDK KAK	125-143
Région riche en prolines	Exon 7 :	GADGK TK IAT PRGAAPP GQKGOAN TR IPAK TPPAPK TPSS GEPPK SGDRSGYSSP GS PGTPG SRS RTPS LPTPPT REP	144-223
Domaines répétés	Exon 9 :	KKVAVVR TPPKS SSAK SRLQT APVPM PDLKNVK SKI GS TENLKHQP GGGK	224-274
	Exon 10 :	VQIINK KLDL SNVQSK CGS KDNIKHV PGGGS	275-305
	Exon 11 :	VQIVY KPVDL SKVTS KCGS LGNIHH KP	306-332
	Exon 12 :	GGGQVEVK SEK LDFKDRV Q SKIGS LDNI THVPGGGNKK	333-370
Extrémité C-terminale	Exon 13 :	IETHK LTFRE NAKAKTDHGA EIVYK SPVVS GDTS PRHL SN VSS TGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L	371-441

Figure 17. **Sites de la protéine tau reconnus par la GSK3 β .** Surlignés en marron, les motifs S/TXXXXS/T trouvés dans la protéine tau. Sont figurés en orange, les sites de phosphorylation dits pathologiques de la maladie d'Alzheimer. Sont figurés en vert, les sites de phosphorylations dits normaux de la protéine tau.

VOIES DE SIGNALISATION DE LA GSK3B

Outre son implication dans la phosphorylation de tau (voir plus loin), la GSK3 β est essentiellement impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline, la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, la voie NF κ B (« Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells ») (Figure 18). Ces voies seront successivement décrites.

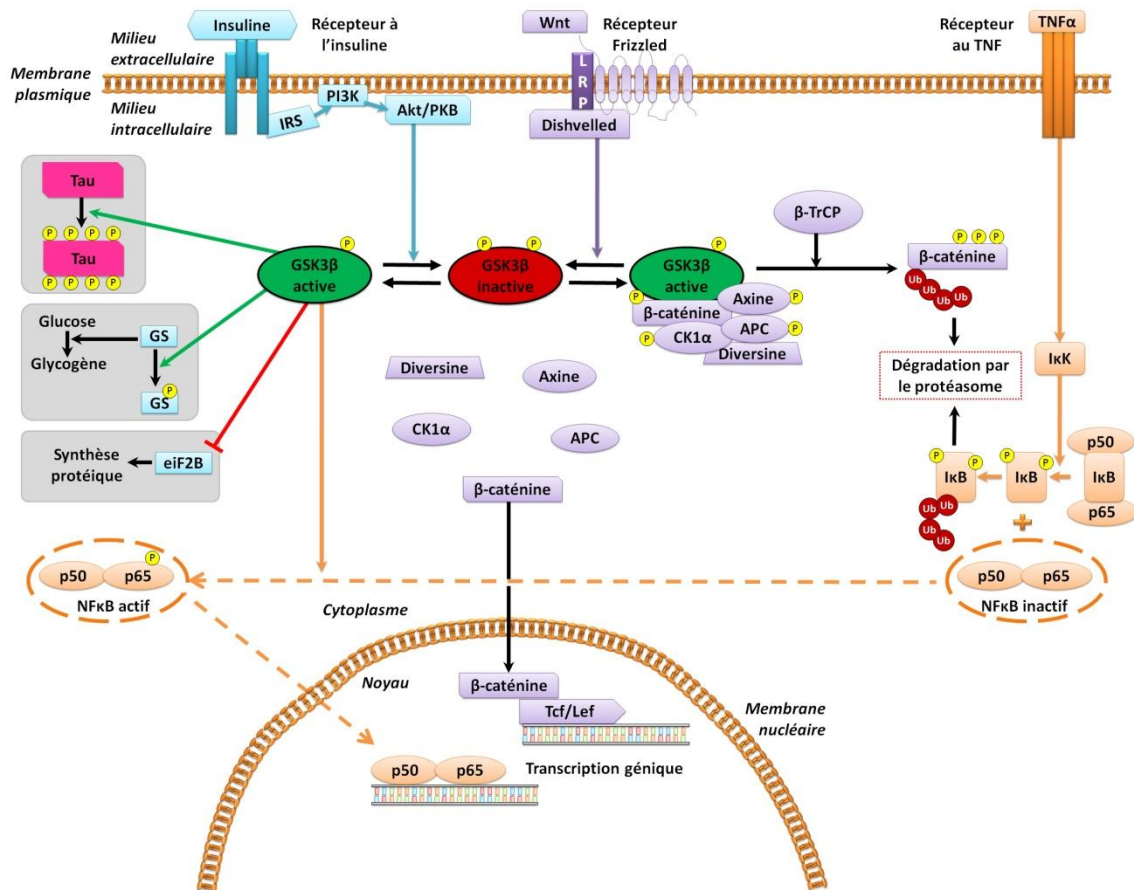


Figure 18. **Principales voies de signalisation de la GSK3β.** Les éléments en bleu appartiennent à la voie de signalisation de l'insuline ; ceux en violet appartiennent à la voie Wnt ; ceux en orange appartiennent à la voie NFκB ; ceux en rose font partie de la voie de la protéine tau.

GSK3B ET LA VOIE DE SIGNALISATION A L'INSULINE

L'insuline, hormone polypeptidique endocrinienne hypoglycémisante, régule l'homéostasie glucidique en augmentant la recapture et le stockage du glucose majoritairement sous forme de glycogène. En conditions basales, lorsque le récepteur à l'insuline IR (« Insulin Receptor ») n'est pas stimulé, la GSK3β est active et induit, par phosphorylation, l'inactivation de la synthétase du glycogène GS (« Glycogen Synthase »), et donc l'inhibition de la synthèse du glycogène. Parallèlement, la GSK3β inactive le facteur eiF2B (« eukaryotic initiation Factor 2B »), diminuant ainsi la synthèse protéique (Figure 19, gauche).

Lorsque l'insuline se fixe sur son récepteur, la cascade de signalisation active le substrat du récepteur de l'insuline IRS (« Insulin Receptor Substrate »), puis la PI3K (« Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase »), qui active à son tour, la kinase Akt/PKB. Akt/PKB phosphoryle GSK3β sur la S9 et/ou la S389 la rendant inactive. Par conséquent, la régulation de la GS par la GSK3β ne peut s'effectuer, ce qui conduit à l'activation de la GS

et donc à la synthèse de glycogène (Woodgett, 2001, Eldar-Finkelman, 2002). De même, le facteur de transcription eIF2B est activé, permettant à la synthèse protéique de se dérouler (Welsh and Proud, 1993, Welsh et al., 1997), (Figure 19, droite).

D'autre part, le diabète ainsi que la résistance à l'insuline sont montrés comme associés à la maladie d'Alzheimer (Biessels and Kappelle, 2005). Les gènes de la voie de signalisation par l'insuline sont donc potentiellement des facteurs de susceptibilité pour la maladie d'Alzheimer (Hamilton et al., 2007, Reiman et al., 2007).

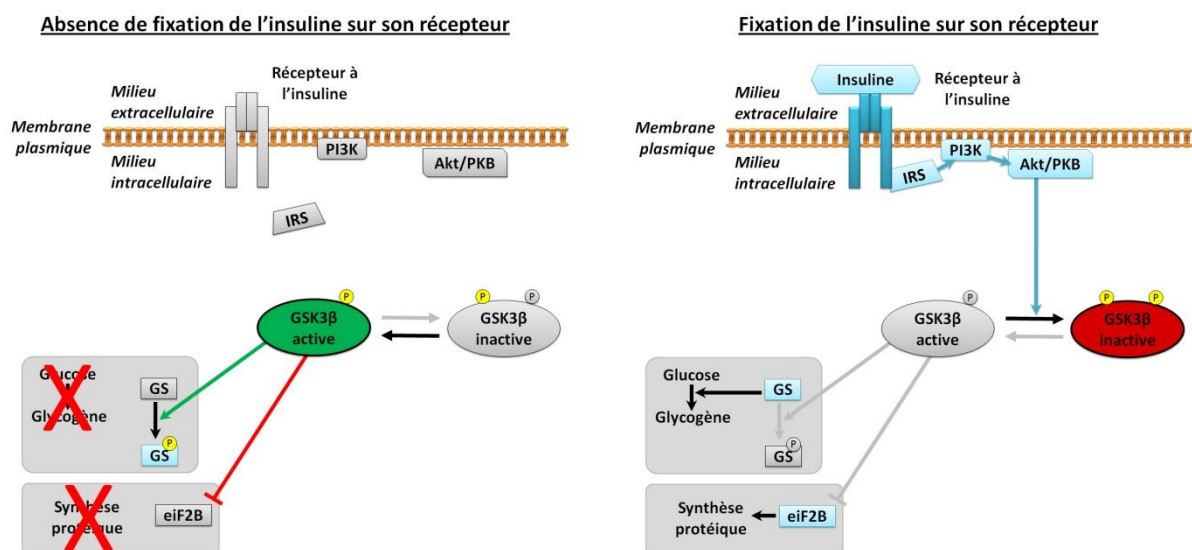


Figure 19. **Voie de signalisation à l'insuline.** A gauche, en l'absence de stimulation du récepteur de l'insuline, la GSK3 β est active et inhibe la GS et le facteur eIF2B. A droite, lorsque l'insuline se fixe sur son récepteur, la GSK3 β est inactive, permettant ainsi la synthèse protéique et le stockage du glucose sous forme de glycogène. IRS : substrat du récepteur à l'insuline ; PI3K : PhosphatidyInositol-3-phosphate ; Akt/PKB : Protéine kinase B ; eIF2B : « eukaryotic initiation Factor 2B » ; GS : « Glycogen Synthase » ; P : Phosphorylation.

GSK3B ET LA VOIE WNT/B-CATENINE

La voie de signalisation cellulaire Wnt/ β -caténine joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la régulation de l'auto-renouvellement cellulaire dans de nombreux tissus adultes (Clevers, 2006). En conditions basales c'est-à-dire en l'absence de ligand de Wnt, Figure 20 gauche), la GSK3 β fait partie d'un complexe hétéroprotéique appelé « complexe de destruction ». Celui-ci est formé principalement avec la β -caténine, l'APC (« Adenomatous Polyposis Coli »), la CK1 α (« Casein Kinase 1 α »), la diversine et l'axine (voir également le site du Pr Roelle Nusse, découvreur de Wnt1 : <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>). Dans ces conditions, la GSK3 β est constitutivement active. Elle phosphoryle les autres protéines du complexe de destruction, notamment la β -caténine, l'axine et l'APC (Frame et al., 2001). La phosphorylation de l'APC et de l'axine favorise la stabilisation du complexe et augmente l'affinité de la GSK3 β

pour la β -caténine (Rubinfeld et al., 1996, Hedgepeth et al., 1999, Lee and Kim, 2007). La phosphorylation de la β -caténine (par la $CK1\alpha$ sur la S45, puis par la $GSK3\beta$ aux sites T41, S37 et S33) (Liu et al., 2002a), favorise son ubiquitinylation par la β -TrCP (« β -Transducin repeat Containing Protein ») (Hooper et al., 2008). Cette ubiquitinylation entraîne la dégradation de la β -caténine par le système ubiquitine-protéasome. Par conséquent, la voie Wnt/ β -caténine se trouve bloquée (Aberle et al., 1997, Hart et al., 1998, Peifer and Polakis, 2000). De cette façon, en l'absence de ligand de Wnt, le pool de β -caténine est maintenu à un faible niveau (Dale, 1998, Huelsken and Birchmeier, 2001, Nusse, 2005).

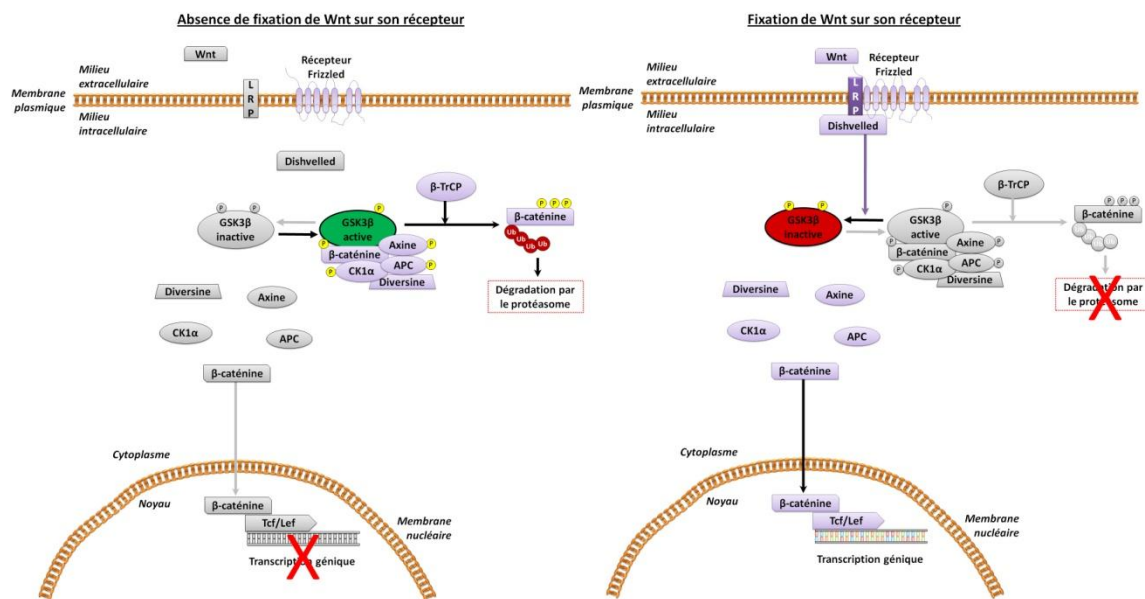


Figure 20. **Voie de signalisation Wnt/ β -caténine**. A gauche, en l'absence de stimulation du récepteur Frizzled par Wnt, la $GSK3\beta$ est active et est séquestrée dans un complexe comprenant notamment la β -caténine. Cette dernière est phosphorylée, puis ubiquitinylée pour être dégradée par le protéasome. A droite, la fixation de Wnt sur le récepteur Frizzled induit sa dimérisation avec le co-récepteur LRP. Ce dimère s'associe avec Dishvelled pour rendre inactive la $GSK3\beta$, la dissociant de l'hétérocomplexe protéique. La β -caténine non phosphorylée est transloquée vers le noyau où elle induit la transcription de gènes cibles. APC : « Adenomatous Polyposis Coli » ; $CK1\alpha$: « Casein Kinase 1 α » ; LRP : « Low density lipoprotein Receptor-related Protein » ; Tcf/Lef : « T cell factor/Lymphoid enhancer factor transcription ».

Lorsque la voie Wnt est activée (Figure 20, droite), par fixation d'un ligand sur le récepteur Frizzled, celui-ci se dimérise avec le co-récepteur LRP (« Low density lipoprotein Receptor-related Protein »). Ce dimère s'associe avec la protéine Dishvelled (Dsh). Dsh recrute alors la protéine de liaison à la $GSK3\beta$, Frat-1/GBP et dissocie la $GSK3\beta$ du complexe de destruction, inhibant ainsi son activité kinase. L'inhibition de $GSK3\beta$ empêche la phosphorylation de la β -caténine et, par conséquent, sa dégradation. La β -caténine est ainsi stabilisée au niveau cytoplasmique, puis subit une translocation vers le noyau. La β -caténine nucléaire en coopération avec le complexe Tcf/Lef (« T cell factor/Lymphoid enhancer factor transcription ») stimulent la transcription génique (Seidensticker and

Behrens, 2000, Dominguez and Green, 2001, Huelsken and Birchmeier, 2001). Dans la maladie d'Alzheimer, LRP6 a été identifié comme facteur de risque de la maladie chez des patients non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (De Ferrari et al., 2007).

GSK3 α pourrait être impliquée dans le fonctionnement du complexe de destruction, suggérant ainsi l'importance de cette enzyme dans le fonctionnement de la voie Wnt/ β -caténine (Asuni et al., 2006, Doble et al., 2007). D'autre part, des MAPKs, telles que p38 (Bikkavilli et al., 2008, Thornton et al., 2008), JNK1 et JNK2 (Hu et al., 2008) régulent également, *via* la GSK3 β , la voie de signalisation cellulaire Wnt/ β -caténine.

GSK3B ET LA VOIE NFkB

Au niveau basal, le facteur de transcription NF κ B (composé de 2 sous-unités p50 et p65) est séquestré par un de ses inhibiteurs physiologiques, I κ B (« Inhibitor of NF κ B ») (Figure 21, gauche). Suite à la fixation du TNF α (« Tumor Necrosis Factor α ») sur son récepteur (Figure 21, droite), I κ K (« I κ B Kinase ») phosphoryle I κ B, ce qui entraîne sa dissociation de NF κ B. NF κ B est ensuite transloqué dans le noyau où il active la transcription génique. *In vitro*, GSK3 β phosphoryle la sous-unité p65 de NF κ B. Suite à une stimulation au TNF α , la présence de l'isoforme β de GSK3 (et non l'isoforme α) est nécessaire pour induire la réponse anti-apoptotique régulée par NF κ B (Hoefflich et al., 2000, Pomerantz and Baltimore, 2000).

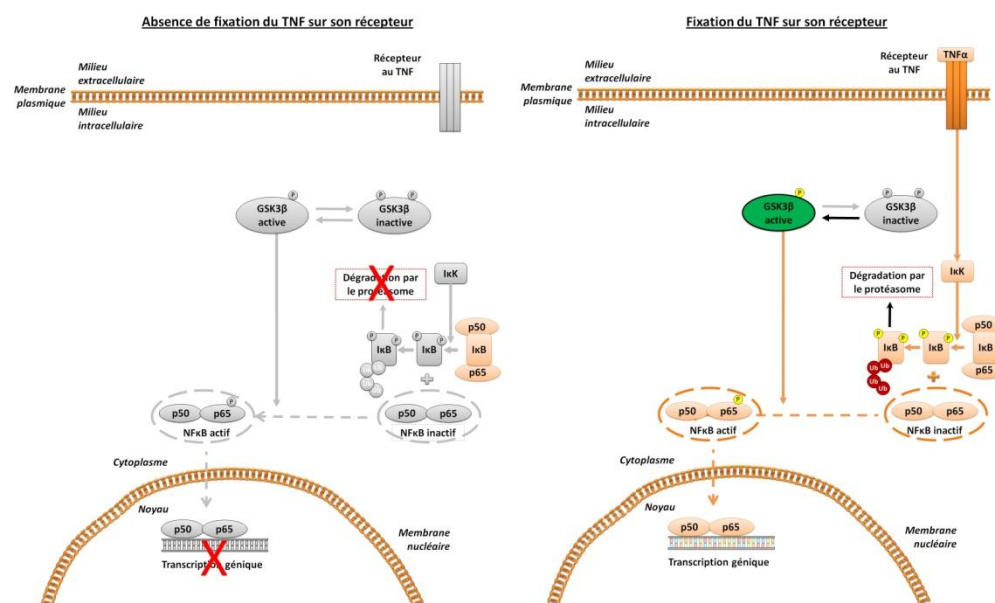


Figure 21. **Voie NF κ B.** A gauche, l'absence de stimulation du récepteur au TNF empêche la transcription génique. A droite, lorsque le récepteur au TNF est stimulé, l'I κ B est phosphorylé, permettant la formation du NF κ B sous sa forme inactive. La présence d'une GSK3 β activée peut alors stimuler NF κ B par phosphorylation générant sa translocation vers le noyau où il induit la transcription de gènes cibles.

Les diverses implications de la kinase GSK3 β dans de nombreuses physiopathologies telles que la maladie d'Alzheimer, le diabète non-insulino-dépendant, les troubles bipolaires et les pathologies neurodégénératives représentent un grand intérêt pour les firmes pharmaceutiques (Hongisto et al., 2008). Au niveau des pathologies neurodégénératives, la GSK3 β pourrait intervenir dans la pathologie au niveau de la phosphorylation de la protéine tau sur des résidus conduisant à la formation de PHFs, en tant que médiateur, de la neurotoxicité de la PSEN1 mutée et/ou dans la régulation du clivage de l'APP et la production d'A β (Hongisto et al., 2008).

Bien que l'inhibition à long terme de la GSK3 puisse être discutable en raison de son implication dans de nombreux processus physiologiques, elle reste néanmoins une des cibles thérapeutiques privilégiées des tauopathies (Cohen and Goedert, 2004, Hooper et al., 2008).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA GSK3B

Comme indiqué précédemment (Figure 17), 24 motifs S/TXXXXS/T sont présents dans la protéine tau. Seulement quatre ne sont pas reconnus par la GSK3 β . La GSK3 (isoformes α et β) induit l'hyperphosphorylation de tau sur 39 sites (Figure 22) pouvant être des sites de « priming » (Hanger et al., 1992, Lovestone et al., 1994, Planel et al., 2001, Hanger et al., 2009). De plus, les souris transgéniques sur-exprimant la GSK3 β présentent une hyperphosphorylation de tau ainsi qu'une dégénérescence neuronale (Spittaels et al., 2000, Lucas et al., 2001). A l'inverse, le traitement de ces souris par le lithium, un inhibiteur de la GSK3 β , bloque l'hyperphosphorylation de tau, la dégénérescence neuronale et la formation de NFTs (Engel et al., 2006).

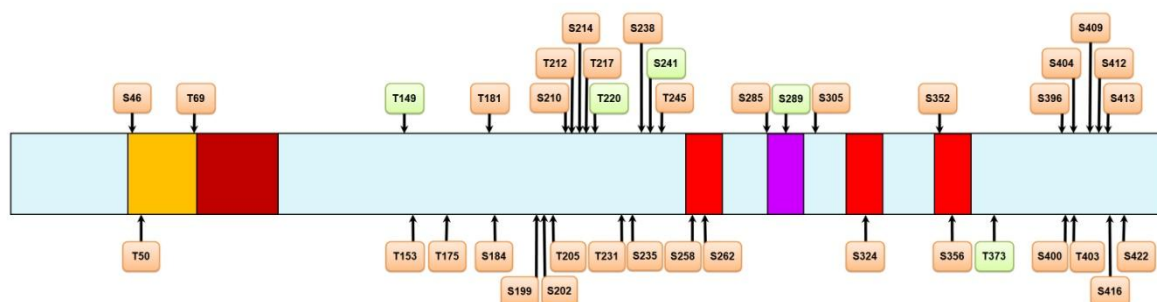


Figure 22. **Localisation sur la protéine tau des sites phosphorylés par la GSK3 β .** En orange, sites pathologiques ; en vert, sites dits normaux.

Au niveau des voies de régulation de la GSK3 β , l'hyperphosphorylation transitoire de tau induite par l'insuline est corrélée à l'inhibition de la GSK3 β (Lesort et al., 1999) et

dickkopf, un régulateur de la voie Wnt/ β -caténine est sur-exprimé dans la maladie d'Alzheimer et entraîne une hyperphosphorylation de tau (Caricasole et al., 2004).

D'autre part, la PSEN1 se lie à la GSK3 β et à tau. La PSEN1 mutée des formes familiales de la maladie d'Alzheimer lie plus efficacement la GSK3 β et contribue à l'augmentation du nombre de sites phosphorylables de tau (Takashima et al., 1998, Baki et al., 2004). Parmi les nombreuses phosphorylations de tau induites par la GSK3 β , celle de la T231 facilite l'hyperphosphorylation de l'extrémité C-terminale de tau. Cette phosphorylation aurait un rôle important dans l'agrégation de tau en PHFs (Cho and Johnson, 2004b, Rudrabhatla and Pant, 2009).

➤ GSK3 β , APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

L'hyperphosphorylation de tau est montrée comme précédant le clivage de la caspase-3 (Cho and Johnson, 2004a). A l'examen neuropathologique, la présence de protéines clivées impliquées dans les voies de l'apoptose est observée dans les cerveaux Alzheimer (Rohn et al., 2002, Gamblin et al., 2003, Bhat et al., 2004). Suite à un stress apoptotique, une activation transitoire de la GSK3 β est suivie rapidement d'une translocation nucléaire de la GSK3 β phosphorylée en T276. Ces événements précèdent l'inactivation de la GSK3 β dans la phase exécutive de l'apoptose neuronale (Elyaman et al., 2002). La co-transfection de la GSK3 β et de la protéine tau engendre la mort cellulaire par apoptose, suggérant que la phosphorylation de tau par la GSK3 β est toxique (Shimura et al., 2004). De même, la sur-expression/sur-activation de GSK3 β dans la lignée cellulaire PC12 (Bhat et al., 2000, Bhat et al., 2002) et dans les cultures corticales de rats (Hetman et al., 2000) induit la mort neuronale. D'autre part, l'exposition de neurones hippocampaux de rat au peptide A β augmente l'activité de la GSK3 β , la phosphorylation de tau, puis la mort neuronale (Takashima et al., 1996). *A contrario*, l'inhibition de GSK3 β par des petites molécules (SB-415286 et SB-216763, voir plus loin) a également été montrée pour avoir un effet neuroprotecteur contre l'apoptose (Cross et al., 2001).

L'hypothèse selon laquelle la GSK3 β jouerait un rôle central dans la maladie d'Alzheimer et que sa dérégulation contribuerait à l'apparition des traits histopathologiques de la maladie, à la fois dans les cas sporadiques et les cas familiaux, a été clairement formulée en 2008 (Hooper et al., 2008). Les données établies par la communauté scientifique mettent en évidence que la GSK3 β , soit par augmentation de son activité, soit

par sa sur-expression, est impliquée dans l'hyperphosphorylation de tau, les déficits de mémorisation, l'augmentation de la production de peptides A β ainsi que la réponse inflammatoire, et qu'elle réduit la synthèse d'acétylcholine (un déficit cholinergique est observée dans la maladie d'Alzheimer) (Hoshi et al., 1996). De plus, la GSK3 β en tant que régulateur de l'apoptose et de la p53 peut directement contribuer à la perte neuronale observée dans la maladie d'Alzheimer (Turenne and Price, 2001, Proctor and Gray, 2010). Des données montrent que :

- la GSK3 β co-localise avec les neurites dystrophiques et les NFTs (Yamaguchi et al., 1996, Pei et al., 1997) ;
- l'activité de la GSK3 β , *via* la phosphorylation en Y216, est augmentée au niveau du cortex frontal des cerveaux Alzheimer (Leroy et al., 2007) ;
- la GSK3 β est sur-exprimée dans les hippocampes de patients Alzheimer (Blalock et al., 2004) ;
- la sur-expression de la GSK3 β chez des souris bloque l'initiation de la PLT (Hooper et al., 2007) et provoque un déficit d'apprentissage spatial (Hernandez et al., 2002). De plus, la PLT inhibe la DLT (dépression à long terme) *via* GSK3 β (Peineau et al., 2007), ce qui suggère que la GSK3 β est l'« interrupteur » entre ces deux processus, et que la sur-expression de la GSK3 β dans la maladie d'Alzheimer peut être à l'origine du déficit cognitif ;
- et enfin que la GSK3 β favorise l'assemblage de l'actine et de la tubuline (Koivisto et al., 2004).

Dans les cerveaux Alzheimer, la GSK3 β activée est localisée dans les PHFs, au niveau des neurites dystrophiques ainsi que dans les NFTs (Pei et al., 1997). D'autre part, le déficit spatio-temporel est associé avec l'augmentation de l'expression de la forme active de la GSK3 β , la progression des NFTs et la neurodégénérescence (Bhat et al., 2004). L'inhibition pharmacologique par le lithium ou les kenpaullones (des inhibiteurs spécifiques de la GSK3 β , voir plus loin) aussi bien que l'utilisation d'ARN interférents (ARNi) spécifiques de la GSK3 β réduisent la production de peptides A β dans les modèles animaux d'amyloïdose (Phiel et al., 2003). D'autre part, la GSK3 α , mais non la GSK3 β , régule le clivage de l'APP en augmentant la production de peptides A β (Sun et al., 2002, Phiel et al., 2003) et l'exposition de neurones aux peptides A β augmente l'activité de la GSK3 β (Takashima et al., 1996, Alvarez et al., 1999).

Au niveau périphérique, l'activité de la GSK3 β est importante pour la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Jope et al., 2007, Rodionova et al., 2007). Dans la maladie d'Alzheimer, une réponse inflammatoire est observée autour des plaques séniles (Christie et al., 1996, McGeer and McGeer, 1996). Elles sont la cible de l'immunothérapie contre la maladie d'Alzheimer (voir plus loin). L'immunothérapie est un succès concernant les fonctions cognitives et la réduction des plaques séniles dans les modèles animaux et les patients dits « Alzheimer » (Buttini et al., 2005). Cependant, les essais cliniques de phase II ont dû être arrêtés car les patients développaient des symptômes d'inflammation cérébrale ressemblant à des encéphalites ou des méningites suite à la vaccination par le peptide A β (Robinson et al., 2003, Schenk et al., 2005).

Du fait de l'augmentation de l'activité de la GSK3 β dans les cerveaux Alzheimer (Leroy et al., 2002), de l'implication de la GSK3 β dans l'hyperphosphorylation et l'agrégation de tau (Perez et al., 2003) et que la sur-expression de GSK3 β dans des souris transgéniques accélère la pathologie de tau (Terwel et al., 2008), la GSK3 β constitue une cible thérapeutique privilégiée dans la maladie d'Alzheimer.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA GSK3B

LITHIUM

Le lithium ($CI_{50_{\text{lithium}}} = 2\text{mM}$, CI : Concentration d'inhibition à 50 %), un cation monovalent déjà utilisé en clinique pour le traitement des troubles bipolaires, est un inhibiteur peu spécifique de la GSK3 β (Klein and Melton, 1996). Outre son AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), le lithium, en raison de sa petite taille, possède également la particularité de traverser par diffusion simple la BHE (barrière hémato-encéphalique). Le lithium agit directement sur l'activité de la GSK3 β , en entrant en compétition avec le Mg^{2+} (Ryves and Harwood, 2001). Il agit également indirectement sur la GSK3 β (et la GSK3 α), en augmentant la phosphorylation sur la S9 (et sur la S21) (Chalecka-Franaszek and Chuang, 1999, De Sarno et al., 2002). Comme attendu, les traitements chroniques de lithium provoquent une augmentation des niveaux protéiques de la β -caténine, un des substrats de la GSK3 β , mimant ainsi l'activation de la voie Wnt (Gould et al., 2003).

De nombreux autres inhibiteurs de la GSK3 β sont disponibles. Parmi eux, les paullones (Leost et al., 2000), les indirubines (Leclerc et al., 2001), les anilinomaléimides

(Smith et al., 2001) et les thiadiazolidinones (Martinez et al., 2002) sont les principaux, mais ont une tendance à inhiber d'autres kinases telles que la CDK2 (« Cyclin-Dependent Kinase 2 ») et la CDK5. Les indirubines sont des inhibiteurs de GSK3 β qui entrent en compétition avec l'ATP mais n'ont pas une sélectivité accrue pour la GSK3 β . Elles sont également sélectifs des CDKs (Bhat et al., 2004).

DERIVES DES ANILINOMALEIMIDES : SB-415286 ET SB-216763

A l'heure actuelle, les dérivés les plus utilisés pour inhiber la GSK3 β (et la GSK3 α) sont des dérivés des maléimides (Tableau 8). Le SB-216763 et SB-415286, qui sont eux aussi spécifiques de l'activité GSK3 β , entrent en compétition avec l'ATP. Ils sont neuroprotecteurs et n'agissent pas sur les CDKs (Smith et al., 2001). Cependant, les constantes d'inhibition observées *in vitro* pour SB-216763 et

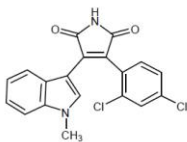
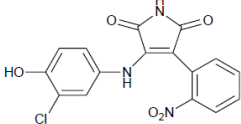
Dérivés des maléimides		
Noms	SB-216763	SB-415286
Noms usuels	3-(2,4-dichlorophényl)-4-(1-méthyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione	3-[(3-chloro-4-hydroxyphényl)amino]-4-(2-nitrophényl)-1H-pyrrole-2,5-dione
Structures		
CI50 _{GSK3αet β}	34 nM	78 nM
Dose pour un effet neuroprotecteur à 100%	3 μ M	30 μ M
Formule chimique	C ₁₉ H ₁₂ N ₂ O ₂ Cl ₂	C ₁₆ H ₁₀ N ₃ O ₅ Cl
Poids moléculaires	371,2 g.mol ⁻¹	359,7 g.mol ⁻¹

Tableau 8. **Caractéristiques des dérivés des maléimides : SB-216763 et SB-415286.**

SB-415286 sont respectivement plus sélectives pour la GSK3 α (9 nM et 31 nM) que pour la GSK3 β (34 nM et 78 nM) (Coghlan et al., 2000).

DERIVES DES INDIRUBINES

Historiquement, les indirubines bromées ont été découvertes par isolement des composants de la « pourpre de Méditerranée », un colorant unique réservé aux plus favorisés. Ce colorant est issu des mollusques : *Murex brandaris* et



Figure 23. **Mollusques à l'origine de la pourpre de Méditerranée.** A gauche, *Murex brandaris*. A droite, *Hexaplex trunculus*.

Hexaplex trunculus (Figure 23). Cette pourpre est composée de diverses indirubines plus ou moins bromées. D'autre part, l'Académie de Médecine Chinoise a démontré l'efficacité de l'indirubine contre la leucémie myéloïde chronique. En raison de la faible solubilité de l'indirubine et du faible taux de dérivés d'indirubines trouvés par les chimistes chinois, le monde occidental n'a quasiment pas étudié le potentiel de l'indirubine. Cependant, des chercheurs de la station biologique de Roscoff (France) ont observé que l'indirubine était un inhibiteur de l'activité des CDKs (Hoessel et al., 1999), puis de la GSK3 β (Leclerc et al., 2001). Cette équipe a ensuite cherché à accroître le potentiel de ces dérivés en ajoutant un groupement 3'-oxime afin d'améliorer leur solubilité et leur efficacité. Cette modification a augmenté la sélectivité de ces inhibiteurs pour la GSK3 β (Meijer et al., 2003).

Aujourd'hui, les dérivés des indirubines sont connus pour être des inhibiteurs puissants et réversibles de la GSK3 α/β (Meijer et al., 2003, Polychronopoulos et al., 2004). A l'origine, les indirubines sont sélectives

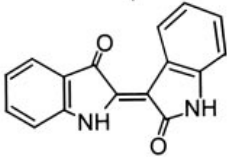
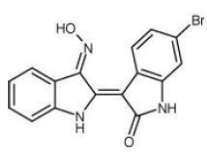
Noms	Indirubine	6-BIO
Structures		
GSK3 β	1	0,005
CDK1	10 (x10)	0,320 (x64)
CDK5	10 (x10)	0,083 (x17)

Tableau 9. **Constantes d'inhibition (en μM) pour la GSK3 β , la CDK1 et la CDK5 des dérivés d'indirubine.** Entre parenthèses sont indiquées les valeurs en nombre de fois de la spécificité des inhibiteurs comparée à celle pour la GSK3 β .

pour la GSK3 β comparée aux kinases CDK1 (« Cyclin-Dependent Kinase 1 ») et CDK5 (Meijer et al., 2003). Parmi les nombreux dérivés mis au point (dérivés non spécifiques d'autres kinases telles que les PKA, PKC, MAPKK ou Erk), le 6-bromoindirubin-3'-oxime (6-BIO) a vu sa sélectivité et sa spécificité augmentées, ce qui en fait un inhibiteur sélectif et puissant pour la GSK3 β (Tableau 9). Malgré cela, le 6-BIO possède une forte toxicité sur les cellules de la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y (9 μM) (Vougogiannopoulou et al., 2008). Afin de réduire cette toxicité relativement élevée, la position du groupement bromé a été modifiée pour générer les composés 5-BIO et 7-BIO. Ces composés synthétisés n'ont montré *in vitro* que très peu de spécificité vis-à-vis de la GSK3 β (>100 μM) (Zahler et al., 2007).

DERIVES DU 6-BIO

Toujours en vue de diminuer la toxicité du 6-BIO, une nouvelle génération de dérivés du 6-BIO a été conçue afin d'augmenter la sélectivité pour la GSK3 β . Parmi les 26 composés dérivés du 6-BIO, 11 ne sont toxiques qu'au-delà de 70 μ M et leurs constantes d'inhibition sont comprises entre 0,003 μ M et 0,140 μ M (Vougianniopoulou et al., 2008). Ces nouveaux composés synthétisés méritent d'être évalués au niveau de leur efficacité *in vivo* vis-à-vis de la GSK3 β ainsi que pour leur potentiel rôle neuroprotecteur.

2. CYCLIN-DEPENDENT KINASE 5

La CDK5, essentielle au développement du SNC, est une kinase PDPK codée par le gène 7q36 chez l'Homme et, comme son nom l'indique, a la possibilité de se lier aux cyclines (D et E) (Miyajima et al., 1995, Guidato et al., 1998). Son poids moléculaire est de 33 kDa. Malgré son nom, la CDK5 n'interfère pas avec le cycle cellulaire. Bien que la CDK5 soit exprimée dans de nombreux tissus, son activité est restreinte aux neurones (cellules post-mitotiques) (Paglini and Caceres, 2001, Paglini et al., 2001) en raison de la distribution de ses activateurs (Kesavapany et al., 2004) : les protéines p35 (Ishiguro et al., 1994, Tsai et al., 1994) et p39 (Humbert et al., 2000a, Humbert et al., 2000b). Bien qu'elle possède 57 % d'homologie avec p35 (Dhariwala and Rajadhyaksha, 2008), l'expression de p39 est très peu documentée. Elle est fœtale et s'estompe au fur et à mesure que p35 est exprimée.

CDK5 est impliquée dans la régulation des éléments du cytosquelette (Hallows et al., 2003, Smith, 2003), la croissance neuritique (Nikolic et al., 1996), le transport membranaire (Shea et al., 2003, Barclay et al., 2004) ainsi que les fonctions synaptiques (Cheng and Ip, 2003). Cette kinase phosphoryle des résidus sérine ou thréonine qui sont immédiatement suivis d'une proline et d'un résidu basique (K ou R) situé en position +3 du site de phosphorylation, soit un motif de type S/TPXK/R (Shetty et al., 1993, Brown et al., 1999). Le 3^{ème} activateur de CDK5, p25 (plus stable que p35), est issu du clivage de la p35 induit par des protéases calcium-dépendantes, les calpaïnes (Lee et al., 2000). Le complexe CDK5/p25 est hyperactif et voit son activité kinasique et donc l'hyperphosphorylation de tau ainsi que la neurotoxicité augmentées (Camins et al., 2006). Un fragment similaire nommé p29 (et issu du clivage de p39) tend également à perturber l'activité de CDK5 (Patzke et al., 2003).

La CDK5 est régulée par des modifications post-traductionnelles et transcriptionnelles (Dhariwala and Rajadhyaksha, 2008). Les phosphorylations de la CDK5 en T14 et S159 sont inhibitrices alors que la phosphorylation en T15 est activatrice (Sharma et al., 1999, Dhavan and Tsai, 2001). La phosphorylation de p35 en S8 et T38 par la CDK5 elle-même provoque son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Kamei et al., 2007). La CDK5 régule en amont les voies de signalisation cellulaire des MAPKs (Zheng et al., 2007, Chang et al., 2010). Outre les MAPKs, les autres substrats de la CDK5 sont la protéine tau et les neurofilaments (Shetty et al., 1993, Hisanaga et al., 1995, Pant and Veeranna, 1995, Hollander et al., 1996). Au niveau transcriptionnel, CDK5 est régulée par δ FosB, un membre de la famille des facteurs de transcription c-jun (Chen et al., 2000).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA CDK5

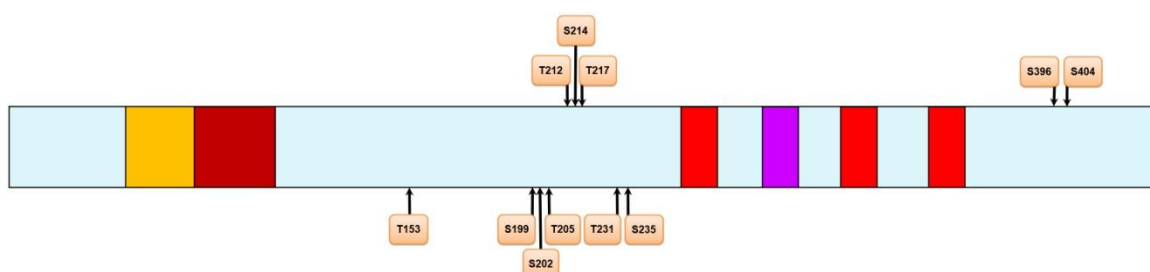


Figure 24. **Localisation des sites de phosphorylation de tau par la CDK5.** Tous les sites de phosphorylations ciblés par la CDK5 sont des sites dits pathologiques.

La CDK5 phosphoryle tau sur 11 sites (Figure 24). Parmi ces sites, 7 (soit 63 % des sites phosphorylés par la CDK5) sont trouvés dans la région riche en proline. L'activation à long terme de la CDK5 chez des souris (27 semaines) entraîne la formation de NFTs dans le cortex et l'hippocampe (Cruz et al., 2003). D'autre part, la phosphorylation de tau par la CDK5 la rend meilleure substrat de la GSK3 β (Sengupta et al., 1997). Parmi les principaux substrats de la CDK5 figurent également l'APP, la PSEN1 et la β -caténine (Tableau 10).

Substrats de la CDK5	Sites de phosphorylation de la CDK5	Effets générés par la phosphorylation
APP	T668	Affecte le transport soutenu par les microtubules, augmentation du taux de peptides A β
Tau	T153, S199, S202, T205, T212, T214, T217, T231, S235, S396 et S404	Hyperphosphorylation de tau, désorganisation du cytosquelette
MAP		Diminution de la stabilité du cytosquelette
pRb	S87, S249, T252, T373, S780, T821 et T826	Phosphorylation de pRb, défaut d'expression d'E2F et mort cellulaire
β -caténine	Y654	Dissociation de la N-cadhérine, diminution des adhésions intercellulaires
PSEN1	T354	Stabilisation du fragment C-terminal de PSEN1

Tableau 10. **Sites de phosphorylation sur les principaux substrats de la CDK5 et effets générés.** APP : Précurseur Protéique de l'Amyloïde ; pRb : protéine du Rétinoblastome ; PSEN1 : Préséniline 1.

La CDK5 est impliquée dans l'apoptose neuronale mais son action pro- ou anti-apoptotique est dépendante du contexte cellulaire. La phosphorylation de la protéine de rétinoblastome, pRb, par la CDK5 est un événement précoce à la neurotoxicité induite par le complexe CDK5-p25 (Hamdane et al., 2005). *A contrario*, CDK5 peut également phosphoryler la protéine Bcl-2 (« B-cell lymphoma 2 ») et donc inhiber l'apoptose (Cheung et al., 2008) en empêchant le relargage dans le cytosol du cytochrome c. Le complexe CDK-p25 interagit avec d'autres voies cellulaires comme celle des kinases GSK3 β et c-Jun (Dhariwala and Rajadhyaksha, 2008). En effet, la CDK5 peut inhiber, *via* une phosphorylation en T131, la JNK3. Cette inhibition a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation de son substrat c-Jun, et donc de réduire le niveau d'apoptose (Li et al., 2002). De plus, les cultures corticales de neurones de souris invalidées pour la CDK5 montrent une augmentation de la sensibilité à des stimuli apoptotiques, associée à une augmentation de l'activité de JNK3 et de la phosphorylation de c-Jun (Li et al., 2002).

D'autre part, l'inhibition de CDK5 par la butyrolactone réduit la toxicité induite par le peptide A β (Alvarez et al., 1999). A l'inverse, la sur-expression de p35, l'activateur de CDK5, et la présence du peptide A β induisent une apoptose dans les cultures neuronales et ce, de façon synergique (Utreras et al., 2009).

L'implication de CDK5 dans la maladie d'Alzheimer reste controversée. Chez les cerveaux de patients Alzheimer, des études ont montré que le ratio p25/p35 et le niveau du complexe CDK5/p25 sont augmentés (Camins et al., 2006). Cependant, ces données sont en contradiction avec une autre étude montrant que le taux de p25 est diminué dans les cerveaux Alzheimer (Dhariwala and Rajadhyaksha, 2008).

Toutefois, concernant la maladie d'Alzheimer, l'étude de la CDK5 présente un grand intérêt pour plusieurs raisons :

- la CDK5 induit l'hyperphosphorylation des protéines tau, pouvant être à l'origine de l'accumulation de tau en DNF ;
- la CDK5 régule les activités de nombreuses kinases, dont GSK3 β , induisant ainsi l'hyperphosphorylation de tau (Kerokoski et al., 2001, Van den Haute et al., 2001) ;

- la CDK5 phosphoryle PSEN1 et altère ses interactions avec d'autres molécules, mais, à ce jour, la présence du complexe CDK5-PSEN1 n'a pas été rapportée comme affectant la production de peptides A β (Smith and Tsai, 2002, Shelton and Johnson, 2004) ;
- la CDK5 phosphoryle directement l'APP en T668, relocalisant ainsi l'APP du soma à l'axone (Iijima et al., 2000). Cette phosphorylation favorise la formation des peptides A β (Lee et al., 2003) ;
- la CDK5 est impliquée dans la neurodégénérescence induite par le peptide A β (Lopes et al., 2010).

De plus, *in vivo*, l'activation de la CDK5 cause l'activation de GSK3 β et l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de la CDK5 pourrait constituer une cible thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer (Iqbal et al., 2009). Outre la maladie d'Alzheimer, les implications de la CDK5 dans l'apoptose neuronale font de la CDK5 une cible thérapeutique pour de nombreuses autres pathologies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson et la maladie d'Huntington (Dhariwala and Rajadhyaksha, 2008).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA CDK5

(R)-ROSCOVITINE

La purine (*R*)-roscovitine et l'olomoucine figurent parmi les nombreux inhibiteurs pharmacologiques disponibles de CDK5. La (*R*)-roscovitine possède une plus grande sélectivité pour la CDK5 comparée aux autres CDKs (Tableau 11) et possède l'avantage de traverser la BHE (Knockaert et al., 2002, Pallas et al., 2005, Vita et al., 2005). La (*R*)-roscovitine inhibe l'activité kinasique en

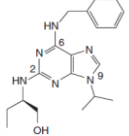
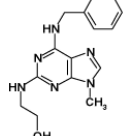
Noms	(<i>R</i>)-Roscovitine	Olomoucine
Noms chimiques	2-(<i>R</i>)-(1-éthyl-2-hydroxyéthylamino)-h-benzylamino-9-isopropylpurine	2-(2-hydroxyéthylamino)-6-benzylamino-9-méthylpurine
Structures		
Formule brute	C ₁₉ H ₂₆ N ₆ O	C ₁₅ H ₁₈ N ₆ O
Masse molaire	354,5 g.mol ⁻¹	298,3 g.mol ⁻¹
Sélectivité des inhibiteurs		
CDK1	0,65	7
CDK2	0,70	7
CDK4	>100	>1000
CDK5	0,16	3
CDK6	>100	>250
Erk1/2	>14	>40
PKC	>100	>800

Tableau 11. Comparaison de la sélectivité de 2 inhibiteurs de CDK5 : l'olomoucine et la roscovitine. D'après (Meijer et al., 1997). Les concentrations inhibitrices 50 sont données en μ M.

entrant en compétition avec l'ATP. La CI50 est de 160 nM (De Azevedo et al., 1997, Meijer et al., 1997). Comme on peut le constater dans le Tableau 11, la (*R*)-roscovitine est également sélective des CDK1 et CDK2 mais à des concentrations 4,1 et 4,4 fois plus élevées. La concentration efficace sur la CDK5 comparée aux autres CDKs est de 25 µM (Meijer et al., 1997). Parmi les inhibiteurs présentés dans ce manuscrit, seule la (*R*)-roscovitine (aussi nommée CYC202, Sélaciclib) est, depuis 2006, en essais cliniques de phase II pour les cancers du sein, les lymphomes des cellules B et le cancer du poumon à grandes cellules (Ribas et al., 2006). Ces essais de phase II en font un inhibiteur hautement important en vue d'une future extension d'AMM pour la maladie d'Alzheimer.

(*R*)-CR8

Le composé (*R*)-CR8 (l'isomère *R*) est un dérivé de la (*R*)-roscovitine. (*R*)-CR8 est obtenu en remplaçant le groupement benzyle en position N6 par un groupement 4-(2-pyridiyl)benzyle. (*R*)-CR8 est un inhibiteur des CDK1/2/5/9, deux à quatre fois plus spécifique que la (*R*)-roscovitine (Bettayeb et al., 2008).

Kinases	(<i>R</i>)-roscovitine	(<i>R</i>)-CR8
CDK1/cycline B	0,33	0,09
CDK2/cycline A	0,21	0,072
CDK2/cycline E	0,17	0,041
CDK5/p25	0,28	0,11
CDK7/cycline H	0,8	1,1
CDK9/cycline T	0,23	0,18
CK1δ/ε	4	0,4
DYRK1A	3	3,6
Erk2	11	3,6
GSK3α/β	60	12

Tableau 12. **Sélectivité de la (*R*)-roscovitine et du (*R*)-CR8.** D'après (Bettayeb et al., 2008). Les concentrations inhibitrices 50 sont données en µM.

L'inhibition conjointe des 3 kinases majoritaires de tau (GSK3β, CDK5 et CK1) en fait un composé hautement attractif pour la maladie d'Alzheimer. Cependant, l'application de (*R*)-CR8 sur des cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y est 32 fois plus toxique que la (*R*)-roscovitine ($CI50_{(R)\text{-CR8}} = 0,55 \mu\text{M}$ versus $CI50_{(R)\text{-roscovitine}} = 17,8 \mu\text{M}$; Tableau 12). En effet, (*R*)-CR8 est respectivement 50 et 68 fois plus puissant que la (*R*)-roscovitine pour induire le clivage de PARP et activer les caspases, des protéines impliquées dans l'apoptose. Ces données suggèrent plutôt une utilisation de (*R*)-CR8 contre diverses tumeurs (Bettayeb et al., 2008).

3. MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES

Les implications des MAPKs, Erk1/2, MEK (« MAP/Erk kinase »), JNK et p38 dans la phosphorylation anormale de tau en font des cibles thérapeutiques potentielles dans la maladie d'Alzheimer (Harper and Wilkie, 2003, Churcher, 2006). Des augmentations des niveaux de phosphorylation d'Erk1/2 ainsi que des niveaux d'Erk et de JNK ont été trouvées dans les cerveaux Alzheimer en *post-mortem* (Zhu et al., 2001a, Pei et al., 2002). Une phosphorylation prolongée des MAPKs intervient également suite à une dérégulation ou une inhibition de la PP2A (Pei et al., 2003, Zhao et al., 2003). Les MAPKs, JNK, p38 et Erk1/2 phosphorylent tau *in vitro* sur des sites spécifiques retrouvés dans les cerveaux Alzheimer et colocalisent *in vivo* avec tau (Zhu et al., 2001b, Augustinack et al., 2002, Bartov et al., 2006) mais aussi, dans le cas de JNK et p38, avec des agrégats de tau dans différentes tauopathies (Atzori et al., 2001). Une augmentation de l'activité des MAPKs est également mise en évidence dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou du syndrome de Down (Swatton et al., 2004b). De plus, le stress oxydatif observé dans la maladie d'Alzheimer (Moreira et al., 2005a, Moreira et al., 2005b, Nunomura et al., 2006) est associé à une activation des voies JNK, Erk et p38 (Robinson and Cobb, 1997).

A. P38

Chez l'Homme, le gène codant pour la kinase p38 (ou MAPK14 ou encore SAPK2, « Stress-Activated Protein Kinase 2 ») (Goedert et al., 1997a) est localisé dans le locus p21.3-22 du chromosome 6. Il existe 4 isoformes de p38 : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ (Kyriakis and Avruch, 2001). Au niveau physiologique, la kinase p38 est activée par une double phosphorylation d'un motif TGY suite à un stress extracellulaire ou sous l'action des cytokines (Thornton and Rincon, 2009, Remy et al., 2010). Les MAPKKs (« MAPK kinases ») activatrices de p38 sont MKK3/6 (Derijard et al., 1995, Han et al., 1996, Remy et al., 2010) voire MKK4 (Dalrymple, 2002). P38 est également activée par autophosphorylation (Ge et al., 2002). Parmi les nombreux substrats de la kinase p38, figurent p53, GSK3 β et tau (Thornton et al., 2008). En particulier dans le cerveau, la p38 phosphoryle en S389 et inhibe la protéine GSK3 β (Thornton et al., 2008).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA P38

Les 4 isoformes de p38 (Kyriakis and Avruch, 2001) phosphorylent tau sur 21 résidus (Figure 25) (Feijoo et al., 2005, Sergeant et al., 2008), soit 27 % des sites de phosphorylation de la protéine tau. Parmi ces sites, certains nécessitent l'interaction de p38 avec une SAPK3/4. Aucun de ces sites ne se trouve dans les domaines répétés de la protéine tau. Cependant, ces données observées *in vitro* ne préfigurent en rien le fonctionnement de p38 *in vivo*.

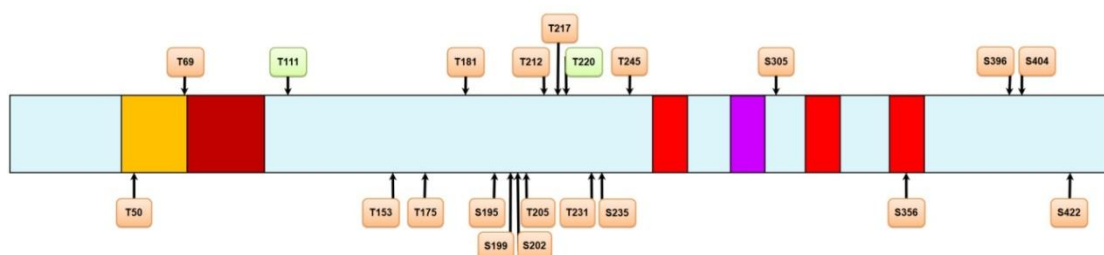


Figure 25. **Localisation des sites de phosphorylation de tau par la p38.**

➤ P38, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

P38 est impliquée dans l'apoptose (Xia et al., 1995) induite suite à un stress oxydatif, environnemental ou chimique (Kyriakis et al., 1994, Johnson and Lapadat, 2002, Weston and Davis, 2002). Les kinases p38 et JNK sont activées suite à une induction de cytotoxicité par une drogue déstabilisatrice du cytosquelette, la colchicine (Yang et al., 2007), ce qui suggère une possible implication d'une désorganisation des microtubules dans la mort apoptotique. *A contrario*, la p38 est montrée comme pouvant inactiver la GSK3 β (en phosphorylant la S389) et, par conséquent, conduire à une stabilisation de la β -caténine, et promouvoir la survie cellulaire (Thornton and Rincon, 2009).

Nom usuel	SB239063
Nom	trans-4-[4-(4-Fluorophényl)-5-(2-méthoxy-4-pyrimidinyl)-1H-imidazol-1-yl]cyclohexanol
Structure	
CI50	44 nM
Formule chimique	C ₂₀ H ₂₁ FN ₄ O
Poids moléculaires	368,4 g.mol ⁻¹

Tableau 13. **Caractéristiques du SB239063, inhibiteur de la p38.**

Les peptides A β conduisent à l'activation de la p38 (McDonald et al., 1998). Cette activation serait impliquée dans la réponse inflammatoire associée à la maladie d'Alzheimer (Dalrymple, 2002). Dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la forme active de p38 est co-localisée dans les NFTs ainsi que dans les neurones se trouvant à l'intérieur ou à proximité des plaques séniles (Zhu et al., 2000). Ces données tendent à indiquer une possible implication de p38 *in vivo* dans la maladie d'Alzheimer. Ainsi, bloquer la pathologie de tau et la mort neuronale par des inhibiteurs spécifiques de la kinase p38 pourrait constituer une stratégie thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA P38

Le SB239063 (CI₅₀ = 44 nM) est un inhibiteur de la kinase p38 (Tableau 13). Ce puissant inhibiteur est 220 fois plus sélectif pour la kinase p38 que pour Erk, JNK et les autres kinases. SB239063 réduit la production des cytokines inflammatoires (Underwood et al., 2000) et est neuroprotecteur contre un stress excitotoxique des neurones primaires en culture (Legos et al., 2002).

B. ERK1/2

Les Erk1/2 (également connues sous le nom de MAPK3 sont respectivement codés par les gènes situés sur les loci 16p11.2 (Charest et al., 1993) et 22q11.2 (Li et al., 1994a). Les Erk1/2 phosphorylent la sérine des motifs KSP (Roder et al., 1993, Giasson and Mushynski, 1996). Elles sont activées suite à l'activation de la protéine Raf ou Ras (MAPKKK : « MAPKK Kinase »), suivie de celle de MEK1/2 (MAPKK) (Crews et al., 1992, Alessi et al., 1994). Suite à cette activation, Erk1/2 est transloquée au noyau et phosphoryle ses substrats tels que la p90Rsk, la phospholipase A2 ou des facteurs de transcriptions comme c-Myc ou Elk-1 (Wada and Penninger, 2004).

➤ TAU, SUBSTRAT D'ERK1/2

Bien que l'implication d'Erk1/2 dans la phosphorylation de tau *in vivo* ait été controversée (Latimer et al., 1995, Ekinici and Shea, 1999), *in vitro* cette kinase phosphoryle tau sur 16 sites parmi lesquels les sites S396 et S404 (Figure 26) (Guise et al., 2001, Echeverria et al., 2004, Sergeant et al., 2008).

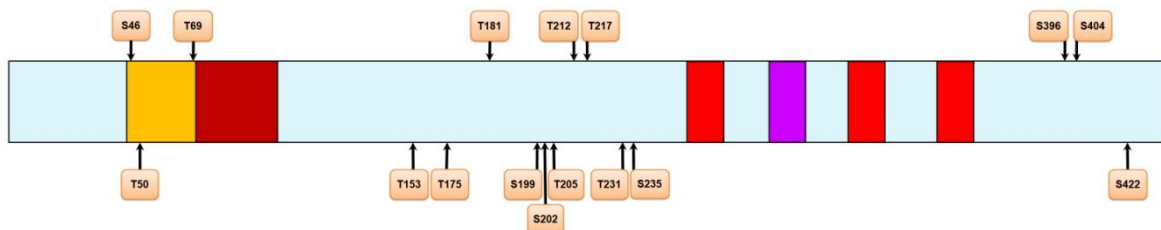


Figure 26. **Localisation des sites de phosphorylation tau par Erk1/2.**

➤ ERK1/2, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Erk1/2 est impliquée dans la mort neuronale (Veeranna et al., 2004, Medina et al., 2005). Suite à un traitement au paclitaxel (une drogue anticancéreuse, toxine du cytosquelette), une augmentation d'Erk est observée, suivie successivement d'une hyperphosphorylation de tau aux résidus S199 et S202 et d'une apoptose (Guisse et al., 2001). De même, les agrégats de peptides A β induisent l'activation de la caspase-3, ainsi qu'une activation de la voie Erk (Ferreira et al., 1997, Rapoport and Ferreira, 2000, Chong et al., 2006).

D'autre part, les souris transgéniques pour l'*ApoE4* (facteur de risque de la maladie d'Alzheimer) présente une forte activité Erk associée à un niveau élevé de la phosphorylation de tau (Harris et al., 2004). De même, une phosphorylation anormale de tau est corrélée avec une augmentation de la phosphorylation et de l'activité d'Erk1/2 dans les cerveaux Alzheimer en *post-mortem* (Pei et al., 2002, Swatton et al., 2004a). L'activité d'Erk est également régulée par les PSEN1/2 (Dehvari et al., 2008).

Ces données suggèrent qu'Erk pourrait être impliquée dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Ainsi, développer des inhibiteurs de la protéine Erk pourrait donc présenter un intérêt thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE D'ERK1/2

Les 2 principaux inhibiteurs de la voie Erk1/2 sont PD98059 et U0126 (Duncia et al., 1998). Tous deux inhibent les MEK1 et 2 dans des proportions différentes (Tableau 14).

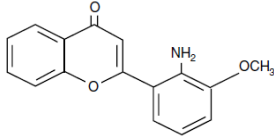
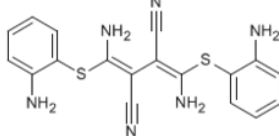
Noms usuels	PD98059	U0126
Noms	2-(2'-amino-3'-méthoxy)-flavone	1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophénylthio)-butadiène
Structures		
CI50_{MEK1}	4 µM	72 nM
CI50_{MEK2}	50 µM	58 nM
Formule chimique	C ₁₆ H ₁₃ NO ₃	C ₁₈ H ₁₆ N ₆ S ₂
Poids moléculaires	267,3 g.mol ⁻¹	380,5 g.mol ⁻¹

Tableau 14. **Caractéristiques des inhibiteurs de la voie Erk : PD98059 et U0126.**

C. JNK1/2/3

Les 3 kinases JNK1/2/3 (également connues sous le nom de MAPK8/9/10) sont codées par des gènes distincts situés respectivement sur les loci 10q11.2, 5q35 (Gupta et al., 1996) et 4q21.3 (Yoshida et al., 2002). Les JNK1/2/3 sont exprimées dans le cerveau et sont activées par phosphorylation des résidus tyrosine et thréonine par des kinases telles que MKK4 (connue aussi sous les noms de SEK1/JNKK1) ou la MKK7 (connue aussi sous les noms de SEK2/JNKK2) (Wada and Penninger, 2004). Les JNKs sont inhibées par l'action de phosphatases telles que les MAPPs (« Mitogen-activated protein phosphatases ») (Karin, 1995).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA JNK1/2/3

In vitro, les kinases JNKs, en association avec les SAPKs, phosphorylent tau sur 14 sites (Figure 27) (Reynolds et al., 1997).

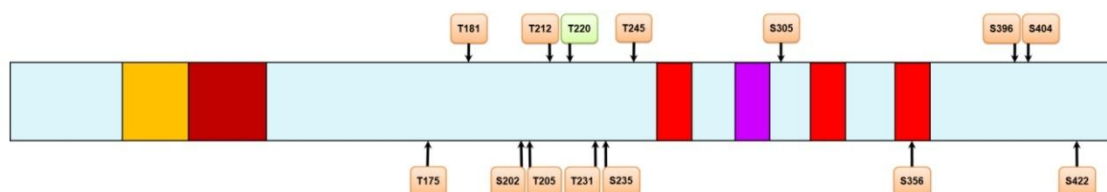


Figure 27. **Localisation des sites de phosphorylation de tau par les JNK1/2/3.**

➤ JNK1/2/3, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Les kinases JNKs régulent l'apoptose en réponse à plusieurs types de stress dont l'exposition aux ultra-violets, aux radiations ionisantes, aux drogues anticancéreuses telles

que le cisplatine, l'étoposide, aux cytokines comme le TNF α et la privation du facteur trophique NGF (« Nerve Growth Factor ») (Xia et al., 1995, Wada and Penninger, 2004).

Dans la maladie d'Alzheimer et les autres tauopathies, les protéines JNKs et SAPKs sont associées aux agrégats de tau dans les neurones et les cellules gliales (Ferrer et al., 2002). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la JNK/SAPK phosphorylée (donc activée) est redistribuée au niveau cellulaire et co-localise avec les protéines tau hyperphosphorylées (Zhu et al., 2001b). Les JNKs sont également impliquées dans l'augmentation de l'activité de la γ -sécrétase conduisant à une accumulation des peptides A β , ce qui suggère un rôle potentiel des JNKs dans la formation des plaques séniles (Shen et al., 2008). L'inhibition des JNKs pourrait donc constituer une stratégie de neuroprotection contre la maladie d'Alzheimer.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DES JNK1/2/3

SP600125 est un inhibiteur puissant et réversible des kinases JNK1/2/3 (Tableau 15) (Bennett et al., 2001). Cet inhibiteur est 300 fois plus sélectif des kinases JNKs que des kinases Erk et p38 (Han et al., 2001). Il est également deux fois plus sélectif pour les JNK1/2 que pour la JNK3 (Tableau 15).

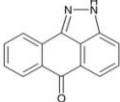
Nom	SP600125
Structure	
CI50 _{JNK1/2}	40 nM
CI50 _{JNK3}	90 nM
Formule	C ₁₄ H ₈ N ₂ O
Poids	220,2 g.mol ⁻¹

Tableau 15. **SP600125, caractéristiques**

B. NON-PROLINE-DIRECTED PROTEIN KINASE

Dans le groupe des kinases non-PDPK phosphorylant tau, sont trouvées :

- les kinases de tau et de la tubuline : TTBK1/2 (« Tau-TuBulin Kinase 1/2 ») (Tomizawa et al., 2001, Sato et al., 2006, Kitano-Takahashi et al., 2007),
- les caséines kinases : CK1 α /1 δ /2 (« Casein Kinase 1 α /1 δ /2 ») (Greenwood et al., 1994, Hanger et al., 2007),
- les kinases ayant une double spécificité de régulation et de phosphorylation des tyrosines : DYRK (« Dual-specificity tYrosine phosphorylation and Regulated Kinase ») (Woods et al., 2001),

- les kinases régulant l'affinité pour les microtubules : MARK (« Microtubule Affinity-Regulating Kinase ») (Drewes et al., 1997, Drewes, 2004),
- la kinase phosphorylante (KP) (Paudel, 1997),
- les PKA, PKB/Akt, PKC et PKN (« Protein Kinase cAMP-dependent/B/C/N ») (Sergeant et al., 2005),
- la CaMKII (« Ca²⁺/CalModulin-dependent protein Kinase II »).

