

Université de Montréal

Expression, activation et localisation de  
CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII  
dans les souris JNPL3 qui expriment  
la forme humaine mutante P301L de tau

v.007

par

Marilyse Piché

Département de pathologie et biologie cellulaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en pathologie et biologie cellulaires  
option Système nerveux

novembre, 2004

©, Marilyse Piché, 2004



W  
4  
U58  
2005  
V,007

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Expression, activation et localisation de  
CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII  
dans les souris JNPL3 qui expriment  
la forme humaine mutante P301L de tau

présenté par :

Marilyse Piché

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Doucet

Président-rapporteur

Nicole Leclerc

Directrice de recherche

Roger Lippé

Membre du jury

# Résumé français

Il subsiste encore plusieurs questions à propos des mécanismes du processus pathologique des tauopathies. Pour ce travail, nous avons choisi cinq kinases qui ont le potentiel de phosphoryler tau *in vitro*: CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA, et ROCKII. Nous avons étudié l'expression, l'activation et la localisation de ces kinases. Comme modèle, nous avons utilisé la souris JNPL3 qui surexprime la forme humaine mutante P301L de tau et qui présente des caractéristiques pathologiques similaires aux tauopathies.

Dans des homogénats de moelle épinière, nous avons observé que l'expression de GSK3 $\beta$  et PKA RII $\alpha$  était plus élevée chez les souris JNPL3 que chez les souris témoins. Par immunohistochimie, nous avons observé que la compartimentation des kinases dans les motoneurones n'était pas affectée chez les souris JNPL3. Grâce à des fractionnements cellulaires de cerveau, nous avons étudié la localisation subcellulaire de ces kinases. Une diminution de p35 et de GSK3 $\beta$  dans certaines fractions golgiennes a été notée.

Ces résultats démontrent que certaines de ces kinases et sous-unités sont dérégulées au niveau de leur expression, leur activation et leur localisation, ceci étant induit par la surexpression de la protéine tau humaine P301L chez la souris.

Mots clé: Tau, CaMKII, CDK5, GSK3, PKA, ROCK, souris JNPL3, fractionnement, neurone

# Résumé anglais

Presently there are several unsolved questions regarding the exact pathological mechanisms responsible for tauopathies. For this project, we examined the protein levels, activation states, and cellular locations of five kinases: CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA, and ROCKII, all of which have been previously shown to phosphorylate tau *in vitro*. Using JNPL3 transgenic mice, which over-express the human tau protein P301L and share pathologic similarities with tauopathies, we observed elevated protein levels of GSK3 $\beta$  and PKA RII $\alpha$  in spinal cord homogenates as compared to control mice. We also observed, by immunohistochemistry, that the compartmentalization of these kinases was not affected in JNPL3 mice. Using brain fractions, we studied the subcellular localization of these kinases and found decreased levels of p35 and GSK3 $\beta$  in some Golgi fractions.

These results demonstrate that the protein level, activation and localization of tau phosphorylating kinases and their sub-units are deregulated in JNPL3 mice. Furthermore we suggest that these changes are due to the over-expression of the mutant form of the human tau protein P301L.

Key words: Tau, CaMKII, CDK5, GSK3, PKA, ROCK, JNPL3 mice, neuron, localization, fractionation.

# Table des matières

Résumé français	p. iii
Résumé anglais	p. iv
Table des matières	p. v
Liste des figures et tableaux	p. ix
Sigles et abréviations	p. x
Remerciements	p. xi