1. TAU-TUBULIN KINASE 1/2

Les TTBKs appartiennent à la superfamille de la CK1 (Manning et al., 2002) et à la famille des kinases non-PDPK. Elles phosphorylent la protéine tau et la tubuline. La TTBK1 est codée par un gène localisé dans le locus 6q21.1, et est fortement exprimée dans les neurones (Sato et al., 2002). Le gène qui code pour la TTBK2 est situé dans le locus 15q15.2. Le transcrit primaire, composé de 20 exons, génère par épissage alternatif 3 transcrits comportant 13, 15 et 19 exons. Ces exons renferment obligatoirement les exons 4 à 9 et 14 à 20 (Kraemer et al., 2006, Houlden et al., 2007, Edener et al., 2009). La partie N-terminale code pour le domaine kinase. TTBK2 est hautement exprimée dans les cellules de Purkinje, les cellules de la couche de cellules granulaires, l'hippocampe, le cerveau moyen et la substance noire. En revanche, l'expression de TTBK2 est beaucoup plus faible au niveau du cortex cérébral (Houlden et al., 2007).

Les TTBK1 (Sato et al., 2002) et TTBK2 (Houlden et al., 2007) phosphorylent des résidus sérines suivis d'une arginine (motif SR). TTBK1 et TTBK2 présentent une grande homologie dans les 554 premiers acides aminés (identiques pour 60%) (Sato et al., 2008).

➤ TAU, SUBSTRAT DES TTBK1/2

TTBK1 et TTBK2 phosphorylent tau sur 10 sites (Figure 28) (Sato et al., 2006, Lebouvier et al., 2008). Les phosphorylations des sites S202 et S422 sont impliquées dans l'agrégation des protéines tau (Pennanen and Gotz, 2005). La TTBK1 induit, et ce, de façon dose-dépendante, l'agrégation des protéines tau (Sato et al., 2006). En particulier, la TTBK2 phosphoryle tau en S208 et S210 (Tomizawa et al., 2001), qui constituent des sites de « priming » pour une phosphorylation ultérieure par la GSK3β (Noble et al., 2005).

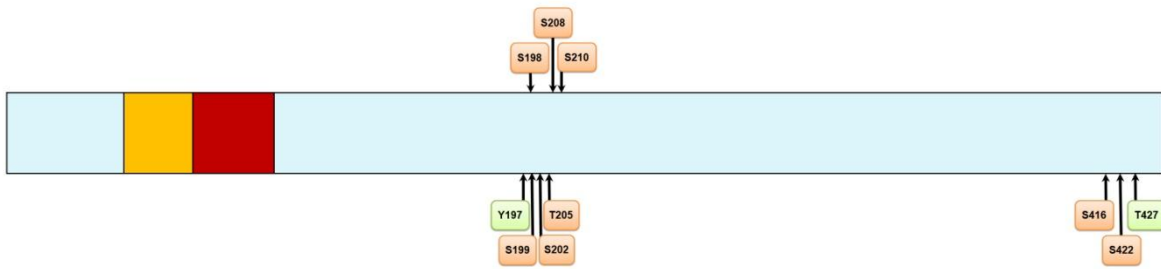


Figure 28. **Localisation des sites de phosphorylation de tau par les TTBK1/2.**

➤ TTBK1/2, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Outre les phosphorylations sur la protéine tau, la présence de TTBK1 est observée dans les neurones se trouvant dans un environnement présentant des plaques séniles au niveau des régions corticales des cerveaux Alzheimer (Sato et al., 2002, Sato et al., 2008). De même, la TTBK2 est retrouvée dans les PHFs. D'autre part, des mutations de TTBK2 ont été identifiées chez des patients atteints d'ataxie cérébelleuse de type 11 et montrent une dégénérescence cérébelleuse ainsi qu'une agrégation de tau (Houlden et al., 2007). Le modèle animal de souris sur-exprimant la protéine TTBK1 développe progressivement, avec l'âge, une phosphorylation des neurofilaments et de la protéine tau, une activation des calpaïnes, une augmentation de la formation du complexe CDK5/p25 (due probablement au clivage de la p35 en p25 par les calpaïnes), une diminution des récepteurs au NMDA ainsi qu'une perte neuronale. Ces données évoquent une possible implication des TTBKs dans la cascade de tau (Sato et al., 2008), et donc l'importance de développer des inhibiteurs spécifiques des TTBKs. D'autre part, aucune donnée concernant les TTBK1/2 et l'apoptose n'a été établie.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DES TTBK1/2

Actuellement, il n'existe pas d'inhibiteurs pharmacologiques des TTBKs. Pour inhiber ces kinases, seule l'approche moléculaire utilisant la technologie ARNi peut être envisagée.

2. CASEIN KINASES 1A/1Δ/2

Les caséines kinases (CK) monomériques CK1 α /1 δ /2 appartiennent à la superfamille des kinases caséines de type 1 et sont codées par des gènes situés respectivement dans les loci 13q13 (Tapia et al., 1994), 17q25 (Kusuda et al., 1996) et 6q21.3 (Albertella et al., 1996). Les CKs sont hautement conservées au niveau de leur domaine catalytique et

différent entre elles par la longueur de la partie N-terminale. Il existe au moins 7 isoformes de CK1 nommées α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ et ϵ . Leurs poids moléculaires varient entre 37 kDa (CK1 α) et 51 kDa (CK1 γ_3) (Knippschild et al., 2005). Les CKs phosphorylent la dernière sérine ou thréonine des motifs D/EXXS/T et SLS pour les motifs non phosphorylés, et pS/pTXXS/T (où pS et pT font références à des sérine et thréonine phosphorylées) pour les motifs préalablement phosphorylés (Marin et al., 2003). Seules les CK1 α et CK1 δ semblent être impliquées dans la maladie d'Alzheimer (Sergeant et al., 2005).

La forme active de la CK2 est un hétérotétramère composé de 2 sous-unités catalytiques (α et/ou α') et de 2 sous-unités régulatrices β . CK2 utilise indifféremment l'ATP ou le GTP comme substrat énergétique et donneur du groupement phosphate (Ahmad et al., 2008). CK2 phosphoryle les motifs S/TXXD/E et S/TXXS/T/pY (où pY fait référence à une phospho-tyrosine) (Marin et al., 2003).

➤ TAU, SUBSTRAT DES CK1A/1 Δ /2

Les activités de CK1 et CK2 contribuent à la dynamique des microtubules en phosphorylant *in vitro* la protéine tau, modulant ainsi son affinité pour les microtubules (Risnik et al., 1988, Li et al., 2004). En réponse à un stress génotoxique, CK1 δ régule la dynamique du cytosquelette par phosphorylation de la tubuline ou des MAPs telles que les protéines tau, MAP4, MAP1A et la stathmine (Singh et al., 1995, Behrend et al., 2000, Knippschild et al., 2005).

CK1 phosphoryle tau sur 46 sites (Figure 29). Cependant, les sites AT-8 (S202/T205) et PHF-1 (S396/S404) restent controversés (Li et al., 2004). Neuf sites sont exclusivement phosphorylés par la CK1 δ (T17, T95, T101/T102, S113, T169, S238, T263, S341 et S433) dont 3 présents dans les PHFs (S113, S238 et S433) (Hanger et al., 2007). La CK2 phosphoryle la protéine tau et régule ses interactions aux microtubules (Avila et al., 1994) *via* 7 sites de phosphorylation (T39, T52, S56, S199, T386, S400 et S412) (Greenwood et al., 1994, Hanger et al., 2007).

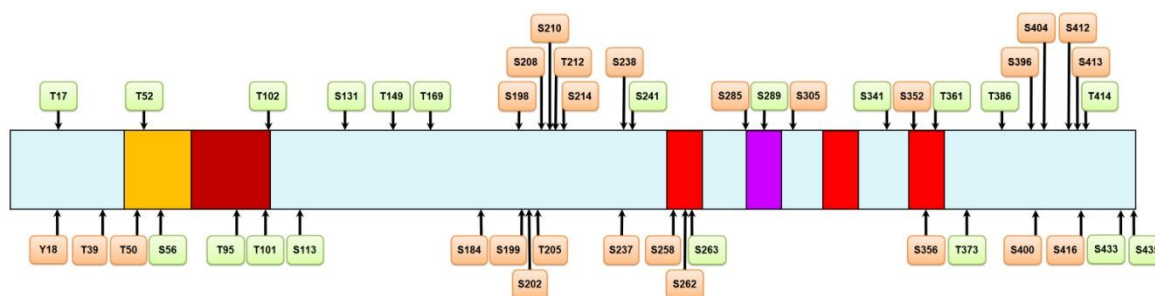


Figure 29. **Sites de phosphorylation de tau par les CK1/2.**

➤ CK1A/1Δ/2, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Les isoformes de CK1 régulent l'apoptose *via* la phosphorylation du récepteur aux neurotrophines p75^{NTR} (Beyaert et al., 1995). Les isoformes α et δ de CK1 et la CK2 sont impliquées dans la régulation de l'apoptose induite par Fas/CD95. L'inhibition de CK1 et CK2 accélère l'apoptose dépendante de Fas/CD95, alors que leurs sur-expressions diminuent le nombre de cellules apoptotiques. D'autre part, les CK1 et CK2 font partie du complexe de la voie Wnt/ β -caténine (voir plus haut). Les CKs, plus particulièrement CK1 α , phosphorylent en S45 la β -caténine (Liu et al., 2002a, Marin et al., 2003) stimulant ainsi sa translocation dans le noyau et la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire (Song et al., 2000). Cette phosphorylation S45 est nécessaire à la phosphorylation en T41, S37 et S33 de la β -caténine par la GSK3 β (Liu et al., 2002a). Bien qu'aucune donnée n'ait été établie concernant l'apoptose neuronale et les CKs, l'ensemble des études menées dans les autres systèmes cellulaires montrent qu'une réduction des niveaux de CK1 ou de CK2 induit l'apoptose (Ahmad et al., 2008).

Les CK1 sont des constituants majeurs des agrégats de protéines tau (Kuret et al., 1997). Dans la maladie d'Alzheimer, les isoformes CK1 α et CK1 δ sont trouvées au niveau des lésions neurofibrillaires (Kuret et al., 1997, Schwab et al., 2000). De plus, le taux des ARNm (Acide RiboNucléiques messagers) (Yasojima et al., 2000) et le niveau d'activité enzymatique des CK1 (Ghoshal et al., 1999) sont respectivement augmentés de 24 et 30 fois dans les cerveaux Alzheimer comparés aux cerveaux contrôles.

Par ailleurs, l'activité de la CK1 est stimulée par le peptide β -amyloïde (Chauhan et al., 1993) et joue un rôle dans la production du peptide A β dans les neurones (Flajolet et al., 2007). Ces données ainsi que le rôle de la CK1 dans la phosphorylation de tau montrent une possible implication de la CK1 dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer (Hanger et

al., 2007). L'identification d'inhibiteurs spécifiques de la CK1, voire des isoformes α et δ , s'avère être d'un grand intérêt thérapeutique.

Tout comme la CK1, la CK2 est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. *In vitro*, la CK2 phosphoryle l'ApoE qui, à son tour, active la CK2. *In vivo*, l'ApoE, CK2 et tau interagissent avec les microtubules (Rafferty et al., 2005). Les isoformes α et α' de la CK2 ont des effets opposés (activateur direct et inhibiteur direct ou indirect) sur l'activité de la protéine phosphatase majoritaire du SNC, la PP2A (Heriche et al., 1997, Perez and Avila, 1999). L'isoforme α a une localisation somatique tandis que celle de l'isoforme α' est dendritique. Ainsi, la différence de fonctionnalité des deux isoformes résulterait de la distribution des substrats de la PP2A : tau et MAP1B se trouvent phosphorylés au niveau des dendrites et non phosphorylés au niveau du soma neuronal (Binder et al., 1985, Kowall and Kosik, 1987, Papasozomenos and Binder, 1987, Ulloa et al., 1994). Au niveau axonal, la CK2 est associée aux microtubules (Serrano et al., 1989). D'autre part, les oligomères solubles intracellulaires de peptides A β induisent une dérégulation de la CK2 perturbant ainsi le transport axonal rapide (Pigino et al., 2009).

Au regard du nombre de sites de phosphorylation de tau par la CK1, l'inhibition de cette enzyme, en particulier l'isoforme δ , présente un grand intérêt thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer. D'autre part, la régulation de la CK2 constituerait une cible thérapeutique prometteuse dans la maladie d'Alzheimer, en particulier, si elle était combinée avec un traitement permettant de réguler l'activité de la GSK3 β .

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DES CK1A/1 Δ /2

L'IC261 est un inhibiteur compétitif au niveau du site de fixation de l'ATP, de la CK1 (Tableau 16). Il est très spécifique des isoformes δ et ε (CI50 \approx 1 μ M) ainsi que de l'isoforme α mais à de plus fortes concentrations (CI50 = 11 - 21 μ M) (Knippschild et al., 1997, Behrend et al., 2000, Mashhoon et al., 2000).

Les 2 principaux inhibiteurs pharmacologiques de la CK2 (également compétitifs de l'ATP), sont dérivés d'un composé relativement peu sélectif de la CK2 (inhibant de façon comparable CK2 et DYRK1A), le TBB (4,5,6,7-tétrabromobenzotriazole) (CI50 = 900 nM) (Sarno et al., 2003). Ces dérivés du TBB sont nommés DMAT et TBCA (Tableau 16). L'inhibiteur DMAT est près de 1 400 fois plus spécifique pour CK2 (CI50 = 140 nM) que pour CK1 (CI50 > 200 μ M) (Pagano et al., 2004). Cependant, DMAT est autant sélectif

pour CK2 que pour DYRK1A (Pagano et al., 2007). L'inhibiteur TBCA, quant à lui, est 5 fois plus efficace que le TBB dans l'inhibition de la CK2 ($CI50_{CK2} = 0,11 \mu M$ pour TBCA et $CI50_{CK2} = 0,56 \mu M$ pour TBB) et possède l'avantage d'être peu sélectif pour la DYRK1A ($CI50 = 24,5 \mu M$) (Pagano et al., 2007).

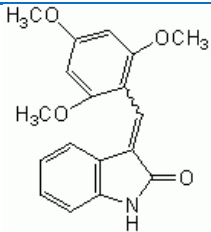
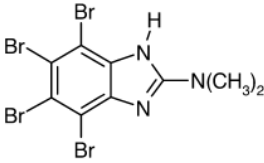
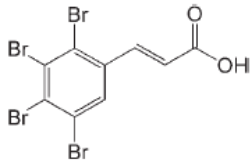
Noms	IC261	DMAT	TBCA
	3-[(2,3,6-trimethoxyphenyl)methylidényl]-indolin-2-one	2-diméthylamino-4,5,6,7-tétabromo-1H-benzimidazole	Acide tétabromocinnamic
Structures			
CI50CK1α	11-21 μM	>200 μM	-
CI50CK1δ	0,7-1,3 μM	>200 μM	-
CI50 CK1ϵ	0,6-1,4 μM	>200 μM	-
CI50 CK2		140 nM	110 nM
Formule chimique	$C_{18}H_{17}NO_4$	$C_9H_7Br_4N_3$	$C_9H_4Br_4O_2$
Poids moléculaires	311,3g.mol ⁻¹	479,8 g.mol ⁻¹	463,6 g.mol ⁻¹

Tableau 16. **Caractéristiques des inhibiteurs de CK1 (IC261) et de CK2 (DMAT et TBCA).**

3. DUAL-SPECIFICITY TYROSINE PHOSPHORYLATION AND REGULATED KINASE 1/2

Il existe 6 isoformes de DYRK nommées 1A/1B/2/3/4A/4B (Becker et al., 1998, Woods et al., 2001). Ces isoformes sont impliquées dans la différenciation des progéniteurs nerveux et la survie cellulaire pour DYRK1A (Guo et al., 2010, Yabut et al., 2010), dans le cancer colorectal (Jin et al., 2009) et la différenciation cellulaire pour DYRK1B (Mercer and Friedman, 2006), la tumorigénèse pour DYRK2 (Miller et al., 2003, Gorringer et al., 2005, Maddika and Chen, 2009), l'érythropoïèse et la survie cellulaire pour DYRK3 (Zhang et al., 2005a, Wojchowski et al., 2006, Guo et al., 2010) et la spermatogénèse pour DYRK4 (Sacher et al., 2007). DYRK1A et DYRK2 sont les seules isoformes de DYRK à phosphoryler tau (sur le site T212), le facteur eIF2B et le facteur de transcription CREB (« cAMP Response Element Binding »; impliqué dans les processus neuronaux d'apprentissage et de mémorisation) (Woods et al., 2001, Yang et al., 2001). DYRK1A est majoritairement nucléaire alors que DYRK2 est essentiellement cytoplasmique (Becker et al., 1998).

Les DYRKs catalysent leur autophosphorylation sur leur boucle d'autorégulation au niveau des résidus tyrosines au niveau d'un motif YXY localisé dans le domaine catalytique (Kentrup et al., 1996, Becker and Joost, 1999, Campbell and Proud, 2002). Suite à cette autophosphorylation, les DYRKs se comportent comme des kinases à sérines et thréonines (Lochhead et al., 2005). En plus de la régulation par autophosphorylation de DYRK1A sur sa Y231 (Himpel et al., 2001), l'interaction de DYRK1A avec la protéine 14-3-3 induit un changement conformationnel de DYRK1A augmentant ainsi son activité catalytique (Kim et al., 2004, Alvarez et al., 2007).

Le gène codant pour DYRK1A est localisé au niveau du locus 21q22.2 contenu dans la région dite critique du chromosome 21 impliquée dans le syndrome de Down (communément dénommé trisomie 21) (Guimera et al., 1996, Song et al., 1996, Chen and Antonarakis, 1997). Ceci constitue une donnée importante car aussi bien les patients atteints du syndrome de Down (qui constitue un modèle de vieillissement accéléré) que ceux de la maladie d'Alzheimer développent des plaques séniles ainsi que des DNFs (Burger and Vogel, 1973, Masters et al., 1985, Grundke-Iqbal et al., 1986). Par ailleurs, DYRK1A joue un rôle dans les processus tels que la prolifération des progéniteurs neuronaux, la neurogénèse et la différenciation neuronale (Yang et al., 2001, Hammerle et al., 2003).

DYRK2 est localisé dans le locus du gène 12q14 (Zhang et al., 2005a) et catalyse *in vitro* la phosphorylation des protéines histones H2B et H3 (Becker et al., 1998). Les rôles de DYRK2 sont limités à la phosphorylation de quelques substrats tels que NFAT (« Nuclear Factor of Activated T-cells ») (Gwack et al., 2006), eiF2B (Woods et al., 2001) et la glycogène synthétase (Skurat and Dietrich, 2004).

➤ TAU, SUBSTRAT DES DYRK1/2

La sur-expression de DYRK1A *in vitro* et dans des modèles de souris transgéniques induit l'hyperphosphorylation de la protéine tau au niveau des résidus T212, S202 et S404 (Figure 30) (Woods et al., 2001, Ryoo et al., 2007). La phosphorylation de tau au niveau de la T212 par DYRK1A amorcerait (par « priming ») celle en S208 par la GSK3 β (Woods et al., 2001). D'autre part, DYRK1A influence l'épissage alternatif de tau (Shi et al., 2008).

Tout comme DYRK1A, DYRK2 est capable de phosphoryler la T212 de tau, et d'induire la phosphorylation de tau en S208 par la GSK3 β (Woods et al., 2001). A ce jour, aucun autre rôle de DYRK2 n'est décrit pour l'hyperphosphorylation de tau.

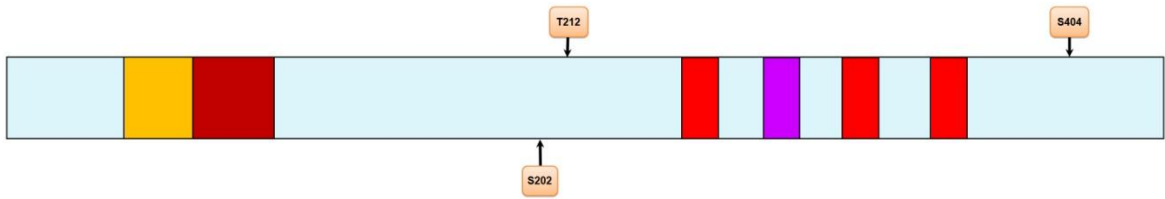


Figure 30. **Localisation des sites de phosphorylation de tau par DYRK1/2.**

➤ DYRK1/2, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Au niveau de la rétine, DYRK1 régule le nombre de cellules entrant en apoptose (Fotaki et al., 2002) *via* la phosphorylation (protectrice) de la caspase-9 en T125 (Allan and Clarke, 2007, Laguna et al., 2008). DYRK1 régule également *via* Hip-1 (« Huntingtin-interacting protein-1 ») l'apoptose des progéniteurs nerveux hippocampiques (Kang et al., 2005).

DYRK2 est activée en réponse à un stress génotoxique générant des lésions importantes de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Cette activation de DYRK2 induit sa translocation vers le noyau. DYRK2 phosphoryle alors la protéine p53 en S46, induisant l'apoptose (Taira et al., 2007). Cependant, aucune donnée n'est établie concernant l'induction, *via* DYRK2, d'une apoptose neuronale indépendante des lésions de l'ADN.

Le polymorphisme de DYRK1A constitue un facteur génétique favorisant la progression de la maladie d'Alzheimer (Ferrer et al., 2005, Kimura et al., 2007). De plus, DYRK1A phosphoryle l'APP (Ryoo et al., 2008) et voit ses niveaux d'ARNm augmentés suite à l'exposition des cellules de neuroblastome SH-SY5Y au peptide A β 42 (Kimura et al., 2007). Cette augmentation est également observée dans le cerveau des patients Alzheimer comparés aux patients témoins de même âge (Kimura et al., 2007). Pour la maladie d'Alzheimer, comme pour le syndrome de Down, l'inhibition de DYRK1A pourrait être d'un grand intérêt thérapeutique.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DES DYRK1/2

L'harmine est utilisée depuis plus de 3 siècles par les indiens d'Amazonie (voir l'encart sur l'Ayawasca). Elle est isolée à partir d'une plante *Peganum harmala* (nommée également Harmal, Figure 31). Il s'agit d'un alcaloïde qui inhibe fortement DYRK1A (CI50 = 80 nM) comparé aux autres kinases parmi lesquelles DYRK2 (CI50 = 800 nM) et DYRK3 (CI50 = 900 nM ; Tableau 17) (Bain et al., 2007). L'harmine est un inhibiteur pharmacologique exceptionnel puisqu'il est sélectif et inhibe les formes matures de DYRK1A mais également l'autophosphorylation sur la tyrosine pendant la traduction, prévenant ainsi la stimulation de l'activité enzymatique (Seifert et al., 2008).



Figure 31. **Fleur de la harmal.** La harmal ou harmel ou rue de Syrie, (*Peganum harmala*) est une plante médicinale, de la famille des nitrariaceae, vivace, à fleurs jaunes.

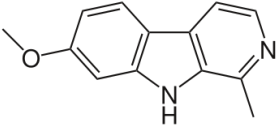
Nom usuel	Harmine
	7-méthoxy-1-méthyl-β-carboline
Structure	
CI50 _{DYRK1A}	80 nM
CI50 _{DYRK2}	800 nM
CI50 _{DYRK3}	900 nM
Formule chimique	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O
Poids moléculaires	212,3 g.mol ⁻¹

Tableau 17. **Caractéristiques de l'harmine.**

***L'Ayawasca.** Avec l'harmiline, l'harmine constitue un des nombreux alcaloïdes de l'Ayawasca (en langue quechua, Aya : mort ; Waska : liane). Cette décoction est utilisée par de nombreux groupes indiens de l'Amazonie occidentale et est basée sur un mélange de lianes de banisteriopsis et de feuilles de chacruna. Par leur action IMAO (inhibiteur des monoamines oxydases), l'harmaline et l'harmine permettent à la diméthyltryptamine (substance hallucinogène contenue dans la chacruna) de s'introduire dans le SNC et de se substituer à la sérotonine, permettant au cerveau de capter des visions, considérées comme visions de l'« autre monde ». D'après (Desahyes, 2002).*

4. MICROTUBULE AFFINITY-REGULATING KINASE

Les MARKs régulent la stabilité des microtubules et contrôlent les processus de différenciation, de croissance neuritique, de division cellulaire ainsi que le trafic des organites (Drubin and Nelson, 1996). Les 4 isoformes MARK (Tableau 18) sont numérotées de 1 à 4. Elles sont composées d'un domaine catalytique, suivi d'un domaine d'association à l'ubiquitine UBA (« Ubiquitine-Associated domain ») et un domaine kinase au niveau de l'extrémité C-terminale (Matenia and Mandelkow, 2009).

Ces 4 isoformes ont été découvertes en raison de leur capacité à phosphoryler des MAPs telles que la protéine tau, MAP2 et MAP4, et à dissocier les MAPs des microtubules, augmentant ainsi la dynamique des microtubules (Illenberger et al., 1996, Drewes et al.,

1997, Trinczek et al., 2004). Les MARKs sont activées par phosphorylation de la T208 *via* 2 kinases : MARKK (« MARK Kinase »)/TAO (« Thousand-And-One amino acid ») (Chen et al., 2003, Timm et al., 2003) et STK11 (« Serine /Threonine protein Kinase 11 ») (Lizcano et al., 2004). MARK2 est phosphorylée au niveau de la boucle d'activation en T208 (phosphorylation activatrice ouvrant le domaine catalytique) (Timm et al., 2008) et en S212 (Timm et al., 2003). En revanche, la phosphorylation en S212 par la GSK3 β inhibe son activité (Timm et al., 2008). Etant donné que les séquences des boucles d'activation des isoformes des MARKs sont similaires, on admet que toutes les isoformes sont régulées de la même façon. MARK3 est la seule MARK activée suite à des lésions de l'ADN (Peng et al., 1998).

Isoformes des MARKs	Localisations chromosomiques	Poids moléculaire	Références bibliographiques
MARK1	1q41	85 kDa	(Nagase et al., 2000)
MARK2	11q12-q13	78 et 82 kDa	(Courseaux et al., 1995)
MARK3	14q32.3	83 kDa	(Ono et al., 1997)
MARK4	19q13.2	79 kDa	(Kato et al., 2001)

Tableau 18. **Localisations chromosomiques et poids moléculaires des isoformes des MARKs.**

Les MARKs sont également régulées par des interactions protéiques au niveau du domaine catalytique notamment avec PAK5 (« p21-Activated Kinase 5 ») (Matenia et al., 2005) et les protéines de type 14-3-3 (Benton et al., 2002). A la vue de la structure des domaines UBA des MARKs, une régulation par ubiquitinylation est également fortement possible (Panneerselvam et al., 2006).

➤ TAU, SUBSTRAT DES MARKS

Les MARKs phosphorylent la protéine tau au niveau des motifs KI/CGS (Figure 32) contenus dans les domaines répétés (Augustinack et al., 2002, Timm et al., 2008), provoquant ainsi le détachement de tau et par conséquent la déstabilisation des microtubules (Biernat et al., 1993, Chin et al., 2000, Timm et al., 2003, Mandelkow et al., 2004). Les motifs KI/CGS situés au niveau des S262, S293, Ser324 et S356 de la protéine tau sont phosphorylés par les MARKs (Biernat et al., 1993, Zheng-Fischhofer et al., 1998). A ces motifs s'ajoutent 2 phosphorylations en S305 et S320. Les motifs reconnus par les MARKs correspondent exactement à ceux définis dans les MBDs (motif KXGS) et induisant le détachement de tau des microtubules.



Figure 32. **Localisation des sites de tau phosphorylés par les MARKs.**

La voie de signalisation impliquant STK11 et MARK2 est décrite pour induire la dégradation de la protéine tau phosphorylée (Kojima et al., 2007), mais cela reste très controversé (Dickey et al., 2008, Matenia and Mandelkow, 2009) par des résultats montrant que MARK2 et Akt interagissent ensemble pour hyperphosphoryler la protéine tau. Ceci serait accompagné d'une diminution d'activité de la GSK3 β *via* sa phosphorylation en S9 (Dickey et al., 2008). Cependant, dans les modèles de souris transgéniques de tauopathies, les sites de phosphorylation des MARKs sont retrouvés hautement phosphorylés (Albertella et al., 1996).

➤ MARKS, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Aucune donnée n'a pu mettre en relation les MARKs et l'apoptose neuronale. Cependant, comme les MARKs phosphorylent les MAPs sur des motifs consensus, entraînant le détachement de la tubuline et de la protéine tau, et par conséquent la déstabilisation du réseau des microtubules (Chin et al., 2000). Le type de motifs phosphorylés par les MARKs est généralement retrouvé comme précédant la formation des agrégats de tau dans la maladie d'Alzheimer (Chin et al., 2000). De plus, les souris KO pour la MARK2 montrent une perturbation des fonctions d'apprentissage et de mémorisation (Segu et al., 2008).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DES MARKS

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'inhibiteurs pharmacologiques des MARKs.

5. KINASE PHOSPHORYLASE

La kinase phosphorylase (KP), dont le gène est situé dans le locus Xp13, est une enzyme tétramérique dépendante du calcium. Elle régule la glycogénolyse en phosphorylant et activant une phosphorylase A (Paudel, 1997). Le niveau de l'activité kinase/phosphorylase est relativement élevé dans les neurones (Paudel et al., 1993). La sous-unité γ constitue le site catalytique de l'enzyme tandis que les 3 sous-unités α , β et δ

sont constitutivement inhibitrices et régulent l'activité de la KP. L'activité de cette dernière est modifiée soit par liaison d'ions calcium, soit par phosphorylation.

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA KP

In vitro, la KP phosphoryle tau sur les résidus S237, S262, S285, S305 et S352 (Figure 33) ; seul le résidu S262 est phosphorylé *in vivo* (Morishima-Kawashima et al., 1995, Seubert et al., 1995, Paudel, 1997). Au niveau cérébral, les ions calciques activent la KP (Drummond and Bellward, 1970). Dans les cultures neuronales, l'augmentation du niveau intracellulaire de calcium provoque une hyperphosphorylation de tau (Mattson, 1990, Mattson et al., 1991) et la perte des interactions avec les microtubules (Mattson et al., 1991) et, par conséquent, une altération du cytosquelette neuronal (Kater et al., 1988).

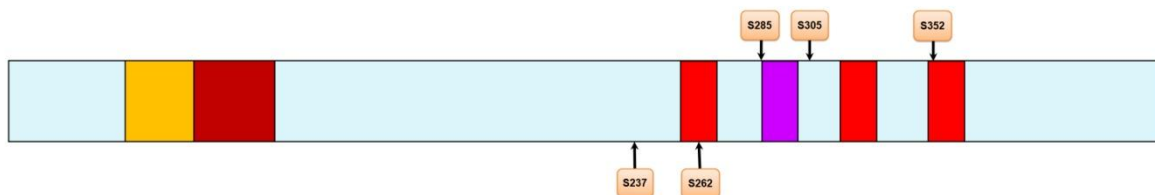


Figure 33. **Localisation des sites de tau phosphorylés par la KP.**

➤ KP, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Des niveaux élevés d'ions calciques conduisant à l'hyperphosphorylation de tau ont été suggérés comme activant des kinases de tau telles que la KP (induisant une phosphorylation sur la S262 de tau) dans les cerveaux Alzheimer (Mattson et al., 1991, Saitoh et al., 1993, Mattson, 1994). Cette phosphorylation en S262 induit le détachement de tau des microtubules (Drewes et al., 1995). Bien que la KP phosphoryle tau sur un site de phosphorylation dit anormal de tau, il n'a pas encore été rapporté que la KP était anormalement activée dans les cerveaux Alzheimer et aucune donnée entre apoptose neuronale et KP n'a encore été établie.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA KP

L'implication de la KP étant peu documentée, à ce jour, son inhibition pharmacologique est difficilement envisageable dans le cadre d'une thérapeutique contre la maladie d'Alzheimer.

6. PROTEIN KINASES A/B/C/N

La PKA, enzyme hétérotétramérique, est constituée de 2 sous-unités régulatrices (lieu de fixation de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) et deux sous-unités catalytiques. Suite à l'activation des adénylates cyclases *via* des récepteurs couplés aux protéines G, les taux d'AMPc intracellulaire augmentent et activent la PKA. La dégradation de l'AMPc par les phosphodiesterases conduit à l'inhibition de la PKA. Parmi les substrats de PKA qui nous intéressent, on compte : Akt/PKB, la PKC (Dell'Acqua and Scott, 1997), Bad (Tan et al., 2000), CREB (Gonzalez and Montminy, 1989) ainsi que les S21 et S9 des isoformes α et β de GSK3 respectivement (Fang et al., 2000).

Akt/PKB est activée par phosphorylation en T308 (au niveau de sa boucle d'activation) (Alessi et al., 1996) et en S473 (Bayascas and Alessi, 2005). La phosphatase PTEN (« Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10 ») est le principal régulateur de la voie Akt/PKB (Cantley and Neel, 1999). De plus, Akt/PKB régule la synthèse du glycogène à travers la phosphorylation inhibitrice des isoformes α et β de la GSK3 (Cross et al., 1995, Hajdich et al., 2001).

Chez les mammifères, les isoformes des PKCs sont réparties en 3 classes : les PKCs dites classiques (isoformes α , β_I , β_{II} et γ), les nouvelles PKCs (isoformes δ , ϵ , η et θ) et les PKCs atypiques (ζ , λ/ι) (Alkon et al., 2007). Ces 3 classes diffèrent par leurs structures et leurs sensibilités à différents activateurs (Tableau 19). Les PKCs sont codés par des gènes distincts, exceptées les isoformes β_I et β_{II} qui sont des variants résultant d'un épissage alternatif. Ces PKCs sont composées de 4 domaines nommés C1, C2, C3 et C4. Les domaines régulateurs, C1 et C2, sont impliqués respectivement dans la fixation des activateurs et des ions calciques. Les domaines catalytiques C3 et C4, contiennent le site de fixation de l'ATP (C3), le domaine de liaison du substrat et le domaine kinase (C4). Les PKCs classiques contiennent les 4 domaines. Les PKCs nouvelles sont dépourvus du domaine C2 et sont donc insensibles aux ions calciques. Les PKCs atypiques sont dépourvues du domaine C2 et de la moitié du domaine C1 et sont insensibles à tous les activateurs classiques des PKCs (ions calciques, diacylglycérol, esters de phorbols, bryostatines), mais elles peuvent être activées par la phosphatidylsérine (Tableau 19).

Les PKCs sont phosphorylés sur 3 motifs S/T conservés au niveau de la boucle d'activation, du motif de rotation (« turn motif ») et du motif hydrophobe (Flint et al., 1990,

Parekh et al., 2000, Newton, 2003) (Tableau 20). Elles sont également régulées *in vivo* par des phénomènes de trans-phosphorylation et d'autophosphorylation (Dutil et al., 1994).

	PKCs classiques	PKCs nouvelles	PKCs atypiques
Ions calciques	X		
Phosphatidylsérine	X	X	X
Diacylglycérol	X	X	
Esters de phorbols	X	X	
Bryostatines	X	X	

Tableau 19. **Activateurs des isoformes des PKCs.**

La PKN est une kinase à sérine et thréonine ayant un domaine catalytique très semblable à celui des PKCs (Mukai and Ono, 1994). Elle est activée par les acides gras et les petites GTPases Rho (Mukai et al., 1994). Elle est ubiquiste et hautement exprimée au niveau cérébral (Kitagawa et al., 1995).

PKCs		Sites de phosphorylation des PKCs		
Types de PKCs	Isoformes des PKCs	Boucle d'activation	Motif de rotation	Motif hydrophobique
PKCs classiques	α	T497	T638	S657
	β_I	T500	T641	S660
	β_{II}	T500	T642	S661
	γ	T514	T655	T674
PKCs nouvelles	δ	T505	S643	S662
	ϵ	T566	T710	S729
	η	T513	T655	S674
	θ	T538	S676	S695
PKCs atypiques	ζ	T410	T560	E579
	λ/ι	T403	T574	E555

Tableau 20. **Sites de phosphorylations régulant l'activité des isoformes des PKCs.** D'après (Parekh et al., 2000).

➤ TAU, SUBSTRAT DES PKA/B/C/N

La forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, induit l'hyperphosphorylation de la protéine tau à travers la PKA (Tian et al., 2009). Une phosphorylation préalable de tau par la PKA rend tau meilleur substrat pour la GSK3 β (Liu et al., 2004b). La PKA est impliquée dans la phosphorylation de nombreux sites retrouvés dans les PHFs (Figure 34) (Litersky et al., 1996, Sergeant et al., 2005, Hanger et al., 2007).

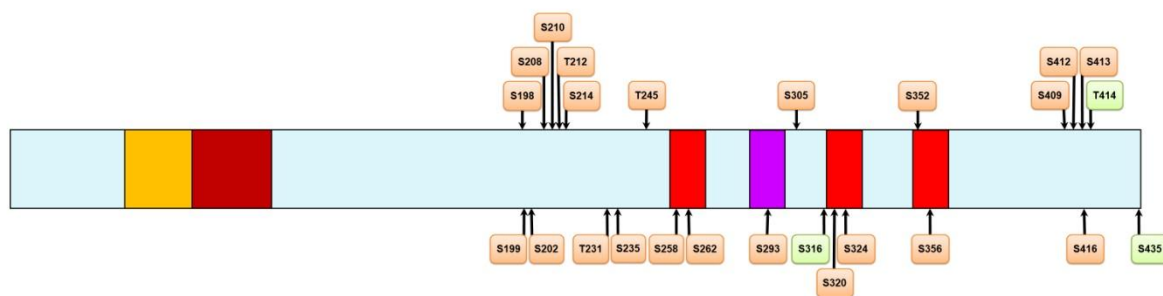


Figure 34. **Localisation des sites de tau phosphorylés par la PKA.**

La sur-expression d'Akt/PKB induit une augmentation de la phosphorylation de tau au niveau des T212, S214 et S396 dans les cellules de neuroblastome murin Neuro-2A (Zhou et al., 2009).

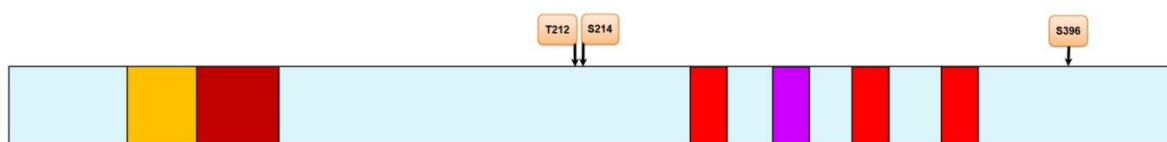


Figure 35. **Localisation des sites de tau phosphorylés par la PKB.**

L'ensemble des isoformes des PKCs phosphorylent la protéine tau sur les résidus S258, S293, S324 et S352 (Figure 36) (Taniguchi et al., 2001). La PKC inhibe également directement (Li et al., 2006) ou indirectement (Isagawa et al., 2000) la principale kinase de tau, la GSK3 β . Lorsque les PKCs sont activées, elles réduisent la quantité de peptides A β (un activateur de la GSK3 β), inhibant ainsi la GSK3 β et réduisant la phosphorylation de tau (Isagawa et al., 2000).



Figure 36. **Localisation des sites de tau phosphorylés par la PKC.**

La PKN phosphoryle tau *in vitro* et *in vivo* et co-localise avec les NFTs dans les cerveaux de patients Alzheimer (Kawamata et al., 1998). Les sites de phosphorylation de tau cibles de la PKN sont S258, S320, S324, S352 et S356 (Figure 37) (Taniguchi et al., 2001, Sergeant et al., 2008).



Figure 37. **Localisation des sites de tau phosphorylés par la PKN.**

➤ PKA/B/C/N, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Ces PKs ont des rôles différents concernant l'induction de l'apoptose neuronale. La PKA possède un rôle pro-apoptotique (Soderling, 1999). La PKA phosphoryle et inactive la CaMKK (« CalModulin Kinase Kinase »), provoquant ainsi l'inhibition de facteurs transcriptionnels.

A contrario, la PKB/Akt inactive les protéines pro-apoptotiques telles que Bad et 14-3-3 (Franke et al., 1997, Soderling, 1999), la kinase GSK3 β (Cross et al., 1995) afin de favoriser la survie cellulaire (Lee et al., 2009).

Les isoformes α , ϵ , λ et ζ des PKCs ont un rôle dans la prolifération et la survie cellulaires, tandis que la PKC δ est un important régulateur d'apoptose (Reyland, 2009). L'expression d'une PKC δ constitutivement active induit l'apoptose (Emoto et al., 1995). En effet, les souris déficientes pour la PKC δ sont déficientes pour l'apoptose induite par la voie mitochondriale (Humphries et al., 2006). Lors de la ré-introduction de PKC δ chez ces souris, le processus apoptotique est de nouveau fonctionnel (Reyland, 2007). Lorsqu'un stress apoptotique est présent dans la cellule, la PKC δ est clivée au niveau d'une région charnière (entre les domaines régulateurs et catalytiques) par la caspase-3. Ce clivage génère un fragment de PKC δ nommé δ CF (« δ Catalytic Fragment »). Bien que le rôle de ce fragment ne soit pas encore établi, la présence du fragment δ CF induit une apoptose indépendante de tout stimuli de mort cellulaire (Emoto et al., 1995, Ghayur et al., 1996, Reyland, 2007).

Tout comme la PKC δ , la PKN peut être clivée entre ses 2 domaines catalytique et régulateur, libérant un fragment constitutivement actif en C-terminal de 55 kDa. Ce clivage, retrouvé en condition d'ischémie par occlusion artérielle chez les rats (Ueyama et al., 2001), résulte de l'action de la caspase-3 activée en condition apoptotique (Takahashi et al., 1998).

L'activation de la PKA, *via* des injections de forskoline à une dose supérieure à 80 μ M, conduit à une hyperphosphorylation de tau, à un déficit de mémorisation spatiale

chez les rats (Tian et al., 2009), et à des phénomènes potentiellement impliqués dans la maladie d'Alzheimer (Sun et al., 2005). Mais une suractivation de la PKA par la forskoline (dose > 200 μ M) réduit la phosphorylation de tau et n'entraîne pas de déficits de mémorisation spatiale (Tian et al., 2009). Cette suractivation de la PKA est corrélée à une sur-expression de la PP2A ainsi qu'à une augmentation de son activité. Dans les cerveaux Alzheimer, les PKA et PKB activées ainsi que les protéines 14-3-3 sont co-localisées au niveau des NFTs (Layfield et al., 1996, Jicha et al., 1999, Umahara et al., 2004). Les interactions à haute affinité entre les protéines 14-3-3 et tau annihilent, *via* la phosphorylation de tau en S214, la formation des agrégats de tau (Sadik et al., 2009). Dans des modèles de *Drosophila melanogaster*, la déficience de la sous-unité catalytique majeure de la PKA provoque des perturbations des facultés de mémorisation sans affecter l'espérance de vie (Yamazaki and Saitoe, 2008).

Au niveau hippocampique, l'activité de la kinase PKB/Akt (*via* la détection de la phosphorylation en S473) est trouvée significativement diminuée dans un modèle de vieillissement accéléré : les souris SAMP10 (« Senescence-Accelerated Mouse Prone 10 ») (Nie et al., 2009). Avec l'avancée en âge, ces souris présentent des déficits d'apprentissage et de mémorisation ainsi que des troubles affectifs, une amyloïdose, une atrophie cérébrale c'est-à-dire des traits neuropathologiques semblables à ceux observés chez les patients atteints de maladies neurodégénératives (Kawamata et al., 1997).

L'activation des PKC α et PKC ϵ (et probablement des autres isoformes de PKCs), *via* l'activation de l'enzyme de conversion, l'endothéline, réduit la quantité de plaques séniles dans des modèles de souris transgéniques sur-exprimant la protéine APP mutée (Choi et al., 2006). Ces PKCs activées stimulent l' α -sécrétase directement ou *via* la voie des MAPKs Erk1/2 (Alkon et al., 2007). Le rôle des PKCs pourrait donc être important dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer (Khan et al., 2009) où elles « décideraient » du clivage de l'APP en fragment toxique ou non (Alkon et al., 2007). En retour, les peptides A β inhibent directement les PKCs (Lee et al., 2004b). D'autre part, les PKCs régulent la GSK3 β , et conduisent à l'hyperphosphorylation de tau (Wang et al., 2006).

Outre la phosphorylation de tau (Kawamata et al., 1998), la PKN est également capable de phosphoryler en S9 (et donc d'inhiber) la GSK3 β (Isagawa et al., 2000).

Dans un but thérapeutique, trouver des inhibiteurs pharmacologiques des PKs pourrait être d'un grand intérêt.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DES PKA/B/C/N

L'inhibiteur puissant et sélectif de la PKA est un sel de dihydrochloride, le H-89 (Chijiwa et al., 1990). Le H-89 possède une CI50 de 50 nM pour la PKA, de 500 nM pour l'isoforme μ de la PKC et de 32 μ M pour les autres isoformes (Tableau 21) (Johannes et al., 1995).

Parmi les inhibiteurs d'Akt/PKB, le sel hydraté de trifluoroacétate (inhibiteur VIII d'Akt) (Zhao et al., 2005). La sélectivité (CI50) de cet inhibiteur pour les kinases Akt1, Akt2 et Akt3 est respectivement de 58 nM, 210 nM et 2,1 nM. A des concentrations inférieures à 50 μ M (où les PKA et PKC sont également inhibées) et de manière générale, l'inhibition est spécifique d'Akt/PKB (Tableau 22) (Barnett et al., 2005).

Le bisindolylmaleimide I ou GF-109203X (Tableau 23) est l'inhibiteur pharmacologique puissant et sélectif des PKCs (Toullec et al., 1991, Martiny-Baron et al., 1993). Les essais *in vitro* ont montré des CI50 comprises entre 8 et 20 nM pour les PKCs dites classiques (α , β et γ) et entre 100 et 200 nM pour les nouvelles PKCs (isoformes δ et ϵ). Plus

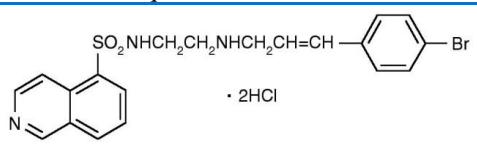
Nom	H-89
Nom	N-(2-(p-bromocinnamylamino)éthyl)-5-isoquinoline sulfonamide
Structure	 • 2HCl
CI50 _{PKA}	50 nM
CI50 _{PKB}	-
CI50 _{PKC}	500 nM (μ) 32 μ M
Formule chimique	C ₂₀ H ₂₀ BrN ₃ O ₂ S + 2 HCl
Poids moléculaire	519,3 g.mol ⁻¹

Tableau 21. **Caractéristiques du H-89, inhibiteur de PKA.**

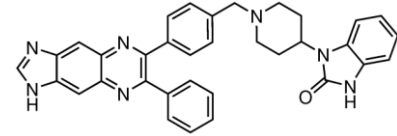
Nom usuel	Inhibiteur VIII d'Akt
Nom	1,3-Dihydro-1-((4-(6-phényl-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-yl)phényl)méthyl)-4-piperidiny)-2H-benzimidazol-2-one trifluoroacétate
Structure	 • xCF ₃ CO ₂ H • xH ₂ O
CI50 _{PKA}	> 50 μ M
CI50 _{PKB}	< 50 μ M
CI50 _{PKC}	> 50 μ M
Formule chimique	C ₃₄ H ₂₉ N ₇ O + xC ₂ HF ₃ O ₂ + yH ₂ O
Poids moléculaire	551,6 g.mol ⁻¹

Tableau 22. **Caractéristiques de l'inhibiteur VIII d'Akt, inhibiteur de PKB.**

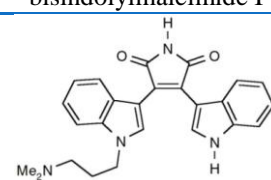
Nom usuel	GF-109203X
Nom	bisindolylmaleimide I
Structure	
CI50 _{PKCs classiques}	8 à 20 nM
CI50 _{PKCs nouvelles}	100 à 200 nM
Formule chimique	C ₂₅ H ₂₄ N ₄ O ₂
Poids moléculaire	412,5 g.mol ⁻¹

Tableau 23. **Caractéristiques de GF-109203X, inhibiteur de PKCs.**

largement, le GF-109203X inhibe l'isoforme ζ de la PKC (CI50 = 5,8 μ M) (Toullec et al., 1991, Heikkila et al., 1993, Martiny-Baron et al., 1993).

Concernant la PKN, aucune étude à ce jour n'a pu mettre en évidence un inhibiteur pharmacologique spécifique.

7. Ca^{2+} /CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II

La CaMKII est ubiquiste mais abondamment exprimée dans le cerveau. La CaMKII est un complexe hétérotétramérique composé de 4 sous-unités α , β , γ et δ . Ces sous-unités sont codées par des gènes localisés dans les loci 5q32, 7p14 (Wang et al., 2000), 10q22 (Li et al., 1994b) et 4q26, respectivement. La CaMKII phosphoryle un motif consensus KXXS/T. La liaison de calcium ou de calmoduline au niveau du domaine régulateur de la CaMKII provoque l'autophosphorylation activatrice en T286 sur la sous-unité α (Means, 2000). La phosphorylation et la déphosphorylation en T286 sont respectivement contrôlées par la PKA et la PP1 (Makhinson et al., 1999). La CaMKII phosphorylée en T286 se lie aux récepteurs NMDA (cible de la mémantine, un médicament préconisé contre la maladie d'Alzheimer) jusqu'à dissociation du calcium ou de la calmoduline (Griffith, 2004). Les sites T305 et T306 de la CaMKII sont dits inhibiteurs car ils empêchent la fixation *de novo* du calcium ou de la calmoduline, diminuant ainsi le degré d'activation maximal de la CaMKII.

► TAU, SUBSTRAT DE LA CAMKII

Dix motifs KXXS/T (ressemblant au motif consensus, KXGS, contenu dans les MBDs) sont retrouvés dans la protéine tau (Figure 38). La CaMKII phosphoryle tau sur les S262 et S356 (Litersky et al., 1996, Singh et al., 1996). Les S131, T135, T212, S214 et S416 sont également phosphorylées par la CaMKII (Yoshimura et al., 2003, Yamamoto et al., 2005).

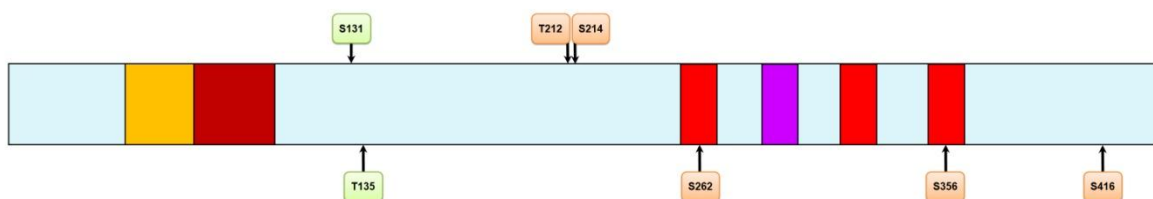


Figure 38. Localisation des sites de phosphorylation de tau par la CaMKII

➤ CAMKII, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

La CaMKII intervient dans l'apoptose neuronale. En effet, l'induction d'apoptose par l'acide rétinoïque dans des cellules P19 transfectées de manière stable avec l'isoforme la plus longue de tau (441 a.a.) est bloquée par l'inhibition de la CaMKII par le KN93 (Tsukane and Yamauchi, 2009).

Dans les cerveaux Alzheimer, les neurones comportant des PHFs expriment la CamKII (Simonian et al., 1994, Wang et al., 2005). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de la CaMKII tels que l'AIP (« Autocatmide-related Inhibitory Peptide ») ou le KN93 réduisent la toxicité induite par les peptides Aβ (Lin et al., 2004). Ces données suggèrent l'intérêt d'utiliser des inhibiteurs de la CaMKII.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA CAMKII

L'inhibition pharmacologique de la CaMKII est réalisée principalement par le KN93 (Tableau 24), cependant son action spécifique pour la CaMKII reste controversée au profit des canaux potassiques voltage-dépendants (Rezazadeh et al., 2006). Le KN62 est un inhibiteur plus spécifique et plus sélectif de la CaMKII (Tokumitsu et al., 1990), mais affecte les récepteurs purinergiques avec une CI50 de 15 nM (Chessell et al., 1998).

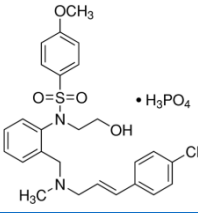
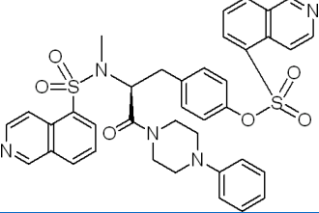
Noms	KN93	KN62
Noms chimiques	N-[2-[N-(4-Chlorocinnamyl)-N-methylaminomethyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamide phosphate salt, N-[2-[[[3-(4'-Chlorophenyl)-2-propenyl]methylamino]methyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4'-methoxybenzenesulfonamide phosphate salt	(S)-5-Isoquinolinesulfonic acid 4-[2-[(5-isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl]phenyl ester, 1-[N,O-bis(5-Isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine
Structures		
CI50	1 μM	0,9 μM
Formule brute	C ₂₆ H ₂₉ ClN ₂ O ₄ S · H ₃ PO ₄	C ₃₈ H ₃₅ N ₅ O ₆ S ₂
Masse molaire	599,0 g.mol ⁻¹	721,9 g.mol ⁻¹

Tableau 24. **Caractéristiques des inhibiteurs de la CaMKII : KN-93 et KN-62.**

L'utilisation de la séquence d'acides aminés KKALRRQEAVDAL nommée peptide AIP inhibe encore plus spécifiquement la CaMKII (CI50 = 100 nM).

C. TYROSINE-SPECIFIC PROTEIN KINASES

La protéine tau est également phosphorylée au niveau de ses 5 résidus tyrosine (Lee et al., 1998, Lebouvier et al., 2009) situés en position Y18 (Lee et al., 2004a), Y29, Y197 (Vega et al., 2005), Y310 (Sato et al., 2006) et Y394 (Derkinderen et al., 2005). Peu de protéines kinases spécifiques des tyrosines ont été identifiées, mais, parmi elles :

- Les kinases de la famille Src (SFKs : « Src Family Kinases ») : Src (Lee, 2005), Lck (Williamson et al., 2002), Syk (Lebouvier et al., 2008), Fyn (Lee et al., 2004a),
- La kinase c-Abl (Derkinderen et al., 2005).

1. SRC FAMILY KINASES

Parmi les protéines SFK exprimées dans le cerveau, seulement 4 ont été identifiées comme impliquées dans la maladie d'Alzheimer : Src (60 kDa), Lck (56 kDa), Syk (72 kDa) et Fyn (59 kDa), respectivement codées par les gènes situés dans les loci 20q12-q13 (Le Beau et al., 1984), 1p35-p34.3 (Marth et al., 1986, Volpi et al., 1994), 9q22 (Ku et al., 1994) et 6q21 (Popescu et al., 1987, Boyle et al., 1992). Ces SFKs sont généralement associées aux processus immunologiques d'activation de la microglie.

Les kinases Src et Fyn sont régulées par 2 phosphorylations : l'une, activatrice, en Y416 au niveau de la boucle d'activation du domaine kinase, l'autre, inhibitrice, en Y527 au niveau de l'extrémité C-terminale (Hunter, 1987). La phosphorylation activatrice résulte souvent d'une autophosphorylation (Chiang and Sefton, 2000, Roskoski, 2004, 2005). Des sites équivalents en Y416 et Y527 existent chez les autres membres des SFKs (Tableau 25). La phosphorylation activatrice de Lck est en Y394 et celle inhibitrice est en Y505 (Chow et al., 1993). Les phosphorylations de Syk sont en Y323 (Deckert et al., 1998, Rao et al., 2001), Y352 (association avec la phospholipase C γ 1) (Law et al., 1996), Y525 et Y526 (Zhang et al., 2000).

Protéines	Phosphorylations activatrices	Phosphorylations inhibitrices
Src	Y416	Y527
Fyn	Y416	Y527
Lck	Y394	Y505
Syk	Y323 et Y352	Y525 et Y526

Tableau 25. Sites de phosphorylation activateurs et inhibiteurs des SFKs.

➤ TAU, SUBSTRAT DES KINASES DES SFKS

Src, Fyn et Lck se lient à la protéine tau grâce à leur domaine SH3 (Lee et al., 1998). La phosphorylation de la protéine tau en T231 réduit ces interactions (Zamora-Leon et al., 2001). Les protéines Src et Fyn sont présentes au niveau du cône de croissance des neurones (Maness et al., 1988, Helmke and Pfenninger, 1995). Chez les souris KO pour les protéines Src et Fyn, la croissance neuritique est inhibée (Beggs et al., 1994, Ignelzi et al., 1994).

Dans les cellules COS-7 (« African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell line ») co-transfectées avec une protéine tau tronquée, Fyn phosphoryle tau en Y18 (Figure 39). Cette phosphorylation est retrouvée dans les NFTs (Lee et al., 2004a, Lebouvier et al., 2008). L'interaction de tau avec le domaine SH3 de Fyn, mais pas de Src, est augmentée par la présence de l'exon 10 (codant pour le domaine R2) dans la protéine tau (Bhaskar et al., 2005). La présence d'une phosphorylation en Y18 sur la protéine tau empêche la fixation de Fyn à tau (Bhaskar et al., 2005). Fyn se lie également aux régions de tau autour des résidus 213-221 et 230-246 (Zamora-Leon et al., 2001, Lebouvier et al., 2009). Tout comme la phosphorylation en Y18, celle en T231 par la GSK3 β est essentielle pour la fixation de Fyn à tau (Reynolds et al., 2008).

Comme Fyn, Syk phosphoryle tau en Y18, et ceci, selon la même cinétique (Lebouvier et al., 2008). Cette phosphorylation est présente dans les NFTs et le traitement de cellules de neuroblastome humain SH-SY5Y par le peptide A β induit une hyperphosphorylation de la protéine tau au niveau du résidu Y18 (Hernandez et al., 2009b).

Aucune interaction entre tau et Lck n'est décrite à ce jour. Cependant, par des méthodes de phosphorylation *in vitro* et de spectrométrie de masse, Lck et Fyn ont été montré comme phosphorylant préférentiellement la Y18 et que Lck pouvait toutefois phosphoryler les autres résidus tyrosine de tau, et ceci mieux que Fyn (Lebouvier et al., 2009).



Figure 39. **Localisation des sites de phosphorylation de tau par les SFKs.**

Les SFKs sont reliées à l'apoptose *via* la tyrosine kinase 1A associée à l'apoptose, AATYK1A (« Apoptosis-Associated TYrosine Kinase 1A »). Lorsque l'AATYK1A est palmitoylée sur les résidus C4, C6 ou C7 (La palmitoylation est une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout de palmitate, un acide gras saturé de 16 carbones, au niveau d'un résidu cystéine *via* un pont thioester), les kinases Src et Fyn phosphorylent AATYK1A aux Y25 et Y46 (Tsutsumi et al., 2008). La fonction des SFKs activées est de promouvoir la mobilité, la progression et la survie cellulaire (Zalewska et al., 2005, Mitra and Schlaepfer, 2006, Ziemka-Nalecz and Zalewska, 2007)

L'implication des SFKs dans la maladie d'Alzheimer semble être liée à la cascade neuro-inflammatoire que l'on observe dans ce cas. L'activation de la microglie induirait l'activation de molécules d'adhésion et de surface avec un recrutement des SFKs (Ho et al., 2005).

La kinase Fyn est co-localisée avec la protéine tau dans les NFTs des cerveaux Alzheimer (Shirazi and Wood, 1993, Ho et al., 2005). De plus, dans les neurones contenant des protéines tau hyperphosphorylées, les protéines Fyn sont sur-exprimées (Shirazi and Wood, 1993, Ho et al., 2005). Chez les souris KO pour Fyn, la déficience en Fyn est neuroprotectrice vis-à-vis de la toxicité induite par le peptide A β (Lambert et al., 1998). Les mêmes résultats sont observés contre la toxicité du peptide A β 25-35 sur des cultures organotypiques de coupes de cerveaux de souris KO pour Fyn (Pena et al., 2009). *A contrario*, la sur-expression de Fyn entraîne une augmentation de la cytotoxicité du peptide A β , une perturbation des fonctions synaptiques et des troubles cognitifs chez les souris sur-exprimant la protéine APP humaine (Chin et al., 2004, Chin et al., 2005). Le peptide A β active la protéine Fyn (Derkinderen et al., 2005). Cette dernière peut activer les kinases GSK3 β (Lesort et al., 1999) et CDK5 (Kawarabayashi et al., 2004).

L'expression de Lck est diminuée dans les cerveaux Alzheimer comparés aux cerveaux témoins (Hata et al., 2001). Le polymorphisme du gène Lck a également été décrit comme facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer (Zhong et al., 2005).

Trouver des inhibiteurs spécifiques des SFKs, pouvant empêcher d'une part l'activation microgliale ainsi que la phosphorylation de la protéine tau pourrait donc être d'un intérêt thérapeutique.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DES SFKS

Du fait, de l'implication des SFKs dans l'activation des lymphocytes T, les études visant à générer des inhibiteurs hautement spécifiques et sélectifs des SFKs se sont succédées. Parmi les nombreux inhibiteurs des SFKs, l'AP23846 (Tableau 26), un dérivé de purine substitué aux positions 2, 6 et 9 (Summy et al., 2005) montre une grande spécificité ($0,2 \text{ nM} < \text{CI}_{50} < 0,5 \text{ nM}$) pour les SFKs (Tableau 26), par rapport à la protéine c-Abl ($\text{CI}_{50} = 21 \text{ nM}$). Le Dasatinib (Tableau 26 ; aussi connu sous le nom de BMS-354825), est également un inhibiteur des protéines Src ($\text{CI}_{50} = 0,55 \text{ nM}$) et c-Abl ($\text{CI}_{50} = 3 \text{ nM}$) (Lombardo et al., 2004). Le troisième inhibiteur de Src est le SKI-606 (également connu sous le nom de bosutinib ; Tableau 26) (Golas et al., 2003). Cet inhibiteur est moins spécifique que les 2 précédents ($\text{CI}_{50} = 1,2 \text{ nM}$).

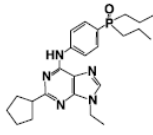
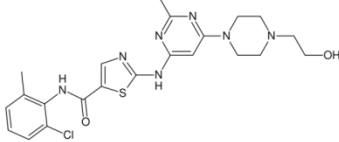
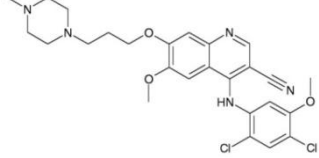
Noms	AP23846	Dasatinib	SKI-606
Noms chimiques	-	N-(2-chloro-6-méthylphényl)-2-(6-(4-(2-hydroxyéthyl)-pipérazin-1-yl)-2-méthylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide	4-anilino-3-quinolinecarbonitrile
Structures			
CI50Src	0,5 nM		
CI50Lck	0,6 nM	0,55 nM	1,2 nM
CI50Syk	Non testé		
CI50Fyn	0,2 nM		
CI50c-Abl	21 nM	3 nM	-
Formules brutes	$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{PO}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_7\text{O}_2\text{S}$	$\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_3$
Masses molaires	$403,5 \text{ g.mol}^{-1}$	$488,0 \text{ g.mol}^{-1}$	$530,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Tableau 26. **Caractéristiques des inhibiteurs des SFKs : AP23846, Dasatinib et SKI-606.**

2. C-ABL

Le gène codant pour la kinase c-Abl est situé dans le locus 9q34.1 (Heisterkamp et al., 1982, Jhanwar et al., 1984). La kinase c-Abl est directement concernée par le « chromosome Philadelphie », qui est une translocation réciproque des chromosomes 9 et 22, t(9 ; 22). Le point de cassure du chromosome 9 possède la particularité de toujours se situer au niveau de l'exon 1 du gène Abl alors que celle du chromosome 22 se situe au niveau d'une région du gène BCR (BCR : Breakpoint Cluster Region). La recombinaison du chromosome 9 avec une partie du chromosome 22 génère un gène BCR/Abl qui est le

marqueur recherché pour l'identification de leucémie myéloïde chronique (Melo et al., 1993, Faderl et al., 1999, Zheng et al., 2009).

C-Abl a une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. Elle contrôle principalement la prolifération cellulaire (Van Etten, 1999) et l'apoptose (Wang, 2000). En effet, c-Abl contrôle la fonction de la protéine p73, un analogue de la protéine p53, qui active l'expression de gènes pro-apoptotiques en réponse à un stress génotoxique (Tsai and Yuan, 2003). En réponse à des facteurs de croissance, la c-Abl est activée par les SFKs (Plattner et al., 1999). La phosphorylation activatrice de c-Abl est en Y245 (Brasher and Van Etten, 2000). Une autre phosphorylation en Y412 dans la boucle d'activation est nécessaire pour l'activité kinasique (Pluk et al., 2002).

➤ TAU, SUBSTRAT DE C-ABL

La protéine c-Abl phosphoryle tau en Y18 et en Y394 (Figure 40). Elle est présente dans les NFTs des cerveaux Alzheimer (Lee et al., 2004a, Derkinderen et al., 2005, Lebouvier et al., 2009), où elle co-localise avec la protéine tau (Shirazi and Wood, 1993, Ho et al., 2005).



Figure 40. **Localisation des sites de phosphorylation de tau par la c-Abl.**

➤ C-ABL, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Dans les neurones, la kinase c-Abl activée (phosphorylée en Y412) peut se lier *in vitro* à la p73 (phosphorylée en Y99) induisant ainsi un signal pro-apoptotique. Le traitement des neurones hippocampiques par A β augmente l'expression des kinases c-Abl et p73 (Alvarez et al., 2004, Cancino et al., 2008, Vazquez et al., 2009). Ces dernières se lient en formant un complexe induisant l'apoptose (Alvarez et al., 2004). Cette action peut être bloquée par l'inhibition pharmacologique par le mésilate d'imatinib, un inhibiteur spécifique de c-Abl, ou par ARNi (Alvarez et al., 2004). Cependant, l'apoptose dépendante de c-Abl est souvent celle induite en réponse à des lésions de l'ADN (Wang, 2000).

Dans les premières étapes de la formation des NFTs, l'expression de la kinase c-Abl est élevée dans les neurones, suggérant une implication de la protéine c-Abl dans le

processus d'agrégation de tau (Derkinderen et al., 2005, Lebouvier et al., 2009). Il est possible qu'une phosphorylation en tyrosine initie le mécanisme et induise directement ou indirectement l'activation des kinases à sérines et thréonines (Van Etten, 1999). La c-Abl peut également phosphoryler une kinase importante de tau, la CDK5 (Zukerberg et al., 2000).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE C-ABL

L'inhibiteur de la c-Abl est le mésilate d'imatinib ou STI571 ou encore Glivec® (Tableau 27). La CI50 du Glivec® est comprise entre 3 et 6 µM (Podtcheko et al., 2003, Zhang et al., 2003). Il a la

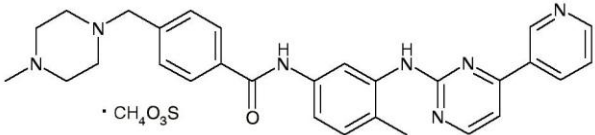
Nom usuel	Glivec® ou STI571
Nom	4-[(4-méthyl-1-pipérazinyl)méthyl]-N-[4-méthyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-phényl]benzamide méthanesulfonate
Structure	
CI50	3 à 6 µM
Formule brute	C ₂₉ H ₃₁ N ₇ O + CH ₄ SO ₃
Masse molaire	589,7 g.mol ⁻¹

Tableau 27. Caractéristiques du Glivec® ou STI571.

particularité d'avoir une AMM pour traiter les patients atteints de leucémie myéloïde chronique ou encore de tumeurs stromales gastro-intestinales (Cancino et al., 2008). L'apoptose, la phosphorylation de tau et les troubles du comportement induits par les dépôts de peptides Aβ sont abolis par l'utilisation de cet inhibiteur dans des modèles de souris « Alzheimer » sur-exprimant l'APP mutée (mutation génique APP^{sw}) et la PSEN1 délétée pour l'acide glutamique 9 (PSEN1ΔE9) (Cancino et al., 2008).

D. CONCLUSIONS SUR LES KINASES DE TAU ET L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU

La représentation de la pyramide des kinases de tau permet de déterminer plus aisément les kinases étant majoritairement impliquées dans l'hyperphosphorylation de tau (Figure 41). Comme on peut l'observer, les kinases principales de tau sont les CK1 α /1 δ /2 et la GSK3 β qui peuvent phosphoryler tau chacune sur environ 50% des sites de phosphorylation dits physiologiques. En revanche, lorsque l'on s'intéresse aux sites de tau trouvés hyperphosphorylés dans les cerveaux Alzheimer, on constate que

la GSK3 β phosphoryle environ 80% des sites dits pathologiques, alors que les

CKs en phosphorylent approximativement 60% (Figure 41). En dépit de ces constatations mathématiques, les autres kinases de tau restent importantes dans la pathologie de tau. En effet, la DYRK1A semble d'un grand intérêt car elle est présente en 3 exemplaires dans un « modèle » de vieillissement accéléré, le syndrome de Down. D'autre part, il est également possible qu'une kinase même minoritaire puisse être à l'origine d'une cascade d'hyperphosphorylation de tau.

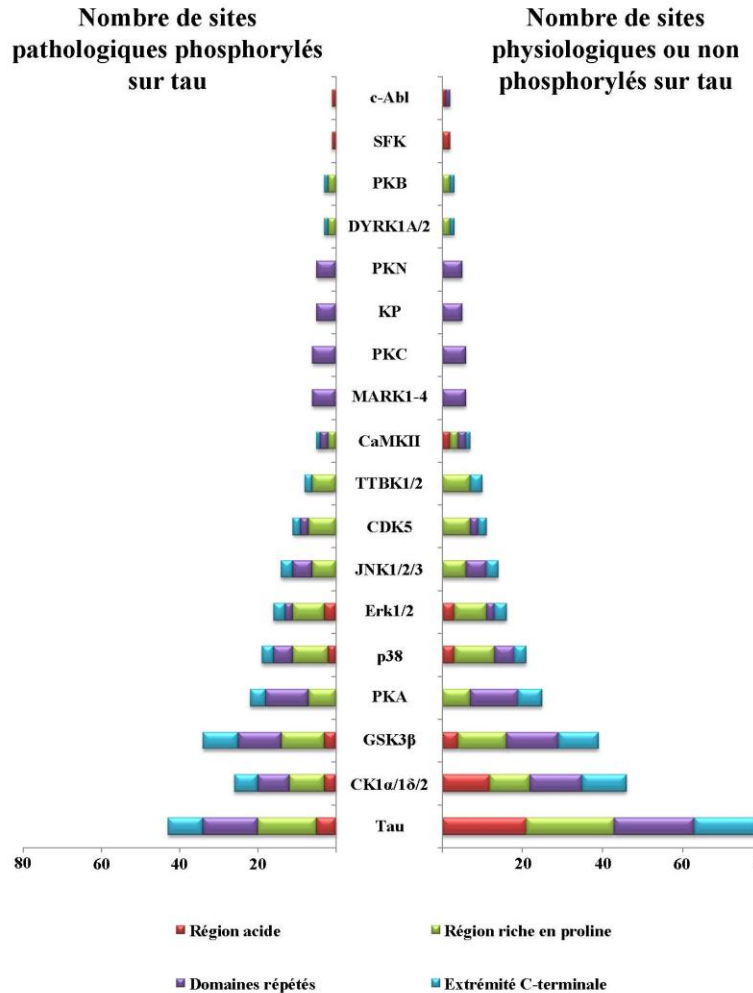


Figure 41. **Pyramide des phosphorylations de tau.** A gauche, nombre de sites de phosphorylation dits pathologiques de la protéine tau. A droite, nombre de sites de phosphorylation pathologiques et physiologiques de la protéine tau.

IV. PHOSPHATASES DE TAU

Comme ce qui a été évoqué ci-dessus, les voies de signalisation cellulaire sont principalement régulées par un cycle de phosphorylation-déphosphorylation. Les enzymes phosphatases sont responsables de la déphosphorylation par hydrolyse du groupement phosphate des phosphoprotéines.

Dans la maladie d'Alzheimer, l'hyperphosphorylation de tau peut être due soit à une sur-activation des kinases, soit à une sous-activation des phosphatases, soit aux deux. Les 71 sites phosphorylables de la protéine tau sont la cible de protéines phosphatases dont le dysfonctionnement peut potentiellement entraîner une hyperphosphorylation aberrante de tau (Buee et al., 2000, Sergeant et al., 2008). Certaines sont déjà identifiées pour avoir une activité ou une expression perturbée dans les cerveaux Alzheimer (Chung, 2009) : c'est le cas des protéines phosphatases 1, 2A, 2B, 5 (PP1, PP2A, PP2B, PP5), PTEN, Cdc25A/B (Cell division cycle 25A/B) (Tableau 29).

Expression ou activité dans les cerveaux Alzheimer	
Diminuée	Augmentée
PP1	PP2B/Calcineurine
PP2A	Cdc25A
PP5	Cdc25B
PTEN	

Tableau 29. **Phosphatases avant une activité ou une expression modifiée dans les cerveaux Alzheimer.** D'après (Chung, 2009).

L'étude des phosphatases de tau est indispensable pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Les phosphatases sont classées en 3 groupes selon leurs séquences d'a.a., la structure de leur site

Classes des phosphatases		
PPPs	PPMs	PTPs
PP1 (37 kDa)	PP2C (42-44 kDa)	PTEN (58-60 kDa)
PP2A (36 kDa)		Cdc25A (65 kDa)
PP2B (60 kDa)		Cdc25B (53 kDa)
PP4 (35 kDa)		
PP5 (60 kDa)		
PP6 (30 kDa)		
PP7 (75 kDa)		

Tableau 28. **Classes des phosphatases.** PPPs : Phosphatases à protéines sérines-thréonines ; PPMs : Phosphatases dépendantes des métaux ; PTPs : Phosphatases à double spécificité sérines/thréonines et tyrosines.

catalytique et leur sensibilité aux inhibiteurs. Ainsi on distingue : les phosphatases à sérine ou thréonine ou à phosphoprotéines, PPPs (« PhosphoProtein Phosphatases »), les protéines phosphatases dépendantes des métaux, PPMs (« Protein Phosphatase Metal-dependent ») et les protéines phosphatases à tyrosine, PTPs (« Protein Tyrosine Phosphatases ») qui peuvent également déphosphoryler les phosphosérines et phosphothréonines (Tableau 28).

In vitro, tau est déphosphorylée par les protéines phosphatases PP1, PP2A, PP2B et non pas par la PP2C (Gong et al., 1993, Gong et al., 1994a, Gong et al., 1994b). Dans les cerveaux Alzheimer, les activités phosphatases sont diminuées de 20 % (Gong et al., 1993, Gong et al., 1995). D'autre part, les activités phosphatases dans les cerveaux humains montrent une prédominance des activités de la PP2A (71 %) en comparaison aux autres phosphatases (PP2B : 7 % ; PP5 : 11 % ; autres phosphatases (majoritairement PP1) : 11 %) (Liu et al., 2005a). Cette partie du manuscrit traitera des phosphatases impliquées plus ou moins fortement dans l'hyperphosphorylation de tau, à savoir : PP1, PP2A, PP2B, PP5, PTEN, Cdc25A et Cdc25B. A l'instar des kinases de tau, ces phosphatases seront décrites ci-dessous.

A. PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASES

1. PROTEIN PHOSPHATASE-1

La PP1 est une phosphatase à sérine ou thréonine (Ouimet et al., 1995). Parmi les isoformes de la PP1 (α , β , γ_1 et γ_2), seule l'isoforme γ est soumise à un épissage alternatif (Ceulemans and Bollen, 2004). La PP1 interagit avec d'autres protéines grâce au motif conservé RXVXF. La séquence consensus est R/KXV/IpXF/W dans laquelle X est tout résidu et pX tout résidu mais phosphorylé (Wakula et al., 2003, Hendrickx et al., 2009). La PP1 s'associe en plusieurs points de la protéine à déphosphoryler, au niveau des motifs « MyPhoNE » (« Myosin Phosphatase N-terminal Element ») dont la séquence consensus est RXXQV/I/LK/RXY/W (Terrak et al., 2004) ou du motif « SILK » dont la séquence consensus est S/GILK/R (Hendrickx et al., 2009). Dans le cerveau, les régulations intracellulaires de la PP1 s'effectuent par l'intermédiaire des inhibiteurs 1 (I_1) et 2 (I_2) *via* la phosphorylation de ceux-ci par la PKA ainsi que par la DARPP-32 (« Dopamine and cAMP-Regulated PhosphoProtein of 32 kDa ») (Huang and Glinsmann, 1976, Huang et al., 1999). Au niveau neuronal, la PP1 est localisée principalement au niveau des épines dendritiques où elle contrôle (Ouimet et al., 1995) *via* DARPP-32 et la PKA l'action de plusieurs neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine et le glutamate (Hemmings et al., 1984, Nairn et al., 2004). Lorsque la DARPP-32 est phosphorylée en T34 par la PKA, elle se lie à la PP1 et l'inhibe. La DARPP-32 est régulée par plusieurs kinases de tau dont CK2, qui phosphoryle DARPP-32 en S202, et favorise la phosphorylation en T34 par la

PKA. A l'inverse, les CDK5 et CK1 phosphorylent DARPP-32 en T75 et S137 et diminuent le taux de phosphorylation en T34 (Nairn et al., 2004).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA PP1

Les sites de tau déphosphorylés par la PP1 sont T212 (40 % des phosphorylations de ce site), T217 (26 %), S262 (33 %), S396 (42 %) et S422 (31 %) (Rahman et al., 2005). Tau favorise également l'interaction de PP1 avec les microtubules (Liao et al., 1998).

➤ PP1, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

In vitro et *in vivo*, la PP1 α interagit avec la protéine pro-apoptotique Bad (Ayllon et al., 2000). Au niveau neuronal, aucune donnée n'est établie en ce qui concerne une induction de l'apoptose par la PP1, probablement en raison de son taux relativement faible d'activité (environ 11 %) dans les cerveaux (Liu et al., 2005a). Dans les substances blanches et grises des cerveaux Alzheimer, l'activité de la PP1 est diminuée d'environ 20 % (Gong et al., 1993, Gong et al., 1995). L'inhibition pharmacologique de la PP1 par la calyculine A (calyA) stimule la sécrétion d'APP soluble, et réduit la production de peptides A β (da Cruz e Silva et al., 1995). A l'inverse, la présence de peptides A β inhibe la PP1 (Vintem et al., 2009). La PP1 est également impliquée dans les processus de mémorisation à long terme (Hoeffler et al., 2007).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA PP1

En raison des homologies de séquences entre la PP1, la sous-unité C de la PP2A et la PP2B (Janssens and Goris, 2001), l'inhibition spécifique de ces phosphatases est difficile. Pour la PP1, l'inhibition se fait essentiellement par la CalyA.

La CalyA (Tableau 30) est un inhibiteur puissant des PP1 et PP2A

(Ishihara et al., 1989, Resjo et al., 1999). Elle est extraite à partir d'une éponge marine *Discodermia calyx*. Les effets dus à l'inhibition de la PP1 ne peuvent se faire qu'après

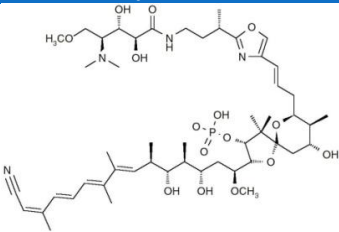
Nom	Calyculine A
Structure	
CI50 _{PP1}	2 nM
CI50 _{PP2A}	0,5 à 1 nM
Formule chimique	C ₅₀ H ₈₁ N ₄ O ₁₅ P
Poids moléculaires	1009,2 g.mol ⁻¹

Tableau 30. **Calyculine A, inhibiteur des PP1 et PP2A.**

déduction de l'effet dû à l'inhibition spécifique de la PP2A par l'acide okadaïque (OKA) qui n'a quasiment aucun effet sur la PP1.

2. PROTEIN PHOSPHATASE-2A

L'implication cellulaire de la PP2A est hautement importante puisque 71 % des activités phosphatases de la cellule sont attribuées à la PP2A (Liu et al., 2005a). Chez tous les eucaryotes, la PP2A est une phosphatase clé du métabolisme (Millward et al., 1999). Elle est impliquée dans la régulation de nombreux processus tels que la réplication de l'ADN, la transcription, la traduction, la progression du cycle cellulaire, la division cellulaire, le développement, la voie Wnt/ β -caténine (par déphosphorylation de la β -caténine) (Li et al., 2001), l'auto-renouvellement des cellules souches (Wang et al., 2009), la tumorigenèse (Janssens et al., 2005, Arnold and Sears, 2008), la dynamique du cytosquelette (Xu et al., 2008) et l'apoptose (Van Hoof and Goris, 2003, Janssens et al., 2008).

La PP2A est un hétérotrimère qui comporte une sous-unité catalytique C de 36 kDa, une sous-unité régulatrice B et une sous-unité structurale A de 65 kDa en forme de croissant qui coordonne l'assemblage des autres sous-unités. La sous-unité C est trouvée sous deux isoformes α et β , ayant 97 % d'homologie (Janssens et al., 2008) et codées par le gène 5q23-31 (Jones et al., 1993). La sous-unité A est trouvée également sous deux isoformes α et β , qui possèdent 85 % d'homologie (Janssens et al., 2008) et codées par le gène 19q13.4 (Ruteshouser et al., 2001). La sous-unité B, hautement variable, régule la spécificité de substrat et la formation du complexe avec les 2 autres sous-unités (Westermarck and Hahn, 2008). A ce jour 4 familles de sous-unités B ont été identifiées (Tableau 31).

Sous-unités	Loci	Isoformes
B B55/PR55/PPP2R2	8p	α
	5q31-q33	β
	4p16	γ
		δ
B' B56/PR61/PPP2R5	1q41	α
	11q13	β
	3p21	γ
	6q21.1	δ
	14q23.1	ϵ
B'' PR72/PPP2R3		PR48
		PR59
	3q	PR72
		PR130
B'''		PR93/SG2NA
		PR110/Striatine

Tableau 31. **Classification des sous-unités de la PP2A.**

La sous-unité structurale A est composée de 15 domaines répétés quasi-identiques nommés domaines « HEAT » en raison de leur présence dans les protéines suivantes : l'huntingtine, le facteur d'élongation 3, la sous-unité A de la PP2A et la kinase TOR

(« Target Of Rapamycin »). Les sous-unités B et C se lient respectivement à la sous-unité A grâce aux domaines répétés 2 à 8 et 11 à 15 (Xu et al., 2006, Cho and Xu, 2007). La diversité des sous-unités de la PP2A conduit à plus d'une centaine de combinaisons pour le complexe PP2A (Westermarck and Hahn, 2008).

Indépendamment du type de la sous-unité B, la régulation de la PP2A se fait par phosphorylation, méthylation et aussi par l'action d'inhibiteurs endogènes nommés I_1^{PP2A} et I_2^{PP2A} (inhibiteur endogène 1 et 2 de la PP2A) (Li and Damuni, 1998). Sur la sous-unité catalytique C, la phosphorylation en Y307 ainsi que la carboxyméthylation en L309 sont respectivement responsables de l'inactivation de PP2A et des échanges de sous-unités B activatrices (Longin et al., 2007, Perrotti and Neviani, 2008). La méthylation *in vivo* de la sous-unité C de la PP2A est estimée à un taux de 70 à 90 % et est nécessaire à l'assemblage des sous-unités de type B55 au complexe de la PP2A (Yu et al., 2001, Janssens et al., 2008). Cette méthylation en L309 est régulée par la LCMT1 (Leucine Carboxyle MéthylTransférase 1) (De Baere et al., 1999, Leulliot et al., 2004) et la PME-1 (Phosphatase MéthylEstérase-1) (Ogris et al., 1999, Longin et al., 2004). La localisation de la LCMT1 dans le cytoplasme et de la PME-1 dans le noyau régulent l'activité de la PP2A dans un cycle d'activation/inactivation interne où la PP2A change de compartiment cellulaire en fonction des besoins propres de la cellule (Longin et al., 2008). Lorsque la méthylation de la sous-unité catalytique C de la PP2A est insuffisante pour la fixation de la sous-unité B, cela entraîne la dissociation de celle-ci ainsi que l'apoptose (Longin et al., 2007). Tout comme la phosphorylation en Y307, une phosphorylation en T304 intervient également dans l'inhibition du recrutement des sous-unités de type B55 (Janssens et al., 2008).

Le troisième type de régulation de la PP2A intervient *via* des inhibiteurs endogènes stables thermiquement, I_1^{PP2A} (30 kDa ; CI50 = 30 nM) et I_2^{PP2A} (39 kDa ; CI50 = 23 nM) qui sont respectivement nucléaire et cytoplasmique (Li et al., 1995, Li et al., 1996, Li and Damuni, 1998, Tsujio et al., 2005). Pour inhiber la PP2A, I_1^{PP2A} interagit avec l'extrémité N-terminale de la sous-unité C de la PP2A (acides aminés 1 à 45) (Chen et al., 2008).

D'autre part, les virus, en particulier le SV40 (« Simian Virus 40 ») utilise l'inhibition de la PP2A pour perturber les voies cellulaires de l'hôte (Arroyo and Hahn, 2005, Arnold and Sears, 2008), d'où le nom de « cheval de Troie de la signalisation cellulaire » donné à la PP2A (Sontag, 2001).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA PP2A

PP2A est impliquée dans la régulation de l'état de phosphorylation de tau (Gong et al., 1993, Bennecib et al., 2000, Kuszczyk et al., 2009). La sous-expression de la sous-unité B55 α de la PP2A est corrélée avec l'hyperphosphorylation de tau observée dans la maladie d'Alzheimer (Sontag et al., 1999, Sontag et al., 2004b). La sous-unité B55 α de PP2A se lie et adresse la PP2A aux microtubules où elle est idéalement positionnée pour déphosphoryler tau et réguler l'activité de nombreuses kinases de tau (Hiraga and Tamura, 2000, Xu et al., 2008, Virshup and Shenolikar, 2009). Par des mutations de divers segments de la protéine tau, Sontag *et al.*, ont pu mettre en évidence que la PP2A se lie à la protéine tau au niveau des acides aminés 221 à 396. Ces auteurs ont également montré que la liaison de la PP2A (hétérocomplexe ABC) à tau était hautement dépendante du type de sous-unité B (AB55 α C > AC > AB55 β C > C > AB56C), et que la présence des microtubules était inhibiteur pour la déphosphorylation de tau par la PP2A (Sontag et al., 1999). Du fait que la PP2A contribue à 71 % des activités phosphatases de la cellule, la PP2A est considérée comme la phosphatase majoritaire de tau (Liu et al., 2005a). D'autre part, la glycosylation anormale de tau inhibe la déphosphorylation par la PP2A à des sites tels que S198, S199 et S202 conduisant à l'hyperphosphorylation de tau (Liu et al., 2002c).

L'OKA, un inhibiteur de la PP2A, provoque l'hyperphosphorylation de tau et, par conséquent, la dissociation de tau des microtubules provoquant ainsi une déstabilisation du cytosquelette neuronal (Gong et al., 2000, Nuydens et al., 2000).

➤ PP2A, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Comme la PP2A régule la déphosphorylation des facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille des protéines Bcl-2 (Chiang et al., 2003, Ray et al., 2005), l'inhibition de la PP2A conduit à l'apoptose neuronale (Ruvolo et al., 2002, Van Hoof and Goris, 2003, Bertoli et al., 2009). Les déphosphorylations successives et activatrices de Bad (molécule pro-apoptotique) en S112 et S136 induisent l'apoptose (Chiang et al., 2003). La PP2A régule également l'induction de l'apoptose *via* les phosphorylations d'Akt en T308 et S473 (Andrabi et al., 2007). D'autre part, l'inhibition de la PP2A par l'I₁^{PP2A} est impliquée dans l'apoptose induite par le segment 646-664 de l'APP (Madeira et al., 2005).

Le stress oxydatif généré par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit également l'apoptose des cellules de neuroblastome SH-SY5Y et des neurones corticaux *via*

l'inhibition de la PP2A et de la PP5 (Chen et al., 2009). Les isoformes de la sous-unité B55 possèdent 80 % d'homologie entre elles et ne diffèrent que par leur queue N-terminale. L'extrémité N-terminale de l'isoforme B55β2 suffit à adresser l'hétérocomplexe de la PP2A à la mitochondrie et accélérer la mort cellulaire (Dagda et al., 2003). De même, la sous-unité B56β est identifiée pour favoriser la mort cellulaire en augmentant la fission mitochondriale (Dagda et al., 2008).

Comme pour la PP1, les substances blanches et grises des cerveaux Alzheimer montrent une diminution de l'activité enzymatique de la PP2A (Gong et al., 1993, Rahman et al., 2005). De même, parmi les activités phosphatases de tau des cerveaux Alzheimer, l'activité enzymatique de la PP2A est diminuée de près de 50 % (Liu et al., 2005a). Les taux de méthylation de la PP2A, de la méthyltransférase et des ARNm de l'holoenzyme ABαC, une forme majoritaire de la PP2A, sont diminués dans les régions affectées des cerveaux Alzheimer (Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001, Sontag et al., 2004a, Sontag et al., 2007, Sontag et al., 2008). De plus, l'ajout de l'enzyme PP2A sur des agrégats de tau restaure *de novo* la liaison de tau aux microtubules à un niveau similaire à celui des contrôles (approximativement 80 % de liaison) (Wang et al., 2007).

Des réductions mineures du taux de méthylation de la PP2A induisent l'hyperphosphorylation de la protéine tau ainsi que le clivage de l'APP en peptides Aβ (Sontag et al., 2007, Zhou et al., 2008). La diminution des niveaux de PP2A peut également être due à la présence de peptides Aβ endogènes ou exogènes (Zhou et al., 2008). D'autre part, la phosphorylation de la PP2A sur sa sous-unité catalytique en Y307 est présente dans les cerveaux Alzheimer (Liu et al., 2008).

L'inhibiteur de la PP2A, OKA, stimule l'agrégation du peptide Aβ, la dégénérescence neuronale, la perte synaptique ainsi que des troubles de l'apprentissage caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Sun et al., 2003). De plus, le traitement de neurones par l'OKA induit le clivage de la dynéine ainsi que l'accumulation des microtubules (Yoon et al., 2008)

Dans les cerveaux Alzheimer, une relocalisation cytoplasmique ainsi que des clivages en N- et C-terminal de l'I₂^{PP2A} sont observés (Tanimukai et al., 2005, Iqbal et al., 2009). De plus, l'I₁^{PP2A} et l'I₂^{PP2A} sont augmentés de 20 % dans les neurones des cerveaux Alzheimer et sont trouvés co-localisés avec la PP2A et les protéines tau hyperphosphorylées (Tanimukai et al., 2005, Chen et al., 2008). I₁^{PP2A} induit l'hyperphosphorylation de tau aux

sites T231, S235, S262, S356 et S404, ainsi que la perturbation du cytosquelette neuronal et de la croissance neuritique (Saito et al., 1995, Chen et al., 2008). Le clivage dans la séquence NLS (« Nuclear Localization Signal ») de l'inhibiteur I_2^{PP2A} entraîne la sur-expression des inhibiteurs I_1^{PP2A} et I_2^{PP2A} et est responsable de l'hyperphosphorylation anormale de tau observée chez les patients Alzheimer (Tanimukai et al., 2005, Kovacech et al., 2007, Tanimukai et al., 2009). L'inhibition du clivage de l' I_2^{PP2A} est donc proposée comme stratégie de neuroprotection possible (Tanimukai et al., 2009). La mémantine est également décrite pour agir sur l' I_2^{PP2A} et contribuer à la restauration de l'activité de la PP2A (Chohan et al., 2006).

Dans les cerveaux Alzheimer, une diminution des hétérocomplexes AB55 α C dans les lobes frontaux et temporaux est corrélée avec la diminution d'activité de la PP2A et le nombre de plaques séniles (Sontag et al., 2004b). De ce fait, la régulation de l'activité de la PP2A (stimulation) ou le ciblage de la sous-unité B spécifique (B α) sont proposées comme approche pour bloquer la pathologie de tau (Deters et al., 2009).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA PP2A

Parmi les inhibiteurs de la PP2A (Tableau 32), la fostriécine (FST) est l'inhibiteur le plus sélectif de la PP2A (CI50 = 1,5 à 5,5 nM). Cependant, la FST inhibe de la même façon la PP2A et la PP4 (Hastie and Cohen, 1998, Honkanen and Golden, 2002).

L'OKA est aujourd'hui l'inhibiteur le plus utilisé pour l'inhibition de la PP2A (Tableau 33). Il est isolé des éponges marines

Halichondria okadaïi et *Halichondria melanodocia* (Vale and Botana, 2008). L'OKA est spécifique de la PP2A lorsqu'il est utilisé à des concentrations inférieures à 100 nM (25 à 50 nM)

	Spécificités relatives de la PP2A comparées à la PP1
FST	≈ 25 000
OKA	≈ 100
Microcystine-LR	≈ 45
Cantharidine	≈ 10
CalyA	≈ 1
Tautomycine	≈ 0,1

Tableau 32. Spécificité des inhibiteurs de la PP2A comparées à la PP1. FST : fostriécine ; OKA : Acide okadaïque ; CalyA : Calyculine A. D'après (Chatfield and Eastman, 2004).

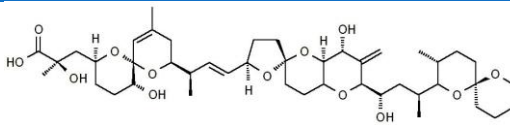
Nom	OKA
Structure	
Formule chimique	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃
Poids moléculaire	805,0 g.mol ⁻¹

Tableau 33. Caractéristiques de l'OKA, inhibiteur de la PP2A.

(Bennecib et al., 2000). La CalyA, comparée à l'OKA, est considérée comme 5 à 10 fois supérieure au niveau de la spécificité pour la PP2A, mais cela inhibe la PP1 et la PP2A aux mêmes doses. D'autre part, l'utilisation de CalyA à des concentrations 10 fois inférieures à celle de l'OKA affecte deux des principales kinases de tau : GSK3 β et CDK5 (Tableau 34).

Sur la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y, l'OKA montre 100 % d'inhibition de la PP2A sans pour autant affecter l'activité de la GSK3 β (Tanaka et al., 1998). De même, sur des coupes de cerveaux de rats, l'OKA induit la phosphorylation de plusieurs sites observés dans la maladie d'Alzheimer, les sites : Tau-1 (S198, S199 et S202), 12E8 (S262 et S356), PHF-1 (S396 et S404) et R145 (S422) (Pei et al., 2003).

	PP2A	PP1	GSK3 β	CDK5	Cdc2
1 μM d'OKA	65%	0%	0%	0%	0%
0,1 μM de CalyA	20%	50%	50%	30%	20%

Tableau 34. **Pourcentages d'inhibition des phosphatases et des kinases cibles de l'OKA et de la CalyA sur des coupes histologiques de cerveaux de rats.**

3. PROTEIN PHOSPHATASE-2B

La PP2B, aussi appelée calcineurine ou PP3 (« Protein Phosphatase-3 »), compte pour 7 % des activités phosphatases du cerveau humain (Liu et al., 2005a). La PP2B est composée d'une sous-unité catalytique A de 58 à 64 kDa (calcineurine A) et d'une sous-unité régulatrice B de 19 kDa (calcineurine B) (Rusnak and Mertz, 2000). La sous-unité A possède 3 isoformes (α , β , γ). La sous-unité B est activée par le calcium et la calmoduline.

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA PP2B

Comme les phosphatases précédentes, certains sites de tau sont soumis à l'action de la PP2B (Bennecib et al., 2000, Liu et al., 2005a). Dans les cultures de neurones, les sites S199, S202, T205, T217, S262, S396, S404 et S422 sont soumis à l'action de la PP2B (Tableau 35) (Saito et al., 1995, Rahman et al., 2006).

Sites de tau	Pourcentages d'activité de la PP2B pour le site étudié
S199	38%
T217	32%
S262	63%
S396	78%
S422	32%

Tableau 35. **Pourcentages d'activité de la PP2B en fonction des sites de phosphorylation de tau.** D'après (Rahman et al., 2006).

➤ PP2B, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Concernant l'apoptose, la PP2B possède des rôles opposés : elle est inducteur d'apoptose lorsqu'elle déphosphoryle Bad en S112 et S136 (libérant ainsi Bad des protéines 14-3-3, association promouvant la survie cellulaire) ; elle est inhibitrice d'apoptose lorsqu'elle déphosphoryle Bcl-2 (Shibasaki et al., 2002). L'inhibition de la PP2B par l'antibiotique FK506 (tacrolimus) bloque l'apoptose de cultures primaires de neurones (Yardin et al., 1998). De même, cette inhibition bloque l'apoptose induite par la sur-expression de la PP2B dans les cellules nerveuses (Asai et al., 1999). La PP2B est impliquée dans l'apoptose induite par divers composés tels que le glutamate (Ankarcrona et al., 1996), l'acide docosahéxaénoïque (DHA), un acide gras oméga-3 (Siddiqui et al., 2001), le sélénium (Celik et al., 2007). Elle est également impliquée dans la mort cellulaire induite par le calcium dépendante de la CaMKII (Shibasaki and McKeon, 1995, Wang et al., 1999, Olofsson et al., 2008).

Alors que l'ensemble des activités phosphatases est diminuée de 50% dans les cerveaux Alzheimer, l'activité de la PP2B est augmentée de 2 fois (Liu et al., 2005a). *A contrario*, une augmentation des ARNm de l'inhibiteur endogène de la PP2B, la calcipressine 1 (ou RCAN1 : « Regulator of CALciNeurin 1 ») est observée dans la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down (Cook et al., 2005, Poppek et al., 2006). Cette augmentation d'expression induit l'hyperphosphorylation et l'accumulation de tau en bloquant l'activité du protéasome et par conséquent le « turn-over » des protéines tau (Poppek et al., 2006). Ces données contradictoires peuvent s'expliquer par le fait que la constante de Michaëlis de la PP2B est 5 fois plus importante que celle des autres phosphatases de tau (Tableau 36) (Liu et al., 2005a).

Phosphatases	Km (µM)
PP1	10,2
PP2A	11,3
PP2B	53,5
PP5	7,6

Tableau 36. Constantes de Michaëlis des phosphatases de tau. D'après (Liu et al., 2005a).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA PP2B

La Cyclosporine A (CsA) et le tacrolimus (FK506) sont les inhibiteurs couramment utilisés de la PP2B (Tableau 37) (Liu et al., 1991). Ils sont également utilisés comme immunosuppresseurs pour les transplantations d'organes. La constante d'inhibition de la PP2B par la CsA est de 270 nM (Liu, 1993, Etkorn et al., 1994). Le FK506 est 100 fois plus puissant que la CsA pour l'inhibition de la PP2B (Kino et al., 1987, Watts et al., 2009).

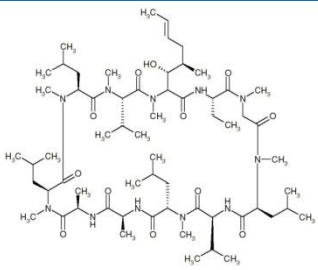
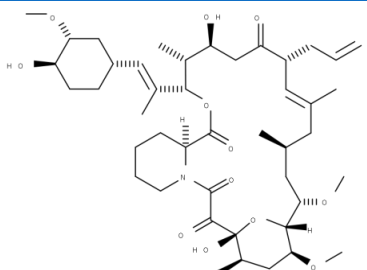
Noms	CsA	FK506
Structures		
Formules brutes	$C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$	$C_{44}H_{69}NO_{12}$
Masses molaires	$1202,6g.mol^{-1}$	$804,0g.mol^{-1}$

Tableau 37. **Caractéristiques des inhibiteurs de la PP2B, CsA et FK506.**

4. PROTEIN PHOSPHATASE-5

La PP5 (58 kDa) est une phosphatase cytoplasmique (Bahl et al., 2001), hautement exprimée dans les cerveaux humains et codée par un gène situé dans le locus 19q13.3 (Xu et al., 1996). Elle possède un domaine catalytique en C-terminal similaire à ceux des phosphatases PP1, PP2A, PP2B, PP4 et PP7 ainsi qu'une extrémité régulatrice N-terminale composée de 3 tétratricopeptides répétés (TPR) régulant les interactions protéiques (Chinkers, 2001). La PP5 est activée par les acides gras insaturés tels que l'acide arachidonique et le phosphatidylinositol (Chen and Cohen, 1997, Skinner et al., 1997). La PP5 est un hétérocomplexe composé de sous-unités A et B similaires à la PP2A (Lubert et al., 2001).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA PP5

In vitro, la PP5 déphosphoryle la protéine tau normale ou bien celle se trouvant dans les agrégats de tau de cerveaux Alzheimer (Gong et al., 2004, Liu et al., 2005a). *In vivo*, la PP5 interagit avec la sous-unité régulatrice A de la PP2A (Lubert et al., 2001). La glycosylation anormale de tau inhibe la déphosphorylation par la PP5 à des sites tels que S198, S199 et S202 conduisant à l'hyperphosphorylation de tau (Liu et al., 2002c).

➤ PP5, APOPTOSE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Suite à un stress par l' H_2O_2 , la PP5, tout comme la PP2A, est inhibitrice de l'apoptose et ceci *via* la déphosphorylation de la kinase 1 régulant le signal apoptotique, ASK1 (« Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 »), une MAPKKK activatrice des JNKs (Morita et al., 2001, Zhou et al., 2004, Chen et al., 2009, Ham et al., 2010). Suite à des lésions de l'ADN, la PP5 agit sur les voies de réparation de l'ADN *via* les protéines ATM

(« Ataxia-Telangiectasia Mutated-kinase »), ATR (« ATM/rad 3 Related kinase ») et DNA-PK (« DNA-dependent ser/thr Protein Kinase ») et suivant le cas favorise la survie cellulaire ou l'apoptose (Zhou et al., 2004, Golden et al., 2008).

Dans les cerveaux Alzheimer, le niveau d'activité enzymatique de la PP5 est diminué de 20 % (Liu et al., 2005b). *In vitro*, la sur-expression de la PP5 protège du stress apoptotique induit par le peptide A β (Sanchez-Ortiz et al., 2009). De plus, le taux des acides gras, stimulant la PP5, est diminué dans les régions du cerveau les plus sérieusement affectées et présentant des NFTs. Chez les patients atteints du syndrome de Down et développant précocement la maladie d'Alzheimer, le taux d'activité de la PP5 n'est pas altéré, et ce, contrairement à la PP2A dont l'activité est diminuée (Liang et al., 2008).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA PP5

Tout comme la PP2A, la PP5 peut être inhibée par l'OKA. L'effet différentiel entre la PP2A et la PP5 peut être déduit en utilisant la FST, un inhibiteur surtout de la PP2A (mais également de la PP4) (Messner et al., 2006).

B. PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASES

1. PHOSPHATASE AND TENSIN HOMOLOG DELETED ON CHROMOSOME 10

Le gène codant pour PTEN, également appelé MMAC (« Mutated in Multiple Advanced Cancers »), est situé sur le locus 10q23 (Steck et al., 1997). *PTEN* est un gène suppresseur de tumeurs (Cantley and Neel, 1999). La phosphatase PTEN est impliquée dans l'apoptose, la migration, la croissance et la survie cellulaire. Elle est stabilisée par des phosphorylations sur les résidus : S370, S380, T382, T383 et S385 situés à son extrémité régulatrice C-terminale, empêchant sa dégradation par le protéasome (Vazquez et al., 2000, Torres and Pulido, 2001). PTEN convertit la phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP₃) en phosphatidylinositol (4,5)-diphosphate (PIP₂) (Chalhoub and Baker, 2009) et déphosphoryle les protéines et lipides sur les résidus sérines/thréonines et tyrosines (Kerr et al., 2006).

➤ TAU, SUBSTRAT DE PTEN

La suppression de PTEN chez la souris induit l'hyperphosphorylation de tau et des neurofilaments (Nayeem et al., 2007). La déphosphorylation de tau par PTEN semble indirecte. En effet, PTEN est impliquée dans la voie de régulation Akt et peut déphosphoryler, et donc inhiber, Akt ce qui lève l'inhibition de GSK3 β (cf voies de signalisations de la GSK3 β). Ceci entraîne l'hyperphosphorylation de tau (Griffin et al., 2005, Zhang et al., 2006a).

➤ PTEN, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

PTEN induit l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose à travers la voie PI3K/Akt (Weng et al., 2001, Li et al., 2009). Au niveau neuronal, l'inhibition de PTEN est protectrice du TNF α (Rickle et al., 2006). Suite à une exposition à l'interféron γ , les œstrogènes

réduisent partiellement le niveau de PTEN et protègent les motoneurones de la mort cellulaire (Smith et al., 2009). PTEN a plus clairement été étudiée dans de nombreuses tumeurs (Tableau 38) et aussi sur son rôle favorisant la voie apoptotique indépendante de la mitochondrie (Zhu et al., 2006, Chalhoub and Baker, 2009, Peacock et al., 2009).

Le niveau de PTEN est diminué dans les cerveaux Alzheimer (Griffin et al., 2005, Zhang et al., 2006a). Ces données restent controversées (Rickle et al., 2006). Des études suggèrent même que PTEN n'est pas associée à la maladie d'Alzheimer et que les données établies ne sont dues qu'au polymorphisme de PTEN (Blomqvist et al., 2006, Hamilton et al., 2006). Cependant, dans les cerveaux Alzheimer, PTEN s'accumule au niveau des NFTs et des astrocytes situés autour des plaques séniles (Sonoda et al., 2010). En fonction des études à venir sur PTEN, son inhibition sera envisageable ou non pour la maladie d'Alzheimer.

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE PTEN

Parmi les dérivés du vanadate (inhibiteur des PTPs), le bpV(bipy) ou le bpV(phén) sont les plus efficaces pour PTEN (Tableau 39) (Schmid et al., 2004). La sélectivité est 10 à

Tumeurs	Pourcentage de mutations de PTEN
Endomètre	38%
SNC	20%
Peau	17%
Prostate	14%

Tableau 38. **Pourcentages de mutation de PTEN pour les tumeurs les plus affectées par PTEN.** D'après (Chalhoub and Baker, 2009).

100 fois plus importante que pour les autres PTPs : la protéine tyrosine phosphatase β (PTP- β) et la protéine tyrosine phosphatase $\beta 1$ (PTP- $\beta 1$) (Tableau 39).

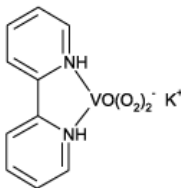
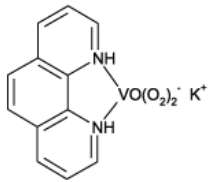
Oxovanadates		
	bpV(bipy)	bpV(phén)
	potassium bispéroxo(bipyridine)oxovanadate	potassium bispéroxo(1,10- phénanthroline)oxovanadate
		
Formules brutes	$K[VO(O_2)_2C_{10}H_8N_2]$	$K[VO(O_2)_2C_{12}H_8N_2] + 3H_2O$
Masses moléculaires	$326,2 \text{ g.mol}^{-1}$	$350,3 + 54,0 \text{ g.mol}^{-1}$
CI50 PTEN	18 nM	38 nM
CI50 PTP-β	60 nM	343 nM
CI50 PTP-$\beta 1$	164 nM	920 nM

Tableau 39. **Caractéristiques des inhibiteurs pharmacologiques de PTEN.** PTP- β : protéine tyrosine phosphatase β ; PTP- $\beta 1$: protéine tyrosine phosphatase $\beta 1$.

2. CELL DIVISION CYCLE 25

Les phosphatases Cdc25 (« Cell division cycle 25 ») sont au nombre de 3 : A, B et C (Demetrick and Beach, 1993, Patterson et al., 2009). Elles

	Cdc25A	Cdc25B	Cdc25C
Locus	3p21	20p13	5q31
Intervention dans le cycle cellulaire	Transition G1-S	Phase G2	Transition G2-M

Tableau 40. **Localisations chromosomiques des gènes cdc25 et leurs rôles dans le contrôle du cycle cellulaire.**

activent les CDKs *via* la déphosphorylation de leurs sites inhibiteurs T14 et Y15, permettant ainsi la progression dans le cycle cellulaire (Tableau 40).

➤ TAU, SUBSTRAT DE LA CDC25

La déphosphorylation de tau par les Cdc25 n'a pas été mise en évidence. Cependant, tout comme tau, les Cdc25 peuvent subir la prolyl-isomérisation de Pin1 (Lavoie et al., 2003).

➤ CDC25, APOPTOSE NEURONALE ET MALADIE D'ALZHEIMER

Divers systèmes cellulaires (cellules d'ostéosarcome, cancéreuses rénales, de leucémie promyélocytaire HL-60, ou encore de carcinome hépatocellulaire) montrent invariablement que l'inhibition pharmacologique de la Cdc25 induit l'apoptose (Kim et al., 2003, Mizuno et al., 2005, Iguchi et al., 2007, Kar et al., 2008).

Dans les cerveaux Alzheimer, les activités des phosphatases à tyrosines Cdc25A et Cdc25B sont augmentées par rapport à celles constatées dans les cerveaux témoins (Ding et al., 2000, Vincent et al., 2001).

➤ INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA CDC25

Le NSC 663284 est un puissant et sélectif inhibiteur des Cdc25 avec des constantes d'inhibition de l'ordre du nanomolaire (Tableau 41) (Lazo et al., 2001, Prevost et al., 2003). En fonction des études ultérieures sur les Cdc25 et la maladie d'Alzheimer, l'inhibition des Cdc25 sera envisagée ou non.

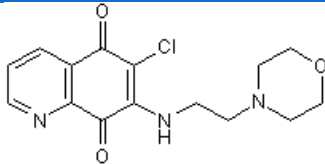
Nom	NSC 663284
Nom scientifique	6-Chloro-7-[[2-(4-morpholinyl)ethyl]amino]-5,8-quinolin edione
Structure	
Formule brute	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ O ₃
Masse moléculaire	321,8g.mol ⁻¹
CI50 _{Cdc25A}	29 nM
CI50 _{Cdc25B}	95 nM
CI50 _{Cdc25C}	89 nM

Tableau 41. **Inhibiteurs pharmacologiques des Cdc25.**

C. CONCLUSIONS SUR LES PHOSPHATASES DE TAU ET L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU

Dans les cerveaux Alzheimer, les activités phosphatases sont réduites de moitié (Liu et al., 2005a). En effet, les activités des PP1, PP2A et PP5 sont respectivement diminuées de 20 %, 50 % et 20 % (Gong et al., 1995, Liu et al., 2005a, Liu et al., 2005b). De plus, l'augmentation de 20 % des inhibiteurs I₁^{PP2A} et I₂^{PP2A} trouvés dans les cerveaux Alzheimer pourrait contribuer à l'hyperphosphorylation de tau (Tanimukai et al., 2005, Chen et al., 2008). D'autre part, chez les patients atteints du syndrome de Down et développant précocement la maladie d'Alzheimer, l'activité de la PP2A est diminuée, et ceci, contrairement à l'activité de la PP5 (Liang et al., 2008). Une diminution des taux de méthylation de la PP2A et des ARNm de la PP2A est également observée dans les régions affectées des cerveaux Alzheimer (Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001, Sontag et al., 2004a, Sontag et al., 2007, Sontag et al., 2008).

A contrario, les phosphatases PTEN (Blomqvist et al., 2006, Hamilton et al., 2006) et Cdc25A/B (Lavoie et al., 2003) ne semblent pas être impliquées (majoritairement) dans l'hyperphosphorylation de tau.

Si l'on considère ces données, et si l'on sait que les activités phosphatases de la cellule sont essentiellement attribuées à la PP2A, il semblerait que la réduction des activités phosphatases observées dans la maladie d'Alzheimer soit essentiellement due à la phosphatase PP2A, voire à la PP5.

V. KINASES ET PHOSPHATASES DE TAU : INTERCONNECTIONS

La maladie d'Alzheimer est une pathologie multifactorielle. Il est aujourd'hui clair que cette pathologie découle de perturbations de l'homéostasie cellulaire ainsi que de facteurs environnementaux. Bien que certains sites de phosphorylation de tau sont clairement impliqués dans l'agrégation de tau (T181, S199, S202, T212, S396, T403 et S404) et d'autres pour générer le caractère toxique de tau (T231, S262), l'hyperphosphorylation de tau observée dans la maladie d'Alzheimer est vraisemblablement due à la perturbation d'activité d'une ou plusieurs kinases et/ou phosphatases (Wang et al., 2007).

Diverses études ont montré des interconnexions possibles entre les kinases et les phosphatases de tau. Il a été montré que les protéines GSK3 β , CK1, CDK5, PKA et PP2A sont co-localisées au niveau d'agrégats de tau (Flaherty et al., 2000, Planel et al., 2001), que la PP2A agissait en amont de la GSK3 β (Lin et al., 2007) et que l'hyperphosphorylation de tau était un médiateur clé de la dégénérescence neuronale. Beaucoup de kinases de tau sont liées à la kinase majoritaire de tau, la GSK3 β . En effet, les PKCs (Wang et al., 2006), PKN (Isagawa et al., 2000), p38 (Thornton et al., 2008) et Fyn (Lesort et al., 1999) peuvent réguler l'activité de la GSK3 β . Les MARKs sont, quant à elles, des substrats de la GSK3 β (Timm et al., 2008). D'autres kinases sont indirectement reliées à la GSK3 β , les kinases CDK5 (Sengupta et al., 1997), PKA (Liu et al., 2004b), TTBK2 (Tomizawa et al., 2001, Noble et al., 2005) et DYRK1A (Woods et al., 2001) phosphorylent la protéine tau et en font un meilleur substrat pour la GSK3 β . La GSK3 β induit également l'activation de la CK2 qui, à son tour, inhibe la phosphatase PTEN (Arevalo and Rodriguez-Tebar, 2006). D'autre part, la GSK3 β fait partie des enzymes capables d'induire la phosphorylation en T668 de l'APP et, par conséquent, son clivage en peptides A β (Lee et al., 2003). Ces données suggèrent un rôle prépondérant de la GSK3 β dans la dégénérescence neuronale.

D'autre part, la GSK3 β et la CDK5 tendent à augmenter les niveaux de peptides A β et la CDK5 régule, *via* Akt, l'activité de la GSK3 β et, par conséquent, la phosphorylation de tau (Wen et al., 2008). La CDK5 serait un modulateur de l'hyperphosphorylation de tau alors que la GSK3 β serait un acteur clé de l'hyperphosphorylation de tau (Plattner et al., 2006). Tout comme pour Cdc2, PP1 régule les activités de la GSK3 β et de la CDK5 (Bennechib et al., 2000).

La PKA, *via* DARPP-32, peut inhiber l'activité de la PP1 (Hemmings et al., 1984, Nairn et al., 2004). L'activité de DARPP-32 est, quant à elle, contrôlée par les kinases CK2 (activateur), CK1 et CDK5 (inhibiteurs) (Nairn et al., 2004). D'autre part, l'activation de la PKA entraîne une augmentation de l'activité de la PP2A (Tian et al., 2009) et la dérégulation de la PP2A peut conduire à la phosphorylation prolongée des MAPKs (Pei et al., 2003, Zhao et al., 2003). La PP2A régule également les activités de la CaMKII (Bennechib et al., 2001). De plus, la GSK3 β agit de façon antagoniste à la PP2A au niveau synaptique (Viquez et al., 2009).

En ce qui concerne les autres kinases de tau, il a été montré que les kinases Fyn et c-Abl peuvent activer la kinase CDK5 (Zukerberg et al., 2000, Kawarabayashi et al., 2004) et que les PKCs pouvaient activer les MAPKs Erk1/2 (Alkon et al., 2007).

En conclusion, toutes ces données montrent des inter-relations d'une part entre les différentes protéines kinases de tau et, d'autre part, entre les protéines phosphatases et les protéines kinases. En se basant sur ces interconnexions, la meilleure stratégie pour bloquer la pathologie de tau consisterait à agir sur plusieurs cibles à la fois sans perturber autant que possible le fonctionnement normal de la cellule.

VI. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les données que nous venons de présenter suggèrent une forte implication de la GSK3 β et de la PP2A dans la maladie d'Alzheimer (Hooper et al., 2008, Liu and Wang, 2009) dans laquelle ces activités kinases et phosphatases seraient perturbées. Les résultats précédents du laboratoire montrent que l'exposition de cultures de neurones corticaux au chlorure de lithium entraînait une diminution de niveaux de tau (Rametti et al., 2008). Celle-ci était corrélée à une protection des neurones contre la toxicité de l'A β . Comme le lithium est un inhibiteur faible de la GSK3 β (CI50 = 2 mM) (Klein and Melton, 1996) et qu'il peut agir sur plusieurs voies de signalisation cellulaire, la diminution des ARNm de tau observée préalablement au laboratoire ne pouvait pas être attribuée avec certitude à l'inhibition de la GSK3 β par le lithium (Rametti et al., 2008). **Le premier objectif de cette thèse était donc de déterminer si la diminution des niveaux de tau par le lithium est due à l'inhibition spécifique de la GSK3 β ou à l'inhibition d'une autre enzyme.** Puisque nous agissions sur un niveau protéique, il était nécessaire de déterminer comment il était possible d'inverser cette diminution des niveaux de tau induite par le lithium afin de pouvoir agir sur la balance de régulation des niveaux de tau. **Afin de déterminer si la protéine tau elle-même est un médiateur de la mort neuronale, nous avons étudié les effets d'une suppression de tau dans un modèle *in vitro* de tauopathies.**

Le second objectif était de créer un modèle de tauopathie *in vitro*, reproduisant l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale. Ce modèle est basé sur l'inhibition de la PP2A par l'OKA. Il permettra d'identifier la ou les kinases(s) impliquée(s) dans l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale. D'autre part, il était nécessaire de déterminer si la présence de la protéine tau, dans sa forme hyperphosphorylée, était nécessaire à l'apoptose neuronale.

Après avoir déterminé, la ou les kinases(s) impliquée(s) dans l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale, le troisième objectif était de cribler des inhibiteurs de kinases de tau qui auraient un potentiel neuroprotecteur accru contre notre modèle *in vitro*.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé des approches pharmacologique et moléculaire au niveau de neurones en culture, de lignées de neuroblastome ou de souches de souris.

MATERIEL ET METHODES

Toutes les concentrations mentionnées sont des concentrations finales.

I. CULTURES CORTICALES D'EMBRYONS DE RATTES ET DE SOURIS

Les supports de cultures ont été préalablement (minimum 2 h) mis en présence de poly-L-lysine ($5 \cdot 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$, Sigma) afin de faciliter l'adhésion des cellules par des interactions de charge.

Les embryons, âgés de 17,5 jours provenant de rattes Wistar (Elevage DEPRE, France) ou de souris C57Bl6/J âgés de 14,5 jours *in utero* ont été extraits de leurs sacs embryonnaires et placés dans du PBS-glucose stérile (Phosphate Buffered Saline (Biowest), 18 mM de Glucose (Lavoisier, France)). Les cortex embryonnaires ont été prélevés, dépourvus des méninges, puis isolés. Une dissociation enzymatique a été réalisée sur les fragments corticaux récoltés par 1/3 de trypsine 0,05 %-EDTA (Ethylène Diamine Tétracétique, Gibco) et 2/3 de PBS-glucose pendant 15 minutes à 37°C. Toutes les 3 minutes, les cellules fraîchement dissociées ont été libérées par agitation. L'action de la trypsine a été bloquée par 4 % de SVF (Sérum de veau fœtal, Biowest). Le surnageant contenant les cellules individualisées a été récupéré et les fragments corticaux restants ont été dissociés par trituration légère à la pipette Pasteur rétrécie à la flamme. L'ensemble des cellules récoltées a été centrifugé à 400 g pendant 15 minutes à température ambiante (Centrifugeuse Sigma 3-18K). Le culot cellulaire a été repris dans du Neurobasal™ Medium (Gibco) complété en B-27 (Gibco) et en 2 mM de L-glutamine (Gibco) contenant 5 % de SVF. Les cellules ont été dénombrées à la cellule de Malassez, puis ensemencées en fonction du support de culture (boîtes de culture de 35 mm de diamètre (BD Falcon) pour réaliser des western-blots et des puits de plaque 24 puits (BD Falcon) contenant des lamelles de 12 mm de diamètre (Invitrogen) aux densités mentionnées dans le tableau ci-dessous (Tableau 42). Les cellules corticales dans leurs supports ont été placées dans une atmosphère à 37°C contenant 5 % de CO₂ pendant 7 jours.

Support de culture	Boîte de 35 mm de diamètre	Plaque 24 puits
Volume d'ensemencement	1,5mL	0,5mL/puit
Densité cellulaire	$1,5 \cdot 10^6$ de cellules	$3 \cdot 10^5$ de cellules

Tableau 42. Densités cellulaires lors de l'ensemencement des cultures corticales.

II. CULTURES DES NEUROBLASTOMES

A. NEUROBLASTOME DE RAT B104

Les cellules adhérentes de neuroblastome B104 de rat ont été rincées par du PBS-glucose stérile pendant 5 minutes. Après avoir ôté le PBS-glucose, la trypsine 0,05 %-EDTA a été ajoutée pendant 10 minutes à 37°C. L'action de la trypsine 0,05 %-EDTA a été bloquée par 4 % de SVF. Les cellules ont été récoltées, puis centrifugées à 400 g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire a été repris dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12) complété en glucose 18 mM (DMEM/F12-Glucose). Les cellules ont été dénombrées par comptage à la cellule de Malassez, puisensemencées en fonction du support de culture aux densités mentionnées dans le tableau suivant (Tableau 43). Les cellules ont ensuite été mises à proliférer dans du DMEM/F12-Glucose en présence de 10 % de SVF dans une atmosphère à 37°C contenant 5 % de CO₂ pendant 2 jours au minimum. Après 2 jours de croissance, les traitements pharmacologiques ont été effectués.

Support de culture	Flasques de 75cm ²	Boîte de 35 mm de diamètre	Plaque de 24 puits
Densité cellulaire	4·10 ⁶ de cellules	5·10 ⁵ de cellules	1·10 ⁴ de cellules

Tableau 43. **Densités cellulaires lors de l'ensemencement du neuroblastome B104.**

B. NEUROBLASTOME HUMAIN SH-SY5Y

Le protocole appliqué est identique à celui utilisé pour le neuroblastome de rat à l'exception du fait que le milieu DMEM/F12 a été remplacé par du RPMI 1640 (Gibco).

III. TRANSFECTIONS DES LIGNEES DE NEUROBLASTOMES

A. VECTEURS UTILISES

1. VECTEURS PERMETTANT LA SUR-EXPRESSION MOLECULAIRE DE GSK3B

Les vecteurs contenant la séquence codante pour la GSK3β nous ont été fournis par le Docteur T. Hagen (Allemagne), et contiennent les séquences de la GSK3β mutée (pcDNA3-V5-GSK3β-S9A) ou non (vecteur pcDNA3-V5-GSK3β-WT). Le vecteur pcDNA3 seul a été utilisé comme contrôle (Figure 42). Pour plus de simplicité dans l'écriture, l'ensemble de ces 3 vecteurs : pcDNA3 seul ; pcDNA3-V5-GSK3β-WT ; pcDNA3-V5-GSK3β-S9A sera référencé comme « vecteurs pcDNA3-V5-GSK3β ».

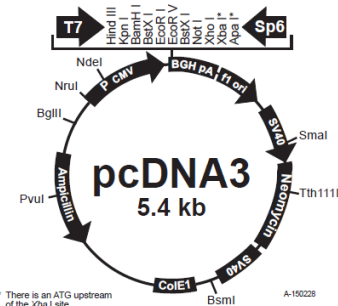


Figure 42. **Vecteurs pcDNA3**. Le vecteur pcDNA3 (5,4 kb) contient un gène de résistance à l'ampicilline, un gène de résistance à la néomycine, des promoteurs T7 et Sp6 ainsi qu'un site de polyadénylation tardif SV40.

Les séquences de la GSK3β (mutée ou non) ont été insérées au niveau des sites de restriction enzymatique BamHI et XbaI (Figure 42 et Figure 43).

GSK3β-WT	1	ATGTCAGGGCGGCCAGAACCACTCC	TTTGC	GAGAGCTGCAAGCCGGTGCAGCAGCCT	60
GSK3β-S9A	1	ATGGCAGGGCGGCCAGAACCACTCC	TTTGC	GAGAGCTGCAAGCCGGTGCAGCAGCCT	60
GSK3β-WT	61	TCAGCTTTTGGCAGCATGAAAGTTAGCAGAGACAAGGACGGCAGCAAGGTGACAACAGTG			120
GSK3β-S9A	61	TCAGCTTTTGGCAGCATGAAAGTTAGCAGAGACAAGGACGGCAGCAAGGTGACAACAGTG			120
GSK3β-WT	121	GTGGCAACTCCTGGGCAGGGTCCAGACAGGCCACAAGAAGTCAGCTATACAGACACTAAA			180
GSK3β-S9A	121	GTGGCAACTCCTGGGCAGGGTCCAGACAGGCCACAAGAAGTCAGCTATACAGACACTAAA			180
GSK3β-WT	181	GTGATTGGAAATGGATCATTGGTGTGGTATATCAAGCCAACTTTGTGATTGAGGAGAA			240
GSK3β-S9A	181	GTGATTGGAAATGGATCATTGGTGTGGTATATCAAGCCAACTTTGTGATTGAGGAGAA			240
GSK3β-WT	241	CTGGTCGCCATCAAGAAAGTATTGCAGGACAAGAGATTTAAGAATCGAGAGCTCCAGATC			300
GSK3β-S9A	241	CTGGTCGCCATCAAGAAAGTATTGCAGGACAAGAGATTTAAGAATCGAGAGCTCCAGATC			300
GSK3β-WT	301	ATGAGAAAGCTAGATCACTGTAACATAGTCCGATTGCGTTATTTCTTCTACTCCAGTGGT			360
GSK3β-S9A	301	ATGAGAAAGCTAGATCACTGTAACATAGTCCGATTGCGTTATTTCTTCTACTCCAGTGGT			360
GSK3β-WT	361	GAGAAGAAAGATGAGGTCTATCTTAATCTGGTGTGGACTATGTTCCGGAAACAGTATAC			420
GSK3β-S9A	361	GAGAAGAAAGATGAGGTCTATCTTAATCTGGTGTGGACTATGTTCCGGAAACAGTATAC			420
GSK3β-WT	421	AGAGTTGCCAGACACTATAGTCGAGCCAAACAGACGCTCCCTGTGATTTATGTCAGGTTG			480
GSK3β-S9A	421	AGAGTTGCCAGACACTATAGTCGAGCCAAACAGACGCTCCCTGTGATTTATGTCAGGTTG			480
GSK3β-WT	481	TATATGTATCAGCTGTTCCGAAGTTTAGCCTATATCCATTCCCTTTGGAATCTGCCATCGG			540
GSK3β-S9A	481	TATATGTATCAGCTGTTCCGAAGTTTAGCCTATATCCATTCCCTTTGGAATCTGCCATCGG			540
GSK3β-WT	541	GATATTAACCCGACAGAACCTCTGTTGGATCCTGATACTGCTGTATTTAAACTCTGTGAC			600
GSK3β-S9A	541	GATATTAACCCGACAGAACCTCTGTTGGATCCTGATACTGCTGTATTTAAACTCTGTGAC			600

GSK3 β -WT	601	TTTGGAAAGTGCAAAGCAGCTGGTCCGAGGAGAACCCAATGTTTCGTATATCTGTTCTCGG	660
GSK3 β -S9A	601	TTTGGAAAGTGCAAAGCAGCTGGTCCGAGGAGAACCCAATGTTTCGTATATCTGTTCTCGG	660
GSK3 β -WT	661	TACTATAGGGCACCAGAGTTGATCTTTGGAGCCACTGATTATACCTCTAGTATAGATGTA	720
GSK3 β -S9A	661	TACTATAGGGCACCAGAGTTGATCTTTGGAGCCACTGATTATACCTCTAGTATAGATGTA	720
GSK3 β -WT	721	TGGTCTGCTGGCTGTGTGTTGGCTGAGCTGTTACTAGGACAACCAATATTTCCAGGGGAT	780
GSK3 β -S9A	721	TGGTCTGCTGGCTGTGTGTTGGCTGAGCTGTTACTAGGACAACCAATATTTCCAGGGGAT	780
GSK3 β -WT	781	AGTGGTGTGGATCAGTTGGTAGAAATAATCAAGGTCTGGGAACCCAACAAGGGAGCAA	840
GSK3 β -S9A	781	AGTGGTGTGGATCAGTTGGTAGAAATAATCAAGGTCTGGGAACCCAACAAGGGAGCAA	840
GSK3 β -WT	841	ATCAGAGAAATGAACCCAAACTACACAGAATTTAAATTCCTCAAATTAAGGCACATCCT	900
GSK3 β -S9A	841	ATCAGAGAAATGAACCCAAACTACACAGAATTTAAATTCCTCAAATTAAGGCACATCCT	900
GSK3 β -WT	901	TGGACTAAGGTCTTCCGACCCCGAACTCCACCGGAGGCAATTGCACTGTGTAGCCGTCTG	960
GSK3 β -S9A	901	TGGACTAAGGTCTTCCGACCCCGAACTCCACCGGAGGCAATTGCACTGTGTAGCCGTCTG	960
GSK3 β -WT	961	CTGGAGTATACACCAACTGCCCGACTAACACCACTGGAAGCTTGTGCACATTATTTTTT	1020
GSK3 β -S9A	961	CTGGAGTATACACCAACTGCCCGACTAACACCACTGGAAGCTTGTGCACATTATTTTTT	1020
GSK3 β -WT	1021	GATGAATTACGGGACCCAAATGTCAAACATCCAAATGGGCGAGACACACCTGCACTCTTC	1080
GSK3 β -S9A	1021	GATGAATTACGGGACCCAAATGTCAAACATCCAAATGGGCGAGACACACCTGCACTCTTC	1080
GSK3 β -WT	1081	AACTTCACCACTCAAGAAGTGTCAAGTAATCCACCTCTGGCTACCATCCTTATTCCTCT	1140
GSK3 β -S9A	1081	AACTTCACCACTCAAGAAGTGTCAAGTAATCCACCTCTGGCTACCATCCTTATTCCTCT	1140
GSK3 β -WT	1141	CATGCTCGGATTCAAGCAGCTGCTTCAACCCCCACAAATGCCACAGCAGCGTCAGATGCT	1200
GSK3 β -S9A	1141	CATGCTCGGATTCAAGCAGCTGCTTCAACCCCCACAAATGCCACAGCAGCGTCAGATGCT	1200
GSK3 β -WT	1201	AATACTGGAGACCGTGGACAGACCAATAATGTGCTTCTGCATCAGCTTCCAACCTCCACT	1260
GSK3 β -S9A	1201	AATACTGGAGACCGTGGACAGACCAATAATGTGCTTCTGCATCAGCTTCCAACCTCCACT	1260
GSK3 β -WT	1261	AGTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCAAGCTTGGGTGGTCCCAACTAG	1311
GSK3 β -S9A	1261	AGTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCAAGCTTGGGTGGTCCCAACTAG	1311

Figure 43. **Séquence nucléotidique de la GSK3 β -WT et de la GSK3 β -S9A insérées dans le vecteur pcDNA3.** Pour la GSK3 β -S9A, le triplet nucléotidique « TCC » surligné en jaune de la GSK3 β -WT et codant pour une sérine en position 9 est remplacé par le triplet « GCC » surligné en vert et codant pour une alanine. Cette mutation dirigée fait de la GSK3 β -S9A un dominant actif.

2. VECTEURS PERMETTANT L'INHIBITION MOLECULAIRE DE GSK3B

Les vecteurs permettant l'inhibition moléculaire de la GSK3 β contiennent des séquences codantes pour des « hairpin short interference RNA » (hsiRNA) cibles de la GSK3 β . Ces vecteurs nous ont été fournis dans le cadre d'une collaboration avec le Docteur D. Turner (Université du Michigan, U.S.A.). Les données sur ces vecteurs sont disponibles sur le site web : http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors/u6_shrna_vectors_for_rnai).

Ces hsiRNA ont été insérés dans le vecteur mU6pro (composé d'un squelette de type pBluescript II) (Figure 45). La GFP a été remplacée dans le vecteur précédent au profit des hsiRNA suivants : GSK3 β HP1 et GSK3 β HP2 (HP pour hairpin). L'ensemble des vecteurs contenant ces constructions et le vecteur vide seront référencés par le nom de « vecteurs mU6-pro-GSK3 β ». Ces hsiRNA exprimés présentent deux brins complémentaires qui sont reliés par une courte séquence en boucle et ont une séquence complémentaire à celle de l'ARNm à dégrader. Le clivage des hsiRNA est réalisé par l'enzyme DICER, puis ces

hsiRNA sont pris en charge par le complexe RISC qui va alors les positionner et les aligner de façon séquence-spécifique sur l'ARN messager cible de la GSK3 β , puis réaliser un clivage. Les différentes constructions insérées ont été répertoriées dans la Figure 44.

Contrairement aux vecteurs permettant la sur-expression moléculaire de la GSK3 β , ces vecteurs ne possèdent qu'un seul gène de résistance : l'ampicilline. Pour utiliser ces constructions, 2 possibilités ont été envisagées : l'insertion d'un second gène de résistance à un antibiotique dans ces constructions, ou bien la co-transfection de ce vecteur avec un second comportant un gène de résistance à un antibiotique. Nous avons choisi d'adopter la seconde solution en raison de la facilité et de la rapidité d'expérimentation.

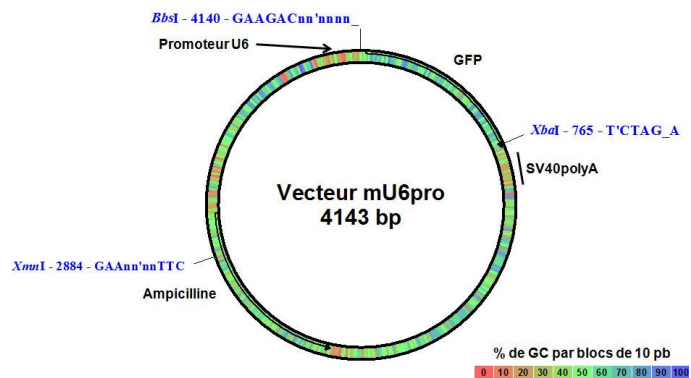


Figure 45. **Vecteur mU6pro contenant la séquence GFP.** Le vecteur mU6pro est composé de 4143 paires de bases (pb). La séquence GFP (Green fluorescent protein) est située entre les sites de restriction uniques BbsI et XbaI. Ces sites interviennent respectivement après le promoteur U6 et avant la queue polyadénylée SV40. Ce vecteur contient le gène de résistance à l'ampicilline.

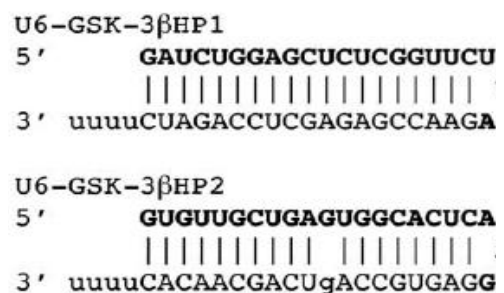


Figure 44. **hsiRNA cibles de la GSK3 β .**

3. VECTEUR PERMETTANT LA CO-TRANSFECTION

En raison de la présence d'un gène de résistance à un antibiotique supplémentaire et de la présence de la GFP permettant de repérer *in vitro* l'efficacité de la transfection et de la sélection, le vecteur pEGFP-N1 (Biolabs) a été choisi comme vecteur de co-transfection (Figure 46).

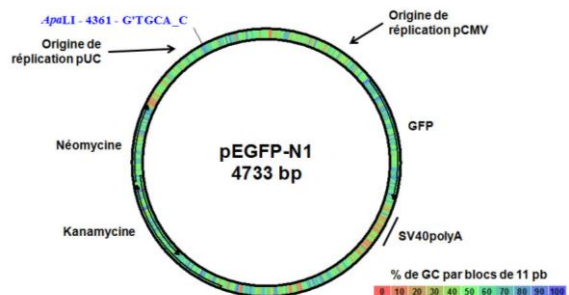


Figure 46. **Vecteur de co-transfection pEGFP-N1.** Ce vecteur de 4733 pb contient la séquence codante pour la GFP ainsi que celles codant pour deux gènes de résistances aux antibiotiques, ceux de la kanamycine et de la néomycine. A l'intérieur de l'origine de répllication bactérienne, le site unique de restriction ApaLI est présent.

B. TRANSFORMATIONS VECTORIELLES

La transfection cellulaire nécessite des quantités relativement importantes (environ 1 g) de vecteurs. L'amplification de ces vecteurs a été réalisée à travers des bactéries rendues compétentes pour le choc thermique ou l'électroporation. La bactérie *Escherichia coli DH5α* a été choisie pour ces 2 techniques.

1. VECTEURS PCDNA3-V5-GSK3B : TRANSFORMATION PAR CHOC THERMIQUE

La transformation des vecteurs pcDNA3-V5-GSK3β a été réalisée par choc thermique. Afin de les rendre compétentes pour le choc thermique, des bactéries *Escherichia coli DH5α* ont été mises à proliférer sous agitation à 37°C pendant 12 h dans 2 mL de Luria Broth (LB) 25 g.L⁻¹. 1 mL de la culture obtenue a été placé dans 10 mL de LB 25 g.L⁻¹ durant 4 h à 37°C. 1 mL de culture bactérienne a été introduit dans 100 mL de LB 25 g.L⁻¹ pendant 4 h à 37°C. Lorsque la densité optique (DO) était comprise entre 0,3 < DO < 0,4, le milieu de culture contenant les bactéries a été centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C. Après avoir placé les culots sur glace, ceux-ci ont été repris dans 10 mL de tampon TSS (« Transformation on Storage Solution », composé de 500 μL de DMSO (DiMéthyl SulfOxide), de 50 mM de Mg²⁺ et de 1 g de polyéthylène-glycol), puis aliquotés sur glace et conservés à -80°C pendant 24 h au moins et 6 mois maximum.

Après décongélation sur glace, les bactéries compétentes ont été mises en présence des vecteurs pcDNA3-V5-GSK3β. Les tubes contenant les mix de transformation ont été placés pendant 45 secondes dans un bain-marie à 42°C, avant d'être placés immédiatement sur glace pendant 5 minutes. Ensuite, 2, 4 et 10 μL du mix de transformation ont été étalés sur des 3 géloses différentes (Agar 15 g.L⁻¹ ; LB 25 g.L⁻¹ ; Ampicilline 50 μg.mL⁻¹). Les 3 types de géloses ont été placés dans une étuve à 37°C jusqu'à ce que les colonies bactériennes soient individualisées (1 nuit dans les conditions habituelles).

2. VECTEURS MU6-PRO-GSK3B : TRANSFORMATION PAR ELECTROPORATION

Pour les vecteurs mU6-pro-GSK3β, la technique d'électroporation a été choisie en raison de son gain de temps et de matériel qu'elle représente.

Après avoir décongelé des bactéries *Escherichia coli DH5a* sur glace, celles-ci ont été introduites dans un milieu LB 25 g.L⁻¹ durant une nuit à 37°C sous agitation. 200 µL de la solution bactérienne ont été mis dans le

Vecteurs transformés	Constantes de temps
mU6-pro	5,5 ms
mU6-pro-GSK3βHP1	5,5 ms
mU6-pro-GSK3βHP2	5,5 ms
pEGFP-N1	5,6 ms

Tableau 44. Constantes de temps obtenues lors des différentes électroporations. Ces constantes de temps reflètent l'efficacité de la transformation bactérienne. Celle-ci doit être comprise entre 5 et 6 ms.

milieu LB 25 g.L⁻¹ jusqu'à la fin de la phase de croissance exponentielle (environ 2 h 40 min). Après une centrifugation à 4000 g durant 7 min, le culot bactérien a été repris dans 5 mL d'eau stérile froide à 4°C afin de rendre les bactéries électro-compétentes. Cette étape a été répétée 2 fois. Le nouveau culot cellulaire a ensuite été repris dans « 40n » µL d'eau stérile froide à 4°C (avec n = nombre de transformations à effectuer). L'électroporation a été réalisée en présence de 40 µL de bactéries électro-compétentes et de 0,5 à 2 µL de plasmides dans une cuve d'électroporation (conservée à -20°C). L'électroporation a été générée par un pulse de courant. Lorsque la constante de temps obtenue était comprise entre 5 et 6 ms, l'expérimentation était poursuivie (Tableau 44).

Les bactéries néo-transformées ont été mises à proliférer pendant 1 h à 37°C dans 900 µL de LB stérile à 25 g.L⁻¹. Ensuite, 20 et 100 µL du mix de transformation ont été étalés sur 4 géloses différentes (Agar 15 g.L⁻¹ ; LB 25 g.L⁻¹ ; Ampicilline 50 µg.mL⁻¹). Les géloses ont été placées dans une étuve à 37°C jusqu'à génération de colonies bactériennes individualisées comme précédemment.

Comme les vecteurs fournis ne contenaient pas de gènes de résistance à un antibiotique chez les Eucaryotes, le vecteur pEGFP-N1 de co-transfection contenant le gène de résistance à la kanamycine a été transformé par ce même protocole.

C. AMPLIFICATION ET EXTRACTION DES ADN PLASMIDIQUES

1. VECTEURS PCDNA3-V5-GSK3B

Une colonie individualisée et isolée de chaque vecteur pcDNA3-V5-GSK3β a été prélevée, puis mise à proliférer pendant 8 h à 37°C sous agitation dans 5 mL de LB 25 g.L⁻¹ contenant l'antibiotique de résistance (Ampicilline : 50 µg.mL⁻¹). Ensuite, 1 mL de la solution bactérienne a été introduit dans 100 mL de milieu de culture bactérienne (LB 25 g.L⁻¹ ; Ampicilline 50 µg.mL⁻¹). L'extraction de l'ADN plasmidique a ensuite été

réalisée selon les recommandations du fournisseur du kit de maxipréparation plasmidique (Qiagen). Les différentes étapes du kit étaient une lyse

Vecteurs transformés	Concentrations (ng.mL ⁻¹)	Rapport de pureté A260/A280
pcDNA3	3199,3	1,88
pcDNA3-GSK3β-WT	1850,8	1,87
pcDNA3-GSK3β-S9A	1796,9	1,85

Tableau 45. **Concentrations plasmidiques obtenues après extraction par maxipréparation.** Le rapport de pureté correspond au rapport des valeurs d'absorbance de l'ADN à 260 nm (A260) sur la valeur d'absorbance des protéines à 280 nm (A280). Ce rapport reflète la qualité de la purification en ADN et doit être compris entre 1,5 et 2.

bactérienne, une neutralisation du tampon de lyse bactérienne et une élution sur colonne de l'ADN plasmidique. La précipitation de l'ADN plasmidique a été suivie d'une dissolution de celui-ci dans 200 µL de tampon d'extraction, TE (Trizma base 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,5). Les quantités d'ADN plasmidiques obtenues ont été mesurées par le NanoDrop 2000 (NanoDrop), et répertoriées dans le Tableau 45.

2. VECTEURS MU6-PRO-GSK3B ET DE CO-TRANSFECTION

Le même protocole a été utilisé avec la kanamycine comme antibiotique de sélection pour les vecteurs de type mU6-pro-GSK3β et

Vecteurs transformés	Concentrations (ng.mL ⁻¹)	Rapport de pureté A260/A280
mU6-pro	918,2	1,93
mU6-pro-GSK3βHP1	1081,7	1,91
mU6-pro-GSK3βHP2	1436,1	1,90
pEGFP-N1	293,1	1,87

Tableau 46. **Concentrations d'ADN plasmidiques obtenues après extraction par le kit de maxipréparation.** Le rapport de pureté correspond au rapport des valeurs d'absorbance de l'ADN à 260 nm (A260) sur la valeur d'absorbance des protéines à 280 nm (A280). Ce rapport reflète la qualité de la purification en ADN, et doit être compris entre 1,5 et 2.

pEGFP-N1. Les quantités d'ADN plasmidiques obtenues ont été mesurées par le NanoDrop 2000 (NanoDrop) et répertoriées dans le Tableau 46.

D. RESTRICTION ENZYMATIQUE DES ADN PLASMIDIQUES

Afin que les ADN plasmidiques puissent s'insérer dans le génome de la cellule hôte, ceux-ci ont du être linéarisés. Pour effectuer cette opération, nous avons pris les précautions de

Enzymes de restriction	NEB 1	NEB 2	NEB 3	NEB 4
ApaI	100 %	100 %	10 %	100 %
PvuI	10 %	75 %	100 %	10 %
XmnI	100 %	100 %	50 %	100 %

Tableau 47. **Pourcentage d'activité des enzymes de restriction dans les tampons NEB.**

choisir une enzyme ayant un site unique de restriction dans la construction plasmidique circulaire, et de ne pas cliver le plasmide entre l'origine de transcription T7, le transcrit

GSK3 β et la queue polyadénylée. Pour répondre à cette dernière recommandation, nous avons choisi une enzyme clivant dans le gène de sélection bactérien. Les taux des activités enzymatiques, donnés par notre fournisseur (New England Biolabs, NEB), ont été répertoriés dans le Tableau 47 en fonction des enzymes de restriction choisies.

1. VECTEURS pCDNA3-V5-GSK3B

Pour les vecteurs pCDNA3-V5-GSK3 β , nous avons utilisé l'enzyme de restriction PvuI (New England Biolabs ; Tableau 47). Pour chacune des constructions plasmidiques extraites, la digestion enzymatique a été réalisée dans du tampon NEB 3 (Tris-HCl 50 mM ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 1 mM ; pH = 7,9 à 25°C ; New England Biolabs) en présence de BSA (Bovine Serum Albumine ; New England Biolabs) à 0,1 mg.mL⁻¹, de 25 μ g de la construction plasmidique et de 3 μ L de l'enzyme de restriction PvuI. Le mix de restriction enzymatique a été placé pendant 4 h à 37°C. Ensuite, 3 μ L d'enzyme de restriction PvuI ont été ajoutés *de novo* au mix de restriction enzymatique pendant 3 h à 37°C.

Afin de vérifier l'efficacité de la digestion enzymatique par PvuI, 10 μ L du mix ont été prélevés et mis en présence de 2 μ L de tampon de charge 6X (New England Biolabs). L'ensemble a ensuite migré à 100 V pendant 20 min dans un gel d'agarose 0,5% dilué dans un tampon TAE 0,5X (Tris-Acétate-EDTA 0,5X) et contenant 1 % de BET (Bromure d'Ethidium). La photographie du gel d'agarose 0,5% (Figure 47) a été réalisée par la G-box (Syngene) à l'aide du logiciel GeneSnap (Syngene).

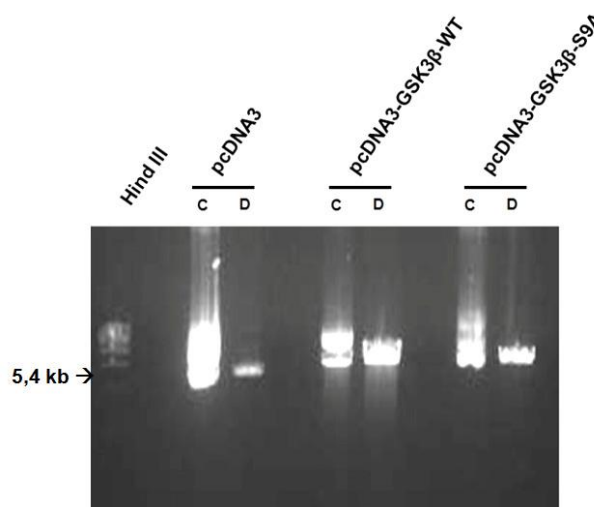


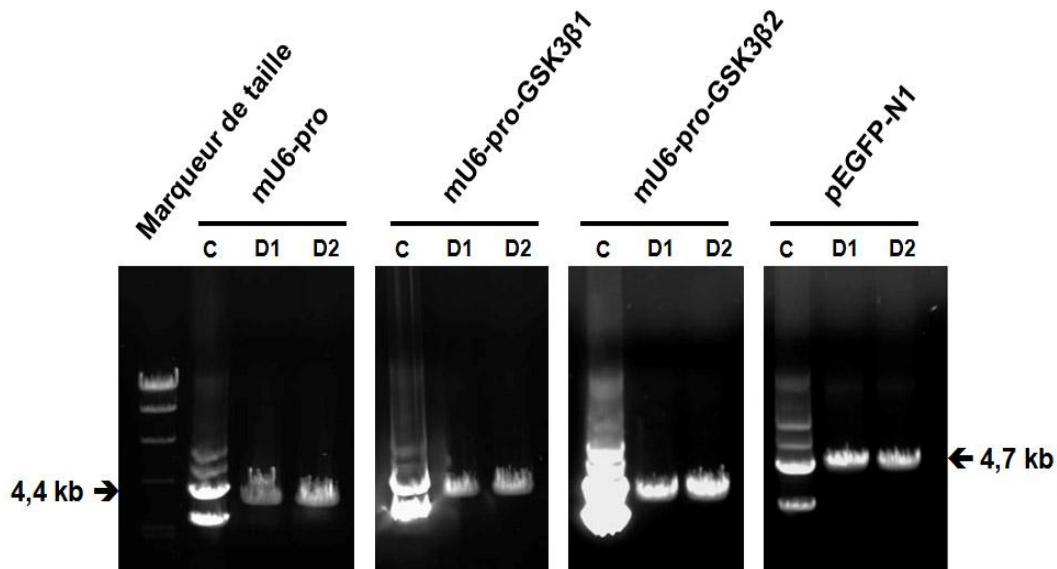
Figure 47. **Photographie, sous lumière UV, du gel d'agarose après migration des vecteurs pCDNA3-GSK3 β .** Hind III : marqueur de taille. C : vecteur sous sa forme circulaire. D : vecteur après digestion par l'enzyme de restriction PvuI.

2. VECTEURS MU6-PRO-GSK3B ET DE CO-TRANSFECTION

Comme précédemment, les différentes constructions ont été digérées par une enzyme de restriction appropriée. Les vecteurs de type mU6-pro-GSK3 ont été digérés dans un tampon NEB 2 (NaCl 50 mM ; Tris-HCl 10 mM ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 1 mM ; pH = 7,9 à 25°C ; New England Biolabs) en présence de BSA et par l'enzyme de restriction XmnI clivant dans le gène de résistance à l'ampicilline (Tableau 47).

Le vecteur pEGFP-N1, quant à lui, a été digéré dans un tampon NEB 4 (Tris-acétate 20 mM; Acétate de potassium 50 mM ; Acétate de magnésium 10 mM ; DTT 1 mM ; pH = 7,9 à 25°C ; New England Biolabs) en présence de BSA et par l'enzyme de restriction ApaLI clivant au niveau de l'origine de réplication bactérienne (Tableau 47).

Les gels d'agarose contenant du BET ont permis de vérifier l'efficacité de la restriction enzymatique. Les photographies ont été réalisées par la G-box (Syngene) à l'aide du logiciel GeneSnap (Syngene ; Figure 48).



E. EXTRACTION ET PRECIPITATION DES ADN PLASMIDIQUES LINEARISES

L'extraction des ADN plasmidique a été réalisée par la méthode d'extraction au phénol-chloroforme.

Après la restriction enzymatique, 200 μ L de phénol saturé en Tris ont été ajoutés à 200 μ L du mix de restriction enzymatique. Après homogénéisation vigoureuse, une centrifugation à 14 000 g pendant 3 min a été réalisée, puis la phase supérieure a été prélevée et ajoutée à 200 μ L de chloroforme. Cette étape a été répétée 1 fois. 20 μ L d'acétate de sodium 3 M, pH = 5,2 ont été ajoutés à la phase supérieure ainsi que 2,5 volumes d'éthanol absolu (500 μ L). Après homogénéisation, l'ensemble a été placé à -20°C pendant 30 min. Une centrifugation à 15 000 g a été réalisée pendant 10 min. Le culot d'ADN a été repris dans 500 μ L d'éthanol à 70 %, puis une nouvelle centrifugation à 15 000 g a été réalisée pendant 10 min. Le culot a été séché pendant 15 min, puis dissous dans 200 μ L de PBS stérile.

1. VECTEURS pCDNA3-V5-GSK3B

Les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β linéarisés et dilués dans du PBS ont ensuite été conservés à -20°C.

2. VECTEURS mU6-PRO-GSK3 β ET DE CO-TRANSFECTION

Afin de procéder aux transfections selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen) avec des rapports ADN : Lipofectamine 2000 convenables (1 μ g d'ADN pour 2,5 μ L de Lipofectamine 2000), nous avons mixé chacun des vecteurs mU6-pro-GSK3 β avec une faible fraction de vecteurs pEGFP-N1 linéarisé. Les rapports entre vecteurs pEGFP-N1 et vecteurs mU6-pro-GSK3 β étaient de 1 pour 10 (considérant que nous avons 1 copie de vecteur pEGFP-N1 pour 10 copies de vecteurs mU6-pro-GSK3 β). Comme plusieurs copies de vecteurs peuvent s'intégrer au génome d'une cellule, ce rapport des vecteurs nous a permis de limiter statistiquement le nombre de faux positifs, à savoir les cellules qui n'ont incorporé que le vecteur pEGFP-N1. Ces mix de transfection ont ensuite été conservés à -20°C.

F. TRANSFECTIONS STABLES ET TRANSITOIRES DES LIGNEES DE NEUROBLASTOME

Lorsque les cellules de neuroblastome de rat B104 ou humain SH-SY5Y atteignaient 80 à 90 % de confluence, la transfection par des vecteurs linéaires a été réalisée. Un premier mix de transfection, nommé « A », a été réalisé en mélangeant 4 µg de vecteur linéarisé avec 80 µL de milieu de culture (DMEM/F12 ou RPMI 1640). Le second mix de transfection, nommé « B » a été réalisé en mélangeant 10 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec 80 µL de milieu de culture. Les mélanges de transfection « A » et « B » ont été incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Le mélange « B » a été ajouté au mélange « A », puis incubé pendant 20 minutes à température ambiante. Parallèlement, les cellules de neuroblastome ont été lavées 2 fois par du PBS-Glucose, 800 µL de milieu de culture ont été ensuite ajouté dans chacun des puits. Le mélange de transfection « A + B » a été placé dans les boîtes de 35 mm contenant les cellules à transférer et incubé pendant 24 h dans une atmosphère à 37°C contenant 5 % de CO₂.

Après 24 h d'incubation, les cellules ont été lavées par 2 lavages successifs au PBS, puis remises dans leur milieu de culture originel complémenté en glucose 18 mM et SVF 10 %. Au milieu de culture a été ajouté 1 g.L⁻¹ de Généticine/G418, antibiotique permettant de sélectionner positivement les cellules ayant intégré les vecteurs linéaires. Cette dose létale après 7 jours de traitement par la G418 avait été préalablement déterminée sur des cellules saines. Pendant 10 jours, le milieu de culture a été remplacé chaque jour par du milieu frais contenant 1 g.L⁻¹ de G418 afin d'éliminer les cellules non transfectées. Après ces 10 jours de sélection, des populations polyclonales pour le vecteur considéré ont été obtenues. Ces expérimentations ont été répétées pour chacun des types de vecteurs pcDNA3-V5-GSK3β et les mix des vecteurs mU6-pro-GSK3β (contenant une fraction de vecteurs pEGFP-N1 : 1/10).

Les transfections cellulaires transitoires ont été réalisées selon le même protocole aux différences près que :

- les vecteurs utilisés étaient circulaires (et non linéarisés) ;
- la sélection par le G418 n'a été réalisée que partiellement (pendant 3 jours).

Les extraits ont ensuite été analysés par western-blot.

G. LIGNÉES MONOCLONALES STABLES

Les différents types de lignées cellulaires adhérentes générées, sur-exprimant et invalidant la GSK3 β , ont été soumis à ce protocole. Les cellules d'une population polyclonale ont été rincées par du PBS-glucose stérile pendant 5 minutes. Après avoir ôté le PBS-glucose, la trypsine 0,05 %-EDTA a été ajoutée pendant 10 minutes à 37°C. L'action de la trypsine 0,05 %-EDTA a été bloquée par 4 % de SVF. Les

cellules ont été récoltées, puis centrifugées à 400 g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire a été repris dans du milieu de culture approprié complété en glucose 18 mM, en SVF 10 % et en 1 g.L⁻¹ de G418. Après comptage à la cellule de Malassez, les cellules ont étéensemencées par dilution limite dans des plaques composées de 96 puits (Figure 49), puis placées dans une atmosphère à 37°C contenant 5 % de CO₂. Chaque semaine, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais contenant 1 g.L⁻¹ de G418.

Lorsqu'une population monoclonale a été obtenue, l'expansion de cette colonie cellulaire a été réalisée par des passages successifs dans des supports de culture ayant une surface d'adhésion croissante. La caractérisation de ces populations dites monoclonales a ensuite été réalisée par western-blots.

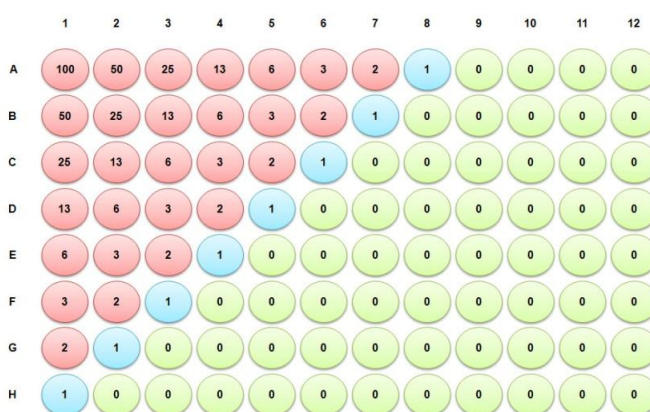


Figure 49. **Schéma théorique de la dilution limite effectuée dans une plaque 96 puits.** Initialement, une centaine de cellules sont déposées dans le puit numéroté A1 puis de gauche à droite et de haut en bas, des dilutions de coefficient 2 ont été appliquées. Chacun des puits est symbolisé par un cercle de couleur, les chiffres figurés indiquent le nombre théorique de cellules devant être présentes dans ce puit. En rouge, les populations polyclonales, en bleu, les populations théoriques monoclonales, en vert les puits vides de cellules.

IV. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

Les inhibiteurs pharmacologiques de kinases utilisés ont été le chlorure de lithium (Sigma-Aldrich), le 6-BIO (Alexis Biochemicals), le 6-BIBEO (6-bromoindirubin-3'-(2-bromoéthyl)-oxime), le 6-BIDECO (6-bromoindirubin-3'-[O-(N,N-diéthylcarbamylo)-oxime]), le 6-BIMYEO (hydrochlorure de 6-bromoindirubin-3'-[O-(2-morpholin-1-yléthyl)-oxime]), la (*R*)-roscovitine, le (*R*)-CR8 et

l'harmine (fournis par le Docteur L. Meijer). Les inhibiteurs pharmacologiques de phosphatases utilisés ont été l'acide okadaïque (Fluka) et le FK506/tacrolimus.

V. WESTERN-BLOTTING

A. EXTRACTION PROTEIQUE

Après le traitement pharmacologique, les cellules placées dans les boîtes de 35 mm ont été lavées par du PBS froid. Puis 150 μ L de tampon de lyse modifié de Laemmli (Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) 2% (Sigma), Glycérol 10% (Euromedex), Trizma base (pH = 6,8) 60 mM, Eau distillée) ont été ajoutés par boîte. Les échantillons lysés ont été récupérés par « scrapping », puis soniqués pendant 20 pulsations de 6 secondes chacune avec un maximum d'amplitude à 40 Watts. Les échantillons ont été ensuite centrifugés à 12 000 g à 20°C pendant 15 minutes. Le surnageant de chaque échantillon a été récupéré afin d'être dosé.

B. DOSAGE ET DÉNATURATION PROTÉIQUES

Le dosage protéique a été réalisé par le kit « D_C Protein Assay (BioRad) » selon les recommandations du fournisseur sur les échantillons préalablement récupérés et par analogie à une gamme de BSA dont les concentrations étaient connues (0 ; 250 ; 500 ; 750 ; 1000 ; 1500 et 2000 μ g.mL⁻¹). La DO a été mesurée au pic d'absorbance des protéines. Lorsque le dosage protéique a été réalisé, du DTT 0,1 M (1,4-DiThioéryThritol ; Sigma-Aldrich) et du Bleu de Bromophénol 0,01 % (Sigma) ont été ajoutés aux échantillons. Ensuite, la dénaturation a été effectuée pendant 10 min à 90°C. Les échantillons ont été conservés à 4°C en attendant d'être utilisés pour les électrophorèses protéiques sur gel de polyacrylamide.

C. ELECTROPHORESE PROTEIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

La détermination du pourcentage du gel de séparation a été réalisée en fonction du poids moléculaire apparent de la protéine recherchée (Tableau 48).

Après polymérisation des gels de séparation (Tableau 49), un gel de concentration à 4 % a été réalisé afin de permettre aux échantillons protéiques d'entrer simultanément dans le gel de séparation. L'électrophorèse protéique (réalisée dans la cuve Mini PROTEAN

Tetra Cell, Bio-Rad) a été effectuée à voltage constant (150 V ; PowerPac Basic, Bio-Rad) et jusqu'à la limite inférieure du gel de séparation dans un tampon d'électrophorèse (Trizma base 25 mM ; Glycine 192 mM ; SDS 0,1 % ; pH = 8,3).

Poids moléculaire de la protéine recherchée (X)	Pourcentage d'acrylamide du gel de séparation
X < 25 kDa	15 %
25 kDa < X < 50 kDa	12 %
50 kDa < X < 70 kDa	10 %
X > 70 kDa	8 %

Tableau 48. Pourcentage du gel de séparation en fonction du poids moléculaire de la protéine recherchée.

Pourcentages d'acrylamide du gel	15%	12%	10%	8%	4%
Eau distillée	1,2	1,7	2,0	2,3	3,4
Acrylamide 30%	2,5	2,0	1,7	1,3	0,85
Trizma base 1,5 M (pH = 8,8)	1,3	1,3	1,3	1,3	0,65
SDS 10%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
APS 10%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,002	0,002	0,002	0,003	0,004

Tableau 49. Composition des gels de polycarylamide. Acrylamide 30 % : Acrylamide 4,11 M (Aldrich), N,N'-méthylènebisacrylamide 0,09 M (Aldrich); APS : Ammonium Per Sulfate (Sigma); TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (Sigma). Les chiffres sont donnés en millilitres.

D. TRANSFERT PROTEIQUE SEMI-SEC SUR MEMBRANE DE POLYFLUORURE DE VINYLIDENE

Après séparation par électrophorèse, les membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF) avec des pores de 0,45 µm (Millipore) ont été régénérées dans du méthanol pur pendant 1 minute. Ensuite, pendant 15 minutes, les membranes de PVDF, 6 feuilles de papier chromatographique Whatman (3MM Chr, Whatman) par membrane de PVDF à transférer ainsi que les gels de polyacrylamide ont été équilibrés dans du tampon de transfert (Trizma base 48 mM ; Glycine 38,6 mM ; Méthanol 20 %). Un transfert semi-sec a été réalisé en plaçant, respectivement dans l'appareil de transfert (Trans-blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) 3 feuilles de papier Whatman, 1 membrane de PVDF, 1 gel de polyacrylamide et 3 feuilles de papier Whatman. Le transfert a été réalisé à 14 V et à voltage constant (PowerPac HC) pendant 120 minutes.

Après le transfert protéique, les membranes ont été placées dans du rouge Ponceau (Ponceau S 0,1 % (Sigma), Acide acétique 5 % (Sigma)) afin de vérifier qualitativement l'efficacité du transfert protéique. Les membranes ont ensuite été lavées par 2 bains rapides au méthanol pur et 2 bains à l'eau distillée et au TBS (Tris Buffered Saline :

Trizma base 20 mM ; Chlorure de sodium 137 mM (Sigma) ; Acide hydrochlorique 3,8 mM (Sigma) ; pH = 7,6).

E. SATURATION DES SITES ANTIGENIQUES ASPECIFIQUES ET IMMUNOMARQUAGE

La saturation des sites antigéniques aspécifiques des membranes PVDF a été réalisée par un bain dans du lait écrémé à 4 % (Régilait, Carrefour) pendant 1 h. Après un lavage rapide au TBS, l'incubation de l'anticorps primaire (Tableau 50) a été effectuée durant la nuit à température ambiante.

Après 1 rinçage au TBS pH = 7,6, l'anticorps secondaire couplé à la HRP (HRP : « Horse Radish Peroxidase »), choisi en fonction de l'anticorps primaire (Tableau 51), a été incubé pendant 1 h à température ambiante.

Anticorps primaire	Fournisseur	Facteur de dilution	Hôte
AT-8 (pS202 et pT205)	Innogenetics (BR3-3)	2000	Souris
Tau-1 (S198, S199 et S202)	Cedarlane (CLT9007)	1000	Souris
12E8 (pS262 et pS356)	Fourni par le Pr Seubert	5000	Souris
T212 (pT212)	Abcam (ab4842)	2000	Lapin
AT-180 (pT231 et pS235)	Innogenetics (BR-07)	1000	Souris
Tau-46 / Tau-G (tau totale)	Sigma (T9450-200UL)	2000	Souris
Tau-5 (tau totale)	Cedarlane (10R-T101ax)	2000	Souris
GSK3β pS9	Cell Signaling (#9323)	1000	Lapin
GSK3β totale	Cell Signaling (#9315)	1000	Lapin
Caspase-3 clivée (D175)	Cell Signaling (#9664)	2000	Lapin
PARP clivée (D214)	BD Pharmingen (51-9000017)	1000	Souris
PARP (Ab-2)	Calbiochem (D10133-1)	1000	Souris
PARP	Cell Signaling (#9532)	1000	Lapin
PARP clivée (D214)	Abcam (ab32064-100)	1000	Lapin
Actine	Cell Signaling (#4967)	10000	Lapin
GAPDH	Santa Cruz (sc-25778)	1000	Lapin

Tableau 50. **Tableau des anticorps primaires utilisés pour le western-blotting.** Entre parenthèses, sont précisés les sites de phosphorylations (pS, pT) reconnus sur la protéine tau par les anticorps AT-8, 12E8, T212, AT-180 et non phosphorylé (-) pour l'anticorps Tau-1. La phosphorylation sur la S9 de la GSK3β (pS9) a également été recherchée.

Anticorps secondaire	Fournisseur	Facteur de dilution	Hôte
HRP anti-anticorps de souris	BioRad (170-6516)	2000	Chèvre
HRP anti-anticorps de lapin	BioRad (170-6515)	2000	Chèvre

Tableau 51. **Tableau des anticorps secondaires utilisés pour le western-blotting.**

F. IMMUNODÉTECTION

Après 3 rinçages au TBS, la membrane a été révélée en présence du réactif Luminol (SantaCruz). La détection des bandes a été réalisée à l'aide de la G-box (Syngene) et l'acquisition des images a été effectuée à l'aide du logiciel GeneSnap (Syngene). La densité de bande a été quantifiée par le logiciel GeneTools (Syngene). Les résultats ont ensuite été normalisés par Microsoft Office Excel 2007. L'intensité de l'immunomarquage de phosphoTau a été normalisée par rapport à l'immunomarquage de tau totale (la protéine tau détectée indépendamment de son état de phosphorylation). Les niveaux de la protéine tau totale ont été normalisés par rapport au contrôle de charge protéique, l'actine ou la GAPDH.

VI. IMMUNOFLUORESCENCE

Après le traitement pharmacologique, les cellules placées dans des puits de plaque 24 puits ont été lavées par du PBS froid, puis fixées par de la paraformaldéhyde à 4 % (Sigma) diluée dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante.

Anticorps primaire	Fournisseur	Facteur de dilution	Hôte
AT-8 (pS202 et pT205)	Innogenetics (BR3-3)	2000	Souris
12E8 (pS262 et pS356)	Fourni par le Pr Seubert	5000	Souris
AD-2 (pS396 et pS404)	BioRad	5000	Souris
Tau-46 (totale tau)	Sigma (T9450-200UL)	1000	Souris
Tau-5 (totale tau)	Cedarlane (10R-T101ax)	1000	Souris
GSK3β pS9	Cell Signaling (#9323)	1000	Lapin
GSK3β totale	Cell Signaling (#9315)	1000	Lapin
Caspase-3 clivée (D175)	Cell Signaling (#9664)	2000	Lapin
PARP clivée (D214)	BD Pharmingen (51-9000017)	1000	Souris

Tableau 52. **Tableau des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.** Entre parenthèses sont précisés les sites de phosphorylations (pS, pT) reconnus sur la protéine tau par les anticorps AT-8, 12E8, AD-2. La phosphorylation sur la S9 de la GSK3 β (pS9) a également été recherchée.

Après 3 rinçages au PBS, les cellules ont été perméabilisées par du Triton X-100 à 0,1 % (Sigma) pendant 15 minutes. La saturation des sites aspécifiques a été réalisée par 10% de sérum de chèvre (Biowest) pendant 1 h. La solution de saturation a ensuite été remplacée par celle qui contient les anticorps primaires dilués dans du PBS (Tableau 52) selon les recommandations des fournisseurs et spécifiquement dirigés contre les protéines recherchées. Après 3 lavages successifs dans du PBS, les anticorps secondaires (Tableau 53) et spécifiquement dirigés contre les anticorps primaires ont été incubés pendant 1 h. Après 1 lavage au TBS, une contre-coloration du noyau par le DAPI 0,001 % (Sigma) a été réalisée pendant 3 minutes. Après 3 lavages de 5 minutes, les lamelles ont été montées sur lames par du mowiol (Aldrich). Les lamelles ont été observées au microscope à

épi-fluorescence et l'acquisition des images a été effectuée à l'aide du logiciel VisioLab (Biocom). Les lames ont été conservées à 4°C pour des observations ultérieures.

Anticorps primaire	Fournisseur	Facteur de dilution	Hôte
AlexaFluor® 488 anti-Anticorps de souris	Invitrogen (A11001)	1000	Chèvre
AlexaFluor® 594 anti-Anticorps de lapin	Invitrogen (A11012)	1000	Chèvre

Tableau 53. Tableau des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence.

VII. SOURIS INVALIDEES POUR TAU

A. PRODUCTION DES SOURIS

Durant cette thèse, et dans le cadre d'une collaboration avec le Pr A. Harada, nous avons importé au sein du laboratoire 3 couples d'un modèle de souris C57Bl6 hétérozygotes pour tau. Chez ces souris, l'inactivation du gène tau est générée en remplaçant le premier exon codant de la protéine tau par une cassette de néomycine. La convention utilisée dans cette thèse sera : Tau+/- (Tau+ : présence de la protéine Tau sur un allèle du gène ; Tau- : présence de la néomycine, et donc absence d'une protéine tau fonctionnelle sur un allèle du gène).

Afin de générer des souris Tau-/-, les souris mâles et femelles Tau+/- ont été mises en accouplement. Après 3 semaines de gestation, les 3 femelles hétérozygotes dont nous disposions sont décédées. Nous avons donc du faire des accouplements en utilisant d'une part, les mâles hétérozygotes Tau+/- dont nous disposions, et d'autre part, des femelles sauvages.

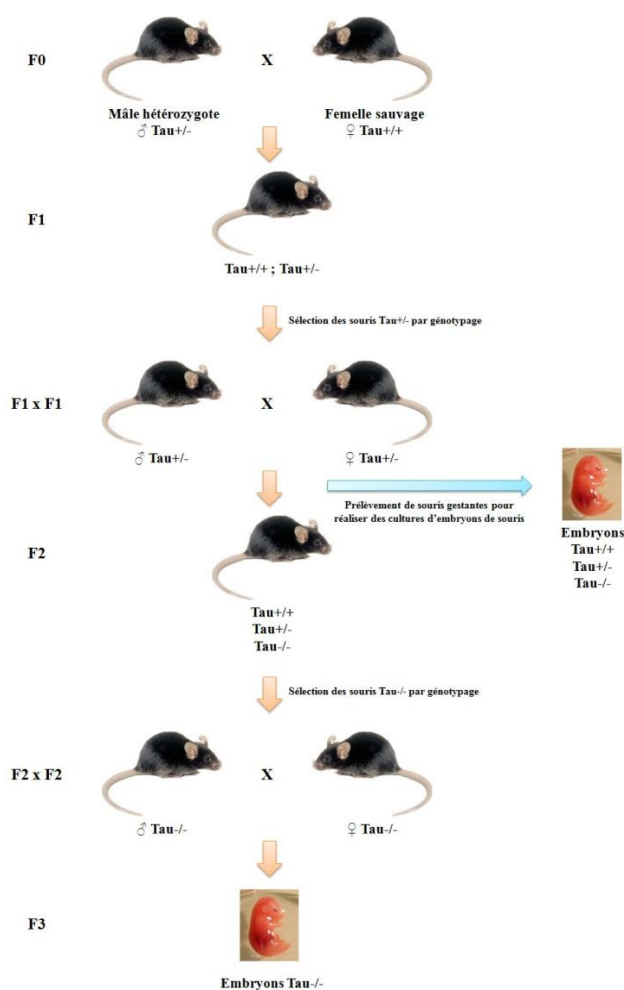


Figure 50. Accouplements des souris en fonction de la présence ou non de protéines tau.

Cet évènement nous a contraints à prendre du retard sur les échéances que nous nous étions fixées pour obtenir des résultats significatifs.

A partir de ces souris, nous avons successivement obtenu des générations F1, F2 afin d'obtenir des embryons Tau^{-/-} à la génération F3. Pour tenter de combler une partie du retard que nous avons pris, nous avons choisi de prélever trois souris gestantes (sur une dizaine) et de réaliser des cultures corticales pour chaque embryon (Figure 50).

B. GENOTYPAGE DES SOURIS INVALIDEES POUR TAU

Pour réaliser le génotypage des souris, nous avons choisi une méthode permettant de prélever une petite portion de queue afin d'extraire l'ADN de la souris. Ces portions de queue de souris peuvent être conservés à 4°C dans de l'éthanol à 70 %.

1. EXTRACTION D'ADN

Les expérimentations suivantes ont été réalisées en conditions non stériles mais avec du matériel stérilisé.

Les portions de queues de souris prélevées ont été mises à incuber une nuit (minimum 6 à 8 h) à 56°C dans 500 µL du tampon d'extraction d'ADN (NaCl 200 mM ; Tris 100 mM, pH = 8,5 ; EDTA 5 mM) complété en SDS 0,2% et en protéinase K à 400 µg.mL⁻¹ de. Une centrifugation à 14 000 rpm pendant 5 min a été réalisée, puis le surnageant a été récupéré. Un volume (500 µL) d'éthanol absolu a été ajouté au surnageant afin de précipiter l'ADN. Le tube a ensuite été homogénéisé par 2 ou 3 retournements successifs. L'ADN (sous forme de pelote) a été récupéré et rincé par immersion dans l'éthanol à 70 %. La pelote a ensuite été placée dans 200 µL de TE. Les tubes contenant les ADN ont ensuite été placés à 56°C pendant 4 h. La conservation des ADN a été réalisée à 4°C.

2. REACTION EN CHAINE PAR POLYMERASE : PCR

Nous avons ensuite amplifié les fragments de gènes tau ou néomycine pour distinguer la fonctionnalité ou non de la protéine tau dans le phénotype de ces souris.

Pour chaque ADN extrait d'une portion de queue de souris, nous avons préparé 50 µL d'un « mix de PCR » (40,8 µL d'H₂O dépourvue de DNase ; 5 µL de Tampon 10X ;

1 μ L de dNTP ; 1 μ L de chacun des primers ; 0,2 μ L de Taq polymérase). Une fois le mix préparé, 1 μ L de l'ADN de queue de souris a été ajouté. Les mix ont été homogénéisés puis les programmes de PCR appliqués ont été référencés dans le Tableau 54.

Nombre de cycles	Etapes	Températures - Temps	
		Tau	Néomycine
1	Activation de l'enzyme	94°C – 2 min	94°C – 5 min
40 / 35	Dénaturation	94°C – 30 s	94°C – 30 s
	Hybridation	60°C – 30 s	60°C – 30 s
	Elongation	72°C – 30 s	72°C – 30 s
1	Terminaison	72°C – 5 min	72°C – 5 min
1	Fin	4°C - ∞	4°C - ∞

Tableau 54. **Cycles de PCR pour l'amplification des gènes tau et néomycine.** Températures, temps et nombres des différents cycles de PCR pour les amorces tau et néomycine.

Les produits de PCR ont été conservés à 4°C, puis ils ont été migrés en présence de tampon de charge dans des gels d'agarose à 1,2 % contenant du BET. Les photographies ont été réalisées par la G-box (Syngene) à l'aide du logiciel GeneSnap (Syngene) (Figure 51).

Après lecture du gel d'agarose, les souris ont été réparties en fonction de leur fond génétique afin de séparer ces derniers et de réaliser des cultures corticales de souris invalidées pour tau. Sur la photographie de gel d'agarose présentée (Figure 51), les génotypes des souris A, B et C sont respectivement Tau^{-/-}, Tau^{+/+} et Tau^{+/-}.

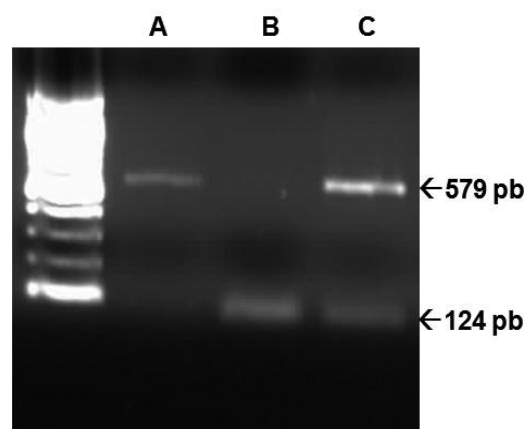


Figure 51. **Photographie, sous lumière UV, du gel d'agarose après migration de 3 extraits de PCR de souche de souris A, B et C invalidée ou non pour tau.** La bande à 579 pb correspond au gène codant pour la protéine tau ayant insérée une cassette de néomycine (allèle tau KO). La bande à 124 pb correspond au gène codant pour la protéine tau native (allèle sauvage).

RESULTATS

1^{ère} partie

I. LA REGULATION DES NIVEAUX DE TAU DANS LES CULTURES CORTICALES PRIMAIRES DE RATS EMBRYONNAIRES EST DEPENDANTE DE LA GSK3B

Les données expérimentales obtenues dans cette partie ont fait l'objet d'un article (voir annexe) paru dans « Brain Research », intitulé : « **Inhibition of GSK3 β downregulates total tau proteins in cultured neurons and its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A** » (Brain Res. 2009 Feb 3;1252:66-75) (Martin et al., 2009).

Dans cette partie, seuls les résultats obtenus avec l'approche pharmacologique ont été publiés. Les données établies par l'approche moléculaire n'ont pas été publiées mais elles ont confirmé les résultats obtenus par l'approche pharmacologique.

Comme le lithium est un inhibiteur faible de la GSK3 β (CI50 = 2mM) (Klein and Melton, 1996) et qu'il agit sur plusieurs voies de signalisation cellulaire, la diminution des ARNm de tau observée préalablement au laboratoire ne peut être attribuée avec certitude à l'inhibition de la GSK3 β par le lithium (Rametti et al., 2008). Pour répondre au premier objectif : « La GSK3 β est-elle impliquée dans la modulation des niveaux de tau ? », nous avons utilisé le 6-BIO, un inhibiteur puissant et sélectif de la GSK3 β (CI50 = 1,5 μ M) (Meijer et al., 2003) dans des cultures de neurones corticaux d'embryons de rat âgés de 17,5 jours. Afin de montrer l'implication préférentielle de la GSK3 β dans la régulation du niveau de tau, nous avons inhibé la CDK5 une autre kinase de tau par la (*R*)-roscovitine.

A. LE LITHIUM ET LE 6-BIO DIMINUENT DE FAÇON DOSE-DEPENDANTE LE NIVEAU DE PROTEINES TAU TOTALES

L'efficacité du lithium et du 6-BIO dans l'inhibition de la GSK3 β a été vérifiée par l'analyse, par western-blots de la phosphorylation de tau sur plusieurs sites (connus pour être phosphorylés par la GSK3 β ; Figure 52A). Il s'agit des sites reconnus par l'anticorps Tau-1 (S195, S198, S199 et S202 lorsqu'elles ne sont pas phosphorylées), le site reconnu par l'anticorps AT-8 (S202 et T205 lorsqu'elles sont phosphorylées) et ceux reconnus par l'anticorps 12E8 (S262 et, dans une moindre mesure, S356 lorsqu'elles sont phosphorylées). Les western-blots réalisés avec ces anticorps montrent que l'exposition des cultures de neurones corticaux au lithium (chlorure de lithium ; 1,25 - 7,5 mM, 8 h) ou au 6-BIO (2,5 - 10 μ M, 8 h) entraîne une diminution dose-dépendante des immunoréactivités des anticorps anti-phospho-tau AT-8 et 12E8. Inversement, les niveaux de tau détectés par l'anticorps Tau-1 étaient augmentées (Figure 52A). Ces données indiquent que le lithium et le 6-BIO aux concentrations que nous avons utilisées inhibent la GSK3 β . L'étude morphologique et l'analyse de la caspase-3 clivée, comme indicateurs d'apoptose neuronale, montrent que, dans nos conditions expérimentales, le lithium (1,25-7,5 mM, 8 h) et le 6-BIO (1,25 - 10 μ M, 8 h) n'induisent pas de manière significative la mort neuronale (Figure 53). Pour détecter la protéine tau totale, les immunoblots ont été effectués à l'aide des anticorps qui détectent tau indépendamment de son état de phosphorylation (tau global) : Tau-5 et Tau-G. L'anticorps Tau-G est développé chez le lapin immunisé par de la protéine tau entière de bovin. Tau-5 détecte la protéine tau dans sa partie moyenne (résidus 210 - 230).

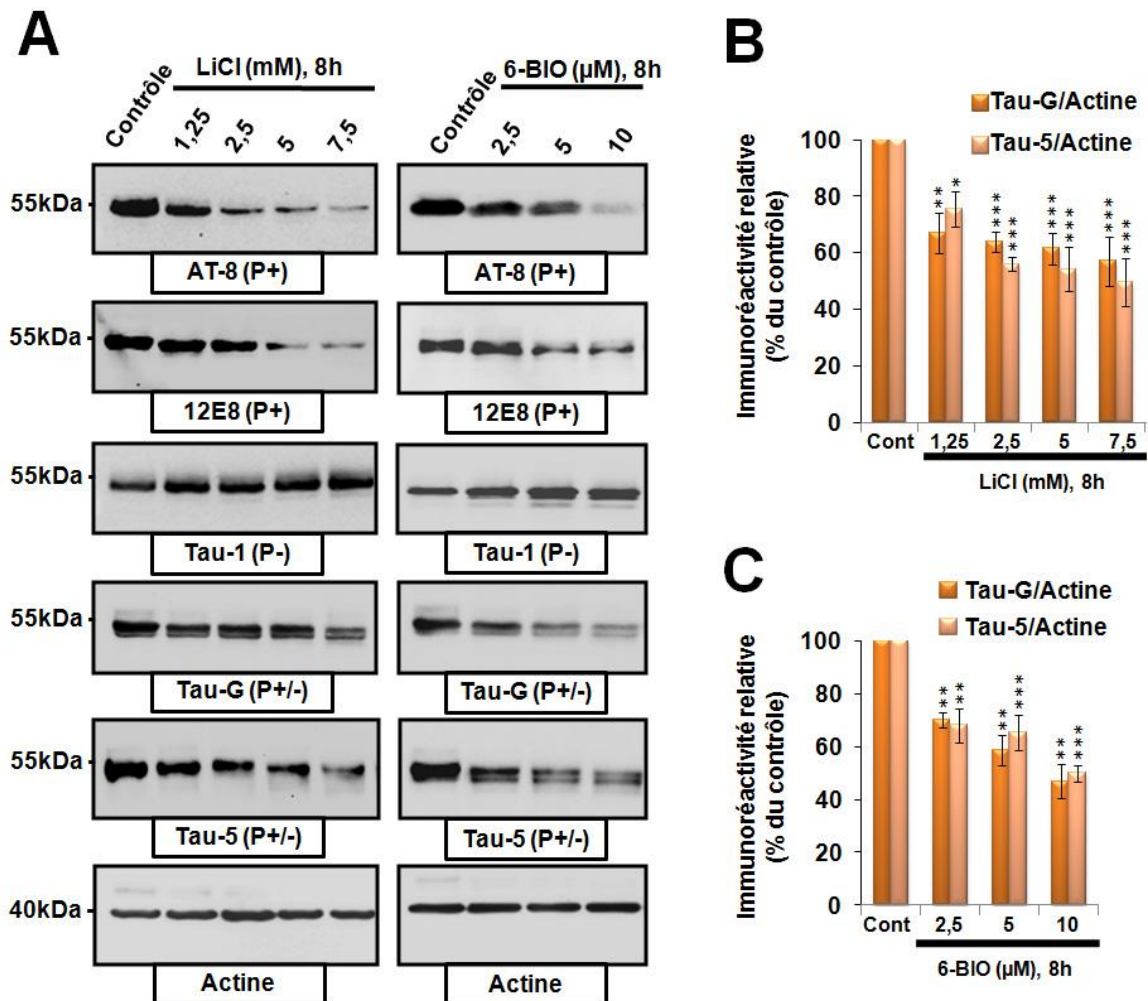


Figure 52. **Le lithium et le 6-BIO diminuent de façon dose-dépendante la phosphorylation ainsi que les niveaux totaux de la protéine tau.** (A) Détection de tau par les anticorps reconnaissant tau phosphorylée (P+), non phosphorylée (P-) et totale (P+/-) par western-blots dans des cultures exposées au lithium (LiCl) (à gauche, colonne de gauche) ou au 6-BIO (à gauche, colonne de droite). (B) et (C) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités de la protéine tau totale dans les cultures exposées pendant 8 h au LiCl (B) ou au 6-BIO (C). Les niveaux de la protéine tau totale (P+/-) ont été déterminés par les anticorps Tau-5 et Tau-G. Les immunoréactivités de tau phosphorylée ou non phosphorylée ont été détectées par les anticorps Tau-1 (S195, S198, S199 et S202 non phosphorylées), AT-8 (S202 et T205 phosphorylées) et 12E8 (S262 et, dans une moindre mesure, S356 phosphorylées). Les immunoréactivités de tau totale ont été normalisées par rapport aux immunoréactivités de l'actine $**p < 0,01$ et $***p < 0,001$ par comparaison aux contrôles.

L'analyse semi-quantitative des immunoréactivités de la protéine tau totale normalisées par rapport à l'actine montrent que l'exposition au lithium ou au 6-BIO diminue de façon dose-dépendante les niveaux de la protéine tau totale (phosphorylée et non phosphorylée). Les immunoréactivités relatives que nous avons obtenues pour la protéine tau avec Tau-5 étaient de $73,6 \pm 4,9 \%$, $56,0 \pm 2,5 \%$, $54,2 \pm 7,8 \%$ ($p < 0,001$ par rapport aux contrôles) et de $50,6 \pm 7,7 \%$ respectivement dans les cultures exposés à 1,25 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mM de lithium (Figure 52A et B). Les immunoréactivités relatives détectées par Tau-G étaient $62,7 \pm 4,1 \%$, $61,8 \pm 2,0 \%$, $61,6 \pm 5,6 \%$ ($p < 0,001$ par rapport aux contrôles) et $50,4 \pm 3,9 \%$ respectivement dans les cultures exposées à 1,25 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mM de lithium

(Figure 52A et B). Les immunoréactivités détectées par Tau-5 étaient de $69,9 \pm 2,8 \%$, $58,6 \pm 5,6 \%$, et $46,8 \pm 6,4 \%$ ($p < 0,001$ par rapport aux cultures contrôles), respectivement dans les cultures exposées à 2,5, 5 et 10 μM de 6-BIO. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'anticorps anti-phospho-tau-indépendant Tau-G (Figure 52A et C).

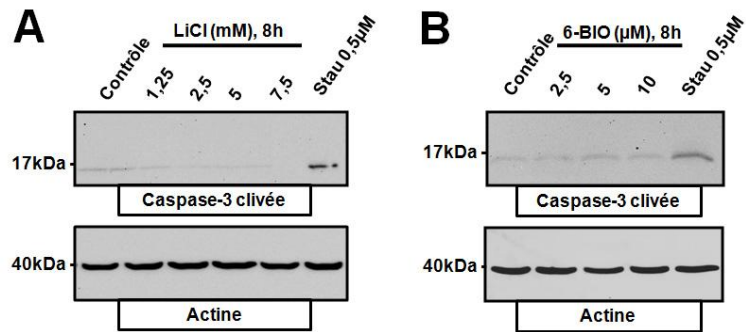


Figure 53. **Le lithium et le 6-BIO n'induisent pas d'apoptose neuronale dans nos conditions expérimentales.** (A) et (B) Détection par western-blots de la caspase-3 clivée, utilisée comme indicateur d'apoptose neuronale, dans les cultures corticales exposées au lithium (A) ou au 6-BIO (B), pendant 8 h. 0,5 μM de staurosporine (Stau 0,5 μM , 24 h) a été utilisée comme contrôle positif de détection de la caspase-3 clivée.

B. LE LITHIUM INHIBE DE FAÇON DOSE-DEPENDANTE L'ACTIVITE DE LA GSK3 β VIA LA PHOSPHORYLATION EN S9

Afin de vérifier que le lithium inhibait l'activité de la GSK3 β sans pour autant altérer les niveaux totaux de la protéine GSK3 β , nous avons analysé l'effet du lithium sur la GSK3 β totale et la GSK3 β phosphorylée en S9 (forme inactive de la GSK3 β). L'analyse par western-blot des niveaux de GSK3 β totale (phosphorylée et non phosphorylée) normalisées par

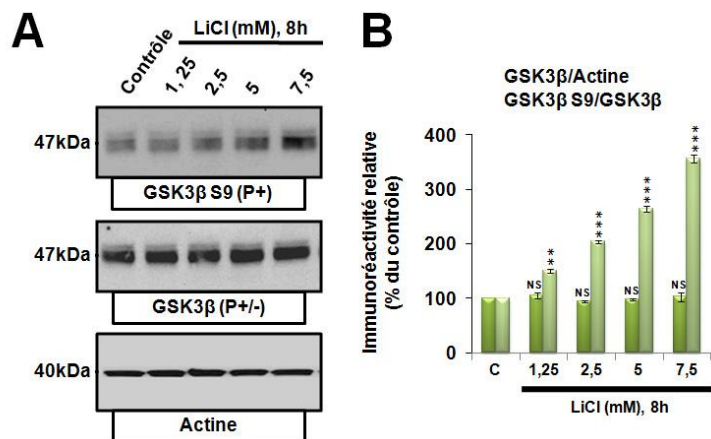


Figure 54. **Le lithium augmente de façon dose-dépendante la phosphorylation de GSK3 β en S9.** (A) Western-blots de GSK3 β phosphorylée en S9, de GSK3 β totale pour des cultures corticales exposées au lithium pendant 8 h. (B) Analyses semi-quantitatives de la GSK3 β totale normalisée par rapport à l'actine et de GSK3 β phosphorylée en S9 normalisée par rapport à la GSK3 β totale. NS : non significatif ; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles.

rapport à l'actine montre que l'exposition des cultures corticales au lithium (1,25 - 7,5 mM, 8 h) ne modifie pas significativement les niveaux de la protéine GSK3 β totale (Figure 54A et B). Toutefois, le lithium (1,25 - 7,5 mM, 8 h) induit et ceci, de façon dose-dépendante, une augmentation de la phosphorylation du résidu S9 de la GSK3 β . Les niveaux de phospho-S9-GSK3 β normalisés par rapport à la GSK3 β totale étaient de

150,8 ± 4,0 % ($p < 0,01$ par rapport aux témoins), 203,9 ± 3,1 % ($p < 0,001$), 264,4 ± 5,2 % et 355,7 ± 7,3 %, respectivement dans les cultures exposées à 1,25 ; 2,5 ; 5 et 7,5 mM de lithium (Figure 54B).

C. L'INHIBITION DE LA CDK5 PAR LA (R)-ROSCOVITINE DEPHOSPHORYLE TAU SANS AFFECTER LE NIVEAU TOTAL DE PROTEINES TAU

CDK5 est également impliquée dans l'hyperphosphorylation de tau (Baumann et al., 1993, Flaherty et al., 2000). L'exposition de cultures corticales à la (R)-roscovitine (1 - 10 µM, 24 h), un inhibiteur sélectif de la CDK5, induit la déphosphorylation de tau aux sites 12E8 et non Tau-1 (qui est déphosphorylé par le lithium et le 6-BIO) sans affecter le niveau de protéines tau totale (Figure 55). Cependant, une diminution significative de tau a

été observée lorsque nous avons appliqué 25 µM de (R)-roscovitine aux cultures corticales. L'analyse par western-blots de la dégradation de tau et du clivage de la caspase-3 en utilisant, respectivement, les anticorps anti-tau déphosphorylée Tau-1 (Rametti et al., 2004) et anti-caspase-3 clivée montre une diminution du niveau total de tau pour 25 µM de (R)-roscovitine, probablement due au caractère toxique de la (R)-roscovitine à de fortes concentrations. Ces données indiquent que parmi les kinases de tau, GSK3β est préférentiellement impliquée dans la régulation des niveaux protéiques de tau.

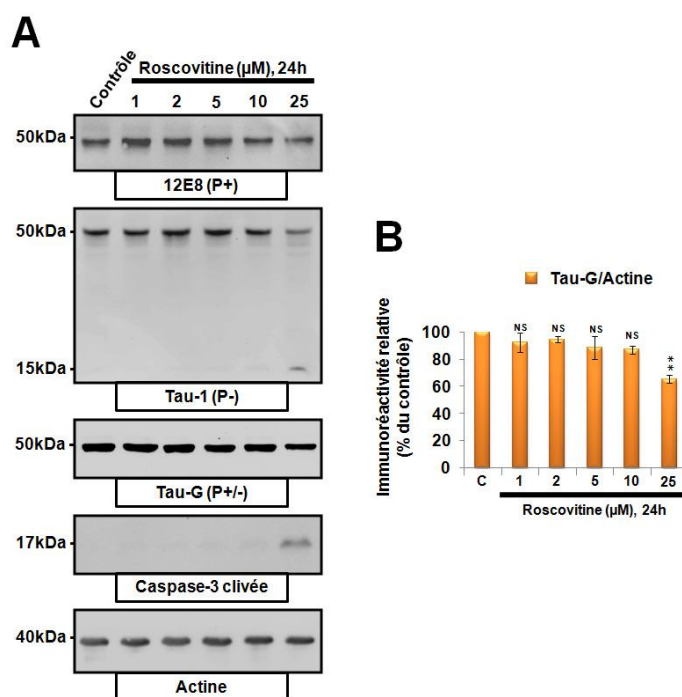


Figure 55. **L'inhibition de la CDK5 par la (R)-roscovitine déphosphoryle tau sans affecter les niveaux protéiques de tau.**

(A) Détection par western-blot de tau phosphorylée (P+) au site 12E8, de tau non phosphorylée (P-) au site Tau-1 et de la protéine tau indépendamment de son état de phosphorylation (P+/- ; tau totale) dans les cultures corticales exposées à la (R)-roscovitine (1 - 25 µM) pendant 24 h. La protéine tau totale a été détectée par l'anticorps Tau-G et la caspase-3 clivée a été détectée avec l'anticorps anti-caspase-3 clivée. (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités de tau totale normalisées par rapport à l'actine. NS : non significatif, ** $p < 0,01$ par rapport aux contrôles.

D. L'INHIBITION DE LA PP2A PAR L'OKA PREVIENT LA DIMINUTION DE TAU INDUITE PAR LE LITHIUM

La GSK3 β a été rapportée pour agir en aval de la PP2A (Lin et al., 2007), celle-ci pouvant être modulée à son tour par la PP2A (Tsuji et al., 2003). Afin de déterminer si la PP2A est impliquée dans la diminution des niveaux de tau induite par le lithium, des cultures corticales ont été exposées simultanément à 5 mM de lithium en présence de concentrations croissantes d'OKA (6,25 - 25 nM), l'inhibiteur sélectif de la PP2A lorsqu'il est utilisé à des concentrations de l'ordre du nanomolaire.

L'analyse de la phosphorylation de tau par western-blot utilisant plusieurs anticorps anti-phospho-tau (AT-8, 12E8 et Tau-1) montre que l'exposition de cultures de neurones à l'OKA entraîne une augmentation de la phosphorylation de tau sur tous les sites examinés (Figure 56A). Une augmentation nette de la phosphorylation de tau (une diminution de l'immunoréactivité détectée par Tau-1 et une augmentation des immunoréactivités détectées par AT-8 et 12E8) ont été observées à partir de 6,25 nM d'OKA pour le site 12E8, et à 12,5 nM d'OKA pour les sites AT-8 et Tau-1. Ces résultats suggèrent une variabilité de l'affinité de la PP2A pour les différents sites de phosphorylation de tau. L'analyse semi-quantitative de la protéine tau totale détectée par les anticorps Tau-5 et Tau-G montre que la présence d'OKA seul augmente les niveaux protéiques de tau (Figure 56). De plus, l'OKA à 12,5 nM et 25 nM inverse la diminution de tau induite par le lithium. Le lithium à 5 mM de lithium induisent une diminution de tau totale de 100 % (contrôles ; valeur arbitraire) à $54,2 \pm 7,8$ % et à $61,6 \pm 5,6$ % quand tau est détectée respectivement par Tau-5 et Tau-G. L'OKA, à 12,5 nM et 25 nM (des concentrations capables d'induire la phosphorylation de tau), et pas à 6,25 nM, inversent la diminution de tau induite par 5 mM de lithium. Les immunoréactivités de la protéine tau totale normalisées par rapport à l'actine étaient de $66,0 \pm 4,5$ % (avec Tau-5) et de $68,7 \pm 4,6$ % (avec Tau-G) dans les cultures exposées à 5 mM de lithium en présence de 12,5 nM d'OKA respectivement. Les immunoréactivités de tau obtenues avec 5 mM de lithium en présence de 25 nM d'OKA ($p < 0,001$ par rapport à 5 mM de lithium) étaient proches de celles des cultures contrôles (100 %). Sans surprise, 12,5 nM et 25 nM d'OKA bloquent la déphosphorylation de tau induite par le lithium aux sites AT-8, 12E8 et Tau-1 (Figure 56).

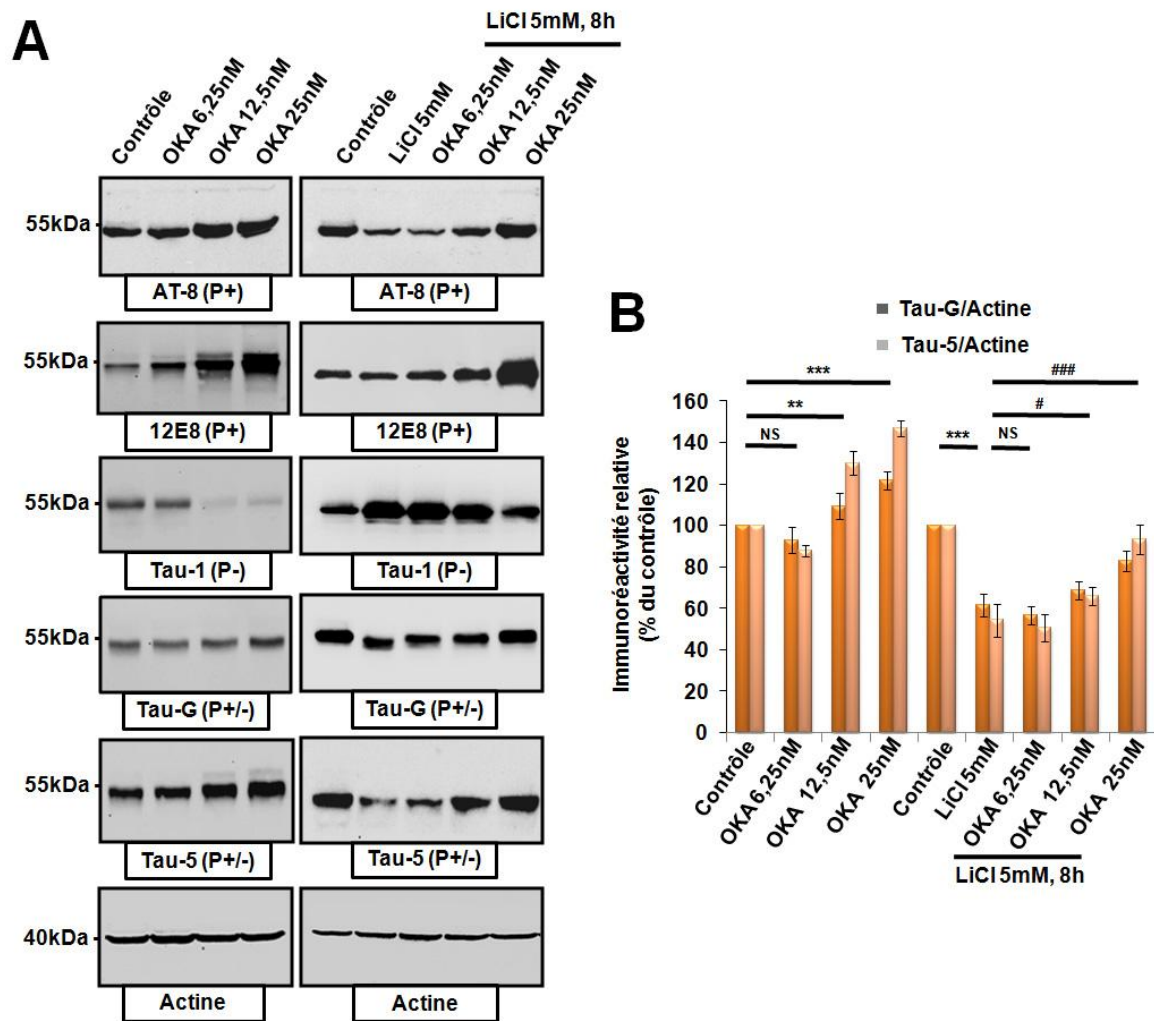


Figure 56. **L'inhibition de la PP2A par l'OKA bloque la diminution de tau induite par le lithium.** (A) Détection par western-blot de tau phosphorylée (P+), de tau non phosphorylée (P-) et de la protéine tau totale indépendamment de son état de phosphorylation (P+/- ; tau totale) dans les cultures corticales exposées pendant 8 h à l'OKA seul (à gauche, colonne de gauche) et en présence ou non de 5 mM de lithium (à gauche, colonne de droite). Les niveaux protéiques de tau ont été détectés par les anticorps Tau-5 et Tau-G. Les niveaux de phosphorylation de tau ont été détectés par les anticorps AT-8 (P+), 12E8 (P+) et tau-1 (P-). (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités totales de tau normalisées par rapport à l'actine. NS : non significatif, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ par rapport à 5 mM de lithium.

E. L'INHIBITION DE LA PP2B PAR LE FK506 NE BLOQUE PAS LA DIMINUTION DE TAU INDUITE PAR LE LITHIUM

Afin de déterminer si la PP2A est préférentiellement impliquée dans la diminution de tau induite par le lithium, nous avons testé les effets de l'inhibition d'une autre phosphatase de type 2, la PP2B/Calcineurine fortement exprimée dans le SNC. Pour cela, les expositions au lithium ont été réalisées en présence ou non de FK506 (2,5 - 5 μ M, 8 h), un inhibiteur spécifique de la PP2B. Comme indiqué précédemment, l'exposition à 5 mM de lithium induit une diminution du niveau de tau totale détectée par les anticorps Tau-5 et

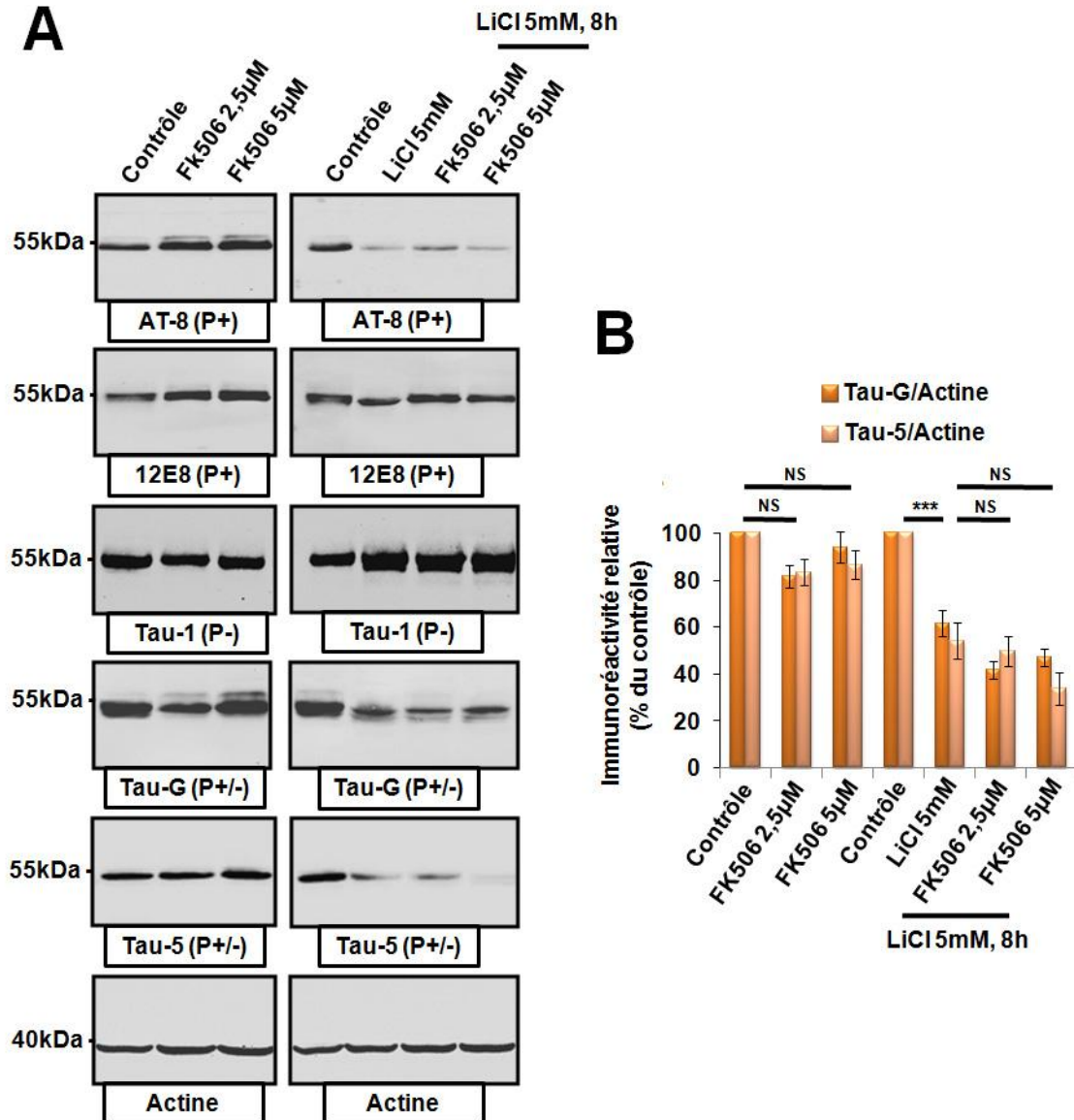


Figure 57. **L'inhibition de la PP2B par le FK506 ne bloque pas la diminution de tau induite par le lithium.** (A) Détection par western-blot de tau phosphorylée (P+), de tau non phosphorylée (P-) et de la protéine tau totale indépendamment de son état de phosphorylation (P+/-) dans les cultures corticales exposées pendant 8 h au FK506 seul (à gauche, colonne de gauche) et en présence ou non de 5 mM de lithium (à gauche, colonne de droite). Les niveaux protéiques de tau ont été détectés par les anticorps Tau-5 et Tau-G et les niveaux de phosphorylation de tau ont été détectés par AT-8 (P+), 12E8 (P+) et Tau-1 (P-). (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités de tau totale normalisées par rapport à l'actine. NS : non significatif, *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles.

Tau-G (Figure 57A). Les immunoréactivités de tau normalisées par rapport à l'actine représentaient $61,6 \pm 5,6$ % des contrôles (avec Tau-G) et $54,2 \pm 7,8$ % (avec Tau-5) (Figure 57B). L'inhibition de la PP2B par le FK506 n'inverse pas la diminution de tau induite par le lithium, mais semble au contraire potentialiser celle-ci. Les immunoréactivités de tau étaient diminuées à $47,0 \pm 3,9$ % (avec Tau-G) et à $33,8 \pm 6,8$ % (avec Tau-5) ($p < 0,05$) dans les cultures exposés à 5 mM de lithium en présence de 5 µM de FK506. Cependant, nous avons constaté à l'aide des immunoblots réalisés avec les anticorps phospho-dépendants AT-8,

12E8 et Tau-1 que le FK506 inversait la déphosphorylation de tau induite par le lithium (Figure 57A). Comme attendu, l'exposition au FK506 seul augmente de façon dose-dépendante la phosphorylation de tau (Figure 57A). Ces données indiquent que l'inhibition de la PP2B par le FK506 prévient la déphosphorylation de tau sans inverser la diminution de tau induite par le lithium.

F. L'INHIBITION MOLECULAIRE DE LA GSK3B PAR HSiRNA INDUIT LA DIMINUTION DES NIVEAUX DE TAU

Suite aux résultats obtenus avec l'approche pharmacologique et afin de confirmer l'implication de la GSK3 β dans la régulation de l'expression de tau, nous avons testé l'impact d'une sur-expression et d'une suppression de l'activité GSK3 β par des hsiRNA sur des lignées de neuroblastomes de rat B104 et d'humain SH-SY5Y.

Après vérification par immunofluorescences et western-blots que les 2 lignées de neuroblastomes considérées, exprimaient les protéines d'intérêt GSK3 β et tau (Figure 58),

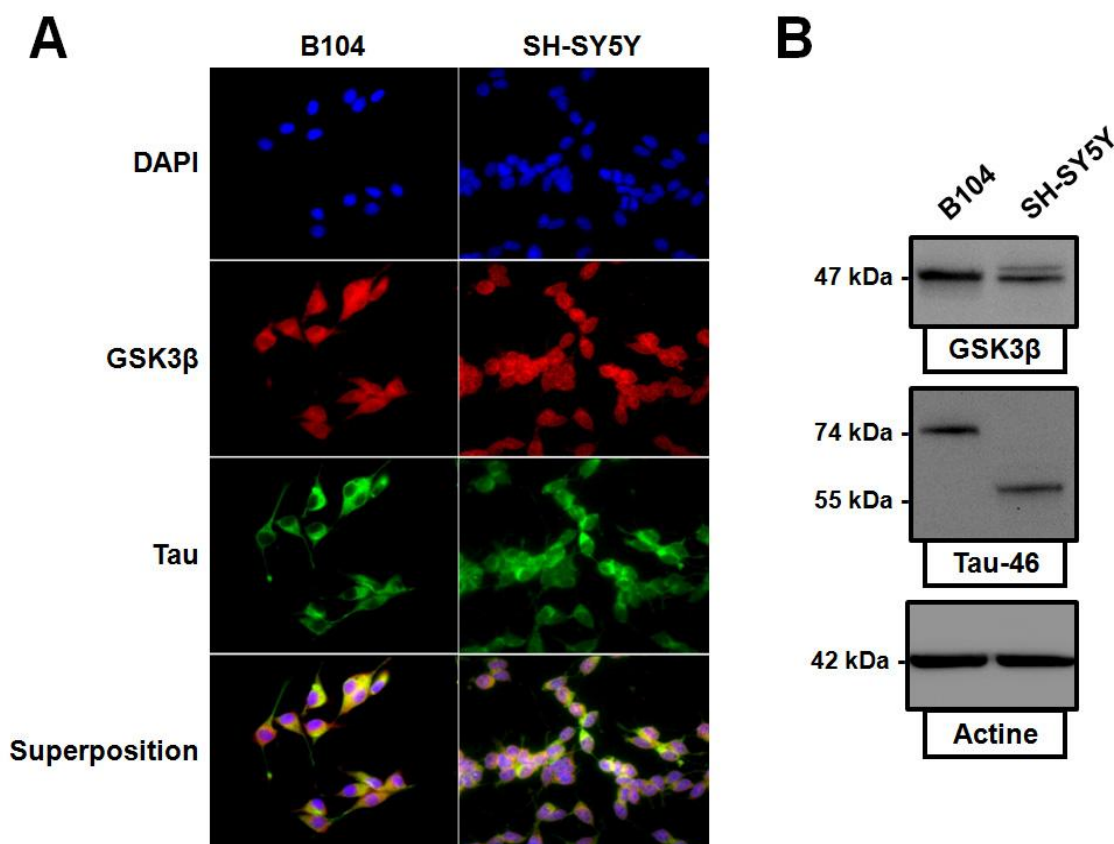


Figure 58. Vérification de la présence des protéines d'intérêt GSK3 β et tau dans les lignées de neuroblastomes B104 et SH-SY5Y. (A) : Immunofluorescences des lignées de neuroblastome de rat B104 et humain SH-SY5Y. (B) : Western-blots réalisés à l'aide des anticorps anti-GSK3 β , Tau-46 et anti-actine.

nous avons développé des lignées dans lesquelles la GSK3 β a été sur-exprimée ou invalidée par hsiRNA. Bien que la protéine tau soit présente dans les 2 lignées cellulaires, nous avons observé que l'immunoréactivité de tau dans la lignée B104 était détectée au niveau de l'isoforme de tau de plus haut poids moléculaire (74 kDa).

Les vecteurs de type mU6-pro-GSK3 β (voir matériel et méthodes) ont été construits par homologie avec les séquences codantes pour la GSK3 β du rat et de la souris. Nous avons donc opté pour une transfection dans un neuroblastome de rat, le neuroblastome B104. Après avoir réalisé des co-transfections stables à l'aide du vecteur pEGFP-N1, nous avons vérifié respectivement, par immunofluorescences (Figure 59) et western-blots (Figure 60), le taux et l'efficacité des transfections. Après sélection, les immunofluorescences montre une efficacité de transfection de près de 100 % pour chacune des populations polyclonales transfectées par les vecteurs mU6-pro-GSK3 β (Figure 59). Par western-blots et pour chaque type de hsiRNA (hairpin 1 et 2, HP1 et HP2), nous avons sélectionné 5 populations polyclonales (Figure 60A et B). La diminution du niveau global de GSK3 β par rapport aux vecteurs contrôles mU6-pro était de 44, 63, 56, 62 et 87 % pour le vecteur mU6-pro-GSK3 β HP1 (Figure 60C), et de 82, 67, 75, 89 et 91 % pour le vecteur mU6-pro-GSK3 β HP2 (Figure 60D). Ces résultats montrent que le vecteur mU6-pro-GSK3 β HP2 est approximativement 20 % plus efficace que le vecteur mU6-pro-GSK3 β HP1 dans l'inhibition moléculaire de la GSK3 β . Aucune détection de la protéine tau à l'aide de l'anticorps Tau-5 n'a été observée dans les populations transfectées par les vecteurs mU6-pro-GSK3 β HP1 et mU6-pro-GSK3 β HP2 (Figure 60).

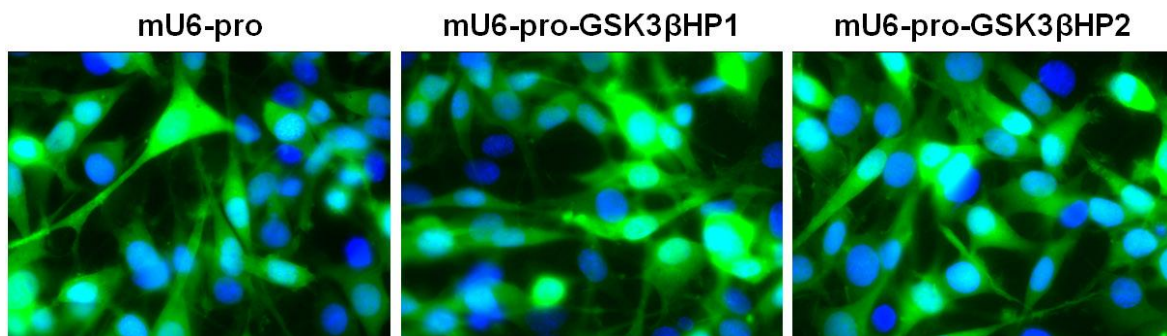


Figure 59. Co-transfection des vecteurs mU6-pro-GSK3 β et pEGFP-N1 dans la lignée de neuroblastome B104.

Comme les séquences protéines de la GSK3 β de rat, de souris et humaine possèdent plus de 90 % d'homologie (les hsiRNA sont dirigés spécifiquement contre les ARNm codant pour la protéine GSK3 β de rat et de souris), nous avons transfecté de manière transitoire les vecteurs mU6-pro-GSK3 β dans la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y. Nous avons considérés une population contrôle contenant le vecteur mU6-pro et 3 types de populations polyclonales. L'une contenant le vecteur de type mU6-pro-GSK3 β HP1, l'autre contenant le vecteur mU6-pro-GSK3 β HP2 et une dernière contenant les deux types de vecteur mU6-pro-GSK3 β HP1 et mU6-pro-GSK3 β HP2 afin d'identifier un éventuel effet synergique des 2 types de hsiRNA. La quantification des immunoréactivités relatives des western-blots réalisés à l'aide des anticorps anti-GSK3 β et Tau-46, normalisées par rapport à la GAPDH, montre une réduction des niveaux de GSK3 β de 24, 46 et 20 % pour les populations transfectées respectivement avec les vecteurs mU6-pro-GSK3 β HP1, mU6-pro-GSK3 β HP2

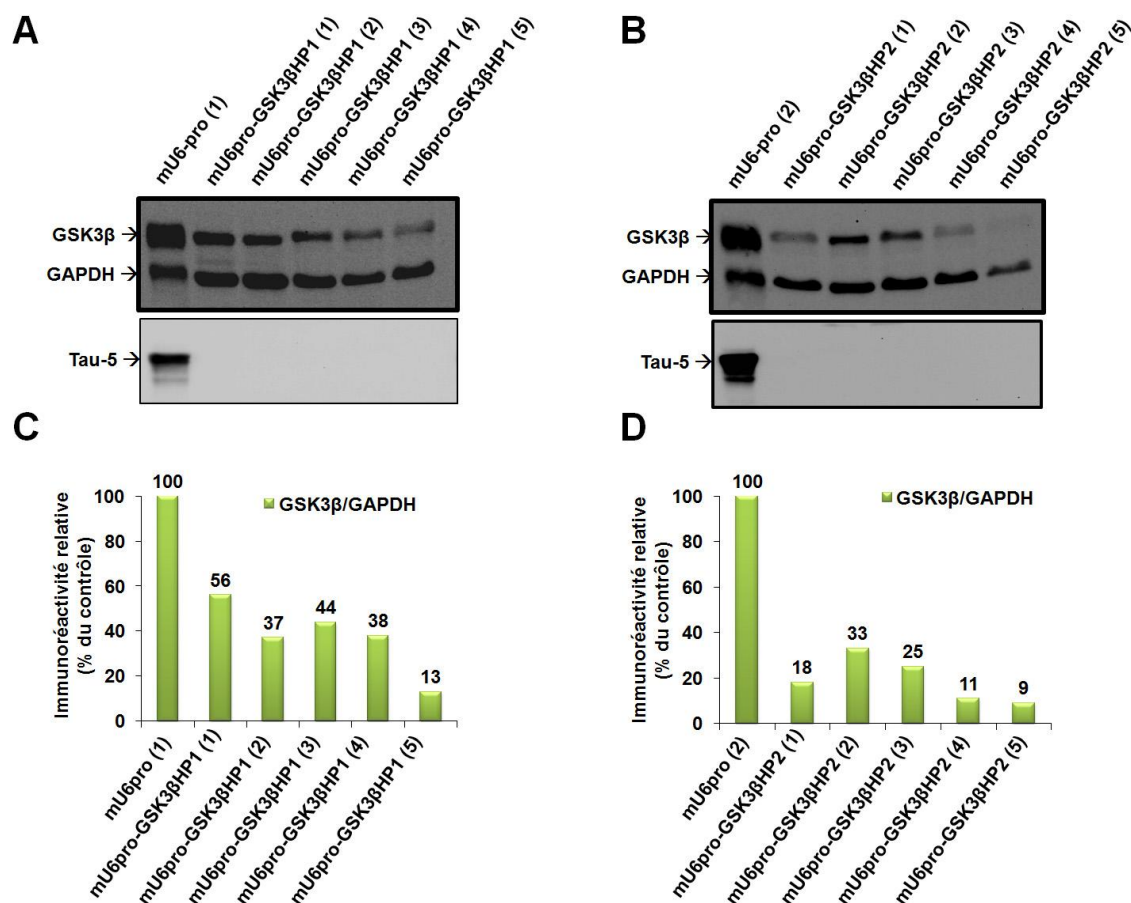


Figure 60. **Taux d'efficacité de la réduction de la GSK3 β après transfections par les vecteurs mU6-pro-GSK3 β dans la lignée de neuroblastome de rat B104.** (A) et (B) : Western-blots des populations polyclonales transfectées à l'aide des vecteurs mU6-pro-GSK3 β HP1 (A) et mU6-pro-GSK3 β HP2 (B). Sont figurés entre parenthèses, les numéros affectés aux populations polyclonales co-transfectées. (C) et (D) : Immunoréactivités relatives GSK3 β /GAPDH dans les différentes populations polyclonales transfectées avec les vecteurs mU6-pro-GSK3 β HP1 (C) et mU6-pro-GSK3 β HP2 (D).

et mU6-pro-GSK3 β HP1 + mU6-pro-GSK3 β HP2, par rapport aux vecteurs contrôles mU6-pro (Figure 61A et B), ce qui confirme l'intégration des vecteurs au sein des populations polyclonales. De même, la normalisation des immunoréactivités réalisées à l'aide de l'anticorps Tau-46 par rapport à la GAPDH montre une réduction de 28, 36 et 39 %, pour chacune des populations polyclonales (Figure 61A et C).

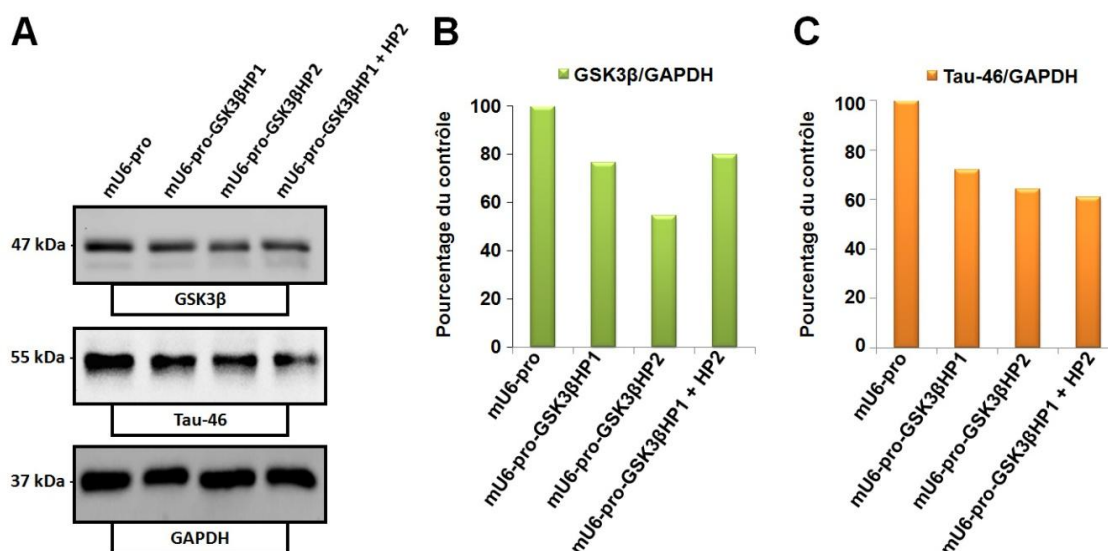


Figure 61. Taux d'efficacité de la réduction de la GSK3 β après transfections par les vecteurs mU6-pro-GSK3 β dans la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y et impact de la réduction de la GSK3 β sur le niveau de tau. Immunoblots (A) et quantifications des immunoréactivités relatives de GSK3 β (B) et de Tau-46 (C) des lignées polyclonales transfectées par les vecteurs mU6-pro-GSK3 β .

Ces données indiquent que l'inhibition moléculaire de la GSK3 β par hsiRNA dans la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y induit une diminution du niveau global de tau, ce qui confirme ainsi les résultats précédemment obtenus à l'aide des inhibiteurs pharmacologiques de la GSK3 β (lithium et 6-BIO).

G. LA SUR-EXPRESSION MOLECULAIRE DE LA GSK3B INDUIT UNE AUGMENTATION DES NIVEAUX DE TAU

Pour envisager des comparaisons, nous avons souhaité déterminer l'effet d'une sur-expression moléculaire de la GSK3 β dans ces mêmes lignées de neuroblastome B104 et SH-SY5Y. Pour cela, nous avons utilisé les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β : pcDNA3, pcDNA3-V5-GSK3 β -WT et pcDNA3-V5-GSK3 β -S9A (dominant actif ; V5 étant le tag). Dans chacune des transfections des vecteurs de type pcDNA3-V5-GSK3 β , nous avons obtenu, après 1 semaine de sélection par la G418, des populations polyclonales avec près de 100 % de cellules transfectées.

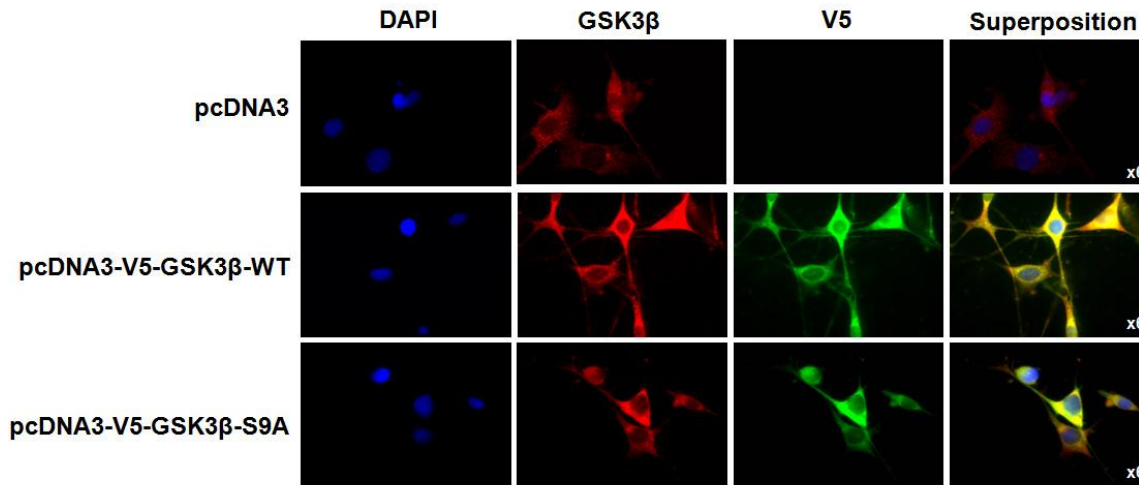


Figure 63. **Immunofluorescences des lignées de neuroblastome B104 transfectées par les vecteurs pcDNA3—V5-GSK3β.** Marquage du noyau cellulaire par le DAPI. Détection en rouge de la protéine GSK3β, détection en vert du tag V5.

Par immunofluorescences des lignées de neuroblastome B104, nous avons constaté que les cellules transfectées par les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3β-WT et pcDNA3-V5-GSK3β-S9A exprimaient le tag V5, indiquant ainsi la présence des vecteurs comportant la séquence codante pour la protéine GSK3β exogène humaine. De plus, nous avons observé un marquage plus intense dans les lignées de neuroblastome B104 transfectées par les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3β-WT et pcDNA3-V5-GSK3β-S9A (Figure 63), ce qui suggère une augmentation de l'expression de la GSK3β. Cette analyse a été complétée par une approche

en western-blots afin de vérifier les niveaux de la GSK3β (Figure 62). Les immunoréactivités montrent la présence du tag V5 dans les populations polyclonales transfectées avec les séquences codantes pour la GSK3β, démontrant ainsi l'efficacité de la transfection (Figure 62A).

La quantification des immunoréactivités de la GSK3β normalisées par

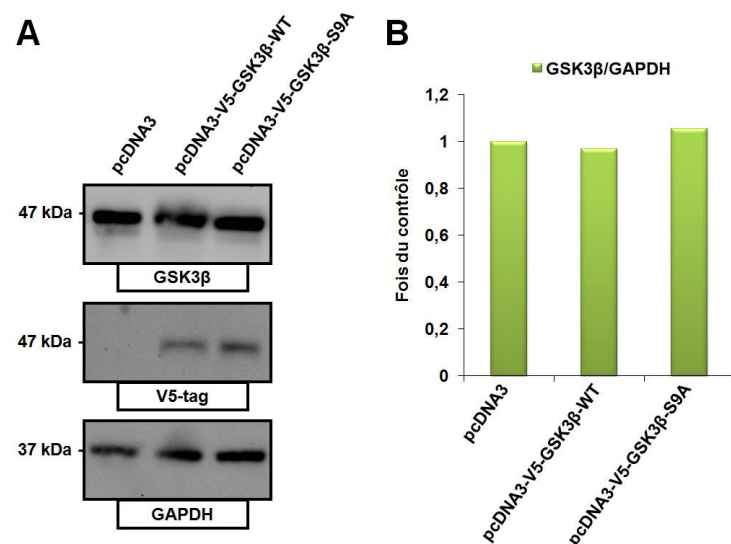


Figure 62. **Taux d'efficacité des transfections par les vecteurs pcDNA3-GSK3β dans la lignée de neuroblastome de rat B104.** Immunoblots (A) et quantifications (B) des immunoréactivités GSK3β normalisées par rapport à la GAPDH des lignées polyclonales B104 transfectées par les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3β.

rapport à la GAPDH montre respectivement de faibles diminution (3 %) et augmentation (5 %) des niveaux de GSK3 β totale dans les lignées polyclonales transfectées par les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β -WT et pcDNA3-V5-GSK3 β -S9A (Figure 62B). Les expériences ont été réitérées plusieurs fois avec des résultats similaires. Nous avons donc choisi de transfecter ces vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β dans une autre lignée de neuroblastome, la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y.

Après transfection dans le neuroblastome humain SH-SY5Y, la quantification des immunoréactivités de la GSK3 β normalisée par rapport à la GAPDH met en évidence une augmentation des taux de GSK3 β de 22 et 16 %, respectivement pour les populations polyclonales transfectées par les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β -WT et pcDNA3-V5-GSK3 β -S9A (Figure 64A et B). De même, les immunoréactivités normalisées de Tau-46 par rapport à la GAPDH ont montré respectivement une augmentation de 12 et 34 % comparé à la population contrôle (Figure 64A et C).

Les résultats obtenus sur les lignées de neuroblastome considérées montrent que la sur-expression de la GSK3 β (WT et S9A) semble augmenter les niveaux de tau. De plus, cette augmentation des niveaux de tau, serait due à un excès intracellulaire de protéines GSK3 β mais également à la présence de protéines GSK3 β activées.

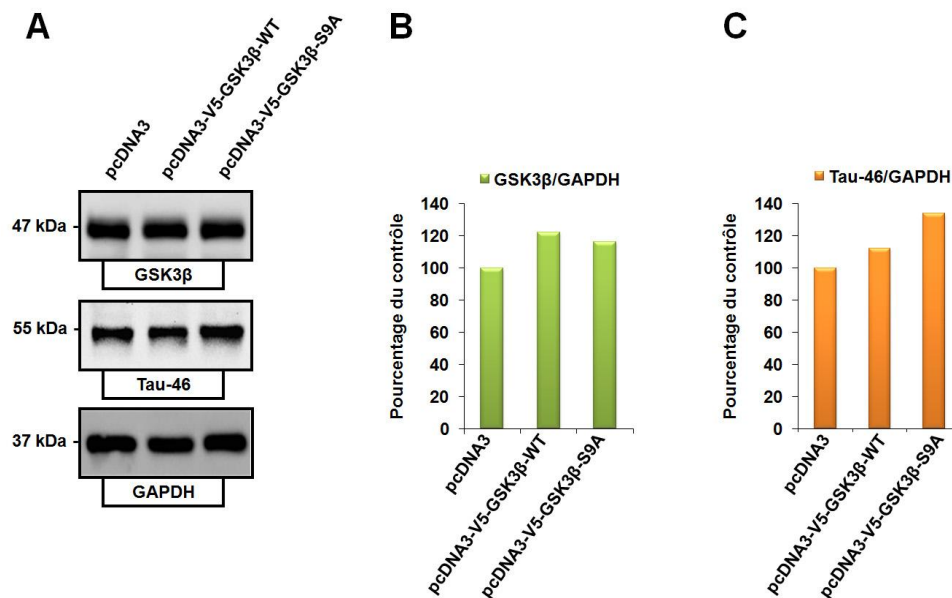


Figure 64. **Effets d'une sur-expression de la GSK3 β dans la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y sur les niveaux de la protéine tau.** Immunoblots (A) et quantifications (B) des immunoréactivités GSK3 β et Tau-46 normalisées par rapport à la GAPDH des lignées polyclonales SH-SY5Y transfectées par les vecteurs pcDNA3-V5-GSK3 β .

H. CONCLUSIONS : LA GSK3B ET LA PP2A SONT SELECTIVEMENT IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DES NIVEAUX PROTEIQUES DE TAU

Par cette étude, nous avons mis en évidence dans des cultures corticales de neurones que **l'inhibition spécifique pharmacologique ou moléculaire** de la **GSK3 β** entraîne une **diminution des niveaux protéiques de tau**. A l'inverse, nous avons montré, dans la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y, que la sur-expression moléculaire de la GSK3 β induit une augmentation des niveaux de tau.

D'autre part, comme l'inhibition de CDK5 non toxique n'a aucun effet sur les niveaux de tau, les données obtenues indiquent que la **GSK3 β** était **préférentiellement impliquée** dans la diminution induite par le lithium des niveaux de tau. Cette diminution nécessitait également l'intervention de la PP2A par l'OKA et non celle de PP2B.

Ces données montrent que la GSK3 β agit non seulement sur la phosphorylation de tau mais également sur son niveau protéique. Comme la protéine tau, indépendamment de son état de phosphorylation, peut être impliquée dans la dégénérescence neuronale, la modulation de l'expression de tau pourrait représenter une cible thérapeutique des tauopathies.

II. LA SUPPRESSION ENDOGENE DE TAU BLOQUE L' APOPTOSE INDUITE PAR L'OKA

Nous avons ensuite cherché à savoir si la protéine tau était directement ou non impliquée dans l'apoptose neuronale. Pour cela nous avons exposée à l'OKA des cultures de neurones corticaux d'embryons issus d'accouplements de souris hétérozygotes tau (+/-) entre elles. Compte tenu de la distribution mendelienne, ces accouplements devraient donner naissance à 25 % d'embryons tau (+/+), 50 % d'embryons tau (+/-) et 25 % d'embryons tau (-/-). Chaque cerveau d'embryon a été mis séparément en culture et les cultures ont été exposées à l'OKA à J7. Le phénotype et le génotype de tau à chaque embryon ont été déterminés *a posteriori* (voir matériel et méthodes). L'apoptose a été analysée par western-blot de la caspase-3 et de la PARP clivées (formes actives).

L'exposition des cultures de neurones corticaux à l'OKA (12,5 - 25 nM, 8 h) entraîne une augmentation dose-dépendante du clivage de ces deux marqueurs de l'apoptose (Figure 65). Les résultats sont exprimés en nombre de fois le niveau observé dans les cultures non traitées (contrôles auxquels nous avons attribué la valeur arbitraire de 1). Dans les cultures, issues de cerveaux sauvages (tau+/+ ; exprimant des niveaux normaux de tau) exposés à 12,5 et 25 nM d'OKA (Figure 65A et C), les immunoréactivités relatives obtenues pour la caspase-3 clivée étaient respectivement de $2,4 \pm 0,6$ ($p < 0,05$) et $4,6 \pm 0,7$ fois ($p < 0,01$). Celles de la PARP clivée étaient respectivement de $2,7 \pm 0,3$ ($p < 0,01$) et $3,7 \pm 0,4$ ($p < 0,01$) fois (Figure 65A et D). Dans les cultures issues de cerveaux invalidés pour la protéine tau (tau-/-), les immunoréactivités relatives obtenues pour la caspase-3 clivée étaient de $1,8 \pm 0,3$ ($*p < 0,05$) et $2,1 \pm 0,4$ respectivement dans les cultures exposés à 12,5 et 25 nM d'OKA (Figure 65A et D). Celles de la PARP clivée étaient de $1,5 \pm 0,2$ et $1,9 \pm 0,3$ fois (NS, $p = 0,053$; Figure 65A et D). La comparaison des cultures de neurones sauvages aux cultures invalidées pour tau montre que le clivage de la caspase-3 et de la PARP étaient plus prononcés dans les cultures sauvages lorsque les cultures sont traitées par l'OKA 12,5 et

25 nM (Figure 65C et D). Ces résultats indiquent que les neurones invalidés pour la protéine tau étaient plus résistants que les neurones sauvages (dosage normal de tau) à l'apoptose induite par l'inhibition de la PP2A par l'OKA.

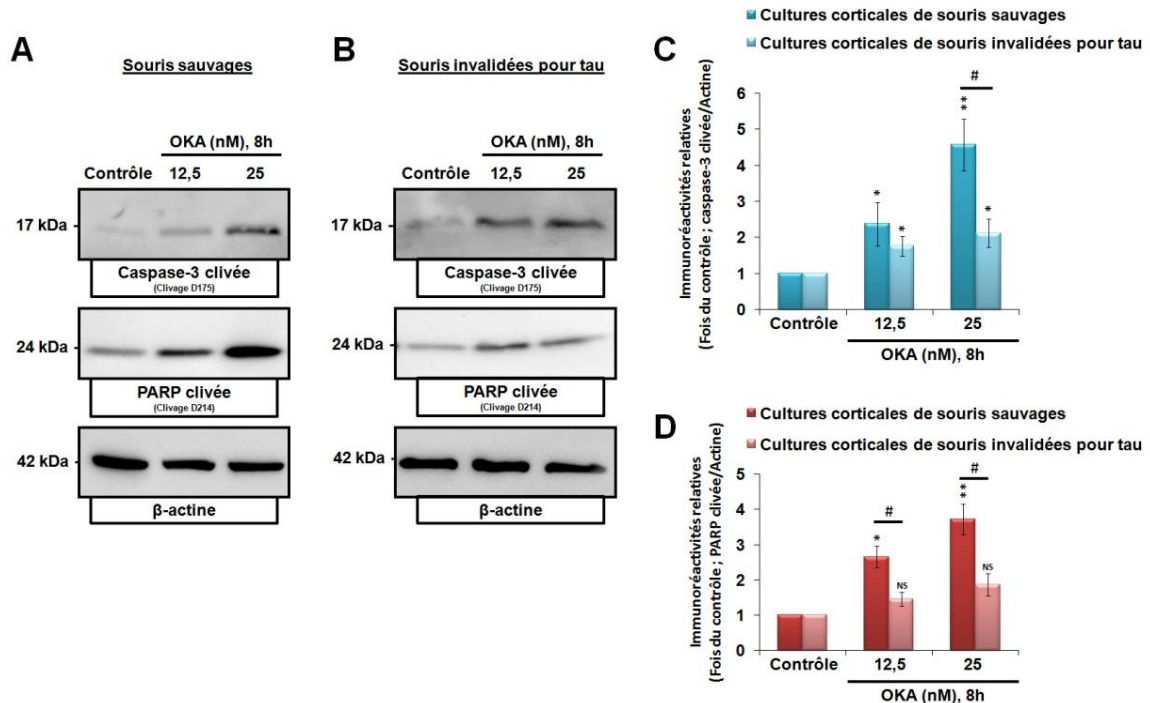


Figure 65. **Effets de la suppression de tau sur l'apoptose induite par l'OKA.** Immunoblots représentatifs réalisés avec des anticorps anti-caspase-3 clivée et PARP clivée dans des cultures de neurones « sauvages » (A) et des cultures invalidées pour tau (B). Quantification des immunoréactivités de la caspase-3 clivée (C) et de la PARP clivée (D) normalisées par rapport à l'actine. NS : non significatif, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport aux contrôles. # $p < 0,05$, par rapport aux cultures sauvages.

Cependant, ces premiers résultats ont été obtenus sur un petit nombre d'embryons ($n = 4$ pour chaque phénotype). Néanmoins, ils montrent déjà une différence significative en fonction du dosage de tau quant à la sensibilité des neurones à l'apoptose induite par l'inhibition de la PP2A. Ainsi ces résultats méritent d'être confirmés par des techniques de quantification in situ de l'apoptose neuronale. De plus, l'effet d'une suppression partielle de tau (neurones hétérozygotes tau $^{+/-}$) sur l'apoptose induite par l'OKA devra être analysé.

2^{ème} partie

III. LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET L'APOPTOSE NEURONALE INDUITES PAR LE BLOCAGE DE LA PP2A IMPLIQUENT SELECTIVEMENT LA GSK3B, ET NON LA CDK5 OU LA DYRK1A

Les données obtenues dans cette partie ont fait l'objet d'un article (voir annexe) qui a été soumis et intitulé : « **Tau phosphorylation and neuronal apoptosis induced by the blockade of PP2A selectively involve GSK3 β , but not CDK5 or DYRK1A** ».

Ces données ont également fait l'objet de 3 communications écrites présentées lors des congrès suivants :

- 2^{ème} journée de l'IFR GEIST de l'université de Limoges, France. Ce poster a été récompensé par le 1^{er} Prix Poster (29 janvier 2009) ;
- 9th International Conference, Alzheimer's and Parkinson's Diseases 2009 (AD/PD), Prague, République Tchèque (11 au 15 mars 2009);
- 7th Forum of European Neuroscience (FENS), Amsterdam, Pays-Bas (3 au 7 juillet 2010).

A. L'OKA INDUIT LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET L'APOPTOSE NEURONALE

L'inhibition de la PP2A par l'OKA induit la phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale dans les cultures corticales et les neuroblastomes (Arias et al., 1993). Afin de déterminer, dans notre modèle, les conditions expérimentales optimales (concentration et temps d'exposition des cultures) dans lesquelles l'OKA est capable d'induire la phosphorylation de tau et l'apoptose, les cultures de neurones corticaux d'embryons de ratte ont été exposées à des concentrations croissantes d'OKA (1, 3, 6,25, 12,5, 25 et 50 nM pendant 8 h). L'efficacité de l'OKA dans l'inhibition de la PP2A a été vérifiée par l'analyse de la phosphorylation de tau sur plusieurs sites par western-blots (connus pour être déphosphorylés par la PP2A ; Figure 66A). Les résultats sont exprimés en nombre de fois le niveau observé dans les cultures non traitées (contrôles auxquels nous avons attribué la valeur arbitraire 1). Les western-blots réalisés à l'aide des anticorps qui détectent tau en fonction de son état de phosphorylation (12E8, AT-8 et Tau-1) montrent que l'OKA induit, de façon dose-dépendante, une augmentation de la phosphorylation de tau (augmentation des immunoréactivités de tau aux sites 12E8 et AT-8, et diminution de l'immunoréactivité de Tau-1) à partir de 6,25 nM. La phosphorylation de tau augmente nettement à 25 nM pour tous les sites de phosphorylation détectés par ces anticorps. Dans les cultures exposées à 25 nM d'OKA, les immunoréactivités de tau phosphorylée détectées avec les anticorps 12E8 et AT-8 sont respectivement de 4,0 ($p < 0,001$) et 2,1 ($p < 0,001$; Figure 66B). L'augmentation de la phosphorylation de tau est saturée aux sites Tau-1 et AT-8 dans les cultures de neurones corticaux exposées à 25 nM d'OKA. Cependant, la phosphorylation de tau à l'épitope 12E8 continue d'augmenter à 50 nM. Cela pourrait être dû à l'inhibition, par 50 nM d'OKA, d'autres phosphatases, spécifiquement celles impliquées dans la déphosphorylation de tau sur les sites détectés par 12E8. L'augmentation de la phosphorylation nette de tau a été confirmée par l'analyse des immunoréactivités de tau déphosphorylée, détectée en western-blot par l'anticorps Tau-1. L'analyse semi-quantitative de Tau-1 montre que l'OKA (6,25 à 50 nM) induit une diminution dose-dépendante des immunoréactivités de tau déphosphorylées. Ces immunoréactivités étaient de 0,7 ($p < 0,05$, par rapport à l'immunoréactivité de Tau-1 dans les contrôles), 0,4 ($p < 0,01$), 0,3 ($p < 0,001$) et 0,2 ($p < 0,001$) dans les cultures exposées respectivement à des concentrations de 6,25, 12,5, 25 et 50 nM d'OKA. L'augmentation de la phosphorylation de tau est corrélée avec la présence d'une apoptose neuronale. Celle-ci a été mise en évidence par l'augmentation des

niveaux de caspase-3 et PARP clivées. L'analyse par western-blots de ces deux marqueurs de l'apoptose indiquent que l'augmentation maximale de la caspase-3 et de la PARP clivées est obtenue à 25 nM d'OKA (Figure 66A et C). L'analyse semi-quantitative des western-blots montre que, dans les cultures exposées à 25 nM d'OKA, les immunoréactivités de la caspase-3 et de la PARP clivées étaient respectivement de 3,5 ($p < 0,001$) et 3,8 ($p < 0,001$). Cependant, dans les cultures exposées à 50 nM d'OKA (par rapport au traitement par 25 nM d'OKA), une apparente diminution de ces immunoréactivités a été observée. Celle-ci pourrait résulter d'une apoptose neuronale massive qui provoque le détachement de cellules du support de culture. Ceci est susceptible d'entraîner une sous-estimation du niveau de ces deux marqueurs d'apoptose dans les cellules restantes sur lesquelles les analyses ont été effectuées. Cette possibilité est soutenue par le fait que les niveaux de tau globale, détectée par les anticorps Tau-46 et Tau-5, sont nettement diminués dans les cultures exposées à 50 nM d'OKA. L'évaluation quantitative *in situ* du niveau d'apoptose par des doubles immunofluorescences de la caspase-3 et la PARP clivées, combinées à la détection de la fragmentation de la chromatine par un marquage nucléaire par le DAPI, confirme les données obtenues par western-blots. L'OKA augmente significativement et de manière dose-dépendante le pourcentage de cellules positives pour la caspase-3 et la PARP clivées, ainsi que le pourcentage des cellules avec un noyau fragmenté (Figure 66D). Par conséquent, la concentration de 25 nM d'OKA pendant 8 h a été retenue pour la suite des expérimentations en raison de son efficacité pour induire la phosphorylation de tau et l'apoptose, et surtout pour produire, selon la littérature, une inhibition spécifique de la PP2A.

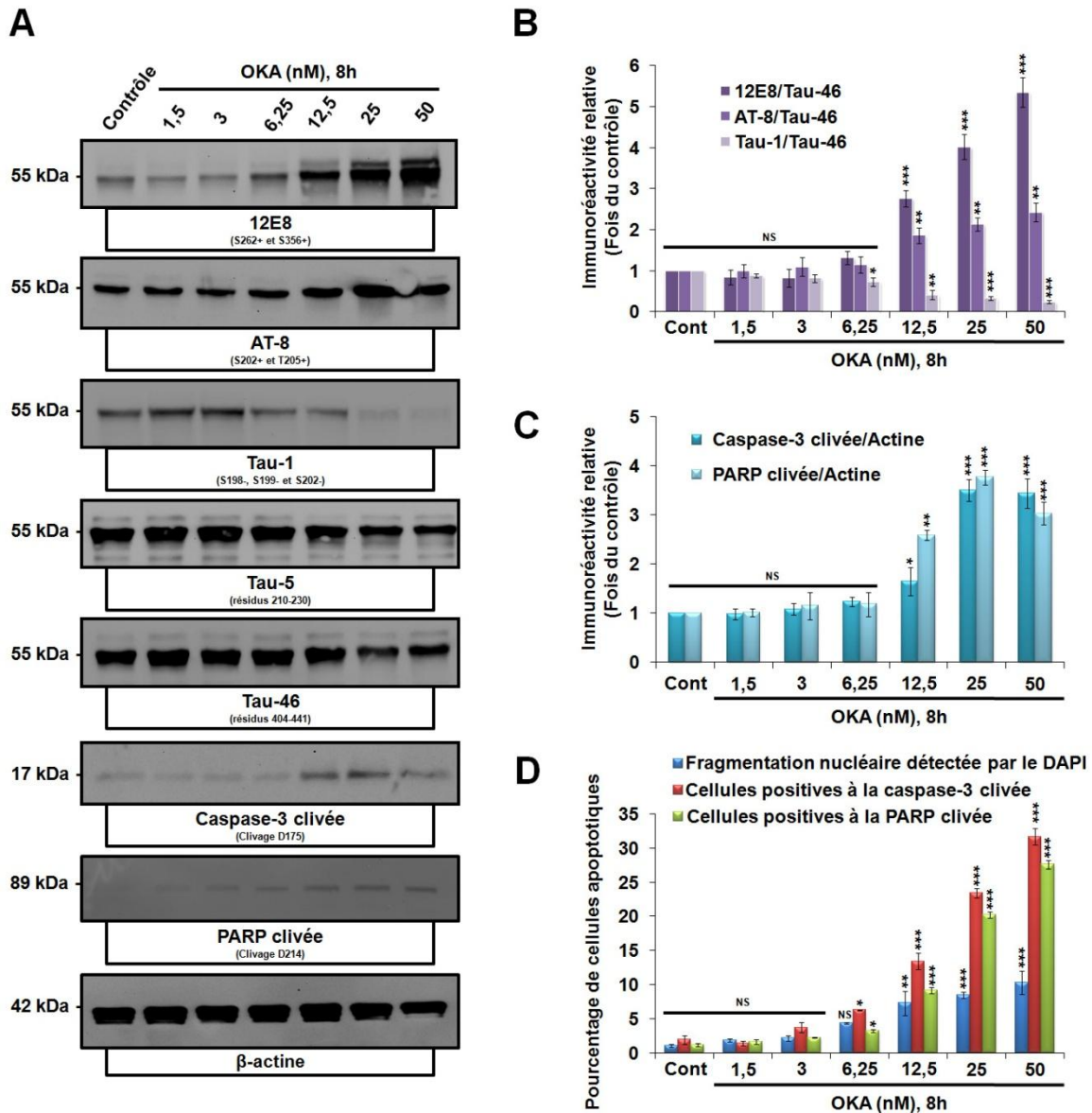


Figure 66. **L'inhibition de la PP2A par l'OKA induit de façon dose-dépendante l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale.** Les cultures primaires corticales ont été exposées à des concentrations croissantes d'OKA (1,25 jusqu'à 50 nM). La phosphorylation de tau a été analysée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-phospho-tau. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée (D175) et de la PARP clivée (D214), par western-blots et immunofluorescences avec les mêmes anticorps. L'apoptose a également été quantifiée par l'analyse de la fragmentation du noyau révélée par un marquage du noyau au DAPI. (A) Analyse par western-blots de la phosphorylation de tau et de l'apoptose. Tau phosphorylée (+) et tau non phosphorylée (-) ont été détectées par les anticorps anti-phospho-tau 12E8 (tau phosphorylée sur S262 et, dans une moindre mesure, sur S356), AT-8 (tau phosphorylée sur S202 et T205) et Tau-1 (tau déphosphorylée sur S195, S198, S199 et S202). Tau globale (phosphorylée et non phosphorylée) a été détectée par Tau-5 et Tau-46 qui reconnaissent, respectivement, les épitopes entre les résidus 210-230 et 404-441. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 et de la PARP clivées. (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités phospho-tau. Les niveaux de tau ont été normalisés par rapport à la protéine tau totale. (C) Analyse semi-quantitative par western-blot de la caspase-3 et la PARP clivées. La β-actine a été utilisée comme témoin de charge. (D) Quantification *in situ* de l'apoptose neuronale détectée par immunofluorescence de la caspase-3 et de la PARP clivées, combinée à l'analyse de la fragmentation nucléaire détectée par le DAPI. Cont : Contrôle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparé aux contrôles. NS: non significatif.

B. LE LITHIUM PREVIENT LES AUGMENTATIONS DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET L' APOPTOSE NEURONALE INDUITES PAR L'OKA

GSK3 β a été montrée pour agir en aval de la PP2A (Lin et al., 2007). Afin de déterminer si la GSK3 β est impliquée dans la phosphorylation de tau ainsi que la mort neuronale induites par l'OKA, nous avons testé l'effet du lithium dans notre modèle cellulaire. Le lithium prévient de façon dose-dépendante la phosphorylation de tau induite par l'OKA sur tous les sites de phosphorylation examinés (12E8, AT-8 et Tau-1) (Figure 67A et B). Le niveau de phospho-tau aux sites 12E8 est de 4,0 dans les cultures exposées à 25 nM d'OKA seul. Ce niveau est réduit à 3,1 ($p < 0,05$) et 2,4 respectivement lorsque le traitement par l'OKA est effectué en présence de 5 et 10 mM de lithium. A l'inverse, le lithium prévient la diminution, induite par l'OKA, de l'immunoréactivité de tau non phosphorylée détectée par Tau-1. Celle-ci est de 0,3 dans les cultures exposées à l'OKA seul, 0,6 ($p < 0,05$) et 1,0 ($p < 0,001$) dans les cultures exposées à l'OKA en présence de 5 et 7,5 mM de lithium respectivement. Le lithium bloque également de façon dose-dépendante les clivages induits par l'OKA de la caspase-3 et de la PARP. Par exemple, la présence de 5 mM de lithium réduit respectivement les clivages de la caspase-3 et de la PARP de 3,5 et 3,8 à 1,7 ($p < 0,001$) et 2,2 ($p < 0,05$; Figure 67A et C). Ces données sont confirmées par la quantification *in situ* aussi bien des pourcentages de cellules positives pour la caspase-3 et la PARP clivées que le nombre de cellules avec une chromatine fragmentée (Figure 67D). Par exemple, le pourcentage de cellules positives pour la caspase-3 est significativement augmenté dans les cultures exposées à 25 nM d'OKA seul ($p < 0,001$ comparé aux contrôles). La présence de lithium à 7,5 et 10 mM réduit, partiellement mais significativement, l'augmentation de la proportion de cellules ($p < 0,001$ par rapport aux cultures exposées avec de l'OKA seul). Des résultats similaires ont été obtenus en ce qui concerne le pourcentage de cellules positives pour le clivage de la PARP et de la fragmentation du noyau (Figure 67D).

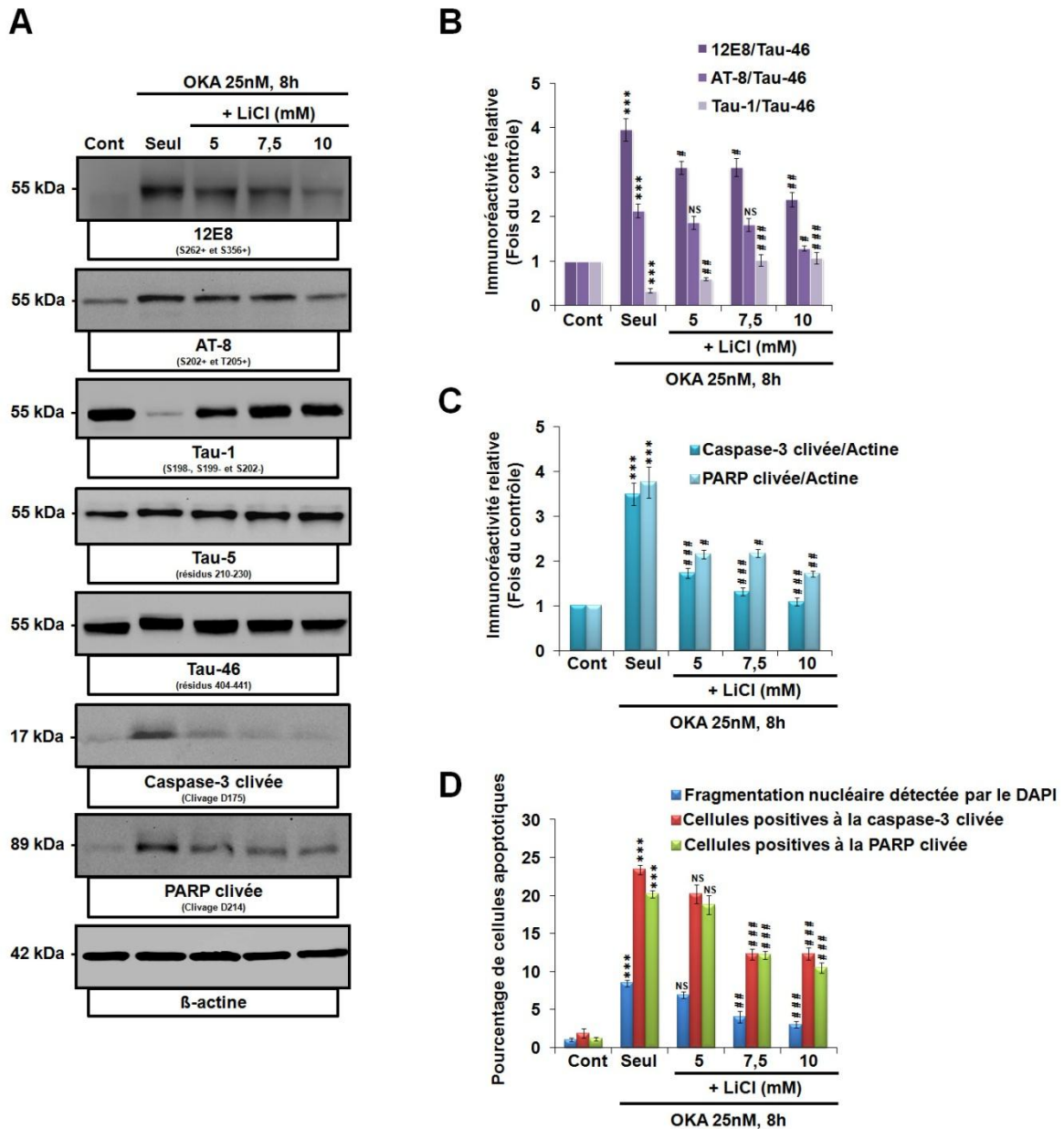


Figure 67. **L'inhibition de la GSK3 β par le chlorure de lithium inverse l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA.** Les cultures primaires corticales ont été exposées à 25 nM d'OKA seul et en présence de concentrations croissantes de LiCl (5, 7,5 et 10 mM, 8 h). La phosphorylation de tau a été analysée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-phospho-tau. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée (D175) et de la PARP clivée (D214), par western-blots et immunofluorescences. L'apoptose a également été quantifiée par l'analyse de la fragmentation du noyau révélée par un marquage au DAPI. (A) Analyse par western-blots de la phosphorylation de tau et de l'apoptose. Tau phosphorylée (+) et tau non phosphorylée (-) ont été détectées par les anticorps anti-phospho-tau 12E8 (tau phosphorylée sur S262 et dans une moindre mesure sur S356), AT-8 (tau phosphorylée sur S202 et T205) et Tau-1 (tau déphosphorylée sur S195, S198, S199 et S202). Tau totale (phosphorylée et non phosphorylée) a été détectée par Tau-5 et Tau-46 qui reconnaissent, respectivement, les épitopes entre les résidus 210-230 et 404-441. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 et la PARP clivées. (B) Analyses semi-quantitatives des immunoréactivités phospho-tau détectées par western-blots. Les niveaux de tau ont été normalisés par rapport à tau totale. (C) Analyses semi-quantitatives par western-blots de la caspase-3 et la PARP clivées. La β -actine a été utilisée comme témoin de charge. (D) Quantification *in situ* de l'apoptose neuronale détectée par immunofluorescence de la caspase-3 et la PARP clivées, combinée à l'analyse de la fragmentation nucléaire détectée par le DAPI. Cont: contrôle. *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ par rapport à l'OKA seul. NS: statistiquement non significatif.

C. LE 6-BIO PREVIENT LES AUGMENTATIONS DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET L' APOPTOSE NEURONALE INDUITES PAR L'OKA

Puisque le lithium (LiCl) est un large inhibiteur de la GSK3 β (CI50 = 2 mM) (Klein and Melton, 1996) et afin d'apporter de nouvelles preuves quant à la possible implication de la GSK3 β dans l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA, nous avons analysé l'effet du 6-BIO, un inhibiteur plus puissant de la GSK3 β (CI50 = 1,5 μ M) (Meijer et al., 2003, Zahler et al., 2007). Les cultures de neurones corticaux ont été exposées pendant 8 h à de l'OKA seul ou en présence de concentrations croissantes de 6-BIO (1,25, 2,5 et 5 μ M). Comme attendu, le 6-BIO bloque de façon dose-dépendante l'augmentation de la phosphorylation de tau induite par l'OKA. Même à 1,25 μ M, 6-BIO est significativement efficace dans le blocage de la phosphorylation de tau induite par l'OKA aux sites AT-8 ($p < 0,01$) et 12E8 ($p < 0,05$). Ces données sont corrélées avec celles obtenues pour l'apoptose qui a été analysée par la détection de la caspase-3 et de la PARP clivées (par western-blot et immunofluorescence) ou par quantification de la fragmentation nucléaire révélée par le marquage au DAPI du noyau (voir Figure 68A pour les western-blots ; Figure 68C pour l'analyse semi-quantitative de la caspase-3 et de la PARP clivées ; Figure 68D pour la quantification des immunofluorescences). L'exposition prolongée des cultures corticales au 6-BIO induit une neurotoxicité (données non présentées), ce qui est en accord avec les résultats obtenus chez les cellules du neuroblastome humain SH-SY5Y. En effet, ces derniers montrent que le 6-BIO est toxique à des concentrations relativement faibles (9 μ M) (Meijer et al., 2003, Vougiannopoulou et al., 2008). Ceci limite l'usage thérapeutique du 6-BIO, il est donc important de développer de nouveaux inhibiteurs plus puissants et sélectifs pour la GSK3 β , et dénués de toute toxicité cellulaire.

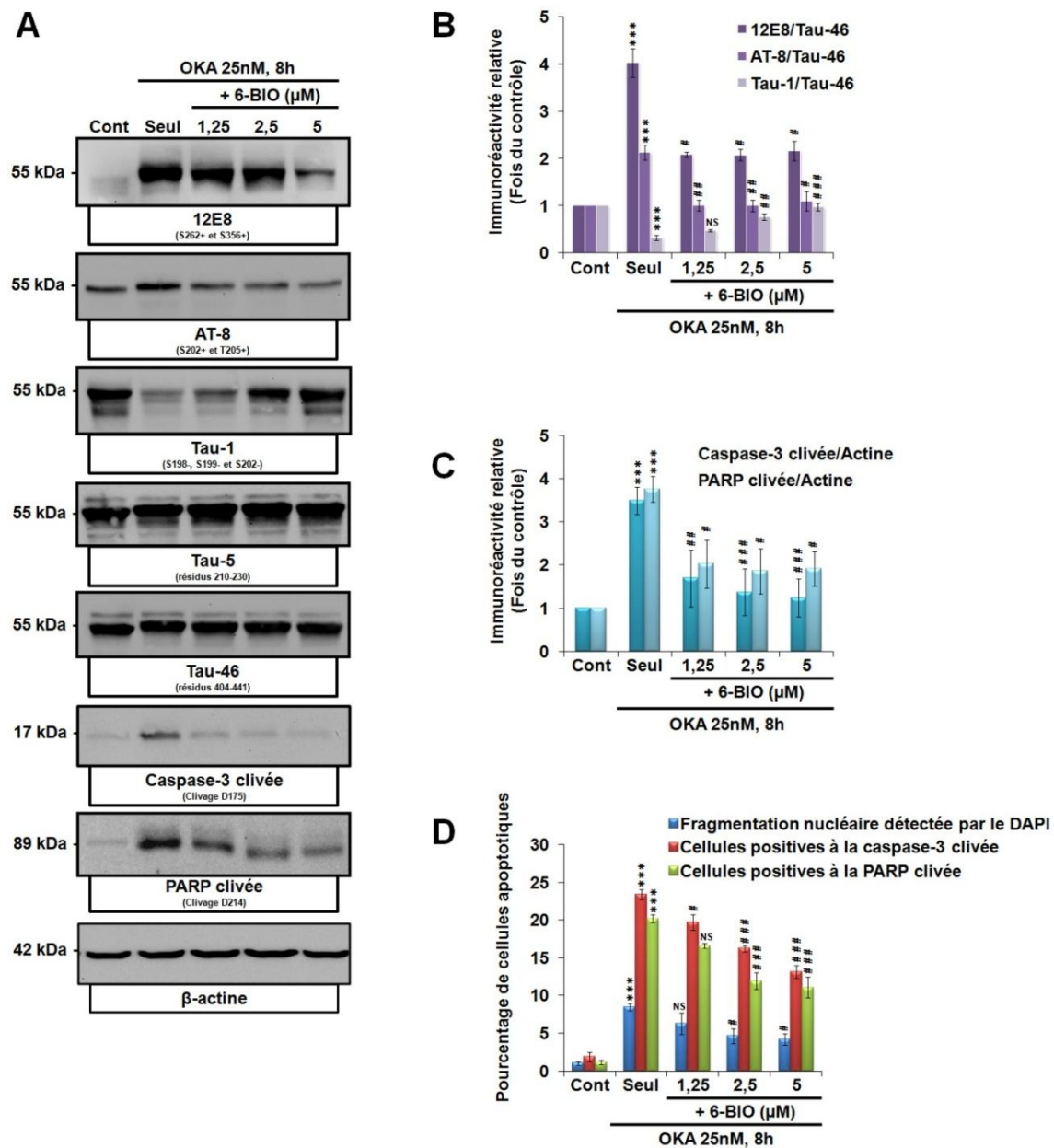


Figure 68. **L'inhibition de la GSK3 β par le 6-BIO inverse l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA.** Les cultures primaires corticales ont été exposées à 25 nM d'OKA seul et en présence de concentrations croissantes de 6-BIO (1,25, 2,5 et 5 μM , 8 h). (A) Analyse par western-blot de la phosphorylation de tau et de l'apoptose. Tau phosphorylée (+) et tau non phosphorylée (-) ont été détectées par les anticorps anti-phospho- tau 12E8, AT-8 et Tau-1. Tau totale (phosphorylée et non phosphorylée) a été détecté par Tau-5 et Tau-46. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 et la PARP clivées. (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités phospho-tau détectées par western-blots. Les niveaux de tau ont été normalisés par rapport à tau totale. (C) Analyse semi-quantitative par western-blots de la caspase-3 et de la PARP clivées. La β -actine a été utilisée comme témoin de charge. (D) Quantification *in situ* de l'apoptose neuronale détectée par immunofluorescence de la caspase-3 et de la PARP clivées, combinée à l'analyse de la fragmentation nucléaire détectée par le DAPI. Cont: contrôle. *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ par rapport à l'OKA seul. NS : statistiquement non significatif.

D. LE 6-BIBE0, UN DERIVE NON TOXIQUE DE 6-BIO, PREVIENT LES AUGMENTATIONS DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET L' APOPTOSE NEURONALE INDUITE PAR L'OKA

Récemment, Vougianniopoulou et collaborateurs ont synthétisé plusieurs composés dérivés du 6-BIO différant entre eux par leurs constantes de sélectivité et de spécificité pour la GSK3 β (Vougianniopoulou et al., 2008). Nous avons testé 26 dérivés pour leur capacité à réduire la phosphorylation de tau dans les cultures de neurones (données non présentées). Parmi ceux-ci, nous avons sélectionné, le composé 6-BIBE0 (6-bromoindirubin-3'-(2-bromoéthyl)-oxime) qui, par rapport au 6-BIO, est plus spécifique pour la GSK3 β que pour la CDK1 (> 10 fois) et la CDK5 (> 10 fois). Ce produit possède également l'avantage d'être beaucoup moins cytotoxique (> 100 μ M) que le 6-BIO (9 μ M). L'analyse de la phosphorylation de tau par western-blot avec plusieurs anticorps montre que 6-BIBE0 inverse de façon dose-dépendante l'augmentation de la phosphorylation de tau induite par l'OKA aux sites 12E8, AT-8 et Tau-1 (Figure 69A et B). L'analyse semi-quantitative des western-blots (Figure 69B) montre que 6-BIBE0, par exemple à 2,5 μ M, réduit les immunoréactivités de phospho--tau de 4,0 à 1,7 ($p < 0,01$) pour le site 12E8 et de 2,1 à 1,5 ($p < 0,05$) pour le site AT-8. A l'inverse le 6-BIBE0 augmente l'immunoréactivité de Tau-1 (tau déphosphorylée) de 0,3 à 1,3 ($p < 0,001$). A 5 μ M, 6-BIBE0 restaure les niveaux de phosphorylation de tau à un niveau similaire à celui des cultures contrôles, et bloque pratiquement totalement l'apoptose induite par l'OKA, comme le montrent les western-blots (Figure 69A et C) et l'analyse des immunofluorescences des clivages de la caspase-3 et de la PARP (Figure 69D et E).

Les analyses semi-quantitatives des western-blots de la caspase-3 et de la PARP clivées montrent respectivement des réductions des clivages pour ces deux protéines dans les cultures traitées par l'OKA en présence de 5 μ M de 6-BIBE0 de 3,5 et 3,8 à 1,0 ($p < 0,001$) et 1,2 fois du contrôle ($p < 0,01$) (Figure 69C). Ces données sont confirmées par l'analyse *in situ* de la mort cellulaire apoptotique à l'aide des anticorps anti-caspase-3 clivée et anti-PARP clivée, combinée à la détection de la fragmentation de la chromatine par le marquage nucléaire au DAPI. L'OKA seul augmente nettement les proportions de cellules positives pour la caspase-3 et la PARP clivées ainsi que celles de la fragmentation nucléaire (Figure 69D). L'analyse quantitative de ces paramètres apoptotiques montre que le 6-BIBE0 à 5 μ M réduit significativement les pourcentages de cellules positives pour

caspase-3 clivée ($p < 0,001$) et la PARP clivée ($p < 0,001$), ainsi que ceux des noyaux fragmentés ($p < 0,01$) (Figure 69E).

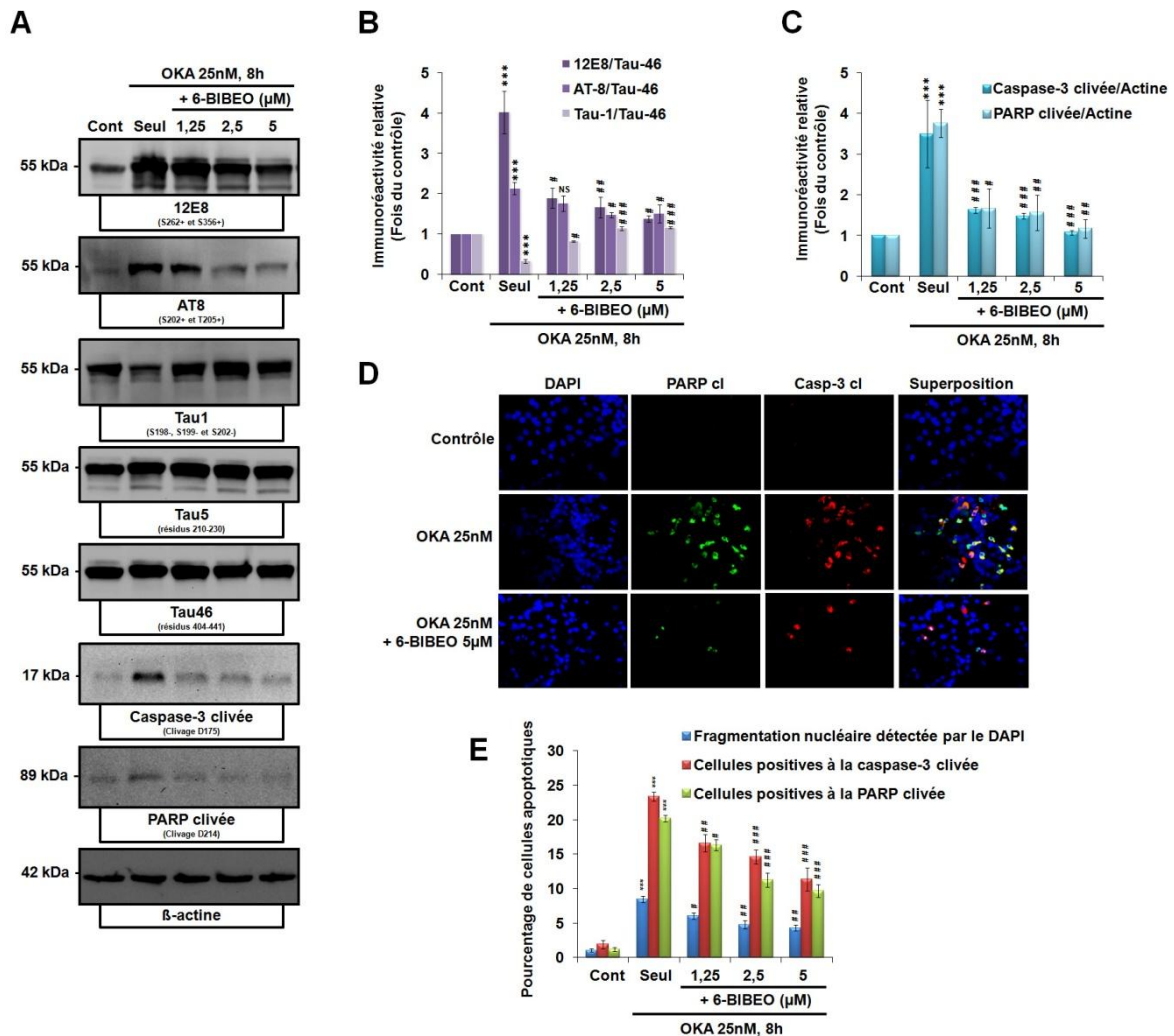


Figure 69. **L'inhibition de la GSK3β par le 6-BIBEO inverse l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA.** Les cultures primaires corticales ont été exposées à 25 nM d'OKA seul et en présence de concentrations croissantes de 6-BIBEO (1,25, 2,5 et 5 μM). La phosphorylation de tau a été analysée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-phospho-tau. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée (D175) et de la PARP clivée (D214), par western-blots et immunofluorescences avec les mêmes anticorps. L'apoptose a également été quantifiée par l'analyse de la fragmentation du noyau révélée par un marquage au DAPI. (A) Analyse par western-blots de la phosphorylation de tau et de l'apoptose. Tau phosphorylée (+) et tau non phosphorylée (-) ont été détectées par les anticorps phospho-dépendants anti-tau 12E8, AT-8 et Tau-1. Tau totale (phosphorylée et non phosphorylée) a été détectée par Tau-5 et Tau-46 qui reconnaissent, respectivement, les épitopes entre les résidus 210-230 et 404-441. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 et la PARP clivées. (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités phospho-tau détectées par western-blots. Les niveaux de tau ont été normalisés par rapport à tau totale. (C) Analyses semi-quantitatives par western-blot de la caspase-3 et la PARP clivées. La β-actine a été utilisée comme témoin de charge. (D) Photomicrographies des doubles immunofluorescences de la caspase-3 clivée (Casp-3 cl, en rouge) et de la PARP clivée (PARP cl, en vert) combinées au marquage du noyau par le DAPI (en bleu). (E) Quantification *in situ* de l'apoptose neuronale détectée par immunofluorescences de la caspase-3 et de la PARP clivées, combinée à l'analyse de la fragmentation nucléaire détectée par le DAPI. Cont: contrôle. *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ par rapport à l'OKA seul. NS : statistiquement non significatif.

E. LES INHIBITIONS DE DYRK1A PAR L'HARMINE ET CELLES DE CDK5 PAR LA (R)-ROSCOVITINE OU PAR SON DERIVE (R)-CR8 NE BLOQUENT PAS L'APOPTOSE NEURONALE INDUITE PAR L'OKA

DYRK1A est directement et indirectement impliquée dans la phosphorylation de tau, en particulier sur les T212, S202 et S404 (Woods et al., 2001, Ryoo et al., 2007) et dans l'apoptose (voir introduction) (Kang et al., 2005, Seifert et al., 2008). L'harmine est un alcaloïde isolé d'une liane tropicale de l'Amazonie (voir introduction, encart sur l'Ayawasca), préalablement décrit comme inhibiteur puissant des MAO A (Kim et al., 1997). Récemment, il a été démontré que l'harmine pouvait inhiber fortement la phosphorylation d'un substrat spécifique de DYRK1A dans les cultures cellulaires ($IC_{50} = 48$ nM), sans compromettre la viabilité cellulaire. Cependant, son effet sur la phosphorylation de tau n'est pas encore documenté. Contrairement aux autres CDKs, CDK5 n'est pas régulée par les cyclines et est principalement active dans les neurones. CDK5 et son co-activateur p25, qui est hautement exprimé dans le cerveau, induit la phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale. Ces deux processus, sont bloqués par la (R)-roscovitine, un inhibiteur connu de la CDK5 (Zheng et al., 2005). (R)-CR8, un nouveau dérivé de la (R)-roscovitine, est trois fois plus puissant que la (R)-roscovitine dans l'inhibition de la CDK5 (Bettayeb et al., 2008).

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si DYRK1A et CDK5, d'autres kinases de tau, étaient impliquées dans la phosphorylation de tau et, surtout, dans l'apoptose neuronale induite par l'OKA. Avant cela, étant donné qu'il n'existe pas de données disponibles pour l'effet de l'harmine sur la phosphorylation de tau, nous avons déterminé au préalable la concentration optimale efficace sur la phosphorylation de tau sans affecter la viabilité cellulaire. Pour cela, des cultures de neurones corticaux ont été exposées à des concentrations croissantes d'harmine (0,01 à 10 μ M, 8 h). L'analyse des western-blots de la phosphorylation de tau en T212 montre que l'harmine induit une diminution de la phosphorylation de tau à partir de 1 μ M (Figure 70A). L'analyse par western-blot de la caspase-3 clivée montre que même à 10 μ M, elle n'est pas cytotoxique (Figure 70A). Ces données montrent que dans notre modèle cellulaire neuronal, l'inhibition de DYRK1A affecte la phosphorylation de tau sans altérer significativement la viabilité cellulaire.

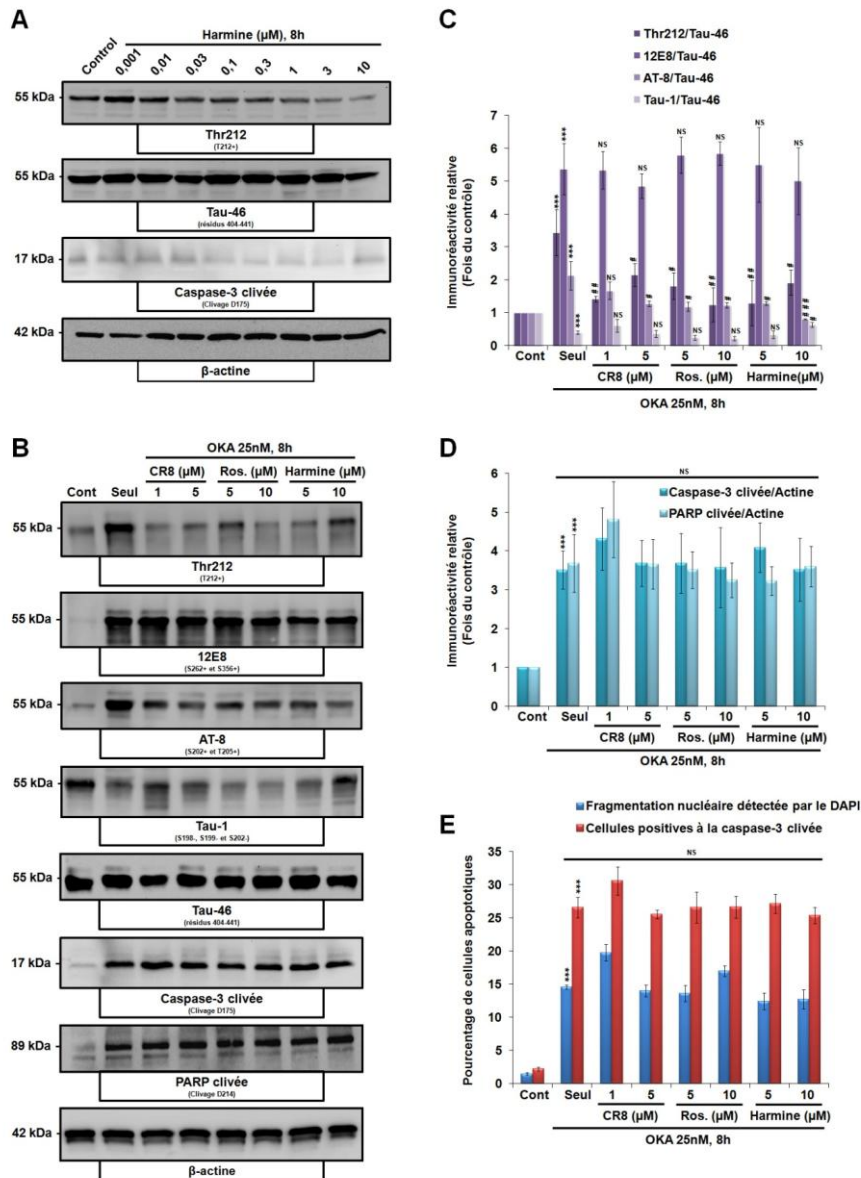


Figure 70. **Inhibition de DYRK1A par l'harmine, de CDK5 par la (R)-roscovitine ou par le (R)-CR8 inverse l'hyperphosphorylation de tau à des sites spécifiques mais ne prévient pas l'apoptose neuronale induite par l'OKA.** (A) L'harmine est un inhibiteur puissant de DYRK1A qui diminue de façon dose-dépendante la phosphorylation de tau au site T212. Les cultures primaires corticales ont été exposées à des concentrations croissantes d'harmine (0,001 ; 0,01 ; 0,03 ; 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 et 10 μM, pendant 8 h). La phosphorylation de tau et l'apoptose ont été analysées par western-blots à l'aide respectivement à l'aide des anticorps anti-tau phosphorylée sur la T212 et anti-caspase-3 clivée (D175) et anti-PARP clivée. (B, C, D et E) Les cultures primaires corticales ont été exposées à 25 nM d'OKA seul et en présence d'harmine (5 et 10 μM), de (R)-roscovitine (5 et 10 μM) ou de (R)-CR8 (1 et 5 μM). La phosphorylation de tau a été analysée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-phospho-dépendants de tau. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée (D175) et de la PARP clivée (D214), par western-blots et immunofluorescences avec les mêmes anticorps. L'apoptose a également été quantifiée par l'analyse de la fragmentation du noyau révélée par un marquage au DAPI. (A) Analyse par western-blots de la phosphorylation de tau et de l'apoptose. Tau phosphorylée (+) et tau non phosphorylée (-) ont été détectées par les anticorps anti-phospho-tau 12E8, AT-8 et Tau-1. Tau totale (phosphorylatée et non phosphorylée) a été détectée par Tau-5 et Tau-46 qui reconnaissent, respectivement, les épitopes entre les résidus 210-230 et 404-441. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 et de la PARP clivées. (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités phospho-tau détectées par western-blots. Les niveaux de tau ont été normalisés par rapport à tau totale. (C) Analyse semi-quantitative par western-blot de la caspase-3 et de la PARP clivées. La β-actine a été utilisée comme témoin de charge. (D) Analyse semi-quantitative par western-blots de la caspase-3 et de la PARP clivées. La β-actine a été utilisée comme témoin de charge. (E) Quantification *in situ* de l'apoptose neuronale détectée par immunofluorescences de la caspase-3 et de la PARP clivées, combinée à l'analyse de la fragmentation nucléaire détectée par le DAPI. Cont: contrôle. Ros. : (R)-roscovitine. CR8 : (R)-CR8. *** $p < 0,001$ comparé aux contrôles. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparé à l'OKA seul. NS: statistiquement non significatif.

Nous avons ensuite testé les effets de l'inhibition de CDK5 et DYRK1A dans l'induction de la phosphorylation de tau et de la mort cellulaire par l'OKA. L'inhibition de CDK5 soit par la (*R*)-roscovitine (5 et 10 μ M) ou par (*R*)-CR8 (1 et 5 μ M) aussi bien que celle de DYRK1A par l'harmine (5 et 10 μ M) réduisent significativement la phosphorylation de tau induite par l'OKA aux sites AT-8 et T212 (Figure 70B et C). De même, l'inhibition de DYRK1A par l'harmine réduit significativement la phosphorylation de tau induite par l'OKA au site Tau-1 (Figure 70B et C). Toutefois, à l'inverse de ce qui a été observé avec l'inhibition de la GSK3 β , ni l'inhibition de la CDK5, ni celle de la DYRK1A ne sont capables de bloquer l'augmentation de la phosphorylation de tau induite par l'OKA au site 12E8. L'analyse par western-blot et immunofluorescence des caspase-3 et PARP clivées montre nettement que la (*R*)-roscovitine, le (*R*)-CR8 et l'harmine n'apportent pas de protection neuronale contre l'apoptose induite par l'OKA (Figure 70B, D et E).

F. L'INHIBITION MOLECULAIRE DE LA GSK3 β PAR HSiRNA INDUIT LE BLOCAGE DE L'APOPTOSE NEURONALE INDUITE PAR L'OKA

Afin d'apporter de nouvelles preuves quant à l'effet neuroprotecteur de l'inhibition de la GSK3 β , nous avons testé par western-blots l'effet de l'inhibition moléculaire de la GSK3 β par hsiRNA sur notre modèle d'induction de l'apoptose neuronale par l'OKA. Pour cela, nous avons exposé deux populations polyclonales de neuroblastome humain SH-SY5Y ont été exposées à 25 nM d'OKA ou non. Nous avons vérifié les niveaux de GSK3 β , puis ceux de la caspase-3 clivée comme marqueur d'apoptose (Figure 71A). La quantification des immunoréactivités relatives de la GSK3 β montre une réduction significative du taux de GSK3 β de $43,5 \pm 5,7$ % ($p < 0,01$ par rapport à la population polyclonale transfectée par le vecteur mU6-pro ; Figure 71A et B). L'exposition de ces deux populations polyclonales à 25 nM d'OKA entraîne une augmentation du clivage de la caspase-3 de 1,9 pour la population ayant intégrée le vecteur mU6-pro et à 1,4 fois du contrôle pour la population ayant intégrée le vecteur mU6-pro-GSK3 β HP2 (Figure 71C). Ces données montrent un blocage partiel (environ 56%) de l'apoptose induite par l'OKA. Comme les expériences n'ont pu être réalisées qu'en duplicate, aucune donnée n'a encore montrée de significativité (Figure 71B et C).

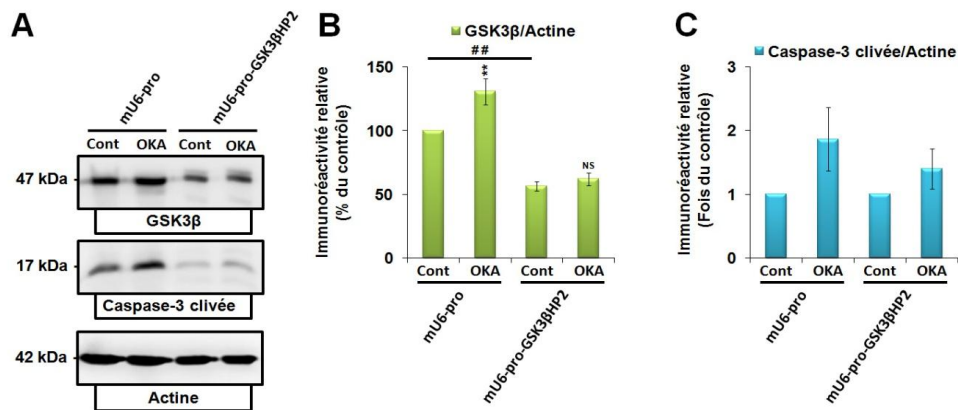


Figure 71. **L'inhibition moléculaire de la GSK3β par hsiRNA bloque partiellement l'apoptose neuronale induite par l'OKA.** Les populations polyclonales de neuroblastome humain SH-SY5Y mU6-pro et mU6-pro-GSK3βHP2 ont été exposées à 25 nM d'OKA pendant 16 h. (A) Western-blots de la GSK3β totale et de la caspase-3 clivée, comme marqueur d'apoptose. (B) Quantification des immunoréactivités relatives de la GSK3β. (C) Quantification des immunoréactivités relatives de la caspase-3 clivée. Cont : contrôle ; OKA : OKA 25 nM. $**p < 0,01$ par rapport au contrôle. $^{##}p < 0,01$ par rapport à la population polyclonale transfectée par le vecteur mU6-pro. NS : non significatif.

A l'aide de ces expériences, nous avons observé que l'utilisation de 25 nM d'OKA pendant 16 h sur la lignée de neuroblastome SH-SY5Y entraîne une augmentation de $30,7 \pm 10,0 \%$ ($**p < 0,01$ par rapport au contrôle) du niveau de GSK3β totale dans la lignée polyclonale transfectée par le vecteur mU6-pro seul (Figure 71A et B).

G. CONCLUSIONS : LA GSK3B EST SPECIFIQUEMENT IMPLIQUEE DANS L' APOPTOSE NEURONALE INDUITE PAR L' OKA

Par cette étude, nous avons démontré dans des cultures corticales de neurones que **l'inhibition spécifique pharmacologique de la GSK3 β bloque la phosphorylation de tau** et bloque l'**apoptose neuronale** induites par l'OKA. De même, l'inhibition moléculaire de la GSK3 β par hsiRNA bloque l'apoptose induite par l'OKA.

Comme l'inhibition de CDK5 par la (*R*)-roscovitine ou par le (*R*)-CR8, ou celle de DYRK1A par l'harmine, à des concentrations non toxiques et agissant sur la phosphorylation de tau, ne protègent pas contre l'apoptose induite par l'OKA, nous avons mis en évidence que la **GSK3 β était sélectivement impliquée** dans la neuroprotection neuronale contre l'apoptose induite par l'OKA.

Nous avons également mis en évidence le **potentiel neuroprotecteur d'un nouvel inhibiteur de la GSK3 β , le 6-BIBEO**, un dérivé du 6-BIO qui est beaucoup moins toxique que ce dernier. Les propriétés neuroprotectrices de cet inhibiteur méritent d'être testées dans un modèle de tauopathie *in vivo*.

3^{ème} partie

IV. 6-BIDECO ET 6-BIMYEO, DEUX NOUVELLES INDIRUBINES BLOQUENT LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET L'APOPTOSE INDUITE PAR L'INHIBITION DE LA PP2A

Les données expérimentales obtenues dans cette partie feront l'objet d'un article qui est en cours de préparation et qui s'intitulera « **6-BIDECO and 6-BIMYEO two novel indirubins and highly selective inhibitors of GSK3 β block tau phosphorylation and apoptosis induced by okadaic acid in cultured neurons** ».

A la suite de nos précédents résultats, nous avons cherché à déterminer si d'autres indirubines parmi les 25 restantes ciblent plus spécifiquement la GSK3 β que le 6-BIBEO et sont moins toxiques que le 6-BIO, possèdent un potentiel neuroprotecteur plus intéressant.

Parmi ces dérivés d'indirubines synthétisés par Vougiannopoulou et collaborateurs (Vougiannopoulou et al., 2008), nous en avons choisi deux en se basant sur leur sélectivité vis-à-vis de la GSK3 β par rapport aux kinases CDK1 et CDK5 et de leur faible toxicité sur le neuroblastome SH-SY5Y (Tableau 55).

Composés	GSK3 β	CDK1	CDK5	Toxicité SH-SY5Y
6-BIO	0,005	0,320	0,083	9
6-BIBEO	0,140	> 10	> 10	> 100
6-BIDECO	0,030	> 10	10	> 100
6-BIMYEO	0,110	1,80	0,90	74

Tableau 55. **Constantes d'inhibition du 6-BIO et de ses dérivés.** Les constantes d'inhibition sont exprimées en μ M. 6-BIDECO : 6-bromoindirubin-3'-[O-(N,N-diéthylcarbamyloxy)]-oxime. 6-BIMYEO : Hydrochlorure de 6-bromoindirubin-3'-[O-(2-morpholin-1-yléthyl)-oxime].

A. 6-BIDECO BLOQUE L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU ET L'APOPTOSE NEURONALE INDUITES PAR L'OKA

L'efficacité du 6-BIDECO (6-bromoindirubin-3'-[O-(N,N-diéthylcarbamyloxy)]-oxime), dans l'inhibition de la GSK3 β , a été vérifiée par l'analyse par western-blot (Figure 72A) de la phosphorylation de tau (Figure 72A) sur plusieurs sites phosphorylés par la GSK3 β : les sites AT-180 (reconnaissant les S231 et T235), 12E8 (S262 et dans une moindre mesure S356 lorsqu'elles sont phosphorylées), AT-8 (S202 et T205 lorsqu'elles sont phosphorylées) et Tau-1 (reconnaissant les S195, S198, S199 et S202 lorsqu'elles ne sont pas phosphorylées). L'analyse de la phosphorylation de tau par western-blot par plusieurs anticorps anti-phospho-tau (AT-180, 12E8, AT-8 et Tau-1) montrent que l'exposition de cultures de neurones corticaux à l'OKA entraîne une augmentation de la phosphorylation de tau à tous les sites examinés (Figure 72A). Ces western-blots réalisés avec les anticorps anti-phospho-tau montrent que l'exposition des cultures de neurones corticaux à l'OKA en présence de concentrations croissantes de 6-BIDECO (1,25 – 5 μ M, 8 h) entraîne une diminution dose-dépendante des immunoréactivités de tau phosphorylées sur les sites AT-180, 12E8 et AT-8. En revanche, aucune différence significative n'a été trouvée pour les immunoréactivités de l'anticorps Tau-1 (Figure 72B). Une diminution nette des immunoréactivités est observée à partir de 1,25 μ M d'OKA pour les sites AT-180 et AT-8, et à 5 μ M pour le site 12E8 (Figure 72B). Les immunoréactivités relatives de tau

phosphorylées détectées par AT-180 étaient de $5,0 \pm 0,3$ ($p < 0,001$) dans les conditions OKA 25 nM seul. Elles étaient de $2,7 \pm 0,3$ ($p < 0,001$, par rapport à l'OKA 25nM seul), $1,8 \pm 0,3$ et $1,8 \pm 0,3$ respectivement dans les conditions OKA 25 nM en présence de 6-BIDECO 1,25, 2,5 et 5 μM (Figure 72B). Celles détectées par l'anticorps 12E8 étaient de $3,5 \pm 0,3$ ($p < 0,001$) pour l'OKA seul. Elles étaient de $2,4 \pm 0,3$, $1,7 \pm 0,3$ ($p < 0,01$, par rapport au traitement à l'OKA 25 nM seul) et $1,8 \pm 0,4$ fois le niveau contrôle. Pour les sites détectés par l'anticorps AT-8, les immunoréactivités phospho-tau étaient de $3,7 \pm 0,3$ ($p < 0,001$) pour l'OKA seul et de $3,0 \pm 0,3$ ($p < 0,01$), $2,8 \pm 0,4$ et $2,0 \pm 0,4$ ($p < 0,05$) dans les conditions OKA 25 nM en présence de 6-BIDECO 1,25, 2,5 et 5 μM . Les immunoréactivités de tau déphosphorylée détectée par l'anticorps Tau-1 étaient similaires entre les différentes conditions de traitement (Figure 72B). Ces résultats suggèrent que même à 1,25 μM , 6-BIDECO est efficace sur la phosphorylation de la protéine tau, au moins pour le site AT-180.

L'analyse semi-quantitative de la caspase-3 clivée montre que pour la présence d'OKA seul, le niveau de clivage de la caspase-3 est de $3,4 \pm 0,4$ ($p < 0,001$; Figure 72A et C). 6-BIDECO bloque l'augmentation de l'immunoréactivité de la caspase-3 clivée induite par 25 nM d'OKA. Les immunoréactivités de la caspase-3 clivée obtenues avec des concentrations croissantes de 6-BIDECO (1,25 - 5 μM , 8 h) en présence de 25 nM d'OKA étaient $1,8 \pm 0,2$ ($p < 0,05$, par rapport au traitement à l'OKA 25nM seul), $1,6 \pm 0,3$ ($p < 0,01$, par rapport au traitement à l'OKA 25nM seul) et $1,6 \pm 0,3$ (Figure 72C).

Ces données indiquent que le 6-BIDECO aux concentrations que nous avons appliquées (1,25 - 5 μM , 8 h) est efficace pour l'inhibition de la GSK3 β . L'étude morphologique et l'analyse de la caspase-3 clivée, comme indicateurs d'apoptose neuronale, montre que dans nos conditions expérimentales, le 6-BIDECO bloque significativement l'apoptose neuronale induite par l'OKA.

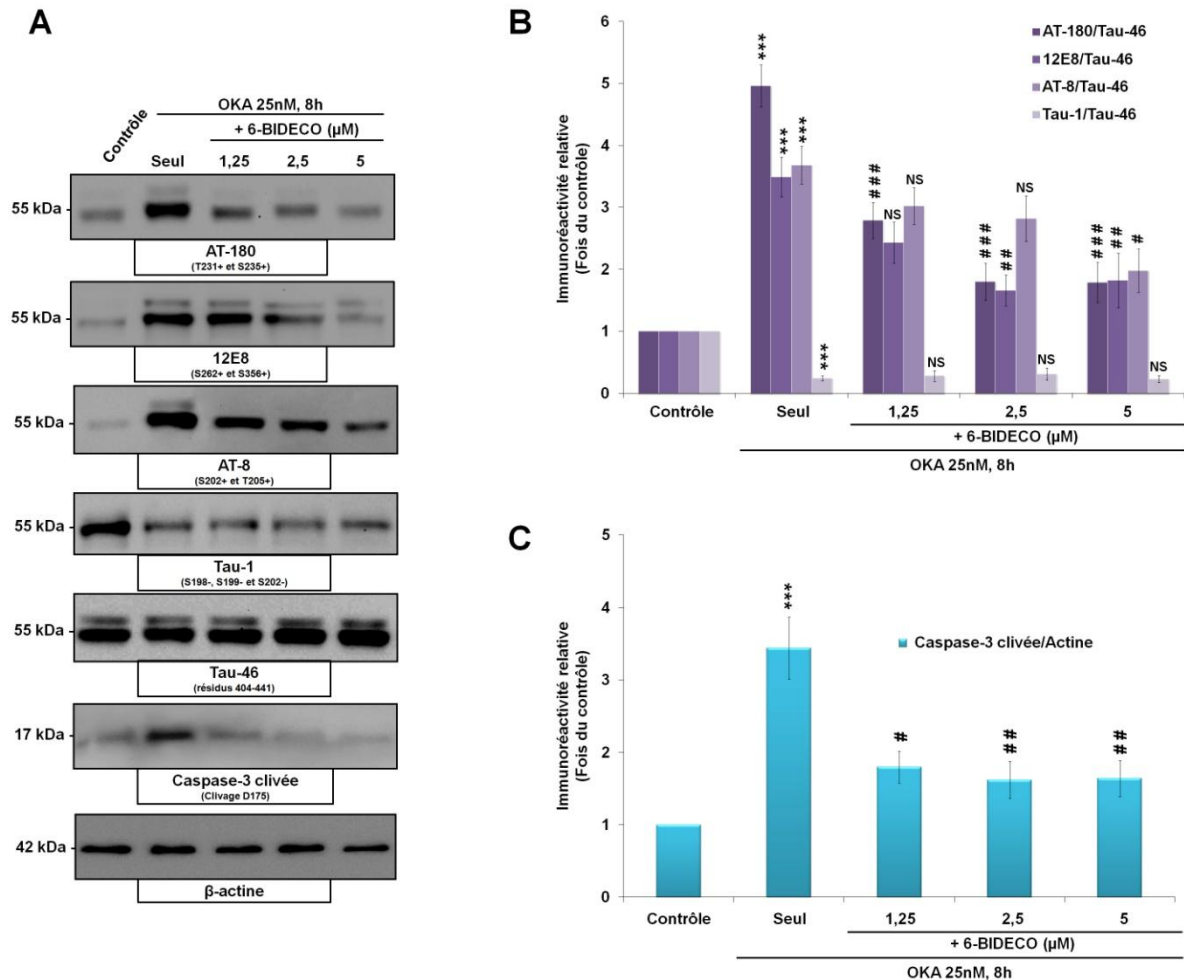


Figure 72. **L'inhibition de la GSK3 β par le 6-BIDEKO inverse l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA.** Les cultures primaires corticales ont été exposées à 25 nM d'OKA seul et en présence de concentrations croissantes de 6-BIDEKO (1,25, 2,5 et 5 μ M). La phosphorylation de tau a été analysée par western-blots à l'aide d'anticorps anti-phospho-tau. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée (D175) par western-blots. (A) Analyse par western-blots de la phosphorylation de tau et de l'apoptose. Tau phosphorylée (+) et non phosphorylée (-) ont été détectées par les anticorps phospho-dépendants anti-tau AT-180 (tau phosphorylée sur les T231 et S235), 12E8 (tau phosphorylée sur S262 et dans une moindre mesure sur S356), AT-8 (tau phosphorylée sur S202 et T205) et Tau-1 (tau déphosphorylée sur S195, S198, S199 et S202). Tau totale (phosphorylée et non phosphorylée) a été détecté par Tau-46. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée. (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités phospho-tau détectées par western-blots. Les niveaux de tau ont été normalisés par rapport à Tau-46. (C) Analyse semi-quantitative par western-blot de la caspase-3 clivée. La β -actine a été utilisée comme témoin de charge. *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ par rapport à l'OKA seul. NS: non significatif.

A. 6-BIMYEO BLOQUE L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU ET L'APOPTOSE NEURONALE INDUITES PAR L'OKA

L'efficacité du composé salin 6-BIMYEO (Hydrochlorure de 6-bromoindirubin-3'-[O-(2-morpholin-1-yléthyl)-oxime], pour inhiber l'activité de la GSK3 β , a été vérifiée de la même manière que pour 6-BIDEKO par western-blot (Figure 73A). L'analyse de la phosphorylation de tau par western-blot à l'aide des mêmes anticorps

anti-phospho-tau (AT-180, 12E8, AT-8 et Tau-1) montre que l'exposition de cultures de neurones à l'OKA provoque une augmentation de la phosphorylation de tau sur les sites AT-180, 12E8 et AT-8 (Figure 73A). Le 6-BIMYEO (1,25 - 5 μ M, 8 h) bloque de façon dose-dépendante la phosphorylation de tau sur les différents sites analysés. Comme précédemment, aucune différence significative n'a été trouvée pour les immunoréactivités de l'anticorps Tau-1 (Figure 73B) Une diminution nette des immunoréactivités de phospho-tau est observée à partir de 1,25 μ M d'OKA pour le site AT-180, et 5 μ M pour les sites 12E8 et AT-8 (Figure 73B). Les immunoréactivités relatives détectées par AT-180 étaient $4,7 \pm 0,2$ ($p < 0,001$) pour l'OKA seul et de $2,3 \pm 0,5$ ($p < 0,01$), $1,5 \pm 0,1$ ($p < 0,001$) et $1,6 \pm 0,5$ dans les conditions OKA 25 nM en présence de 6-BIMYEO 1,25, 2,5 et 5 μ M. Celles détectées par l'anticorps 12E8 étaient de $3,5 \pm 0,3$ ($p < 0,001$) pour l'OKA seul. Elles étaient de $2,8 \pm 0,3$, $2,3 \pm 0,3$ et $2,1 \pm 0,4$ fois le niveau contrôle ($p < 0,05$) dans les conditions OKA 25 nM en présence de 6-BIMYEO 1,25, 2,5 et 5 μ M. Pour l'anticorps AT-8 elles étaient de $3,6 \pm 0,1$ ($p < 0,001$) pour l'OKA seul et de $2,8 \pm 0,3$, $2,1 \pm 0,3$ ($p < 0,01$) et $1,9 \pm 0,3$ fois le niveau contrôle ($p < 0,05$) lorsque nous avons ajouté des doses croissantes de 6-BIMYEO (1,25, 2,5 et 5 μ M, 8 h) à l'OKA 25 nM. Les immunoréactivités détectées par l'anticorps Tau-1 étaient similaires pour les conditions présentant 25 nM d'OKA (Figure 73B). Ces résultats suggèrent que 6-BIMYEO est efficace sur la phosphorylation de la protéine tau à la première concentration utilisée (1,25 μ M), au moins pour le site AT-180.

L'analyse semi-quantitative de la caspase-3 clivée montre que la présence d'OKA seul est de $3,4 \pm 0,4$ fois le niveau des contrôles ($p < 0,001$; Figure 73A et C). De plus, l'ajout de 6-BIMYEO prévient l'augmentation induite par 25 nM d'OKA de l'immunoréactivité de la caspase-3 clivée. Les immunoréactivités de la caspase-3 clivée obtenues avec des concentrations croissantes de 6-BIMYEO (1,25, 2,5 et 5 μ M, 8 h) en présence de 25 nM d'OKA étaient de $1,5 \pm 0,4$ ($p < 0,01$), $1,3 \pm 0,4$ et $1,3 \pm 0,4$ fois du contrôle (Figure 73C).

Ces données indiquent que le 6-BIMYEO aux concentrations que nous avons appliquées (1,25 - 5 μ M, 8 h) est efficace dans l'inhibition de la GSK3 β . L'étude morphologique et l'analyse de la caspase-3 clivée, comme indicateurs d'apoptose neuronale, montrent que dans nos conditions expérimentales, le 6-BIMYEO bloque l'apoptose neuronale induite par l'OKA.

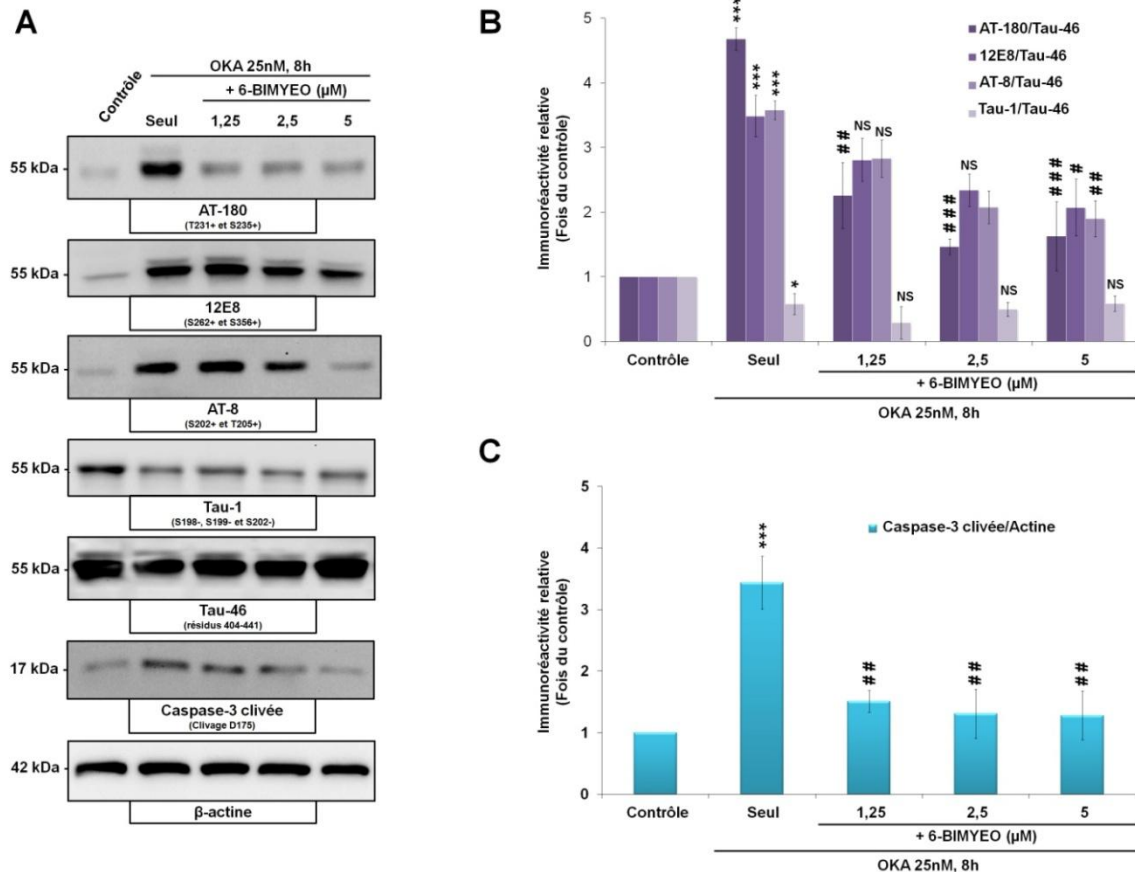


Figure 73. **L'inhibition de la GSK3 β par le 6-BIMYEO inverse l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA.** Les cultures primaires corticales ont été exposées à 25 nM d'OKA seul et en présence de concentrations croissantes de 6-BIMYEO (1,25, 2,5 et 5 μ M, 8 h). La phosphorylation de tau a été analysée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-phospho-tau. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée (D175) par western-blots. (A) Analyse par western-blots de la phosphorylation de tau et de l'apoptose. Tau phosphorylée (+) et non phosphorylée (-) ont été détectées par les anticorps phospho-dépendants anti-tau AT-180 (tau phosphorylée sur les T231 et S235), 12E8 (tau phosphorylée sur S262 et dans une moindre mesure sur S356), AT-8 (tau phosphorylée sur S202 et T205) et Tau-1 (tau déphosphorylée sur S195, S198, S199 et S202). Tau totale (phosphorylée et non phosphorylée) a été détecté par Tau-46. L'apoptose a été analysée par la détection de la caspase-3 clivée. (B) Analyse semi-quantitative des immunoréactivités phospho-tau détectées par western-blots. Les niveaux de tau ont été normalisés par rapport à Tau-46. (C) Analyse semi-quantitative par western-blot de la caspase-3 clivée. La β -actine a été utilisée comme témoin de charge. *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ par rapport à l'OKA seul. NS: statistiquement non significatif.

B. 6-BIMYEO EST PLUS EFFICACE QUE 6-BIDECO POUR BLOQUER L'APOPTOSE INDUITE PAR L'OKA

L'analyse des immunoréactivités de la caspase-3 clivée (Figure 72C et Figure 73C) montre une meilleure efficacité de l'inhibiteur 6-BIMYEO. Afin de vérifier lequel de ces 2 inhibiteurs de la GSK3 β est le plus intéressant pour bloquer l'apoptose induite par l'OKA, nous avons réalisé des immunofluorescences et quantifié la fragmentation de la chromatine à l'aide d'un marquage au DAPI, ainsi que le nombre de cellules positives pour la caspase-3 clivée (Figure 74).

En présence de 25 nM d'OKA pendant 8 h, le taux de cellules avec un noyau fragmenté est de $5,4 \pm 0,4$ ($p < 0,001$, par rapport aux contrôles auxquels nous avons attribué de façon arbitraire la valeur 1). Ce taux est respectivement réduit à $2,7 \pm 0,5$ ($p < 0,01$, par rapport à l'OKA 25 nM), $2,2 \pm 0,2$ et $1,3 \pm 0,2$ fois le niveau contrôle ($p < 0,001$) en présence de 1,25, 2,5 et 5 μM de 6-BIDECO (Figure 74B). Lorsque nous appliquons l'inhibiteur 6-BIMYEO de la même manière le taux de cellules avec de la chromatine fragmentée est réduit à $2,4 \pm 0,7$ ($p < 0,01$, par rapport à l'OKA 25 nM), $2,0 \pm 0,4$ ($p < 0,001$) et $1,5 \pm 0,1$ (Figure 74C).

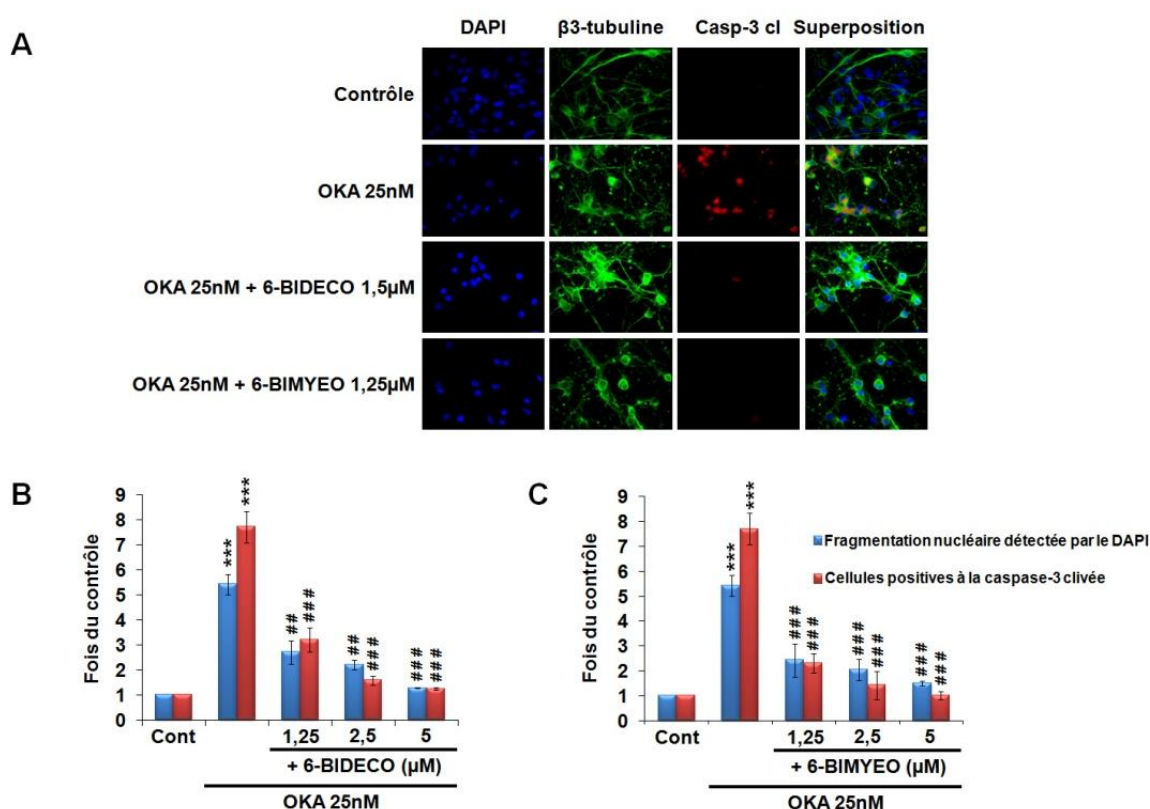


Figure 74. **Blocage de l'apoptose induite par l'OKA par les composés 6-BIDECO et 6-BIMYEO.** (A) Photomicrographies des doubles immunofluorescences de la caspase-3 clivée (Casp-3 cl, en rouge) et de la β -tubuline (en vert) combiné au marquage du noyau par le DAPI (en bleu). (B) et (C) Quantifications *in situ* de l'apoptose neuronale détectée par immunofluorescences de la caspase-3 clivée, combinées à l'analyse de la fragmentation nucléaire détectée par le DAPI. Cont: contrôle. *** $p < 0,001$ par rapport aux contrôles. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ par rapport à l'OKA seul.

En présence d'OKA 25 nM, le taux de cellules positives pour le clivage de la caspase-3 est de $7,7 \pm 0,6$ fois le taux contrôle ($p < 0,001$). L'ajout de 6-BIDECO à 25 nM d'OKA réduit respectivement le taux de cellules caspase-3 positives à $3,2 \pm 0,5$ ($p < 0,001$, par rapport à l'OKA 25 nM), $1,6 \pm 0,2$ et $1,2 \pm 0,1$ pour les concentrations 1,25, 2,5 et 5 μM de 6-BIDECO (Figure 74A et B). Ces taux étaient de $2,3 \pm 0,4$ ($p < 0,001$, par rapport à l'OKA 25 nM), $1,4 \pm 0,6$ et $1,0 \pm 0,2$ pour les mêmes concentrations de 6-BIMYEO (Figure

74A et C). Ces données indiquent que l'inhibiteur 6-BIMYEO est légèrement plus efficace que le 6-BIDECO pour le blocage de l'apoptose induite par l'OKA.

C. CONCLUSIONS : L'UTILISATION DES DERIVES DU 6-BIO, 6-BIDECO ET 6-BIMYEO EST EFFICACE DANS LE BLOCAGE DE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'OKA

Par cette étude, nous avons démontré dans des cultures corticales de neurones que les petites molécules dérivées du 6-BIO, 6-BIDECO et 6-BIMYEO, spécifiques de la GSK3 β et non toxiques (contrairement au 6-BIO) bloquent la phosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA. De plus, en dépit de leurs constantes d'inhibition (voir Tableau 55), le composé 6-BIMYEO est légèrement plus efficace dans le blocage de l'apoptose neuronale induite par l'OKA.

DISCUSSION

L'hyperphosphorylation de tau résulte d'un déséquilibre de la balance kinase-phosphatase. Dans les cerveaux Alzheimer, les activités enzymatiques des phosphatases PP2A et PP5 sont respectivement diminuées de 50 et 20 % (Gong et al., 1993, Liu et al., 2005a, Liu et al., 2005b, Chen et al., 2008). Dans ces cerveaux, l'inhibition des phosphatases intervient de façons directe et indirecte. La phosphorylation inhibitrice de la PP2A en Y307 sur sa sous-unité catalytique est présente dans les cerveaux Alzheimer (Liu et al., 2008) et une augmentation de 20 % du taux des inhibiteurs de la PP2A, I_1^{PP2A} et I_2^{PP2A} , est trouvée (Tanimukai et al., 2005, Chen et al., 2008, Tanimukai et al., 2009). A l'inverse, la dérégulation de kinases entraîne l'hyperphosphorylation des protéines tau. En particulier, l'activité enzymatique de la GSK3 β est augmentée dans les cerveaux Alzheimer (Leroy et al., 2002, Leroy et al., 2007). Dans ces cerveaux, l'hyperphosphorylation de tau est positivement corrélée à la sévérité de la démence (Augustinack et al., 2002) et les forts taux de protéines tau hyperphosphorylées retrouvés dans le LCR des patients Alzheimer constituent un bon indice pronostique pour évaluer la gravité de la neurodégénérescence (Hampel et al., 2004, Buerger et al., 2006, Bain et al., 2007). D'autre part, l'hyperphosphorylation de tau et la présence de la GSK3 β seraient essentielles à la neurotoxicité induite par le peptide A β (Takashima et al., 1993, Rapoport et al., 2002). La GSK3 β est requise et suffisante pour induire l'agrégation de tau (Nuydens et al., 1995, Rankin et al., 2007, Sahara et al., 2008). La GSK3 β et la PP2A co-localisent dans les PHFs des cerveaux Alzheimer (Planel et al., 2001). Ces données montrent que l'hyperphosphorylation de tau est un médiateur clé dans le mécanisme sous-jacent à la dégénérescence neuronale observée dans la maladie d'Alzheimer et les autres tauopathies (Iqbal and Grundke-Iqbal, 1991, Wittmann et al., 2001, Rapoport et al., 2002, Santacruz et al., 2005, Roberson et al., 2007). Il faut cependant signaler qu'il a été suggéré que la formation des agrégats de tau serait une réponse neuroprotectrice adaptative à l'hyperphosphorylation de tau (Keck et al., 2003, Ren et al., 2007).

La maladie d'Alzheimer se déroule séquentiellement : l'hyperphosphorylation de tau est suivie d'une accumulation de tau sous forme d'agrégats, qui sont ensuite ubiquitinylés et s'accumulent. Pour stopper la maladie d'Alzheimer, les stratégies thérapeutiques envisagées sont soit de réduire le niveau de protéine tau *per se*, réduisant ainsi le niveau de protéines tau pouvant être phosphorylées et donc pouvant s'agréger ; soit de réduire l'hyperphosphorylation de tau, empêchant ainsi la formation d'agrégats de tau ; soit d'activer un mécanisme de dégradation des agrégats protéiques (Figure 75).

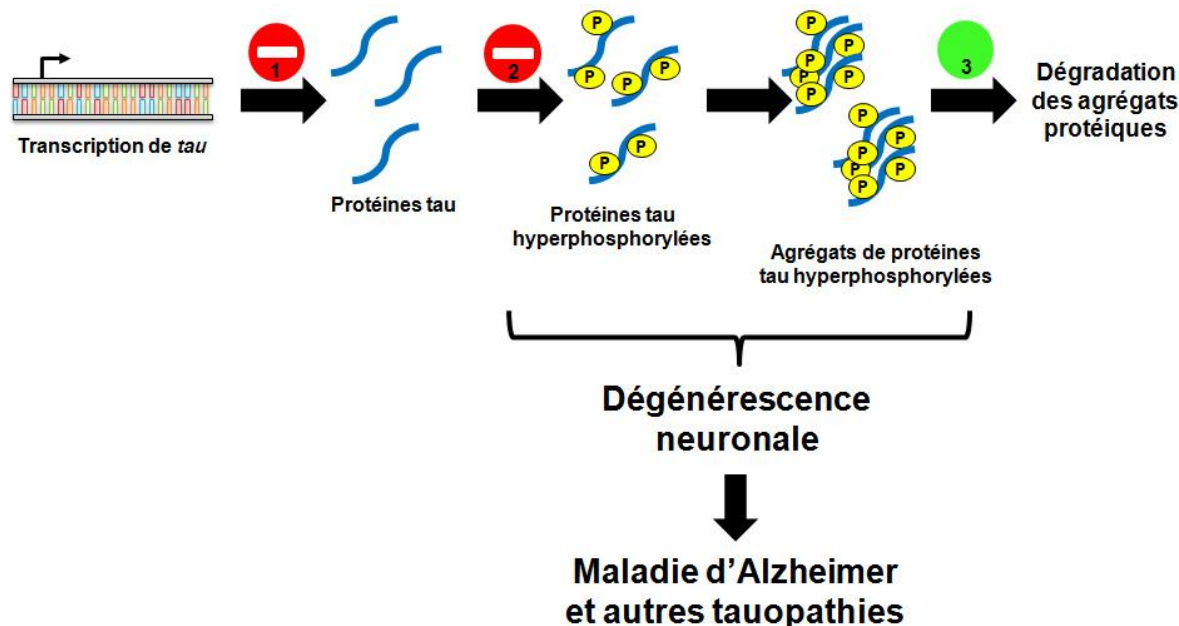


Figure 75. Stratégies thérapeutiques envisagées contre les tauopathies.

Pour la première stratégie thérapeutique, nous avons mis en évidence que l'inhibition de la GSK3 β entraînait une réduction des niveaux de protéines tau (Martin et al., 2009). En effet, l'inhibition tant pharmacologique que moléculaire de la GSK3 β entraîne de manière spécifique une diminution des niveaux de la protéine tau. A l'inverse, la sur-expression moléculaire de la GSK3 β induit une augmentation des niveaux de tau. De plus, l'inhibition de la PP2A par l'OKA bloque la diminution des niveaux de tau induite par le lithium. Ces données indiquent que la PP2A est spécifiquement impliquée dans la diminution des niveaux de tau induite par le lithium. Ces résultats montrent que la GSK3 β régule les niveaux protéiques et de phosphorylation de tau dans les neurones et que les effets induits par la GSK3 β sont bloqués par la PP2A (Martin et al., 2009). Etant donné que l'inhibition de la GSK3 β entraîne une réduction des niveaux de tau, nous avons cherché à savoir si la suppression endogène de tau bloquait l'apoptose. Les premiers résultats montrent que cette suppression chez des souris entraîne une réduction de l'apoptose induite par l'OKA de 56 %. La confirmation de ces résultats par d'autres techniques d'analyse de l'apoptose, comme l'immunofluorescence ou la cytométrie en flux, devra être réalisée. Ces données préliminaires sont en accord avec une étude récente démontrant que la suppression de tau réduit la dégénérescence hippocampique et les déficits d'apprentissage induit par la GSK3 β (Gomez de Barreda et al., 2010).

La seconde stratégie thérapeutique consiste à bloquer l'hyperphosphorylation de tau dans un modèle de perte neuronale. Nous avons donc conçu un modèle de tauopathie *in vitro* utilisant l'OKA, un inhibiteur classique de la PP2A (et de la PP5) (Messner et al., 2006).

Ces deux enzymes ont des activités réduites dans les cerveaux Alzheimer, et leur inhibition conduit à l'hyperphosphorylation de tau (Liu et al., 2005b, Bertoli et al., 2009, Chen et al., 2009, Sanchez-Ortiz et al., 2009). Il a été rapporté que l'OKA stimule également l'agrégation du peptide A β , la dégénérescence neuronale et la perte synaptique, des traits neuropathologiques observés dans la maladie d'Alzheimer (Sun et al., 2003). Notre modèle *in vitro* de pathologie de tau, consistant à exposer des cultures de neurones corticaux *in vitro* à 25 nM d'OKA, montre une hyperphosphorylation de tau suivie d'une apoptose neuronale. Ce modèle, bien qu'*in vitro*, est en accord avec les données obtenues chez les souris transgéniques exprimant un dominant négatif de la sous-unité catalytique de la PP2A, montrant une hyperphosphorylation de tau et une dégénérescence neuronale (Kins et al., 2001).

Ce modèle *in vitro* de tauopathie nous a permis d'identifier la GSK3 β comme cible pharmacologique impliquée dans le blocage de l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale induites par l'OKA. De même, l'inhibition moléculaire de la GSK3 β par hsiRNA bloque l'apoptose induite par l'OKA. *A contrario*, l'inhibition pharmacologique de la CDK5 par la (*R*)-roscovitine ou par le (*R*)-CR8, et l'inhibition de DYRK1A par l'harmine, à des concentrations agissant sur la phosphorylation de tau, n'ont pas montré de potentiel neuroprotecteur contre l'apoptose induite par l'OKA. Nous avons donc mis en évidence que la GSK3 β était sélectivement impliquée dans la neuroprotection contre l'apoptose induite par l'OKA. Ces données sont en accord avec le fait que la sur-expression de la GSK3 β accélère la pathologie de tau (Terwel et al., 2008). D'autre part, nous avons observé que l'utilisation de 25 nM d'OKA pendant 8 h sur la lignée de neuroblastome humain SH-SY5Y entraîne une augmentation d'environ 30 % du niveau de la GSK3 β totale. Ces données suggèrent que la PP2A pourrait agir en amont de la GSK3 β en régulant l'activité de la GSK3 β . L'ensemble de ces résultats confirment l'implication spécifique et sélective de la GSK3 β dans l'apoptose induite par l'OKA.

Afin de tester des composés à visée thérapeutique et suite à l'identification de la GSK3 β comme cible thérapeutique, nous avons identifiés trois dérivés d'indirubines (6-BIBEO, 6-BIDECO et 6-BIMYEO), inhibant la GSK3 β et ayant un potentiel neuroprotecteur accru contre l'apoptose induite par l'OKA. Ces composés ont l'avantage d'être beaucoup moins toxique que le 6-BIO (toxique à 9 μ M sur le neuroblastome humain SH-SY5Y). Le composé 6-BIMYEO semble avoir le potentiel neuroprotecteur le plus prometteur. Par la suite, le potentiel neuroprotecteur de ces composés dans des modèles *in*

vivo devra être évalué. Ces composés pourront être testés dans des modèles de souris transgéniques possédant des hsiRNA inductibles dirigés spécifiquement contre la sous-unité catalytique (ou structurale) de la PP2A. Ces deux précautions permettraient de bloquer spécifiquement l'action de la PP2A à des taux variables et sur une durée déterminée. Une étude sur plusieurs mois voire années pourra également être envisagée afin d'observer les effets d'une inhibition chronique de la PP2A. La détermination du potentiel neuroprotecteur de ces composés au long terme sera alors d'un grand intérêt.

Finalement, dans notre étude, nous avons toujours observé que la GSK3 β agissait de façon antagoniste à la PP2A, et ce, aussi bien pour la régulation de la phosphorylation de tau, que pour la régulation des niveaux protéiques de tau. Ces données montrent l'importance des couplages PP2A-GSK3 β , GSK3 β -tau et tau-PP2A dans la maladie d'Alzheimer. Comme des AMMs pour les inhibiteurs de kinases ont déjà été délivrées, et en raison de la plus grande sélectivité des kinases (comparée aux phosphatases, PP2A régule 71 % des activités phosphatases cellulaires), l'inhibition spécifique de la GSK3 β , par des petites molécules passant la BHE telles que les dérivés du 6-BIO, est d'un grand intérêt. L'ensemble des données accumulées au cours de cette thèse soulignent l'importance de bloquer l'hyperphosphorylation de tau ou de diminuer directement le niveau de protéines tau. Ces stratégies thérapeutiques devraient réduire considérablement la formation des agrégats de tau.

En raison de la présence de NFTs et de l'hyperphosphorylation de tau dans les cerveaux Alzheimer, le niveau de tau est 8 fois plus important que dans les cerveaux témoins de même âge (Khatoon et al., 1992, Kopke et al., 1993). Si les deux premières stratégies thérapeutiques (réduction de l'hyperphosphorylation de tau et réduction du niveau de protéines tau) ne donnent pas de résultats satisfaisants, une troisième piste devra être envisagée. Elle consiste à stimuler la dégradation des agrégats protéiques de tau générés par la dérégulation de la balance cellulaire kinase-phosphatase. Les mécanismes de dégradation de la cellule sont le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie. Les agrégats protéiques de tau sont ubiquitinylés mais le protéasome, qui voit son activité diminuée au cours du vieillissement cellulaire normal, ne prend pas en charge ces agrégats (Shaw and Chau, 1988, Baner et al., 1989, Cripps et al., 2006, Riederer et al., 2009). La stimulation de ce processus ne semble pas d'un intérêt majeur aux stades où ces agrégats sont présents. La stimulation du second processus, l'autophagie, semble plus prometteuse (Nixon, 2007, Ling and Salvaterra, 2009). Parmi les inhibiteurs de la GSK3 β , le lithium, bien que le moins

spécifique, en raison de son AMM et la possibilité d'une éventuelle extension, est hautement étudié et a été montré comme inducteur du processus autophagique (Sarkar et al., 2005). L'OKA produisant des agrégats de protéines tau, et le lithium les dégradants, cela pourrait expliquer en partie le rôle neuroprotecteur de la GSK3 β . Dans notre modèle *in vitro*, la formation des agrégats de tau par l'OKA pourrait être évaluée, et l'induction de la dégradation de ceux-ci par les nouveaux composés, dérivés du 6-BIO, devra être recherchée. Dans le cas où le mécanisme autophagique est identifié pour son rôle neuroprotecteur, la recherche de composés stimulant le processus autophagique pourra également être envisagée. La stimulation du processus pourra en particulier s'effectuer par un inducteur connu et puissant de l'autophagie, possédant déjà une AMM, la rapamycine.

D'autre part, avant son agrégation, la dégradation de tau peut être réalisée par le protéasome de façon dépendante (Morishima-Kawashima et al., 1993) ou indépendante de l'ubiquitine (Cardozo and Michaud, 2002, Baki et al., 2004). Pour cette dernière, la protéine tau est phosphorylée par la GSK3 β , provoquant la fixation de la protéine chaperonne Hsp70 à tau activant ainsi la dégradation de tau par l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (Carrettiero et al., 2009, Kon and Cuervo, 2010). L'étude des connections entre protéines tau, GSK3 β et autophagie dépendante ou indépendante (macroautophagie) des protéines chaperonnes sera la suite logique de ce travail. L'utilisation d'un modèle inductible d'inhibition de la PP2A permettra de cribler de nouveaux composés dégradant les agrégats de protéines tau. L'utilisation d'un modèle d'inhibition moléculaire de la GSK3 β permettra également d'identifier le rôle de la GSK3 β dans l'autophagie.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons démontré que : la GSK3 β et la PP2A agissent sur les niveaux des protéines tau dans les neurones ; la GSK3 β était sélectivement impliquée dans la neuroprotection contre l'apoptose induite par l'OKA ; les nouveaux inhibiteurs 6-BIBEO, 6-BIDECO et 6-BIMYEO protègent de l'apoptose neuronale induite par l'OKA et que la suppression de la protéine tau protège de l'apoptose induite par l'OKA. Ces données suggèrent qu'il serait intéressant de tester d'autres dérivés du 6-BIO afin d'évaluer leur potentiel neuroprotecteur, et de trouver un inhibiteur bloquant l'apoptose neuronale spécifiquement. Si un ou plusieurs inhibiteur(s), inverse(nt) totalement le niveau de phosphorylation de tau et bloque(nt) l'intégralité de l'apoptose neuronale induite par l'OKA, cet ou ces inhibiteur(s) pourront être alors testé dans un modèle *in vivo* de tauopathies. D'autre part, générer un modèle *in vivo* d'inhibition de la PP2A permettrait de cribler de nombreux composés pharmacologiques concernant leur potentiel neuroprotecteur.

Ces travaux montrent dans leur globalité l'implication capitale de la GSK3 β dans un modèle *in vitro* de tauopathie. De plus, cette étude bibliographique associée à celle du Dr D. Hanger (Hanger et al., 2009) sur les sites de phosphorylations de tau retrouvés exclusivement chez les patients Alzheimer, montre que les principales kinases de tau sont la GSK3 β , la CK1 et la p38.

D'autre part, l'action des peptides amyloïdes sur les voies de signalisation cellulaire de l'insuline (Townsend et al., 2007, Lee et al., 2009) ou Wnt/ β -caténine (Magdesian et al., 2008) augmente le niveau de protéines GSK3 β actives, et par conséquent la phosphorylation de la protéine tau (Hernandez et al., 2009a). Ces données indiquent que la GSK3 β pourrait être le lien entre peptides A β et protéine tau (Hernandez et al., 2009a). Identifier des composés neuroprotecteurs contre l'hyperphosphorylation de tau et l'apoptose neuronale spécifique impliquant la GSK3 β est d'une grande importance afin de combattre au niveau cellulaire les nombreuses tauopathies telles que la maladie d'Alzheimer.

L'étape suivant ce travail sera de déterminer d'une part par quels mécanismes cellulaires s'opère cette neuroprotection contre l'apoptose induite par l'inhibition de la PP2A. Les premiers mécanismes pouvant être testés pourront être l'autophagie (macroautophagie et autophagie régulée par les protéines chaperonnes). D'autre part, il serait intéressant de tester les différentes indirubines neuroprotectrices *in vitro* dans un modèle *in vivo* de souris tauopathiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16:3797-3804.1997).
- Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J, Binder LI (C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113 Pt 21:3737-3745.2000).
- Adamec E, Mohan P, Vonsattel JP, Nixon RA (Calpain activation in neurodegenerative diseases: confocal immunofluorescence study with antibodies specifically recognizing the active form of calpain 2. *Acta Neuropathol* 104:92-104.2002).
- Agarwal-Mawal A, Qureshi HY, Cafferty PW, Yuan Z, Han D, Lin R, Paudel HK (14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem* 278:12722-12728.2003).
- Ahmad KA, Wang G, Unger G, Slaton J, Ahmed K (Protein kinase CK2--a key suppressor of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* 48:179-187.2008).
- Albertella MR, Jones H, Thomson W, Olavesen MG, Campbell RD (Localization of eight additional genes in the human major histocompatibility complex, including the gene encoding the casein kinase II beta subunit (CSNK2B). *Genomics* 36:240-251.1996).
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541-6551.1996).
- Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S (Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* 13:1610-1619.1994).
- Ali A, Hoefflich KP, Woodgett JR (Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev* 101:2527-2540.2001).
- Alkon DL, Sun MK, Nelson TJ (PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 28:51-60.2007).
- Allan LA, Clarke PR (Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol Cell* 26:301-310.2007).
- Alvarez A, Toro R, Caceres A, Maccioni RB (Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* 459:421-426.1999).
- Alvarez AR, Sandoval PC, Leal NR, Castro PU, Kosik KS (Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid-beta-peptide and reactive oxygen species. *Neurobiol Dis* 17:326-336.2004).
- Alvarez M, Altafaj X, Aranda S, de la Luna S (DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol Biol Cell* 18:1167-1178.2007).
- Alzheimer A (Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat* 64:146-148.1907).

- Alzheimer A (Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Gesamte Neurol Psychiat* 4:356-385.1911).
- Amadoro G, Ciotti MT, Costanzi M, Cestari V, Calissano P, Canu N (NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2892-2897.2006).
- Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P (Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* 25:5446-5454.2005).
- Andrabi S, Gjoerup OV, Kean JA, Roberts TM, Schaffhausen B (Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19011-19016.2007).
- Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS (Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23:3585-3593.1995).
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31:10626-10633.1992).
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S, Nicotera P (Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett* 394:321-324.1996).
- Appelt DM, Kopen GC, Boyne LJ, Balin BJ (Localization of transglutaminase in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem* 44:1421-1427.1996).
- Arevalo MA, Rodriguez-Tebar A (Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3beta and stimulate axonal growth. *Mol Biol Cell* 17:3369-3377.2006).
- Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B (Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 61:673-682.1993).
- Arnold HK, Sears RC (A tumor suppressor role for PP2A-B56alpha through negative regulation of c-Myc and other key oncoproteins. *Cancer Metastasis Rev* 27:147-158.2008).
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.1992).
- Arroyo JD, Hahn WC (Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* 24:7746-7755.2005).
- Asai A, Qiu J, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, Kuchino Y, Kirino T (High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem* 274:34450-34458.1999).
- Asuni AA, Hooper C, Reynolds CH, Lovestone S, Anderton BH, Killick R (GSK3alpha exhibits beta-catenin and tau directed kinase activities that are modulated by Wnt. *Eur J Neurosci* 24:3387-3392.2006).
- Atzori C, Ghetti B, Piva R, Srinivasan AN, Zolo P, Delisle MB, Mirra SS, Migheli A (Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1190-1197.2001).

- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT (Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:26-35.2002).
- Avila J, Ulloa L, Gonzalez J, Moreno F, Diaz-Nido J (Phosphorylation of microtubule-associated proteins by protein kinase CK2 in neuritogenesis. *Cell Mol Biol Res* 40:573-579.1994).
- Ayllon V, Martinez AC, Garcia A, Cayla X, Rebollo A (Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *EMBO J* 19:2237-2246.2000).
- Bahl R, Bradley KC, Thompson KJ, Swain RA, Rossie S, Meisel RL (Localization of protein Ser/Thr phosphatase 5 in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 90:101-109.2001).
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408:297-315.2007).
- Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK (PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J* 23:2586-2596.2004).
- Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski HM (Tau and ubiquitin immunoreactivity at different stages of formation of Alzheimer neurofibrillary tangles. *Prog Clin Biol Res* 317:837-848.1989).
- Barclay JW, Aldea M, Craig TJ, Morgan A, Burgoyne RD (Regulation of the fusion pore conductance during exocytosis by cyclin-dependent kinase 5. *J Biol Chem* 279:41495-41503.2004).
- Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, Guido T, Hoenow K, Hu K, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee C, Lee M, Motter R, Nguyen M, Reed A, Schenk D, Tang P, Vasquez N, Seubert P, Yednock T (Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2023-2028.2003).
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T (Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6:916-919.2000).
- Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Jones RE, Kahana JA, Kral AM, Leander K, Lee LL, Malinowski J, McAvoy EM, Nahas DD, Robinson RG, Huber HE (Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J* 385:399-408.2005).
- Bartov O, Sultana R, Butterfield DA, Atlas D (Low molecular weight thiol amides attenuate MAPK activity and protect primary neurons from Abeta(1-42) toxicity. *Brain Res* 1069:198-206.2006).
- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336:417-424.1993).
- Bayascas JR, Alessi DR (Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell* 18:143-145.2005).

- Becker W, Joost HG (Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62:1-17.1999).
- Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirmbter K, Tejedor FJ, Joost HG (Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem* 273:25893-25902.1998).
- Beggs HE, Soriano P, Maness PF (NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* 127:825-833.1994).
- Behrend L, Milne DM, Stoter M, Deppert W, Campbell LE, Meek DW, Knippschild U (IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene* 19:5303-5313.2000).
- Benneicib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett* 485:87-93.2000).
- Benneicib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett* 490:15-22.2001).
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW (SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13681-13686.2001).
- Benton R, Palacios IM, St Johnston D (*Drosophila* 14-3-3/PAR-5 is an essential mediator of PAR-1 function in axis formation. *Dev Cell* 3:659-671.2002).
- Bertoli C, Copetti T, Lam EW, Demarchi F, Schneider C (Calpain small-1 modulates Akt/FoxO3A signaling and apoptosis through PP2A. *Oncogene* 28:721-733.2009).
- Bertram L, Tanzi RE (Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9:768-778.2008).
- Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, Ferandin Y, Endicott JA, Galons H, Meijer L (CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* 27:5797-5807.2008).
- Beurel E, Michalek SM, Jope RS (Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 31:24-31.2010).
- Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Declercq W, Van Lint J, Vandenamele P, Agostinis P, Vandenneede JR, Fiers W (Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. *J Biol Chem* 270:23293-23299.1995).
- Bhaskar K, Yen SH, Lee G (Disease-related modifications in tau affect the interaction between Fyn and Tau. *J Biol Chem* 280:35119-35125.2005).
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J (Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89:1313-1317.2004).
- Bhat RV, Leonov S, Luthman J, Scott CW, Lee CM (Interactions between GSK3beta and caspase signalling pathways during NGF deprivation induced cell death. *J Alzheimers Dis* 4:291-301.2002).
- Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM (Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11074-11079.2000).

- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-163.1993).
- Biessels GJ, Kappelle LJ (Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans* 33:1041-1044.2005).
- Bijur GN, Jope RS (Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 276:37436-37442.2001).
- Bikkavilli RK, Feigin ME, Malbon CC (p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt-beta-catenin signaling by inactivation of GSK3beta. *J Cell Sci* 121:3598-3607.2008).
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (Intraneuronal A-beta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45:675-688.2005).
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.1985).
- Blalock EM, Geddes JW, Chen KC, Porter NM, Markesbery WR, Landfield PW (Incipient Alzheimer's disease: microarray correlation analyses reveal major transcriptional and tumor suppressor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2173-2178.2004).
- Blomqvist ME, Reynolds C, Katzov H, Feuk L, Andreasen N, Bogdanovic N, Blennow K, Brookes AJ, Prince JA (Towards compendia of negative genetic association studies: an example for Alzheimer disease. *Hum Genet* 119:29-37.2006).
- Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, Herzog MC, Radde R, Staufenbiel M, Lewis J, Hutton M, Tolnay M, Jucker M (Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol* 171:2012-2020.2007).
- Boyle JM, Hey Y, Myers K, Stern PL, Grzeschik FH, Ikehara Y, Misumi Y, Fox M (Regional localization of a trophoblast antigen-related sequence and 16 other sequences to human chromosomes 6q using somatic cell hybrids. *Genomics* 12:693-698.1992).
- Braak H, Braak E (Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16:271-278; discussion 278-284.1995).
- Brandt R, Leger J, Lee G (Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.1995).
- Brasher BB, Van Etten RA (c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J Biol Chem* 275:35631-35637.2000).
- Brion JP, Anderton BH, Authalet M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, Octave JN, Pradier L, Touchet N, Tremp G (Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Biochem Soc Symp* 81-88.2001).
- Brown NR, Noble ME, Endicott JA, Johnson LN (The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1:438-443.1999).
- Buee-Scherrer V, Goedert M (Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett* 515:151-154.2002).
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.2000).

- Buerger K, Ewers M, Pirttila T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Soininen H, Hampel H (CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 129:3035-3041.2006).
- Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G, Tabaton M, Morbin M, Primavera A, Carella F, Solaro C, Grisoli M, Savoirdo M, Spillantini MG, Tagliavini F, Goedert M, Ghetti B (Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:667-677.1999).
- Bulic B, Pickhardt M, Schmidt B, Mandelkow EM, Waldmann H, Mandelkow E (Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:1740-1752.2009).
- Burger PC, Vogel FS (The development of the pathologic changes of Alzheimer's disease and senile dementia in patients with Down's syndrome. *Am J Pathol* 73:457-476.1973).
- Butler M, Shelanski ML (Microheterogeneity of microtubule-associated tau proteins is due to differences in phosphorylation. *J Neurochem* 47:1517-1522.1986).
- Butner KA, Kirschner MW (Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115:717-730.1991).
- Buttini M, Masliah E, Barbour R, Grajeda H, Motter R, Johnson-Wood K, Khan K, Seubert P, Freedman S, Schenk D, Games D (Beta-amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:9096-9101.2005).
- Cambiazo V, Gonzalez M, Maccioni RB (DMAP-85: a tau-like protein from *Drosophila melanogaster* larvae. *J Neurochem* 64:1288-1297.1995).
- Camins A, Verdaguer E, Folch J, Canudas AM, Pallas M (The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect* 19:453-460.2006).
- Campbell LE, Proud CG (Differing substrate specificities of members of the DYRK family of arginine-directed protein kinases. *FEBS Lett* 510:31-36.2002).
- Cancino GI, Toledo EM, Leal NR, Hernandez DE, Yevenes LF, Inestrosa NC, Alvarez AR (STI571 prevents apoptosis, tau phosphorylation and behavioural impairments induced by Alzheimer's beta-amyloid deposits. *Brain* 131:2425-2442.2008).
- Cantley LC, Neel BG (New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4240-4245.1999).
- Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P (Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci* 18:7061-7074.1998).
- Cardozo C, Michaud C (Proteasome-mediated degradation of tau proteins occurs independently of the chymotrypsin-like activity by a nonprocessive pathway. *Arch Biochem Biophys* 408:103-110.2002).
- Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, Caruso A, Storto M, Gaviraghi G, Terstappen GC, Nicoletti F (Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci* 24:6021-6027.2004).
- Carrettiero DC, Hernandez I, Neveu P, Papagiannakopoulos T, Kosik KS (The cochaperone BAG2 sweeps paired helical filament- insoluble tau from the microtubule. *J Neurosci* 29:2151-2161.2009).

- Celik HA, Kircelli F, Saydam G, Aydin HH (Potential involvement of serine/threonine protein phosphatases in apoptosis of HepG2 cells during selenite treatment. *Biol Trace Elem Res* 117:65-75.2007).
- Ceulemans H, Bollen M (Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84:1-39.2004).
- Chalecka-Franaszek E, Chuang DM (Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8745-8750.1999).
- Chalhoub N, Baker SJ (PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4:127-150.2009).
- Chang KH, de Pablo Y, Lee HP, Lee HG, Smith M, Shah K (Cdk5 is a Major Regulator of p38 Cascade: Relevance to Neurotoxicity in Alzheimer's Disease. *J Neurochem*.2010).
- Charest DL, Mordret G, Harder KW, Jirik F, Pelech SL (Molecular cloning, expression, and characterization of the human mitogen-activated protein kinase p44erk1. *Mol Cell Biol* 13:4679-4690.1993).
- Chatfield K, Eastman A (Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1313-1320.2004).
- Chauhan A, Chauhan VP, Murakami N, Brockerhoff H, Wisniewski HM (Amyloid beta-protein stimulates casein kinase I and casein kinase II activities. *Brain Res* 629:47-52.1993).
- Chen H, Antonarakis SE (Localisation of a human homologue of the *Drosophila* *mnf* and rat *Dyrk* genes to chromosome 21q22.2. *Hum Genet* 99:262-265.1997).
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360:674-677.1992).
- Chen J, Zhang Y, Kelz MB, Steffen C, Ang ES, Zeng L, Nestler EJ (Induction of cyclin-dependent kinase 5 in the hippocampus by chronic electroconvulsive seizures: role of [Delta]FosB. *J Neurosci* 20:8965-8971.2000).
- Chen L, Liu L, Yin J, Luo Y, Huang S (Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1284-1295.2009).
- Chen MX, Cohen PT (Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett* 400:136-140.1997).
- Chen S, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (I1PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 283:10513-10521.2008).
- Chen Z, Raman M, Chen L, Lee SF, Gilman AG, Cobb MH (TAO (thousand-and-one amino acid) protein kinases mediate signaling from carbachol to p38 mitogen-activated protein kinase and ternary complex factors. *J Biol Chem* 278:22278-22283.2003).
- Cheng K, Ip NY (Cdk5: a new player at synapses. *Neurosignals* 12:180-190.2003).
- Cherny RA, Atwood CS, Xilinas ME, Gray DN, Jones WD, McLean CA, Barnham KJ, Volitakis I, Fraser FW, Kim Y, Huang X, Goldstein LE, Moir RD, Lim JT, Beyreuther K, Zheng H, Tanzi RE, Masters CL, Bush AI (Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30:665-676.2001).

- Chessell IP, Michel AD, Humphrey PP (Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor. *Br J Pharmacol* 124:1314-1320.1998).
- Cheung ZH, Gong K, Ip NY (Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2. *J Neurosci* 28:4872-4877.2008).
- Chiang CW, Kanies C, Kim KW, Fang WB, Parkhurst C, Xie M, Henry T, Yang E (Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 23:6350-6362.2003).
- Chiang GG, Sefton BM (Phosphorylation of a Src kinase at the autophosphorylation site in the absence of Src kinase activity. *J Biol Chem* 275:6055-6058.2000).
- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H (Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265:5267-5272.1990).
- Chin J, Palop JJ, Puolivali J, Massaro C, Bien-Ly N, Gerstein H, Scarce-Levie K, Masliah E, Mucke L (Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:9694-9703.2005).
- Chin J, Palop JJ, Yu GQ, Kojima N, Masliah E, Mucke L (Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 24:4692-4697.2004).
- Chin JY, Knowles RB, Schneider A, Drewes G, Mandelkow EM, Hyman BT (Microtubule-affinity regulating kinase (MARK) is tightly associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain: a fluorescence resonance energy transfer study. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:966-971.2000).
- Chinkers M (Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab* 12:28-32.2001).
- Cho JH, Johnson GV (Glycogen synthase kinase 3 beta induces caspase-cleaved tau aggregation in situ. *J Biol Chem* 279:54716-54723.2004a).
- Cho JH, Johnson GV (Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem* 88:349-358.2004b).
- Cho US, Xu W (Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature* 445:53-57.2007).
- Chohan MO, Khatoon S, Iqbal IG, Iqbal K (Involvement of I2PP2A in the abnormal hyperphosphorylation of tau and its reversal by Memantine. *FEBS Lett* 580:3973-3979.2006).
- Choi DS, Wang D, Yu GQ, Zhu G, Kharazia VN, Paredes JP, Chang WS, Deitchman JK, Mucke L, Messing RO (PKCepsilon increases endothelin converting enzyme activity and reduces amyloid plaque pathology in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8215-8220.2006).
- Chong YH, Shin YJ, Lee EO, Kaye R, Glabe CG, Tenner AJ (ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem* 281:20315-20325.2006).
- Chow LM, Fournel M, Davidson D, Veillette A (Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* 365:156-160.1993).
- Christie RH, Freeman M, Hyman BT (Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 148:399-403.1996).

- Chung CW, Song YH, Kim IK, Yoon WJ, Ryu BR, Jo DG, Woo HN, Kwon YK, Kim HH, Gwag BJ, Mook-Jung IH, Jung YK (Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. *Neurobiol Dis* 8:162-172.2001).
- Chung SH (Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *BMB Rep* 42:467-474.2009).
- Churcher I (Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 6:579-595.2006).
- Citron M (Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:677-685.2004).
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207-225.1977).
- Clevers H (Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.2006).
- Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC (Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol* 7:793-803.2000).
- Cohen P, Goedert M (GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3:479-487.2004).
- Cole A, Frame S, Cohen P (Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* 377:249-255.2004).
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF (Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 16:357-363.2000).
- Cook CN, Hejna MJ, Magnuson DJ, Lee JM (Expression of calcipressin1, an inhibitor of the phosphatase calcineurin, is altered with aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 8:63-73.2005).
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.1993).
- Corsetti V, Amadoro G, Gentile A, Capsoni S, Ciotti MT, Cencioni MT, Atlante A, Canu N, Rohn TT, Cattaneo A, Calissano P (Identification of a caspase-derived N-terminal tau fragment in cellular and animal Alzheimer's disease models. *Mol Cell Neurosci* 38:381-392.2008).
- Courseaux A, Fernandes M, Grosgeorge J, Inglis J, Raynaud SD, Gaudray P (Human EMK1 is located on 11q12-q13, close to COX8 and FTH1. *Mamm Genome* 6:311-312.1995).
- Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258:478-480.1992).
- Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Yang F, Davies P, Yang AJ (Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 281:10825-10838.2006).
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.1995).

- Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD (Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J Neurochem* 77:94-102.2001).
- Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH (Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40:471-483.2003).
- Czech C, Lesort M, Tremp G, Terro F, Blanchard V, Schombert B, Carpentier N, Dreisler S, Bonici B, Takashima A, Moussaoui S, Hugon J, Pradier L (Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures. *Neuroscience* 87:325-336.1998).
- D'Souza I, Schellenberg GD (Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim Biophys Acta* 1739:104-115.2005).
- da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA, Zaia CT, Greengard P (Inhibition of protein phosphatase 1 stimulates secretion of Alzheimer amyloid precursor protein. *Mol Med* 1:535-541.1995).
- Dagda RK, Merrill RA, Cribbs JT, Chen Y, Hell JW, Usachev YM, Strack S (The spinocerebellar ataxia 12 gene product and protein phosphatase 2A regulatory subunit Bbeta2 antagonizes neuronal survival by promoting mitochondrial fission. *J Biol Chem* 283:36241-36248.2008).
- Dagda RK, Zaucha JA, Wadzinski BE, Strack S (A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit Bbeta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J Biol Chem* 278:24976-24985.2003).
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105:721-732.2001).
- Dale TC (Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329 (Pt 2):209-223.1998).
- Dalrymple SA (p38 mitogen activated protein kinase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 19:295-299.2002).
- Dartigues JF, Gagnon M, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Commenges D, Sauvel C, Michel P, Salamon R (The Paquid epidemiological program on brain ageing. *Neuroepidemiology* 11 Suppl 1:14-18.1992).
- David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG (Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem* 83:176-185.2002).
- Dayanandan R, Van Slegtenhorst M, Mack TG, Ko L, Yen SH, Leroy K, Brion JP, Anderton BH, Hutton M, Lovestone S (Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett* 446:228-232.1999).
- De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim SH (Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 243:518-526.1997).
- De Baere I, Derua R, Janssens V, Van Hoof C, Waelkens E, Merlevede W, Goris J (Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry* 38:16539-16547.1999).
- De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, Wavrant De-Vrieze F, Avila ME, Major MB, Myers A, Saez K, Henriquez JP, Zhao A, Wollmer MA, Nitsch RM, Hock C, Morris CM, Hardy J, Moon RT (Common genetic variation within the low-density

- lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9434-9439.2007).
- De Sarno P, Li X, Jope RS (Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology* 43:1158-1164.2002).
- Deckert M, Elly C, Altman A, Liu YC (Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosine kinases. *J Biol Chem* 273:8867-8874.1998).
- Dehvari N, Isacson O, Winblad B, Cedazo-Minguez A, Cowburn RF (Presenilin regulates extracellular regulated kinase (Erk) activity by a protein kinase C alpha dependent mechanism. *Neurosci Lett* 436:77-80.2008).
- Dell'Acqua ML, Scott JD (Protein kinase A anchoring. *J Biol Chem* 272:12881-12884.1997).
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8850-8855.2001).
- Demetrick DJ, Beach DH (Chromosome mapping of human CDC25A and CDC25B phosphatases. *Genomics* 18:144-147.1993).
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267:682-685.1995).
- Derkinderen P, Scales TM, Hanger DP, Leung KY, Byers HL, Ward MA, Lenz C, Price C, Bird IN, Perera T, Kellie S, Williamson R, Noble W, Van Etten RA, Leroy K, Brion JP, Reynolds CH, Anderton BH (Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci* 25:6584-6593.2005).
- Desahyes (2002) Psychotropes.
- Deshpande A, Win KM, Busciglio J (Tau isoform expression and regulation in human cortical neurons. *FASEB J* 22:2357-2367.2008).
- Deters N, Ittner LM, Gotz J (Substrate-specific reduction of PP2A activity exaggerates tau pathology. *Biochem Biophys Res Commun* 379:400-405.2009).
- Dhariwala FA, Rajadhyaksha MS (An unusual member of the Cdk family: Cdk5. *Cell Mol Neurobiol* 28:351-369.2008).
- Dhavan R, Tsai LH (A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:749-759.2001).
- Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, Klosak N, Bailey RM, Dunmore J, Ash P, Shoraka S, Zlatkovic J, Eckman CB, Patterson C, Dickson DW, Nahman NS, Jr., Hutton M, Burrows F, Petrucelli L (The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest* 117:648-658.2007).
- Dickey CA, Koren J, Zhang YJ, Xu YF, Jinwal UK, Birnbaum MJ, Monks B, Sun M, Cheng JQ, Patterson C, Bailey RM, Dunmore J, Soresh S, Leon C, Morgan D, Petrucelli L (Akt and CHIP coregulate tau degradation through coordinated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3622-3627.2008).
- Ding XL, Husseman J, Tomashevski A, Nochlin D, Jin LW, Vincent I (The cell cycle Cdc25A tyrosine phosphatase is activated in degenerating postmitotic neurons in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 157:1983-1990.2000).

- Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR (Functional redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β in Wnt/ β -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell* 12:957-971.2007).
- Doble BW, Woodgett JR (GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116:1175-1186.2003).
- Dominguez I, Green JB (Missing links in GSK3 regulation. *Dev Biol* 235:303-313.2001).
- Drewes G (MARKing tau for tangles and toxicity. *Trends Biochem Sci* 29:548-555.2004).
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.1997).
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 270:7679-7688.1995).
- Drews J (Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287:1960-1964.2000).
- Drubin DG, Nelson WJ (Origins of cell polarity. *Cell* 84:335-344.1996).
- Drummond GI, Bellward G (Studies on phosphorylase b kinase from neutral tissues. *J Neurochem* 17:475-482.1970).
- Duncia JV, Santella JB, 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE (MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 8:2839-2844.1998).
- Dutil EM, Keranen LM, DePaoli-Roach AA, Newton AC (In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. *J Biol Chem* 269:29359-29362.1994).
- Echeverria V, Ducatenzeiler A, Dowd E, Janne J, Grant SM, Szyf M, Wandosell F, Avila J, Grimm H, Dunnett SB, Hartmann T, Alhonen L, Cuello AC (Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience* 129:583-592.2004).
- Edener U, Kurth I, Meiner A, Hoffmann F, Hubner CA, Bernard V, Gillessen-Kaesbach G, Zuhlke C (Missense exchanges in the TTBK2 gene mutated in SCA11. *J Neurol*.2009).
- Ekinci FJ, Shea TB (Hyperactivation of mitogen-activated protein kinase increases phospho-tau immunoreactivity within human neuroblastoma: additive and synergistic influence of alteration of additional kinase activities. *Cell Mol Neurobiol* 19:249-260.1999).
- Eldar-Finkelman H (Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8:126-132.2002).
- Elyaman W, Terro F, Wong NS, Hugon J (In vivo activation and nuclear translocation of phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis: links to tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 15:651-660.2002).

- Embi N, Rylatt DB, Cohen P (Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107:519-527.1980).
- Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong WW, Kamen R, Weichselbaum R, et al. (Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J* 14:6148-6156.1995).
- Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99:1445-1455.2006).
- Etzkorn FA, Chang ZY, Stolz LA, Walsh CT (Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of calcineurin by the cyclophilin.cyclosporin A complex. *Biochemistry* 33:2380-2388.1994).
- Fabrigoule C (Do leisure activities protect against Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 1:11.2002).
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM (The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341:164-172.1999).
- Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr., Woodgett JR, Mills GB (Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11960-11965.2000).
- Fasulo L, Ugolini G, Cattaneo A (Apoptotic effect of caspase-3 cleaved tau in hippocampal neurons and its potentiation by tau FTDP-mutation N279K. *J Alzheimers Dis* 7:3-13.2005).
- Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A (The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem* 75:624-633.2000).
- Fath T, Eidenmuller J, Brandt R (Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:9733-9741.2002).
- Feijoo C, Campbell DG, Jakes R, Goedert M, Cuenda A (Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J Cell Sci* 118:397-408.2005).
- Ferreira A, Lu Q, Orecchio L, Kosik KS (Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A beta. *Mol Cell Neurosci* 9:220-234.1997).
- Ferrer I, Barrachina M, Puig B (Anti-tau phospho-specific Ser262 antibody recognizes a variety of abnormal hyper-phosphorylated tau deposits in tauopathies including Pick bodies and argyrophilic grains. *Acta Neuropathol* 104:658-664.2002).
- Ferrer I, Barrachina M, Puig B, Martinez de Lagran M, Marti E, Avila J, Dierssen M (Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol Dis* 20:392-400.2005).
- Fischer D, Mukrasch MD, Biernat J, Bibow S, Blackledge M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (Conformational changes specific for pseudo-phosphorylation at Ser262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry*.2009).
- Flaherty DB, Soria JP, Tomasiewicz HG, Wood JG (Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3beta and cdk5 are key participants. *J Neurosci Res* 62:463-472.2000).

- Flajolet M, He G, Heiman M, Lin A, Nairn AC, Greengard P (Regulation of Alzheimer's disease amyloid-beta formation by casein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4159-4164.2007).
- Flint AJ, Paladini RD, Koshland DE, Jr. (Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence. *Science* 249:408-411.1990).
- Forette F, Seux ML, Staessen JA, Thijs L, Birkenhager WH, Babarskiene MR, Babeanu S, Bossini A, Gil-Extremera B, Girerd X, Laks T, Lilov E, Moisseiev V, Tuomilehto J, Vanhanen H, Webster J, Yodfat Y, Fagard R (Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial. *Lancet* 352:1347-1351.1998).
- Fotaki V, Dierssen M, Alcantara S, Martinez S, Marti E, Casas C, Visa J, Soriano E, Estivill X, Arbones ML (Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol Cell Biol* 22:6636-6647.2002).
- Frame S, Cohen P (GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1-16.2001).
- Frame S, Cohen P, Biondi RM (A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* 7:1321-1327.2001).
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88:435-437.1997).
- Frenkel D, Katz O, Solomon B (Immunization against Alzheimer's beta -amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11455-11459.2000).
- Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E (Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochim Biophys Acta* 1502:122-132.2000).
- Frodin M, Gammeltoft S (Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151:65-77.1999).
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB (Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9:139-148.2007).
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10032-10037.2003).
- Garcia-Sierra F, Mondragon-Rodriguez S, Basurto-Islas G (Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14:401-409.2008).
- Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J (MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295:1291-1294.2002).
- Gendron TF, Petrucelli L (The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4:13.2009).
- Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW (Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97:395-406.1999).

- Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y, Kharbanda S, Allen H, Kamen R, Wong W, Kufe D (Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med* 184:2399-2404.1996).
- Ghoshal N, Smiley JF, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Cochran EJ, Binder LI, Kuret J (A new molecular link between the fibrillar and granulovacuolar lesions of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:1163-1172.1999).
- Giasson BI, Mushynski WE (Aberrant stress-induced phosphorylation of perikaryal neurofilaments. *J Biol Chem* 271:30404-30409.1996).
- Goedert M, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Hill F (PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 109 (Pt 11):2661-2672.1996).
- Goedert M, Hasegawa J, Craxton M, Leversha MA, Clegg S (Assignment of the human stress-activated protein kinase-3 gene (SAPK3) to chromosome 22q13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 41:501-502.1997a).
- Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P (Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 409:57-62.1997b).
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA (Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett* 450:306-311.1999).
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.1989).
- Golas JM, Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, Gibbons J, Frost P, Ye F, Boschelli DH, Boschelli F (SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res* 63:375-381.2003).
- Golden T, Aragon IV, Rutland B, Tucker JA, Shevde LA, Samant RS, Zhou G, Amable L, Skarra D, Honkanen RE (Elevated levels of Ser/Thr protein phosphatase 5 (PP5) in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1782:259-270.2008).
- Gomez de Barreda E, Perez M, Gomez Ramos P, de Cristobal J, Martin-Maestro P, Moran A, Dawson HN, Vitek MP, Lucas JJ, Hernandez F, Avila J (Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol Dis* 37:622-629.2010).
- Gong CX, Grundke-Iqbal I, Damuni Z, Iqbal K (Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase-1 and -2C and its implication in Alzheimer disease. *FEBS Lett* 341:94-98.1994a).
- Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* 61:765-772.1994b).
- Gong CX, Iqbal K (Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem* 15:2321-2328.2008).
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275:5535-5544.2000).

- Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. *J Alzheimers Dis* 9:1-12.2006).
- Gong CX, Liu F, Wu G, Rossie S, Wegiel J, Li L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *J Neurochem* 88:298-310.2004).
- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 65:732-738.1995).
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61:921-927.1993).
- Gonzalez GA, Montminy MR (Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675-680.1989).
- Gorringer KL, Boussioutas A, Bowtell DD (Novel regions of chromosomal amplification at 6p21, 5p13, and 12q14 in gastric cancer identified by array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 42:247-259.2005).
- Gotz J (Tau and transgenic animal models. *Brain Res Brain Res Rev* 35:266-286.2001).
- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293:1491-1495.2001).
- Gotz J, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke Y, Wiesner A, Schonrock N, Ittner LM (A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol* 17:91-103.2007).
- Gotz J, Gotz NN (Animal models for Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: a perspective. *ASN Neuro* 1.2009).
- Gotz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, Burki K, Goedert M (Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 14:1304-1313.1995).
- Gotz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L, Kurosinski P, Chen F (Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry* 9:664-683.2004).
- Gould TD, Gray NA, Manji HK (Effects of a glycogen synthase kinase-3 inhibitor, lithium, in adenomatous polyposis coli mutant mice. *Pharmacol Res* 48:49-53.2003).
- Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV (Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 269:4373-4380.1994).
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C (Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 93:105-117.2005).
- Griffith LC (Regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation by intramolecular and intermolecular interactions. *J Neurosci* 24:8394-8398.2004).
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.1986).
- Guidato S, McLoughlin DM, Grierson AJ, Miller CC (Cyclin D2 interacts with cdk-5 and modulates cellular cdk-5/p35 activity. *J Neurochem* 70:335-340.1998).

- Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu Y, Wang T, Cahill ME, Bigio EH, Berry RW, Binder LI (Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26:1015-1022.2005).
- Guimera J, Casas C, Pucharcos C, Solans A, Domenech A, Planas AM, Ashley J, Lovett M, Estivill X, Pritchard MA (A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* 5:1305-1310.1996).
- Guise S, Braguer D, Carles G, Delacourte A, Briand C (Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 63:257-267.2001).
- Guo X, Williams JG, Schug TT, Li X (DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J Biol Chem*.2010).
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 15:2760-2770.1996).
- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan PG, Rao A (A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441:646-650.2006).
- Haase C, Stieler JT, Arendt T, Holzer M (Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem* 88:1509-1520.2004).
- Hajdуч E, Litherland GJ, Hundal HS (Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett* 492:199-203.2001).
- Hallows JL, Chen K, DePinho RA, Vincent I (Decreased cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activity is accompanied by redistribution of cdk5 and cytoskeletal proteins and increased cytoskeletal protein phosphorylation in p35 null mice. *J Neurosci* 23:10633-10644.2003).
- Ham BM, Jayachandran H, Yang F, Jaitly N, Polpitiya AD, Monroe ME, Wang L, Zhao R, Purvine SO, Livesay EA, Camp DG, 2nd, Rossie S, Smith RD (Novel Ser/Thr protein phosphatase 5 (PP5) regulated targets during DNA damage identified by proteomics analysis. *J Proteome Res* 9:945-953.2010).
- Hamdane M, Bretteville A, Sambo AV, Schindowski K, Begard S, Delacourte A, Bertrand P, Buee L (p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death. *J Cell Sci* 118:1291-1298.2005).
- Hamilton G, Proitsi P, Jehu L, Morgan A, Williams J, O'Donovan MC, Owen MJ, Powell JF, Lovestone S (Candidate gene association study of insulin signaling genes and Alzheimer's disease: evidence for SOS2, PCK1, and PPARgamma as susceptibility loci. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:508-516.2007).
- Hamilton G, Samedi F, Knight J, Archer N, Foy C, Walter S, Turic D, Jehu L, Moore P, Hollingworth P, O'Donovan MC, Williams J, Owen MJ, Lovestone S, Powell JF (Polymorphisms in the phosphate and tensin homolog gene are not associated with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 401:77-80.2006).
- Hammerle B, Carnicero A, Elizalde C, Ceron J, Martinez S, Tejedor FJ (Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 17:2277-2286.2003).
- Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N, Sjoegren M, DeBernardis J, Kerkman D, Ishiguro K, Ohno H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, McCulloch C, Moller HJ, Davies P, Blennow K (Measurement of phosphorylated tau

- epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry* 61:95-102.2004).
- Han D, Paudel HK (FTDP-17 missense mutations site-specifically inhibit as well as promote dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatases of HEK-293 cell extract. *Neurochem Int* 54:14-27.2009).
- Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ (Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* 271:2886-2891.1996).
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS (c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108:73-81.2001).
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15:112-119.2009).
- Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH, Ward MA, Anderton BH (Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 282:23645-23654.2007).
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62.1992).
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488-491.1994).
- Harper SJ, Wilkie N (MAPKs: new targets for neurodegeneration. *Expert Opin Ther Targets* 7:187-200.2003).
- Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Mahley RW, Huang Y (Increased tau phosphorylation in apolipoprotein E4 transgenic mice is associated with activation of extracellular signal-regulated kinase: modulation by zinc. *J Biol Chem* 279:44795-44801.2004).
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P (Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8:573-581.1998).
- Harwood AJ (Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor. *Cell* 105:821-824.2001).
- Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M (Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 437:207-210.1998).
- Hastie CJ, Cohen PT (Purification of protein phosphatase 4 catalytic subunit: inhibition by the antitumour drug fostriecin and other tumour suppressors and promoters. *FEBS Lett* 431:357-361.1998).
- Hata R, Masumura M, Akatsu H, Li F, Fujita H, Nagai Y, Yamamoto T, Okada H, Kosaka K, Sakanaka M, Sawada T (Up-regulation of calcineurin Abeta mRNA in the Alzheimer's disease brain: assessment by cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 284:310-316.2001).
- Hedgepeth CM, Deardorff MA, Rankin K, Klein PS (Regulation of glycogen synthase kinase 3beta and downstream Wnt signaling by axin. *Mol Cell Biol* 19:7147-7157.1999).
- Heikkila J, Jalava A, Eriksson K (The selective protein kinase C inhibitor GF 109203X inhibits phorbol ester-induced morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1185-1193.1993).

- Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR, Spurr NK, Goodfellow PN, Solomon E, Carritt B, Bodmer WF (Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature* 299:747-749.1982).
- Helmer C, Damon D, Letenneur L, Fabrigoule C, Barberger-Gateau P, Lafont S, Fuhrer R, Antonucci T, Commenges D, Orgogozo JM, Dartigues JF (Marital status and risk of Alzheimer's disease: a French population-based cohort study. *Neurology* 53:1953-1958.1999).
- Helmke S, Pfenninger KH (Growth cone enrichment and cytoskeletal association of non-receptor tyrosine kinases. *Cell Motil Cytoskeleton* 30:194-207.1995).
- Hemmings HC, Jr., Greengard P, Tung HY, Cohen P (DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310:503-505.1984).
- Hendrickx A, Beullens M, Ceulemans H, Den Abt T, Van Eynde A, Nicolaescu E, Lesage B, Bollen M (Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 16:365-371.2009).
- Heriche JK, Lebrin F, Rabilloud T, Leroy D, Chambaz EM, Goldberg Y (Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha. *Science* 276:952-955.1997).
- Hernandez F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ (Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83:1529-1533.2002).
- Hernandez F, Gomez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J (GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol*.2009a).
- Hernandez P, Lee G, Sjoberg M, Maccioni RB (Tau phosphorylation by cdk5 and Fyn in response to amyloid peptide Abeta (25-35): involvement of lipid rafts. *J Alzheimers Dis* 16:149-156.2009b).
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20:2567-2574.2000).
- Higuchi M, Zhang B, Forman MS, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM (Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *J Neurosci* 25:9434-9443.2005).
- Himpel S, Panzer P, Eirmbter K, Czajkowska H, Sayed M, Packman LC, Blundell T, Kentrup H, Grotzinger J, Joost HG, Becker W (Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem J* 359:497-505.2001).
- Hiraga A, Tamura S (Protein phosphatase 2A is associated in an inactive state with microtubules through 2A1-specific interaction with tubulin. *Biochem J* 346 Pt 2:433-439.2000).
- Hisanaga S, Uchiyama M, Hosoi T, Yamada K, Honma N, Ishiguro K, Uchida T, Dahl D, Ohsumi K, Kishimoto T (Porcine brain neurofilament-H tail domain kinase: its identification as cdk5/p26 complex and comparison with cdc2/cyclin B kinase. *Cell Motil Cytoskeleton* 31:283-297.1995).
- Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E (Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:247-256.2005).
- Hoeffler CA, Dey A, Sachan N, Wong H, Patterson RJ, Shelton JM, Richardson JA, Klann E, Rothermel BA (The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates

- long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling. *J Neurosci* 27:13161-13172.2007).
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86-90.2000).
- Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel ME, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L (Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1:60-67.1999).
- Hollander BA, Bennett GS, Shaw G (Localization of sites in the tail domain of the middle molecular mass neurofilament subunit phosphorylated by a neurofilament-associated kinase and by casein kinase I. *J Neurochem* 66:412-420.1996).
- Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee VM (Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282:1914-1917.1998).
- Hongisto V, Vainio JC, Thompson R, Courtney MJ, Coffey ET (The Wnt pool of glycogen synthase kinase 3beta is critical for trophic-deprivation-induced neuronal death. *Mol Cell Biol* 28:1515-1527.2008).
- Honkanen RE, Golden T (Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem* 9:2055-2075.2002).
- Hooper C, Killick R, Lovestone S (The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104:1433-1439.2008).
- Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernandez F, Anderton B, Rosenblum K, Bliss T, Cooke SF, Avila J, Lucas JJ, Giese KP, Stephenson J, Lovestone S (Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 25:81-86.2007).
- Horiguchi T, Uryu K, Giasson BI, Ischiropoulos H, LightFoot R, Bellmann C, Richter-Landsberg C, Lee VM, Trojanowski JQ (Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. *Am J Pathol* 163:1021-1031.2003).
- Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K (Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2719-2723.1996).
- Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, Lashley T, Hernandez D, Worth P, Singleton AB, Hilton DA, Holton J, Revesz T, Davis MB, Giunti P, Wood NW (Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet* 39:1434-1436.2007).
- Hu D, Fang W, Han A, Gallagher L, Davis RJ, Xiong B, Yang W (c-Jun N-terminal kinase 1 interacts with and negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling through GSK3beta pathway. *Carcinogenesis* 29:2317-2324.2008).
- Huang FL, Glinsmann WH (Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 70:419-426.1976).
- Huang HB, Horiuchi A, Watanabe T, Shih SR, Tsay HJ, Li HC, Greengard P, Nairn AC (Characterization of the inhibition of protein phosphatase-1 by DARPP-32 and inhibitor-2. *J Biol Chem* 274:7870-7878.1999).

- Huelsken J, Birchmeier W (New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11:547-553.2001).
- Humbert S, Dhavan R, Tsai L (p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113 (Pt 6):975-983.2000a).
- Humbert S, Lanier LM, Tsai LH (Synaptic localization of p39, a neuronal activator of cdk5. *Neuroreport* 11:2213-2216.2000b).
- Humphries MJ, Limesand KH, Schneider JC, Nakayama KI, Anderson SM, Reyland ME (Suppression of apoptosis in the protein kinase Cdelta null mouse in vivo. *J Biol Chem* 281:9728-9737.2006).
- Hunter T (A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell* 49:1-4.1987).
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702-705.1998).
- Ignelzi MA, Jr., Miller DR, Soriano P, Maness PF (Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12:873-884.1994).
- Iguchi T, Miyakawa Y, Saito K, Nakabayashi C, Nakanishi M, Saya H, Ikeda Y, Kizaki M (Zoledronate-induced S phase arrest and apoptosis accompanied by DNA damage and activation of the ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol* 31:285-291.2007).
- Iijima K, Ando K, Takeda S, Satoh Y, Seki T, Itohara S, Greengard P, Kirino Y, Nairn AC, Suzuki T (Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J Neurochem* 75:1085-1091.2000).
- Illenberger S, Drewes G, Trinczek B, Biernat J, Meyer HE, Olmsted JB, Mandelkow EM, Mandelkow E (Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* 271:10834-10843.1996).
- Inouye H, Sharma D, Goux WJ, Kirschner DA (Structure of core domain of fibril-forming PHF/Tau fragments. *Biophys J* 90:1774-1789.2006).
- Iqbal K, Alonso AC, Gong CX, Khatoon S, Pei JJ, Wang JZ, Grundke-Iqbal I (Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl* 53:169-180.1998).
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I (Ubiquitination and abnormal phosphorylation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 5:399-410.1991).
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso Adel C, Grundke-Iqbal I (Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 118:53-69.2009).
- Isagawa T, Mukai H, Oishi K, Taniguchi T, Hasegawa H, Kawamata T, Tanaka C, Ono Y (Dual effects of PKNalpha and protein kinase C on phosphorylation of tau protein by glycogen synthase kinase-3beta. *Biochem Biophys Res Commun* 273:209-212.2000).
- Ishiguro K, Kobayashi S, Omori A, Takamatsu M, Yonekura S, Anzai K, Imahori K, Uchida T (Identification of the 23 kDa subunit of tau protein kinase II as a putative activator of cdk5 in bovine brain. *FEBS Lett* 342:203-208.1994).

- Ishiguro K, Takamatsu M, Tomizawa K, Omori A, Takahashi M, Arioka M, Uchida T, Imahori K (Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J Biol Chem* 267:10897-10901.1992).
- Ishihara H, Martin BL, Brautigam DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, et al. (Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159:871-877.1989).
- Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM (Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol* 158:555-562.2001).
- Janssens V, Goris J (Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353:417-439.2001).
- Janssens V, Goris J, Van Hoof C (PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* 15:34-41.2005).
- Janssens V, Longin S, Goris J (PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci* 33:113-121.2008).
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.2000).
- Jhanwar SC, Neel BG, Hayward WS, Chaganti RS (Localization of the cellular oncogenes ABL, SIS, and FES on human germ-line chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 38:73-75.1984).
- Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P (cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19:7486-7494.1999).
- Jin K, Ewton DZ, Park S, Hu J, Friedman E (Mirk regulates the exit of colon cancer cells from quiescence. *J Biol Chem*.2009).
- Johannes FJ, Prestle J, Dieterich S, Oberhagemann P, Link G, Pfizenmaier K (Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu. *Eur J Biochem* 227:303-307.1995).
- Johnson GL, Lapadat R (Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.2002).
- Johnson GV, Cox TM, Lockhart JP, Zinnerman MD, Miller ML, Powers RE (Transglutaminase activity is increased in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 751:323-329.1997).
- Jones TA, Barker HM, da Cruz e Silva EF, Mayer-Jaekel RE, Hemmings BA, Spurr NK, Sheer D, Cohen PT (Localization of the genes encoding the catalytic subunits of protein phosphatase 2A to human chromosome bands 5q23-->q31 and 8p12-->p11.2, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 63:35-41.1993).
- Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* 32:577-595.2007).
- Kamei H, Saito T, Ozawa M, Fujita Y, Asada A, Bibb JA, Saido TC, Sorimachi H, Hisanaga S (Suppression of calpain-dependent cleavage of the CDK5 activator p35 to p25 by site-specific phosphorylation. *J Biol Chem* 282:1687-1694.2007).

- Kang JE, Choi SA, Park JB, Chung KC (Regulation of the proapoptotic activity of huntingtin interacting protein 1 by Dyrk1 and caspase-3 in hippocampal neuroprogenitor cells. *J Neurosci Res* 81:62-72.2005).
- Kar S, Wang M, Carr BI (2-Methoxyestradiol inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by inhibiting Cdc25 and inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 62:831-840.2008).
- Karin M (The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-16486.1995).
- Kater SB, Mattson MP, Cohan C, Connor J (Calcium regulation of the neuronal growth cone. *Trends Neurosci* 11:315-321.1988).
- Kato T, Satoh S, Okabe H, Kitahara O, Ono K, Kihara C, Tanaka T, Tsunoda T, Yamaoka Y, Nakamura Y, Furukawa Y (Isolation of a novel human gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement in hepatocellular carcinogenesis. *Neoplasia* 3:4-9.2001).
- Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Ueno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T (Neuropathological studies on strains of senescence-accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp Gerontol* 32:161-169.1997).
- Kawamata T, Taniguchi T, Mukai H, Kitagawa M, Hashimoto T, Maeda K, Ono Y, Tanaka C (A protein kinase, PKN, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles and associated endoplasmic reticulum-derived vesicles and phosphorylates tau protein. *J Neurosci* 18:7402-7410.1998).
- Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin SG (Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:3801-3809.2004).
- Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O (Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85:115-122.2003).
- Kentrup H, Becker W, Heukelbach J, Wilmes A, Schurmann A, Huppertz C, Kainulainen H, Joost HG (Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 271:3488-3495.1996).
- Kerokoski P, Suuronen T, Salminen A, Soininen H, Pirttila T (The levels of cdk5 and p35 proteins and tau phosphorylation are reduced during neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 280:998-1002.2001).
- Kerr F, Rickle A, Nayeem N, Brandner S, Cowburn RF, Lovestone S (PTEN, a negative regulator of PI3 kinase signalling, alters tau phosphorylation in cells by mechanisms independent of GSK-3. *FEBS Lett* 580:3121-3128.2006).
- Kesavapany S, Li BS, Amin N, Zheng YL, Grant P, Pant HC (Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide. *Biochim Biophys Acta* 1697:143-153.2004).
- Khan TK, Nelson TJ, Verma VA, Wender PA, Alkon DL (A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses Abeta-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts. *Neurobiol Dis* 34:332-339.2009).
- Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59:750-753.1992).

- Kidd M (Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-193.1963).
- Kim D, Won J, Shin DW, Kang J, Kim YJ, Choi SY, Hwang MK, Jeong BW, Kim GS, Joe CO, Chung SH, Song WJ (Regulation of Dyrk1A kinase activity by 14-3-3. *Biochem Biophys Res Commun* 323:499-504.2004).
- Kim H, Sablin SO, Ramsay RR (Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch Biochem Biophys* 337:137-142.1997).
- Kim HJ, Kang SK, Mun JY, Chun YJ, Choi KH, Kim MY (Involvement of Akt in mitochondria-dependent apoptosis induced by a cdc25 phosphatase inhibitor naphthoquinone analog. *FEBS Lett* 555:217-222.2003).
- Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A, Kida T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Funakoshi E, Nishitomi K, Sakaguchi G, Kato A, Hattori H, Uema T, Takeda M (The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 16:15-23.2007).
- Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, et al. (FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 40:1256-1265.1987).
- Kins S, Cramer A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM, Gotz J (Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 276:38193-38200.2001).
- Kins S, Kurosinaki P, Nitsch RM, Gotz J (Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol* 163:833-843.2003).
- Kitagawa M, Mukai H, Shibata H, Ono Y (Purification and characterization of a fatty acid-activated protein kinase (PKN) from rat testis. *Biochem J* 310 (Pt 2):657-664.1995).
- Kitano-Takahashi M, Morita H, Kondo S, Tomizawa K, Kato R, Tanio M, Shirota Y, Takahashi H, Sugio S, Kohno T (Expression, purification and crystallization of a human tau-tubulin kinase 2 that phosphorylates tau protein. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63:602-604.2007).
- Klein PS, Melton DA (A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8455-8459.1996).
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, Stoter M (The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17:675-689.2005).
- Knippschild U, Milne DM, Campbell LE, DeMaggio AJ, Christenson E, Hoekstra MF, Meek DW (p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* 15:1727-1736.1997).
- Knockaert M, Greengard P, Meijer L (Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* 23:417-425.2002).
- Kobayashi T, Cohen P (Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* 339 (Pt 2):319-328.1999).

- Koivisto L, Hakkinen L, Matsumoto K, McCulloch CA, Yamada KM, Larjava H (Glycogen synthase kinase-3 regulates cytoskeleton and translocation of Rac1 in long cellular extensions of human keratinocytes. *Exp Cell Res* 293:68-80.2004).
- Kojima Y, Miyoshi H, Clevers HC, Oshima M, Aoki M, Taketo MM (Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase signaling. *J Biol Chem* 282:23532-23540.2007).
- Kon M, Cuervo AM (Chaperone-mediated autophagy in health and disease. *FEBS Lett* 584:1399-1404.2010).
- Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268:24374-24384.1993).
- Kovacech B, Kontsekova E, Zilka N, Novak P, Skrabana R, Filipcik P, Iqbal K, Novak M (A novel monoclonal antibody DC63 reveals that inhibitor 1 of protein phosphatase 2A is preferentially nuclearly localised in human brain. *FEBS Lett* 581:617-622.2007).
- Kowall NW, Kosik KS (Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 22:639-643.1987).
- Kraemer BC, Burgess JK, Chen JH, Thomas JH, Schellenberg GD (Molecular pathways that influence human tau-induced pathology in *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* 15:1483-1496.2006).
- Ku G, Malissen B, Mattei MG (Chromosomal location of the Syk and ZAP-70 tyrosine kinase genes in mice and humans. *Immunogenetics* 40:300-302.1994).
- Kuhla B, Haase C, Flach K, Luth HJ, Arendt T, Munch G (Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J Biol Chem* 282:6984-6991.2007).
- Kuret J, Johnson GS, Cha D, Christenson ER, DeMaggio AJ, Hoekstra MF (Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 69:2506-2515.1997).
- Kusuda J, Hidari N, Hirai M, Hashimoto K (Sequence analysis of the cDNA for the human casein kinase I delta (CSNK1D) gene and its chromosomal localization. *Genomics* 32:140-143.1996).
- Kuszczyk M, Gordon-Krajcer W, Lazarewicz JW (Homocysteine-induced acute excitotoxicity in cerebellar granule cells in vitro is accompanied by PP2A-mediated dephosphorylation of tau. *Neurochem Int* 55:174-180.2009).
- Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR (GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 58:829-839.2005).
- Kyriakis JM, Avruch J (Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869.2001).
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.1994).
- Laguna A, Aranda S, Barallobre MJ, Barhoum R, Fernandez E, Fotaki V, Delabar JM, de la Luna S, de la Villa P, Arbones ML (The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Dev Cell* 15:841-853.2008).

- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453.1998).
- LaPointe NE, Morfini G, Pigino G, Gaisina IN, Kozikowski AP, Binder LI, Brady ST (The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J Neurosci Res* 87:440-451.2009).
- Latimer DA, Gallo JM, Lovestone S, Miller CC, Reynolds CH, Marquardt B, Stabel S, Woodgett JR, Anderton BH (Stimulation of MAP kinase by v-raf transformation of fibroblasts fails to induce hyperphosphorylation of transfected tau. *FEBS Lett* 365:42-46.1995).
- Lavoie SB, Albert AL, Vincent M ([Unexpected roles of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1]. *Med Sci (Paris)* 19:1251-1258.2003).
- Law CL, Chandran KA, Sidorenko SP, Clark EA (Phospholipase C-gamma1 interacts with conserved phosphotyrosyl residues in the linker region of Syk and is a substrate for Syk. *Mol Cell Biol* 16:1305-1315.1996).
- Layfield R, Fergusson J, Aitken A, Lowe J, Landon M, Mayer RJ (Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neurosci Lett* 209:57-60.1996).
- Lazo JS, Aslan DC, Southwick EC, Cooley KA, Ducruet AP, Joo B, Vogt A, Wipf P (Discovery and biological evaluation of a new family of potent inhibitors of the dual specificity protein phosphatase Cdc25. *J Med Chem* 44:4042-4049.2001).
- Le Beau MM, Westbrook CA, Diaz MO, Rowley JD (Evidence for two distinct c-src loci on human chromosomes 1 and 20. *Nature* 312:70-71.1984).
- LeBoeuf AC, Levy SF, Gaylord M, Bhattacharya A, Singh AK, Jordan MA, Wilson L, Feinstein SC (FTDP-17 mutations in Tau alter the regulation of microtubule dynamics: an "alternative core" model for normal and pathological Tau action. *J Biol Chem* 283:36406-36415.2008).
- Lebouvier T, Scales TM, Hanger DP, Geahlen RL, Lardeux B, Reynolds CH, Anderton BH, Derkinderen P (The microtubule-associated protein tau is phosphorylated by Syk. *Biochim Biophys Acta* 1783:188-192.2008).
- Lebouvier T, Scales TM, Williamson R, Noble W, Duyckaerts C, Hanger DP, Reynolds CH, Anderton BH, Derkinderen P (The Microtubule-Associated Protein Tau is Also Phosphorylated on Tyrosine. *J Alzheimers Dis*.2009).
- Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G, Meijer L (Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem* 276:251-260.2001).
- Ledesma MD, Bonay P, Colaco C, Avila J (Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 269:21614-21619.1994).
- Lee G (Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1739:323-330.2005).
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21):3167-3177.1998).
- Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, Fang SM, Do LH, Andreadis A, Van Hoesen G, Ksiezak-Reding H (Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2304-2312.2004a).

- Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA (Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med* 11:164-169.2005).
- Lee HK, Kumar P, Fu Q, Rosen KM, Querfurth HW (The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid. *Mol Biol Cell* 20:1533-1544.2009).
- Lee J, Kim MS (The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 77 Suppl 1:S49-57.2007).
- Lee MS, Kao SC, Lemere CA, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, Neve R, Ahljianian MK, Tsai LH (APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J Cell Biol* 163:83-95.2003).
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360-364.2000).
- Lee W, Boo JH, Jung MW, Park SD, Kim YH, Kim SU, Mook-Jung I (Amyloid beta peptide directly inhibits PKC activation. *Mol Cell Neurosci* 26:222-231.2004b).
- Legos JJ, McLaughlin B, Skaper SD, Strijbos PJ, Parsons AA, Aizenman E, Herin GA, Barone FC, Erhardt JA (The selective p38 inhibitor SB-239063 protects primary neurons from mild to moderate excitotoxic injury. *Eur J Pharmacol* 447:37-42.2002).
- Lemeshow S, Letenneur L, Dartigues JF, Lafont S, Orgogozo JM, Commenges D (Illustration of analysis taking into account complex survey considerations: the association between wine consumption and dementia in the PAQUID study. *Personnes Ages Quid. Am J Epidemiol* 148:298-306.1998).
- Leost M, Schultz C, Link A, Wu YZ, Biernat J, Mandelkow EM, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Zaharevitz DW, Gussio R, Senderowicz AM, Sausville EA, Kunick C, Meijer L (Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur J Biochem* 267:5983-5994.2000).
- Leroy K, Boutajangout A, Authelet M, Woodgett JR, Anderton BH, Brion JP (The active form of glycogen synthase kinase-3beta is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:91-99.2002).
- Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP (Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:43-55.2007).
- Lesort M, Jope RS, Johnson GV (Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* 72:576-584.1999).
- Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo JM, Dartigues JF (Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:177-183.1999).
- Letenneur L, Jacqmin H, Commenges D, Barberger-Gateau P, Dartigues JF, Salamon R (Cerebral and functional aging: first results on prevalence and incidence of the Paquid cohort. *Methods Inf Med* 32:249-251.1993).
- Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Sorel I, de La Sierra-Gallay IL, Collinet B, Graille M, Blondeau K, Bettache N, Poupon A, Janin J, van Tilbeurgh H (Structure of protein phosphatase methyltransferase 1 (PPM1), a leucine carboxyl methyltransferase involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* 279:8351-8358.2004).

- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. (Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-977.1995).
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293:1487-1491.2001).
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M (Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25:402-405.2000).
- Lewis SA, Wang DH, Cowan NJ (Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242:936-939.1988).
- Li BS, Zhang L, Takahashi S, Ma W, Jaffe H, Kulkarni AB, Pant HC (Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *EMBO J* 21:324-333.2002).
- Li D, Qu Y, Mao M, Zhang X, Li J, Ferriero D, Mu D (Involvement of the PTEN-AKT-FOXO3a pathway in neuronal apoptosis in developing rat brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.*2009).
- Li G, Yin H, Kuret J (Casein kinase 1 delta phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules. *J Biol Chem* 279:15938-15945.2004).
- Li L, Wysk M, Gonzalez FA, Davis RJ (Genomic loci of human mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* 9:647-649.1994a).
- Li M, Damuni Z (I1PP2A and I2PP2A. Two potent protein phosphatase 2A-specific inhibitor proteins. *Methods Mol Biol* 93:59-66.1998).
- Li M, Guo H, Damuni Z (Purification and characterization of two potent heat-stable protein inhibitors of protein phosphatase 2A from bovine kidney. *Biochemistry* 34:1988-1996.1995).
- Li M, Makkinje A, Damuni Z (Molecular identification of I1PP2A, a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 35:6998-7002.1996).
- Li X, Lu F, Tian Q, Yang Y, Wang Q, Wang JZ (Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm* 113:93-102.2006).
- Li X, Nghiem P, Schulman H, Francke U (Localization of the CAMKG gene encoding gamma isoforms of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) to human chromosome 10 band q22 and mouse chromosome 14. *Cytogenet Cell Genet* 66:113-116.1994b).
- Li X, Yost HJ, Virshup DM, Seeling JM (Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in *Xenopus*. *EMBO J* 20:4122-4131.2001).
- Liang Z, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Wegiel J, Gong CX (Decrease of protein phosphatase 2A and its association with accumulation and hyperphosphorylation of tau in Down syndrome. *J Alzheimers Dis* 13:295-302.2008).
- Liao H, Li Y, Brautigan DL, Gundersen GG (Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem* 273:21901-21908.1998).

- Lin CF, Chen CL, Chiang CW, Jan MS, Huang WC, Lin YS (GSK-3 β acts downstream of PP2A and the PI 3-kinase-Akt pathway, and upstream of caspase-2 in ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J Cell Sci* 120:2935-2943.2007).
- Lin KF, Chang RC, Suen KC, So KF, Hugon J (Modulation of calcium/calmodulin kinase-II provides partial neuroprotection against beta-amyloid peptide toxicity. *Eur J Neurosci* 19:2047-2055.2004).
- Ling D, Salvaterra PM (A central role for autophagy in Alzheimer-type neurodegeneration. *Autophagy* 5:738-740.2009).
- Litersky JM, Johnson GV, Jakes R, Goedert M, Lee M, Seubert P (Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at Ser-262 and Ser-356. *Biochem J* 316 (Pt 2):655-660.1996).
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-847.2002a).
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22:1942-1950.2005a).
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3 β . *FEBS Lett* 530:209-214.2002b).
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX (O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10804-10809.2004a).
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Rossie S, Gong CX (Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 280:1790-1796.2005b).
- Liu F, Li B, Tung EJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci* 26:3429-3436.2007).
- Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* 115:829-837.2002c).
- Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong CX (Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 512:101-106.2002d).
- Liu J (FK506 and ciclosporin: molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 14:182-188.1993).
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL (Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815.1991).
- Liu R, Wang JZ (Protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. *Pathophysiology* 16:273-277.2009).
- Liu R, Zhou XW, Tanila H, Bjorkdahl C, Wang JZ, Guan ZZ, Cao Y, Gustafsson JA, Winblad B, Pei JJ (Phosphorylated PP2A (tyrosine 307) is associated with Alzheimer neurofibrillary pathology. *J Cell Mol Med* 12:241-257.2008).
- Liu SJ, Zhang JY, Li HL, Fang ZY, Wang Q, Deng HM, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wang JZ (Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem* 279:50078-50088.2004b).

- Lizcano JM, Goransson O, Toth R, Deak M, Morrice NA, Boudeau J, Hawley SA, Udd L, Makela TP, Hardie DG, Alessi DR (LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 23:833-843.2004).
- Lochhead PA, Sibbet G, Morrice N, Cleghon V (Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* 121:925-936.2005).
- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K, Castaneda S, Cornelius LA, Das J, Doweyko AM, Fairchild C, Hunt JT, Inigo I, Johnston K, Kamath A, Kan D, Klei H, Marathe P, Pang S, Peterson R, Pitt S, Schieven GL, Schmidt RJ, Tokarski J, Wen ML, Wityak J, Borzilleri RM (Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 47:6658-6661.2004).
- Longin S, Jordens J, Martens E, Stevens I, Janssens V, Rondelez E, De Baere I, Derua R, Waelkens E, Goris J, Van Hoof C (An inactive protein phosphatase 2A population is associated with methylesterase and can be re-activated by the phosphotyrosyl phosphatase activator. *Biochem J* 380:111-119.2004).
- Longin S, Zwaenepoel K, Louis JV, Dilworth S, Goris J, Janssens V (Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit. *J Biol Chem* 282:26971-26980.2007).
- Longin S, Zwaenepoel K, Martens E, Louis JV, Rondelez E, Goris J, Janssens V (Spatial control of protein phosphatase 2A (de)methylation. *Exp Cell Res* 314:68-81.2008).
- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. *Aging Cell* 9:64-77.2010).
- Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S, et al. (Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 4:1077-1086.1994).
- Lubert EJ, Hong Y, Sarge KD (Interaction between protein phosphatase 5 and the A subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a heterotrimeric form of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 276:38582-38587.2001).
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 20:27-39.2001).
- Maddika S, Chen J (Protein kinase DYRK2 is a scaffold that facilitates assembly of an E3 ligase. *Nat Cell Biol* 11:409-419.2009).
- Madeira A, Pommet JM, Prochiantz A, Allinquant B (SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J* 19:1905-1907.2005).
- Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST (Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 283:9359-9368.2008).
- Makhinson M, Chotiner JK, Watson JB, O'Dell TJ (Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J Neurosci* 19:2500-2510.1999).

- Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E (Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* 314:315-321.1992).
- Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E (MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol* 167:99-110.2004).
- Maness PF, Aubry M, Shores CG, Frame L, Pfenninger KH (c-src gene product in developing rat brain is enriched in nerve growth cone membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5001-5005.1988).
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.2002).
- Marin O, Bustos VH, Cesaro L, Meggio F, Pagano MA, Antonelli M, Allende CC, Pinna LA, Allende JE (A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10193-10200.2003).
- Marth JD, Distech C, Pravtcheva D, Ruddle F, Krebs EG, Perlmutter RM (Localization of a lymphocyte-specific protein tyrosine kinase gene (lck) at a site of frequent chromosomal abnormalities in human lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7400-7404.1986).
- Martin L, Magnaudeix A, Esclaire F, Yardin C, Terro F (Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta downregulates total tau proteins in cultured neurons and its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A. *Brain Res* 1252:66-75.2009).
- Martinez A, Alonso M, Castro A, Perez C, Moreno FJ (First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *J Med Chem* 45:1292-1299.2002).
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C (Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 268:9194-9197.1993).
- Mashhoon N, DeMaggio AJ, Tereshko V, Bergmeier SC, Egli M, Hoekstra MF, Kuret J (Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J Biol Chem* 275:20052-20060.2000).
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.1985).
- Matenia D, Griesshaber B, Li XY, Thiessen A, Johne C, Jiao J, Mandelkow E, Mandelkow EM (PAK5 kinase is an inhibitor of MARK/Par-1, which leads to stable microtubules and dynamic actin. *Mol Biol Cell* 16:4410-4422.2005).
- Matenia D, Mandelkow EM (The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 34:332-342.2009).
- Mattson MP (Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca²⁺ influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 4:105-117.1990).
- Mattson MP (Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mistreatment, free radicals, and metabolic compromise. *Ann N Y Acad Sci* 747:50-76.1994).
- Mattson MP, Engle MG, Rychlik B (Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons. *Mol Chem Neuropathol* 15:117-142.1991).

- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349:1546-1549.1997).
- McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE (beta-Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes. *J Neurosci* 18:4451-4460.1998).
- McGeer PL, McGeer EG (Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 777:213-220.1996).
- Means AR (Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol* 14:4-13.2000).
- Medina MG, Ledesma MD, Dominguez JE, Medina M, Zafra D, Alameda F, Dotti CG, Navarro P (Tissue plasminogen activator mediates amyloid-induced neurotoxicity via Erk1/2 activation. *EMBO J* 24:1706-1716.2005).
- Meijer L, Borgne A, Mulner O, Chong JP, Blow JJ, Inagaki N, Inagaki M, Delcros JG, Moulinoux JP (Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243:527-536.1997).
- Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P (GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* 10:1255-1266.2003).
- Melo JV, Gordon DE, Cross NC, Goldman JM (The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81:158-165.1993).
- Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM (Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 91:633-641.1996).
- Mercer SE, Friedman E (Mirk/Dyrk1B: a multifunctional dual-specificity kinase involved in growth arrest, differentiation, and cell survival. *Cell Biochem Biophys* 45:303-315.2006).
- Messner DJ, Romeo C, Boynton A, Rossie S (Inhibition of PP2A, but not PP5, mediates p53 activation by low levels of okadaic acid in rat liver epithelial cells. *J Cell Biochem* 99:241-255.2006).
- Miller CT, Aggarwal S, Lin TK, Dagenais SL, Contreras JI, Orringer MB, Glover TW, Beer DG, Lin L (Amplification and overexpression of the dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2) gene in esophageal and lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 63:4136-4143.2003).
- Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA (Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* 24:186-191.1999).
- Mitra SK, Schlaepfer DD (Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18:516-523.2006).
- Miyajima M, Nornes HO, Neuman T (Cyclin E is expressed in neurons and forms complexes with cdk5. *Neuroreport* 6:1130-1132.1995).
- Mizuno R, Oya M, Hara S, Matsumoto M, Horiguchi A, Ohigashi T, Marumo K, Murai M (Modulation of bcl-2 family proteins in MAPK independent apoptosis induced by a cdc25 phosphatase inhibitor Cpd 5 in renal cancer cells. *Oncol Rep* 14:639-644.2005).
- Moreira PI, Honda K, Liu Q, Santos MS, Oliveira CR, Aliev G, Nunomura A, Zhu X, Smith MA, Perry G (Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology. *Curr Alzheimer Res* 2:403-408.2005a).

- Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Nunomura A, Castellani RJ, Perry G (Oxidative stress and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1043:545-552.2005b).
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985.2000).
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10:1151-1160.1993).
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270:823-829.1995).
- Morishima M, Ihara Y (Posttranslational modifications of tau in paired helical filaments. *Dementia* 5:282-288.1994).
- Morita K, Saitoh M, Tobiume K, Matsuura H, Enomoto S, Nishitoh H, Ichijo H (Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J* 20:6028-6036.2001).
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC (Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem* 81:1073-1083.2002).
- Mukai H, Kitagawa M, Shibata H, Takanaga H, Mori K, Shimakawa M, Miyahara M, Hirao K, Ono Y (Activation of PKN, a novel 120-kDa protein kinase with leucine zipper-like sequences, by unsaturated fatty acids and by limited proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 204:348-356.1994).
- Mukai H, Ono Y (A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 199:897-904.1994).
- Murthy SN, Wilson JH, Lukas TJ, Kuret J, Lorand L (Cross-linking sites of the human tau protein, probed by reactions with human transglutaminase. *J Neurochem* 71:2607-2614.1998).
- Nacharaju P, Ko L, Yen SH (Characterization of in vitro glycation sites of tau. *J Neurochem* 69:1709-1719.1997).
- Nacharaju P, Lewis J, Easson C, Yen S, Hackett J, Hutton M, Yen SH (Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett* 447:195-199.1999).
- Nagase T, Kikuno R, Ishikawa K, Hirosawa M, Ohara O (Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 7:143-150.2000).
- Nairn AC, Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Greengard P (The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:14-23.2004).
- Nayeem N, Kerr F, Naumann H, Linehan J, Lovestone S, Brandner S (Hyperphosphorylation of tau and neurofilaments and activation of CDK5 and ERK1/2 in PTEN-deficient cerebella. *Mol Cell Neurosci* 34:400-408.2007).
- Necula M, Kuret J (Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro. *J Biol Chem* 279:49694-49703.2004).

- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387:271-280.1986).
- Newton AC (Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370:361-371.2003).
- Nie K, Yu JC, Fu Y, Cheng HY, Chen FY, Qu Y, Han JX (Age-related decrease in constructive activation of Akt/PKB in SAMP10 hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 378:103-107.2009).
- Nikolic M, Dudek H, Kwon YT, Ramos YF, Tsai LH (The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* 10:816-825.1996).
- Nixon RA (Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 120:4081-4091.2007).
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6990-6995.2005).
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA (Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:631-641.2006).
- Nusse R (Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15:28-32.2005).
- Nuydens R, De Jong M, Nuyens R, Cornelissen F, Geerts H (Neuronal kinase stimulation leads to aberrant tau phosphorylation and neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 16:465-475; discussion 475-467.1995).
- Nuydens R, Dispensy G, Van Den Keiboom G, de Jong M, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H (Bcl-2 protects against apoptosis-related microtubule alterations in neuronal cells. *Apoptosis* 5:43-51.2000).
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:1063-1070.2003a).
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.2003b).
- Oddo S, Caccamo A, Tseng B, Cheng D, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM (Blocking Abeta42 accumulation delays the onset and progression of tau pathology via the C terminus of heat shock protein70-interacting protein: a mechanistic link between Abeta and tau pathology. *J Neurosci* 28:12163-12175.2008).
- Ogris E, Du X, Nelson KC, Mak EK, Yu XX, Lane WS, Pallas DC (A protein phosphatase methyltransferase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 274:14382-14391.1999).
- Olofsson MH, Havelka AM, Brnjic S, Shoshan MC, Linder S (Charting calcium-regulated apoptosis pathways using chemical biology: role of calmodulin kinase II. *BMC Chem Biol* 8:2.2008).
- Ono T, Kawabe T, Sonta S, Okamoto T (Assignment of MARK3 alias KP78 to human chromosome band 14q32.3 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 79:101-102.1997).

- Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salamon R, Renaud S, Breteler MB (Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol (Paris)* 153:185-192.1997).
- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C (Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61:46-54.2003).
- Ouimet CC, da Cruz e Silva EF, Greengard P (The alpha and gamma 1 isoforms of protein phosphatase 1 are highly and specifically concentrated in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3396-3400.1995).
- Ozer RS, Halpain S (Phosphorylation-dependent localization of microtubule-associated protein MAP2c to the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 11:3573-3587.2000).
- Pagano MA, Meggio F, Ruzzene M, Andrzejewska M, Kazimierczuk Z, Pinna LA (2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole: a novel powerful and selective inhibitor of protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* 321:1040-1044.2004).
- Pagano MA, Poletto G, Di Maira G, Cozza G, Ruzzene M, Sarno S, Bain J, Elliott M, Moro S, Zagotto G, Meggio F, Pinna LA (Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors. *Chembiochem* 8:129-139.2007).
- Paglini G, Caceres A (The role of the Cdk5--p35 kinase in neuronal development. *Eur J Biochem* 268:1528-1533.2001).
- Paglini G, Peris L, Diez-Guerra J, Quiroga S, Caceres A (The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. *EMBO Rep* 2:1139-1144.2001).
- Pallas M, Verdaguer E, Jorda EG, Jimenez A, Canudas AM, Camins A (Flavopiridol: an antitumor drug with potential application in the treatment of neurodegenerative diseases. *Med Hypotheses* 64:120-123.2005).
- Panda D, Samuel JC, Massie M, Feinstein SC, Wilson L (Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9548-9553.2003).
- Panneerselvam S, Marx A, Mandelkow EM, Mandelkow E (Structure of the catalytic and ubiquitin-associated domains of the protein kinase MARK/Par-1. *Structure* 14:173-183.2006).
- Pant HC, Veeranna (Neurofilament phosphorylation. *Biochem Cell Biol* 73:575-592.1995).
- Papasozomenos SC, Binder LI (Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton* 8:210-226.1987).
- Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ (Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 19:496-503.2000).
- Park SY, Ferreira A (The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 25:5365-5375.2005).
- Park SY, Tournell C, Sinjoanu RC, Ferreira A (Caspase-3- and calpain-mediated tau cleavage are differentially prevented by estrogen and testosterone in beta-amyloid-treated hippocampal neurons. *Neuroscience* 144:119-127.2007).
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ (Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* 418:475-489.2009).

- Patzke H, Maddineni U, Ayala R, Morabito M, Volker J, Dikkes P, Ahljianian MK, Tsai LH (Partial rescue of the p35^{-/-} brain phenotype by low expression of a neuronal-specific enolase p25 transgene. *J Neurosci* 23:2769-2778.2003).
- Paudel HK (The regulatory Ser262 of microtubule-associated protein tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. *J Biol Chem* 272:1777-1785.1997).
- Paudel HK, Zwiers H, Wang JH (Phosphorylase kinase phosphorylates the calmodulin-binding regulatory regions of neuronal tissue-specific proteins B-50 (GAP-43) and neurogranin. *J Biol Chem* 268:6207-6213.1993).
- Peacock JW, Palmer J, Fink D, Ip S, Pietras EM, Mui AL, Chung SW, Gleave ME, Cox ME, Parsons R, Peter ME, Ong CJ (PTEN loss promotes mitochondrially dependent type II Fas-induced apoptosis via PEA-15. *Mol Cell Biol* 29:1222-1234.2009).
- Pei JJ, Braak H, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 109:45-55.2002).
- Pei JJ, Gong CX, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 163:845-858.2003).
- Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:70-78.1997).
- Peifer M, Polakis P (Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287:1606-1609.2000).
- Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL (LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron* 53:703-717.2007).
- Pena F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Marquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M (Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: Role of FYN-kinase. *Hippocampus*.2009).
- Peng CY, Graves PR, Ogg S, Thoma RS, Byrnes MJ, 3rd, Wu Z, Stephenson MT, Piwnicka-Worms H (C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ* 9:197-208.1998).
- Pennanen L, Gotz J (Different tau epitopes define Abeta42-mediated tau insolubility. *Biochem Biophys Res Commun* 337:1097-1101.2005).
- Perez M, Avila J (The expression of casein kinase 2alpha' and phosphatase 2A activity. *Biochim Biophys Acta* 1449:150-156.1999).
- Perez M, Hernandez F, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J (Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 5:301-308.2003).
- Perrotti D, Neviani P (Protein phosphatase 2A (PP2A), a drugable tumor suppressor in Ph1(+) leukemias. *Cancer Metastasis Rev* 27:159-168.2008).
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V (Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3033-3036.1987).
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423:435-439.2003).

- Pigino G, Morfini G, Atagi Y, Deshpande A, Yu C, Jungbauer L, LaDu M, Busciglio J, Brady S (Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5907-5912.2009).
- Planel E, Yasutake K, Fujita SC, Ishiguro K (Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J Biol Chem* 276:34298-34306.2001).
- Plattner F, Angelo M, Giese KP (The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 281:25457-25465.2006).
- Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM (c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 13:2400-2411.1999).
- Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G (Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 108:247-259.2002).
- Podtcheko A, Ohtsuru A, Tsuda S, Namba H, Saenko V, Nakashima M, Mitsutake N, Kanda S, Kurebayashi J, Yamashita S (The selective tyrosine kinase inhibitor, STI571, inhibits growth of anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1889-1896.2003).
- Polychronopoulos P, Magiatis P, Skaltsounis AL, Myrianthopoulos V, Mikros E, Tarricone A, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Leost M, Greengard P, Meijer L (Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* 47:935-946.2004).
- Pomerantz JL, Baltimore D (Signal transduction. A cellular rescue team. *Nature* 406:26-27, 29.2000).
- Popescu NC, Kawakami T, Matsui T, Robbins KC (Chromosomal localization of the human fyn gene. *Oncogene* 1:449-451.1987).
- Poppek D, Keck S, Ermak G, Jung T, Stolzing A, Ullrich O, Davies KJ, Grune T (Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochem J* 400:511-520.2006).
- Prevost GP, Brezak MC, Goubin F, Mondesert O, Galcera MO, Quaranta M, Alby F, Lavergne O, Ducommun B (Inhibitors of the CDC25 phosphatases. *Prog Cell Cycle Res* 5:225-234.2003).
- Proctor CJ, Gray DA (GSK3 and p53 - is there a link in Alzheimer's disease? *Mol Neurodegener* 5:7.2010).
- Rafferty M, Campbell R, Glaros EN, Rye KA, Halliday GM, Jessup W, Garner B (Phosphorylation of apolipoprotein-E at an atypical protein kinase CK2 PSD/E site in vitro. *Biochemistry* 44:7346-7353.2005).
- Rahman A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Phosphothreonine-212 of Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau is a preferred substrate of protein phosphatase-1. *Neurochem Res* 30:277-287.2005).
- Rahman A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (PP2B isolated from human brain preferentially dephosphorylates Ser-262 and Ser-396 of the Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated tau. *J Neural Transm* 113:219-230.2006).
- Rametti A, Esclaire F, Yardin C, Cogne N, Terro F (Lithium down-regulates tau in cultured cortical neurons: a possible mechanism of neuroprotection. *Neurosci Lett* 434:93-98.2008).
- Rametti A, Esclaire F, Yardin C, Terro F (Linking alterations in tau phosphorylation and cleavage during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 279:54518-54528.2004).

- Rankin CA, Sun Q, Gamblin TC (Tau phosphorylation by GSK-3 β promotes tangle-like filament morphology. *Mol Neurodegener* 2:12.2007).
- Rao N, Ghosh AK, Ota S, Zhou P, Reddi AL, Hakezi K, Druker BK, Wu J, Band H (The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J* 20:7085-7095.2001).
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364-6369.2002).
- Rapoport M, Ferreira A (PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons. *J Neurochem* 74:125-133.2000).
- Ray RM, Bhattacharya S, Johnson LR (Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 280:31091-31100.2005).
- Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A (Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 156:885-898.2009).
- Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Hardy J, Dunckley T, Zismann VL, Joshipura KD, Pearson JV, Hu-Lince D, Huentelman MJ, Craig DW, Coon KD, Liang WS, Herbert RH, Beach T, Rohrer KC, Zhao AS, Leung D, Bryden L, Marlowe L, Kaleem M, Mastroeni D, Grover A, Heward CB, Ravid R, Rogers J, Hutton ML, Melquist S, Petersen RC, Alexander GE, Caselli RJ, Kukull W, Papassotiropoulos A, Stephan DA (GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron* 54:713-720.2007).
- Remy G, Risco AM, Inesta-Vaquera FA, Gonzalez-Teran B, Sabio G, Davis RJ, Cuenda A (Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cell Signal* 22:660-667.2010).
- Ren QG, Liao XM, Chen XQ, Liu GP, Wang JZ (Effects of tau phosphorylation on proteasome activity. *FEBS Lett* 581:1521-1528.2007).
- Resjo S, Oknianska A, Zolnierowicz S, Manganiello V, Degerman E (Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A. *Biochem J* 341 (Pt 3):839-845.1999).
- Reyes JF, Reynolds MR, Horowitz PM, Fu Y, Guillozet-Bongaarts AL, Berry R, Binder LI (A possible link between astrocyte activation and tau nitration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 31:198-208.2008).
- Reyland ME (Protein kinase C δ and apoptosis. *Biochem Soc Trans* 35:1001-1004.2007).
- Reyland ME (Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci* 14:2386-2399.2009).
- Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP, Anderton BH (Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C γ 1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 283:18177-18186.2008).
- Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH (Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* 68:1736-1744.1997).
- Reynolds MR, Berry RW, Binder LI (Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 44:1690-1700.2005).

- Reynolds MR, Lukas TJ, Berry RW, Binder LI (Peroxynitrite-mediated tau modifications stabilize preformed filaments and destabilize microtubules through distinct mechanisms. *Biochemistry* 45:4314-4326.2006a).
- Reynolds MR, Reyes JF, Fu Y, Bigio EH, Guillozet-Bongaarts AL, Berry RW, Binder LI (Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *J Neurosci* 26:10636-10645.2006b).
- Rezazadeh S, Claydon TW, Fedida D (KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 317:292-299.2006).
- Ribas J, Boix J, Meijer L ((R)-roscovitine (CYC202, Seliciclib) sensitizes SH-SY5Y neuroblastoma cells to nutlin-3-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 312:2394-2400.2006).
- Rickle A, Bogdanovic N, Volkmann I, Zhou X, Pei JJ, Winblad B, Cowburn RF (PTEN levels in Alzheimer's disease medial temporal cortex. *Neurochem Int* 48:114-123.2006).
- Riederer IM, Schiffrin M, Kovari E, Bouras C, Riederer BM (Ubiquitination and cysteine nitrosylation during aging and Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.*2009).
- Risnik VV, Adam G, Gusev NB, Friedrich P (Casein kinases I and II bound to pig brain microtubules. *Cell Mol Neurobiol* 8:315-324.1988).
- Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT, Cotman CW (Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest* 114:121-130.2004).
- Ritchie CW, Bush AI, Mackinnon A, Macfarlane S, Mastwyk M, MacGregor L, Kiers L, Cherny R, Li QX, Tammer A, Carrington D, Mavros C, Volitakis I, Xilinas M, Ames D, Davis S, Beyreuther K, Tanzi RE, Masters CL (Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 60:1685-1691.2003).
- Roberson ED, Scarce-Lavie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.2007).
- Robinson MJ, Cobb MH (Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:180-186.1997).
- Robinson SR, Bishop GM, Munch G (Alzheimer vaccine: amyloid-beta on trial. *Bioessays* 25:283-288.2003).
- Roder HM, Eden PA, Ingram VM (Brain protein kinase PK40erk converts TAU into a PHF-like form as found in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 193:639-647.1993).
- Rodionova E, Conzelmann M, Maraskovsky E, Hess M, Kirsch M, Giese T, Ho AD, Zoller M, Dreger P, Luft T (GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109:1584-1592.2007).
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. (Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775-778.1995).
- Rohn TT, Head E (Caspases as therapeutic targets in Alzheimer's disease: is it time to "cut" to the chase? *Int J Clin Exp Pathol* 2:108-118.2009).

- Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E (Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 11:341-354.2002).
- Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues JF (Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol* 169:489-496.2009).
- Roskoski R, Jr. (Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324:1155-1164.2004).
- Roskoski R, Jr. (Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1-14.2005).
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272:1023-1026.1996).
- Rudrabhatla P, Pant HC (Phosphorylation-Specific Peptidyl-Prolyl Isomerization of Neuronal Cytoskeletal Proteins by Pin1: Implications for Therapeutics in Neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*.2009).
- Rusnak F, Mertz P (Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521.2000).
- Ruteshouser EC, Ashworth LK, Huff V (Absence of PPP2R1A mutations in Wilms tumor. *Oncogene* 20:2050-2054.2001).
- Ruvolo PP, Clark W, Mumby M, Gao F, May WS (A functional role for the B56 alpha-subunit of protein phosphatase 2A in ceramide-mediated regulation of Bcl2 phosphorylation status and function. *J Biol Chem* 277:22847-22852.2002).
- Rylatt DB, Aitken A, Bilham T, Condon GD, Embi N, Cohen P (Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107:529-537.1980).
- Ryoo SR, Cho HJ, Lee HW, Jeong HK, Radnaabazar C, Kim YS, Kim MJ, Son MY, Seo H, Chung SH, Song WJ (Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104:1333-1344.2008).
- Ryoo SR, Jeong HK, Radnaabazar C, Yoo JJ, Cho HJ, Lee HW, Kim IS, Cheon YH, Ahn YS, Chung SH, Song WJ (DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J Biol Chem* 282:34850-34857.2007).
- Ryves WJ, Harwood AJ (Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 280:720-725.2001).
- Sacher F, Moller C, Bone W, Gottwald U, Fritsch M (The expression of the testis-specific Dyrk4 kinase is highly restricted to step 8 spermatids but is not required for male fertility in mice. *Mol Cell Endocrinol* 267:80-88.2007).
- Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yamamori H, Nessa BN, Morihara T, Takeda M (Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: implications for the mechanism of tau aggregation. *J Neurochem* 108:33-43.2009).
- Sahara N, Murayama M, Lee B, Park JM, Lagalwar S, Binder LI, Takashima A (Active c-jun N-terminal kinase induces caspase cleavage of tau and additional phosphorylation by GSK-3beta is required for tau aggregation. *Eur J Neurosci* 27:2897-2906.2008).

- Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Miyamoto E, Kishimoto T, Hisanaga S (In situ dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Lett* 376:238-242.1995).
- Saitoh T, Horsburgh K, Masliah E (Hyperactivation of signal transduction systems in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 695:34-41.1993).
- Sanchez-Ortiz E, Hahm BK, Armstrong DL, Rossie S (Protein phosphatase 5 protects neurons against amyloid-beta toxicity. *J Neurochem* 111:391-402.2009).
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.2005).
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC (Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 170:1101-1111.2005).
- Sarno S, de Moliner E, Ruzzene M, Pagano MA, Battistutta R, Bain J, Fabbro D, Schoepfer J, Elliott M, Furet P, Meggio F, Zanotti G, Pinna LA (Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *Biochem J* 374:639-646.2003).
- Sato S, Cerny RL, Buescher JL, Ikezu T (Tau-tubulin kinase 1 (TTBK1), a neuron-specific tau kinase candidate, is involved in tau phosphorylation and aggregation. *J Neurochem* 98:1573-1584.2006).
- Sato S, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Hashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A (Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J Biol Chem* 277:42060-42065.2002).
- Sato S, Xu J, Okuyama S, Martinez LB, Walsh SM, Jacobsen MT, Swan RJ, Schlautman JD, Ciborowski P, Ikezu T (Spatial learning impairment, enhanced CDK5/p35 activity, and downregulation of NMDA receptor expression in transgenic mice expressing tau-tubulin kinase 1. *J Neurosci* 28:14511-14521.2008).
- Schaffer B, Wiedau-Pazos M, Geschwind DH (Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in neural and non-neural tissues. *Gene* 302:73-81.2003).
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177.1999).
- Schenk DB, Seubert P, Grundman M, Black R (A beta immunotherapy: Lessons learned for potential treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2:255-260.2005).
- Schenk F, Leuba, G., Büla, C. (2004) Du vieillissement cérébral à la maladie d'Alzheimer (Autour de la notion de plasticité).
- Schmid AC, Byrne RD, Vilar R, Woscholski R (Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. *FEBS Lett* 566:35-38.2004).
- Schwab C, DeMaggio AJ, Ghoshal N, Binder LI, Kuret J, McGeer PL (Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 21:503-510.2000).

- Segu L, Pascaud A, Costet P, Darmon M, Buhot MC (Impairment of spatial learning and memory in ELKL Motif Kinase1 (EMK1/MARK2) knockout mice. *Neurobiol Aging* 29:231-240.2008).
- Seidensticker MJ, Behrens J (Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta* 1495:168-182.2000).
- Seifert A, Allan LA, Clarke PR (DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J* 275:6268-6280.2008).
- Sengupta A, Kabat J, Novak M, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys* 357:299-309.1998).
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* 167:99-105.1997).
- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buee L (Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5:207-224.2008).
- Sergeant N, Delacourte A, Buee L (Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:179-197.2005).
- Serrano L, Hernandez MA, Diaz-Nido J, Avila J (Association of casein kinase II with microtubules. *Exp Cell Res* 181:263-272.1989).
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, et al. (Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917-18922.1995).
- Sharma P, Sharma M, Amin ND, Albers RW, Pant HC (Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11156-11160.1999).
- Shaw G, Chau V (Ubiquitin and microtubule-associated protein tau immunoreactivity each define distinct structures with differing distributions and solubility properties in Alzheimer brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2854-2858.1988).
- Shaw PC, Davies AF, Lau KF, Garcia-Barcelo M, Waye MM, Lovestone S, Miller CC, Anderton BH (Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 alpha and -3 beta encoding genes. *Genome* 41:720-727.1998).
- Shea TB, Jung C, Pant HC (Does neurofilament phosphorylation regulate axonal transport? *Trends Neurosci* 26:397-400.2003).
- Shelton SB, Johnson GV (Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *J Neurochem* 88:1313-1326.2004).
- Shen C, Chen Y, Liu H, Zhang K, Zhang T, Lin A, Jing N (Hydrogen peroxide promotes Abeta production through JNK-dependent activation of gamma-secretase. *J Biol Chem* 283:17721-17730.2008).
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. (Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.1995).
- Shetty KT, Link WT, Pant HC (cdc2-like kinase from rat spinal cord specifically phosphorylates KSPXK motifs in neurofilament proteins: isolation and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6844-6848.1993).

- Shi J, Zhang T, Zhou C, Chohan MO, Gu X, Wegiel J, Zhou J, Hwang YW, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX, Liu F (Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome. *J Biol Chem* 283:28660-28669.2008).
- Shibasaki F, Hallin U, Uchino H (Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem* 131:1-15.2002).
- Shibasaki F, McKeon F (Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 131:735-743.1995).
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS (CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279:4869-4876.2004).
- Shirazi SK, Wood JG (The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport* 4:435-437.1993).
- Siddiqui RA, Jenks LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ, Stillwell W (Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. *Biochim Biophys Acta* 1499:265-275.2001).
- Simonian NA, Elvhage T, Czernik AJ, Greengard P, Hyman BT (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II immunostaining is preserved in Alzheimer's disease hippocampal neurons. *Brain Res* 657:294-299.1994).
- Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J Neurochem* 64:1420-1423.1995).
- Singh TJ, Wang JZ, Novak M, Kontzekova E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett* 387:145-148.1996).
- Sinjoanu RC, Kleinschmidt S, Bitner RS, Brioni JD, Moeller A, Ferreira A (The novel calpain inhibitor A-705253 potently inhibits oligomeric beta-amyloid-induced dynamin 1 and tau cleavage in hippocampal neurons. *Neurochem Int* 53:79-88.2008).
- Skinner J, Sinclair C, Romeo C, Armstrong D, Charbonneau H, Rossie S (Purification of a fatty acid-stimulated protein-serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J Biol Chem* 272:22464-22471.1997).
- Skurat AV, Dietrich AD (Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J Biol Chem* 279:2490-2498.2004).
- Smith D (Cdk5 in neuroskeletal dynamics. *Neurosignals* 12:239-251.2003).
- Smith DG, Buffet M, Fenwick AE, Haigh D, Ife RJ, Saunders M, Slingsby BP, Stacey R, Ward RW (3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg Med Chem Lett* 11:635-639.2001).
- Smith DS, Tsai LH (Cdk5 behind the wheel: a role in trafficking and transport? *Trends Cell Biol* 12:28-36.2002).
- Smith JA, Zhang R, Varma AK, Das A, Ray SK, Banik NL (Estrogen partially down-regulates PTEN to prevent apoptosis in VSC4.1 motoneurons following exposure to IFN-gamma. *Brain Res*.2009).
- Smith MA, Tabaton M, Perry G (Early contribution of oxidative glycation in Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 217:210-211.1996).
- Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5710-5714.1994).

- Soderling TR (The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. Trends Biochem Sci 24:232-236.1999).
- Song DH, Sussman DJ, Seldin DC (Endogenous protein kinase CK2 participates in Wnt signaling in mammary epithelial cells. J Biol Chem 275:23790-23797.2000).
- Song WJ, Sternberg LR, Kasten-Sportes C, Keuren ML, Chung SH, Slack AC, Miller DE, Glover TW, Chiang PW, Lou L, Kurnit DM (Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region". Genomics 38:331-339.1996).
- Songyang Z, Blechner S, Hoagland N, Hoekstra MF, Piwnica-Worms H, Cantley LC (Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. Curr Biol 4:973-982.1994).
- Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T (Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. Neurosci Lett 471:20-24.2010).
- Sontag E (Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. Cell Signal 13:7-16.2001).
- Sontag E, Hladik C, Montgomery L, Luangpirom A, Mudrak I, Ogris E, White CL, 3rd (Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. J Neuropathol Exp Neurol 63:1080-1091.2004a).
- Sontag E, Luangpirom A, Hladik C, Mudrak I, Ogris E, Speciale S, White CL, 3rd (Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. J Neuropathol Exp Neurol 63:287-301.2004b).
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Bloom GS, Mumby MC (Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. Neuron 17:1201-1207.1996).
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, 3rd, Mumby MC, Bloom GS (Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. J Biol Chem 274:25490-25498.1999).
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, Diaz-Arrastia R, Ogris E, Dayal S, Lentz SR, Arning E, Bottiglieri T (Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau and amyloid precursor protein regulation. J Neurosci 27:2751-2759.2007).
- Sontag JM, Nunbhakdi-Craig V, Montgomery L, Arning E, Bottiglieri T, Sontag E (Folate deficiency induces in vitro and mouse brain region-specific downregulation of leucine carboxyl methyltransferase-1 and protein phosphatase 2A B(α) subunit expression that correlate with enhanced tau phosphorylation. J Neurosci 28:11477-11487.2008).
- Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM (Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. Neurosci Lett 197:149-153.1995).
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenheede J, Moechars D, Loos R, Van Leuven F (Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. J Biol Chem 275:41340-41349.2000).

- Stambolic V, Woodgett JR (Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303 (Pt 3):701-704.1994).
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV (Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15:356-362.1997).
- Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow EM, Feany MB (S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J Neurosci Res* 85:1271-1278.2007).
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8098-8102.1993).
- Stukenberg PT, Kirschner MW (Pin1 acts catalytically to promote a conformational change in Cdc25. *Mol Cell* 7:1071-1083.2001).
- Sugden PH, Fuller SJ, Weiss SC, Clerk A (Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S137-153.2008).
- Summy JM, Trevino JG, Lesslie DP, Baker CH, Shakespeare WC, Wang Y, Sundaramoorthi R, Metcalf CA, 3rd, Keats JA, Sawyer TK, Gallick GE (AP23846, a novel and highly potent Src family kinase inhibitor, reduces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human solid tumor cell lines and abrogates downstream angiogenic processes. *Mol Cancer Ther* 4:1900-1911.2005).
- Sun L, Liu SY, Zhou XW, Wang XC, Liu R, Wang Q, Wang JZ (Inhibition of protein phosphatase 2A- and protein phosphatase 1-induced tau hyperphosphorylation and impairment of spatial memory retention in rats. *Neuroscience* 118:1175-1182.2003).
- Sun L, Wang X, Liu S, Wang Q, Wang J, Bennecib M, Gong CX, Sengupta A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Bilateral injection of isoproterenol into hippocampus induces Alzheimer-like hyperphosphorylation of tau and spatial memory deficit in rat. *FEBS Lett* 579:251-258.2005).
- Sun X, Sato S, Murayama O, Murayama M, Park JM, Yamaguchi H, Takashima A (Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neurosci Lett* 321:61-64.2002).
- Swatton JE, Prabakaran S, Karp NA, Lilley KS, Bahn S (Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE). *Mol Psychiatry* 9:128-143.2004a).
- Swatton JE, Sellers LA, Faull RL, Holland A, Iritani S, Bahn S (Increased MAP kinase activity in Alzheimer's and Down syndrome but not in schizophrenia human brain. *Eur J Neurosci* 19:2711-2719.2004b).
- Taira N, Nihira K, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K (DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell* 25:725-738.2007).
- Takahashi M, Mukai H, Toshimori M, Miyamoto M, Ono Y (Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11566-11571.1998).

- Takahashi M, Tsujioka Y, Yamada T, Tsuboi Y, Okada H, Yamamoto T, Liposits Z (Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 97:635-641.1999).
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B (Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9637-9641.1998).
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K (Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidyl inositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 203:33-36.1996).
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7789-7793.1993).
- Tan Y, Demeter MR, Ruan H, Comb MJ (BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *J Biol Chem* 275:25865-25869.2000).
- Tanaka T, Zhong J, Iqbal K, Trenkner E, Grundke-Iqbal I (The regulation of phosphorylation of tau in SY5Y neuroblastoma cells: the role of protein phosphatases. *FEBS Lett* 426:248-254.1998).
- Taniguchi T, Kawamata T, Mukai H, Hasegawa H, Isagawa T, Yasuda M, Hashimoto T, Terashima A, Nakai M, Mori H, Ono Y, Tanaka C (Phosphorylation of tau is regulated by PKN. *J Biol Chem* 276:10025-10031.2001).
- Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 166:1761-1771.2005).
- Tanimukai H, Kudo T, Tanaka T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M (Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disease. *Psychogeriatrics* 9:103-109.2009).
- Tapia C, Featherstone T, Gomez C, Taillon-Miller P, Allende CC, Allende JE (Cloning and chromosomal localization of the gene coding for human protein kinase CK1. *FEBS Lett* 349:307-312.1994).
- Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R (Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429:780-784.2004).
- Terwel D, Muylleert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, Devijver H, Van Leuven F (Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol* 172:786-798.2008).
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M (Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320:667-670.2008).
- Thornton TM, Rincon M (Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5:44-51.2009).
- Tian Q, Zhang JX, Zhang Y, Wu F, Tang Q, Wang C, Shi ZY, Zhang JH, Liu S, Wang Y, Zhang Q, Wang JZ (Biphasic Effects of Forskolin on Tau Phosphorylation and Spatial Memory in Rats. *J Alzheimers Dis*.2009).
- Timm T, Li XY, Biernat J, Jiao J, Mandelkow E, Vandekerckhove J, Mandelkow EM (MARKK, a Ste20-like kinase, activates the polarity-inducing kinase MARK/PAR-1. *EMBO J* 22:5090-5101.2003).
- Timm T, Marx A, Panneerselvam S, Mandelkow E, Mandelkow EM (Structure and regulation of MARK, a kinase involved in abnormal phosphorylation of Tau protein. *BMC Neurosci* 9 Suppl 2:S9.2008).

- Tokumitsu H, Chijiwa T, Hagiwara M, Mizutani A, Terasawa M, Hidaka H (KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 265:4315-4320.1990).
- Tomizawa K, Omori A, Ohtake A, Sato K, Takahashi M (Tau-tubulin kinase phosphorylates tau at Ser-208 and Ser-210, sites found in paired helical filament-tau. *FEBS Lett* 492:221-227.2001).
- Torres J, Pulido R (The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 276:993-998.2001).
- Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, et al. (The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266:15771-15781.1991).
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305-33312.2007).
- Trinczek B, Brajenovic M, Ebner A, Drewes G (MARK4 is a novel microtubule-associated proteins/microtubule affinity-regulating kinase that binds to the cellular microtubule network and to centrosomes. *J Biol Chem* 279:5915-5923.2004).
- Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN, Dedhar S (Cell-extracellular matrix interactions stimulate the AP-1 transcription factor in an integrin-linked kinase- and glycogen synthase kinase 3-dependent manner. *Mol Cell Biol* 19:7420-7427.1999).
- Tsai KK, Yuan ZM (c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction. *Cancer Res* 63:3418-3424.2003).
- Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, Jr., Chae T, Harlow E (p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371:419-423.1994).
- Tsuji S, Morinobu S, Tanaka K, Kawano K, Yamawaki S (Lithium, but not valproate, induces the serine/threonine phosphatase activity of protein phosphatase 2A in the rat brain, without affecting its expression. *J Neural Transm* 110:413-425.2003).
- Tsujio I, Zaidi T, Xu J, Kotula L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Inhibitors of protein phosphatase-2A from human brain structures, immunocytological localization and activities towards dephosphorylation of the Alzheimer type hyperphosphorylated tau. *FEBS Lett* 579:363-372.2005).
- Tsukane M, Yamauchi T (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II mediates apoptosis of P19 cells expressing human tau during neural differentiation with retinoic acid treatment. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24:365-371.2009).
- Tsutsumi K, Tomomura M, Furuichi T, Hisanaga S (Palmitoylation-dependent endosomal localization of AATYK1A and its interaction with Src. *Genes Cells* 13:949-964.2008).
- Tucholski J, Kuret J, Johnson GV (Tau is modified by tissue transglutaminase in situ: possible functional and metabolic effects of polyamination. *J Neurochem* 73:1871-1880.1999).
- Turenne GA, Price BD (Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol* 2:12.2001).
- Ueyama T, Ren Y, Sakai N, Takahashi M, Ono Y, Kondoh T, Tamaki N, Saito N (Generation of a constitutively active fragment of PKN in microglia/macrophages after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurochem* 79:903-913.2001).

- Ugolini G, Cattaneo A, Novak M (Co-localization of truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's disease neurones. *Neuroreport* 8:3709-3712.1997).
- Ulloa L, Diez-Guerra FJ, Avila J, Diaz-Nido J (Localization of differentially phosphorylated isoforms of microtubule-associated protein 1B in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 61:211-223.1994).
- Umahara T, Uchihara T, Tsuchiya K, Nakamura A, Iwamoto T, Ikeda K, Takasaki M (14-3-3 proteins and zeta isoform containing neurofibrillary tangles in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 108:279-286.2004).
- Underwood DC, Osborn RR, Kotzer CJ, Adams JL, Lee JC, Webb EF, Carpenter DC, Bochnowicz S, Thomas HC, Hay DW, Griswold DE (SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. *J Pharmacol Exp Ther* 293:281-288.2000).
- Utreras E, Maccioni R, Gonzalez-Billault C (Cyclin-dependent kinase 5 activator p35 over-expression and amyloid beta synergism increase apoptosis in cultured neuronal cells. *Neuroscience*.2009).
- Vale C, Botana LM (Marine toxins and the cytoskeleton: okadaic acid and dinophysistoxins. *FEBS J* 275:6060-6066.2008).
- Van den Haute C, Spittaels K, Van Dorpe J, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Van Leuven F (Coexpression of human cdk5 and its activator p35 with human protein tau in neurons in brain of triple transgenic mice. *Neurobiol Dis* 8:32-44.2001).
- Van Etten RA (Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 9:179-186.1999).
- Van Hoof C, Goris J (Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. *Biochim Biophys Acta* 1640:97-104.2003).
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3:561-576.2000).
- Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR (Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20:5010-5018.2000).
- Vazquez MC, Vargas LM, Inestrosa NC, Alvarez AR (c-Abl modulates AICD dependent cellular responses: transcriptional induction and apoptosis. *J Cell Physiol* 220:136-143.2009).
- Veeranna, Kaji T, Boland B, Odrliin T, Mohan P, Basavarajappa BS, Peterhoff C, Cataldo A, Rudnicki A, Amin N, Li BS, Pant HC, Hungund BL, Arancio O, Nixon RA (Calpain mediates calcium-induced activation of the erk1,2 MAPK pathway and cytoskeletal phosphorylation in neurons: relevance to Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:795-805.2004).
- Vega IE, Cui L, Propst JA, Hutton ML, Lee G, Yen SH (Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Brain Res Mol Brain Res* 138:135-144.2005).
- Vega IE, Traverso EE, Ferrer-Acosta Y, Matos E, Colon M, Gonzalez J, Dickson D, Hutton M, Lewis J, Yen SH (A novel calcium-binding protein is associated with tau proteins in tauopathy. *J Neurochem* 106:96-106.2008).
- Verdecia MA, Bowman ME, Lu KP, Hunter T, Noel JP (Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains. *Nat Struct Biol* 7:639-643.2000).
- Vincent I, Bu B, Hudson K, Husseman J, Nochlin D, Jin L (Constitutive Cdc25B tyrosine phosphatase activity in adult brain neurons with M phase-type alterations in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105:639-650.2001).

- Vintem AP, Henriques AG, da Cruz ESOA, da Cruz ESEF (PP1 inhibition by Abeta peptide as a potential pathological mechanism in Alzheimer's disease. *Neurotoxicol Teratol* 31:85-88.2009).
- Viquez NM, Fuger P, Valakh V, Daniels RW, Rasse TM, DiAntonio A (PP2A and GSK-3beta act antagonistically to regulate active zone development. *J Neurosci* 29:11484-11494.2009).
- Virshup DM, Shenolikar S (From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33:537-545.2009).
- Vita M, Abdel-Rehim M, Olofsson S, Hassan Z, Meurling L, Siden A, Siden M, Pettersson T, Hassan M (Tissue distribution, pharmacokinetics and identification of roscovitine metabolites in rat. *Eur J Pharm Sci* 25:91-103.2005).
- Vogel T, Benetos A, Verreault R, Kaltenbach G, Kiesmann M, Berthel M ([Risk factors for Alzheimer: towards prevention?]. *Presse Med* 35:1309-1316.2006).
- Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ, Lee VM (PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol* 168:402-412.2001).
- Volpi EV, Romani M, Siniscalco M (Subregional mapping of the human lymphocyte-specific protein tyrosine kinase gene (LCK) to 1p35-->p34.3 and its position relative to the 1p marker D1S57. *Cytogenet Cell Genet* 67:187-189.1994).
- von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E (Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5129-5134.2000).
- Vougianniopoulou K, Ferandin Y, Bettayeb K, Myrianthopoulos V, Lozach O, Fan Y, Johnson CH, Magiatis P, Skaltsounis AL, Mikros E, Meijer L (Soluble 3',6-substituted indirubins with enhanced selectivity toward glycogen synthase kinase -3 alter circadian period. *J Med Chem* 51:6421-6431.2008).
- Wada T, Penninger JM (Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23:2838-2849.2004).
- Wakula P, Beullens M, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 278:18817-18823.2003).
- Wang C, Chang KC, Somers G, Virshup D, Ang BT, Tang C, Yu F, Wang H (Protein phosphatase 2A regulates self-renewal of Drosophila neural stem cells. *Development* 136:2287-2296.2009).
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284:339-343.1999).
- Wang JY (Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19:5643-5650.2000).
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:871-875.1996).
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 25:59-68.2007).
- Wang P, Wu YL, Zhou TH, Sun Y, Pei G (Identification of alternative splicing variants of the beta subunit of human Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II with different activities. *FEBS Lett* 475:107-110.2000).

- Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 269:14566-14574.1994).
- Wang YJ, Chen GH, Hu XY, Lu YP, Zhou JN, Liu RY (The expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and its links with AD-related pathology. *Brain Res* 1031:101-108.2005).
- Wang ZF, Li HL, Li XC, Zhang Q, Tian Q, Wang Q, Xu H, Wang JZ (Effects of endogenous beta-amyloid overproduction on tau phosphorylation in cell culture. *J Neurochem* 98:1167-1175.2006).
- Watts AB, Cline AM, Saad AR, Johnson SB, Peters JI, Williams RO, 3rd (Characterization and pharmacokinetic analysis of tacrolimus dispersion for nebulization in a lung transplanted rodent model. *Int J Pharm.*2009).
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862.1975).
- Welsh GI, Proud CG (Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* 294 (Pt 3):625-629.1993).
- Welsh GI, Stokes CM, Wang X, Sakaue H, Ogawa W, Kasuga M, Proud CG (Activation of translation initiation factor eIF2B by insulin requires phosphatidyl inositol 3-kinase. *FEBS Lett* 410:418-422.1997).
- Wen Y, Planel E, Herman M, Figueroa HY, Wang L, Liu L, Lau LF, Yu WH, Duff KE (Interplay between cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 beta mediated by neuregulin signaling leads to differential effects on tau phosphorylation and amyloid precursor protein processing. *J Neurosci* 28:2624-2632.2008).
- Weng L, Brown J, Eng C (PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet* 10:237-242.2001).
- Westermarck J, Hahn WC (Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med* 14:152-160.2008).
- Weston CR, Davis RJ (The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12:14-21.2002).
- Williamson R, Scales T, Clark BR, Gibb G, Reynolds CH, Kellie S, Bird IN, Varndell IM, Sheppard PW, Everall I, Anderton BH (Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J Neurosci* 22:10-20.2002).
- Winnock M, Letenneur L, Jacqmin-Gadda H, Dallongeville J, Amouyel P, Dartigues JF (Longitudinal analysis of the effect of apolipoprotein E epsilon4 and education on cognitive performance in elderly subjects: the PAQUID study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72:794-797.2002).
- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293:711-714.2001).
- Wojchowski DM, Menon MP, Sathyanarayana P, Fang J, Karur V, Houde E, Kapelle W, Bogachev O (Erythropoietin-dependent erythropoiesis: New insights and questions. *Blood Cells Mol Dis* 36:232-238.2006).
- Woodgett JR (Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9:2431-2438.1990).

- Woodgett JR (Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE* 2001:RE12.2001).
- Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* 355:609-615.2001).
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.1995).
- Xu X, Lagercrantz J, Zickert P, Bajalica-Lagercrantz S, Zetterberg A (Chromosomal localization and 5' sequence of the human protein serine/threonine phosphatase 5' gene. *Biochem Biophys Res Commun* 218:514-517.1996).
- Xu Y, Chen Y, Zhang P, Jeffrey PD, Shi Y (Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Mol Cell* 31:873-885.2008).
- Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E, Yu JW, Strack S, Jeffrey PD, Shi Y (Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell* 127:1239-1251.2006).
- Yabut O, Domogauer J, D'Arcangelo G (Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Neurosci* 30:4004-4014.2010).
- Yaffe MB, Schutkowski M, Shen M, Zhou XZ, Stukenberg PT, Rahfeld JU, Xu J, Kuang J, Kirschner MW, Fischer G, Cantley LC, Lu KP (Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278:1957-1960.1997).
- Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA, Imahori K (Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol* 92:232-241.1996).
- Yamamoto H, Hiragami Y, Murayama M, Ishizuka K, Kawahara M, Takashima A (Phosphorylation of tau at serine 416 by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal soma in brain. *J Neurochem* 94:1438-1447.2005).
- Yamazaki D, Saitoe M ([cAMP/PKA signaling underlies age-related memory impairment]. *Brain Nerve* 60:717-724.2008).
- Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, et al. (Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7787-7791.1994).
- Yancopoulos D, Spillantini MG (Tau protein in familial and sporadic diseases. *Neuromolecular Med* 4:37-48.2003).
- Yang EJ, Ahn YS, Chung KC (Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 276:39819-39824.2001).
- Yang Y, Zhu X, Chen Y, Wang X, Chen R (p38 and JNK MAPK, but not ERK1/2 MAPK, play important role in colchicine-induced cortical neurons apoptosis. *Eur J Pharmacol* 576:26-33.2007).
- Yardin C, Terro F, Lesort M, Esclaire F, Hugon J (FK506 antagonizes apoptosis and c-jun protein expression in neuronal cultures. *Neuroreport* 9:2077-2080.1998).
- Yasojima K, Kuret J, DeMaggio AJ, McGeer E, McGeer PL (Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res* 865:116-120.2000).

- Yin H, Kuret J (C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization. *FEBS Lett* 580:211-215.2006).
- Yoon SY, Choi JE, Choi JM, Kim DH (Dynein cleavage and microtubule accumulation in okadaic acid-treated neurons. *Neurosci Lett* 437:111-115.2008).
- Yoshida S, Harada H, Nagai H, Fukino K, Teramoto A, Emi M (Head-to-head juxtaposition of Fas-associated phosphatase-1 (FAP-1) and c-Jun NH2-terminal kinase 3 (JNK3) genes: genomic structure and seven polymorphisms of the FAP-1 gene. *J Hum Genet* 47:614-619.2002).
- Yoshimura Y, Ichinose T, Yamauchi T (Phosphorylation of tau protein to sites found in Alzheimer's disease brain is catalyzed by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II as demonstrated tandem mass spectrometry. *Neurosci Lett* 353:185-188.2003).
- Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang DM, Xu DH, Sato C, Rogaev E, Smith M, Janus C, Zhang Y, Aebersold R, Farrer LS, Sorbi S, Bruni A, Fraser P, St George-Hyslop P (Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407:48-54.2000).
- Yu XX, Du X, Moreno CS, Green RE, Ogris E, Feng Q, Chou L, McQuoid MJ, Pallas DC (Methylation of the protein phosphatase 2A catalytic subunit is essential for association of Balph α regulatory subunit but not SG2NA, striatin, or polyomavirus middle tumor antigen. *Mol Biol Cell* 12:185-199.2001).
- Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ (A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol* 4:483-490.2008).
- Zahler S, Tietze S, Totzke F, Kubbutat M, Meijer L, Vollmar AM, Apostolakis J (Inverse in silico screening for identification of kinase inhibitor targets. *Chem Biol* 14:1207-1214.2007).
- Zalewska T, Ziemka-Nalecz M, Domanska-Janik K (Transient forebrain ischemia effects interaction of Src, FAK, and PYK2 with the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor in gerbil hippocampus. *Brain Res* 1042:214-223.2005).
- Zamora-Leon SP, Lee G, Davies P, Shafit-Zagardo B (Binding of Fyn to MAP-2c through an SH3 binding domain. Regulation of the interaction by ERK2. *J Biol Chem* 276:39950-39958.2001).
- Zhang D, Li K, Erickson-Miller CL, Weiss M, Wojchowski DM (DYRK gene structure and erythroid-restricted features of DYRK3 gene expression. *Genomics* 85:117-130.2005a).
- Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, Siraganian RP (Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem* 275:35442-35447.2000).
- Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS (Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. *Mol Cancer* 2:1.2003).
- Zhang X, Li F, Bulloj A, Zhang YW, Tong G, Zhang Z, Liao FF, Xu H (Tumor-suppressor PTEN affects tau phosphorylation, aggregation, and binding to microtubules. *FASEB J* 20:1272-1274.2006a).
- Zhang Y, Tian Q, Zhang Q, Zhou X, Liu S, Wang JZ (Hyperphosphorylation of microtubule-associated tau protein plays dual role in neurodegeneration and neuroprotection. *Pathophysiology* 16:311-316.2009).

- Zhang YJ, Xu YF, Chen XQ, Wang XC, Wang JZ (Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity. *FEBS Lett* 579:2421-2427.2005b).
- Zhang YJ, Xu YF, Liu YH, Yin J, Li HL, Wang Q, Wang JZ (Peroxynitrite induces Alzheimer-like tau modifications and accumulation in rat brain and its underlying mechanisms. *FASEB J* 20:1431-1442.2006b).
- Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, van de Wetering M, Clevers H, Saftig P, De Strooper B, He X, Yankner BA (Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395:698-702.1998).
- Zhao WQ, Feng C, Alkon DL (Impairment of phosphatase 2A contributes to the prolonged MAP kinase phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol Dis* 14:458-469.2003).
- Zhao Z, Leister WH, Robinson RG, Barnett SF, Defeo-Jones D, Jones RE, Hartman GD, Huff JR, Huber HE, Duggan ME, Lindsley CW (Discovery of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 15:905-909.2005).
- Zheng-Fischhofer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E (Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* 252:542-552.1998).
- Zheng X, Oancea C, Henschler R, Moore MA, Ruthardt M (Reciprocal t(9;22) ABL/BCR fusion proteins: leukemogenic potential and effects on B cell commitment. *PLoS One* 4:e7661.2009).
- Zheng YL, Kesavapany S, Gravell M, Hamilton RS, Schubert M, Amin N, Albers W, Grant P, Pant HC (A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *EMBO J* 24:209-220.2005).
- Zheng YL, Li BS, Kanungo J, Kesavapany S, Amin N, Grant P, Pant HC (Cdk5 Modulation of mitogen-activated protein kinase signaling regulates neuronal survival. *Mol Biol Cell* 18:404-413.2007).
- Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease. *J Neurol Sci* 238:53-57.2005).
- Zhou G, Golden T, Aragon IV, Honkanen RE (Ser/Thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MKK-4/JNK signaling cascade. *J Biol Chem* 279:46595-46605.2004).
- Zhou XW, Gustafsson JA, Tanila H, Bjorkdahl C, Liu R, Winblad B, Pei JJ (Tau hyperphosphorylation correlates with reduced methylation of protein phosphatase 2A. *Neurobiol Dis* 31:386-394.2008).
- Zhou XW, Winblad B, Guan Z, Pei JJ (Interactions Between Glycogen Synthase Kinase 3beta, Protein Kinase B, and Protein Phosphatase 2A in Tau Phosphorylation in Mouse N2a Neuroblastoma Cells. *J Alzheimers Dis*.2009).
- Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, Kullertz G, Stark M, Fischer G, Lu KP (Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 6:873-883.2000).

- Zhu X, Castellani RJ, Takeda A, Nunomura A, Atwood CS, Perry G, Smith MA (Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev* 123:39-46.2001a).
- Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA (The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11:270-281.2002).
- Zhu X, Ogawa O, Wang Y, Perry G, Smith MA (JNK1, an upstream activator of JNK/SAPK, is activated in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85:87-93.2003).
- Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H, Smith MA (Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 76:435-441.2001b).
- Zhu X, Rottkamp CA, Boux H, Takeda A, Perry G, Smith MA (Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:880-888.2000).
- Zhu Y, Hoell P, Ahlemeyer B, Krieglstein J (PTEN: a crucial mediator of mitochondria-dependent apoptosis. *Apoptosis* 11:197-207.2006).
- Ziemka-Nalecz M, Zalewska T (Transient forebrain ischemia effects FAK-coupled signaling in gerbil hippocampus. *Neurochem Int* 51:405-411.2007).
- Zukerberg LR, Patrick GN, Nikolic M, Humbert S, Wu CL, Lanier LM, Gertler FB, Vidal M, Van Etten RA, Tsai LH (Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* 26:633-646.2000).

ANNEXES

Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β downregulates total tau proteins in cultured neurons and its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A

Ludovic Martin^a, Amandine Magnaudeix^a, Françoise Esclaire^{a, b}, Catherine Yardin^{a, b} and Faraj Terro^{a, b}

a Groupe de Neurobiologie Cellulaire–EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de Médecine 2, rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX–France

b Laboratoire d'Histologie et de Cytogénétique–Hôpital de la Mère et de l'Enfant 8, avenue D. Larrey, 87042 Limoges CEDEX–France

Brain Research

Volume 1252, 3 February 2009, Pages 66-75

Texte intégral : <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.057>

**Tau phosphorylation and neuronal apoptosis induced by the blockade of PP2A
selectively involve GSK3 β , but not CDK5 or DYRK1A**

Ludovic MARTIN¹, Amandine MAGNAUDEIX¹, Guylene PAGE³, Faraj TERRO^{1,2*}

¹ Groupe de Neurobiologie Cellulaire – EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de Médecine, 2 rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France

² Laboratoire d'Histologie et de Cytogénétique – Hôpital de la Mère et de l'Enfant, 8 avenue D. Larrey, 87042 Limoges CEDEX, France

³ Groupe de Recherche sur le Vieillissement Cérébral, GREViC, UFR Médecine-Pharmacie- 6 rue de la Milétrie, BP 199 86034 Poitiers

* Corresponding author. Unité de Neurobiologie Cellulaire, EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies – Faculté de Médecine, 2 rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France. Fax: +33 5 55 43 58 93. E-mail address: faraj.terro@unilim.fr.

Running title: **Blockade of PP2A, tau phosphorylation, apoptosis and GSK3 β**

Résumé

La maladie d'Alzheimer est une pathologie dont les étiologies sont encore inconnues. Etroitement liée au vieillissement de la population, elle est caractérisée par la présence de deux traits neuropathologiques : les dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) et les plaques séniles, des agrégats extracellulaires de peptides β -amyloïdes. Les DNFs sont des agrégats intraneuronaux composés essentiellement de protéines tau anormalement phosphorylées. L'hyperphosphorylation de tau est positivement corrélée à la sévérité de la démence. Cette hyperphosphorylation résulterait d'un déséquilibre de la balance kinase-phosphatase. Dans les cerveaux Alzheimer, les activités enzymatiques des phosphatases PP2A et PP5 sont diminuées et l'activité de la GSK3 β est augmentée. Une des stratégies thérapeutiques dans la maladie d'Alzheimer vise à bloquer la pathologie de tau et ceci, consiste soit à réduire le niveau de la protéine tau, soit en agissant sur son état de phosphorylation.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence que l'inhibition de la GSK3 β par le lithium entraînait une réduction des niveaux de la protéine tau. Cette réduction peut être bloquée par l'inhibition de la PP2A. Nous avons ensuite cherché à déterminer si la diminution du niveau de tau bloquait l'apoptose neuronale. Pour cela, nous avons mis au point un modèle *in vitro* de l'hyperphosphorylation de tau associée à une apoptose neuronale. Ce modèle consistait à inhiber la PP2A par l'acide okadaïque (OKA) dans des cultures primaires de neurones corticaux. Les premiers résultats ont montré que la suppression de tau chez des souris (KO) entraînait une réduction de l'apoptose neuronale induite par l'OKA. Ce modèle *in vitro* de tauopathie nous a permis également d'identifier la GSK3 β comme cible pharmacologique privilégiée, impliquée dans l'hyperphosphorylation de tau et surtout dans l'apoptose neuronale induites par l'OKA. En effet, l'inhibition de la CDK5 et de la DYRK1A n'a pas montré de potentiel neuroprotecteur contre l'apoptose induite par l'OKA. Compte tenu de l'implication sélective de la GSK3 β , nous avons pu caractériser les propriétés neuroprotectrices de trois dérivés d'indirubines inhibiteurs de la GSK3 β . Les effets de ces dérivées méritent d'être évalués dans un modèle *in vivo* de tauopathies. Ce travail souligne l'intérêt de l'étude du rôle de la GSK3 β dans les processus pathologiques des tauopathies, en particulier la maladie d'Alzheimer.

Mots clés : Tau, GSK3 β , PP2A, neuroprotection