## **Introduction**

1. Le neurone : une cellule polarisée et compartimentée	p. 1
1.1 Établissement de la polarité neuronale	p. 2
2. Le cytosquelette	p. 4
2.1 Les neurofilaments	p. 4
2.2 Les microfilaments d'actine	p. 6
2.3 Les microtubules	p. 7
2.4 Les protéine associées aux microtubules (MAPs)	p. 8
2.4.1 MAP1	p. 8
2.4.2 MAP2	p. 9
2.4.3 Tau	p. 10
3. Phosphorylation de tau	p. 13
3.1 La calcium / calmoduline kinase II (CaMKII)	p. 15
3.1.1 Activation	p. 15
3.1.2 Localisation	p. 16
3.1.3 Phosphorylation de tau	p. 16
3.2 La kinase 5 dépendante à des cyclines (CDK5)	p. 16

3.2.1	Activation	p. 17
3.2.2	Localisation	p. 17
3.2.3	Phosphorylation de tau	p. 18
3.3	La Kinase de la glycogène synthase 3 (GSK3)	p. 19
3.3.1	Activation	p. 19
3.3.2	Localisation	p. 19
3.3.3	Phosphorylation de tau	p. 20
3.4	La protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA)	p. 20
3.4.1	Activation	p. 20
3.4.2	Localisation des sous-unités	p. 21
3.4.3	Phosphorylation de tau	p. 21
3.5	La kinase ROCK	p. 22
3.5.1	Activation	p. 22
3.5.2	Localisation	p. 22
3.5.3	Phosphorylation de tau	p. 23

#### 4. Les mutations de tau :

la cause génétique de certaines tauopathies	p. 24
4.1 Les enchevêtrements neurofibrillaires	p. 24
4.2 Études <i>in vitro</i> de la mutation tau P301L	p. 28

#### 5. Surexpression de la protéine tau :

les modèles <i>in vivo</i> des tauopathies	p. 29
5.1 Phosphorylation de tau	p. 29
5.2 Distribution somato-dendritique	p. 31
5.3 Formation des NFTs et le processus de neurodégénérescence	p. 32
5.4 Études <i>in vitro</i> de la mutation P301L	p. 33
5.5 Objectif de ce travail	p. 35

## **Matériel et Méthodes**

6. Anticorps primaires	p. 37
7. Immunohistochimie	p. 37
7.1 Coupe de moelle épinière	p. 37
7.2 Incubation des anticorps	p. 40
7.3 Microscopie	p. 40
8. Homogénats de la moelle épinière	p. 40
9. Fractionnement du cerveau	p. 41
10. Immunobuvardage	p. 42
10.1 Décapage ( <i>stripping</i> )	p. 42

## **Résultats**

11. Niveau d'expression des kinases	p. 43
12. Activation des kinases	p. 45
13. Localisation de tau et de CaMKII, p35, GSK3 $\beta$ , RII $\alpha$ et ROCKII dans les motoneurones des souris témoins et JNPL3	p. 48
13.1 Marqueurs du compartiment somato-dendritique et axonal	p. 49
13.2 Compartimentation de la protéine tau	p. 49
13.3 Compartimentation des kinases et sous-unités	p. 54
14. Localisation subcellulaire des kinases et sous-unités	p. 64
14.1 Caractérisation des fractions	p. 64
14.2 Distribution des kinases et sous-unités	p. 67

## **Discussion et conclusion**

15. Expression, niveau protéique et activation des kinases	p. 72
15.1 CaMKII et plasticité synaptique	p. 73
15.2 Conséquences de l'inhibition de PKA	p. 73
15.3 GSK3 $\beta$ et neurodégénérescence	p. 74
15.4 CDK5, p25 et p35	p. 75
15.5 Surexpression de p25 et de GSK3 $\beta$	p. 76
16. Compartimentation des kinases	p. 77
17. Localisation subcellulaire des kinases	p. 78
18. Un autre modèle de souris	p. 80

## **Bibliographie**

p. 82

## **Annexe**

Contribution externe

p. xii

# Liste des figures et tableaux

Figure 1	Du gène à la protéine tau	p. 12
Figure 2	Les sites de phosphorylation de la protéine tau par CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII	p. 14
Figure 3	Les mutations de tau impliquées dans certaines tauopathies	p. 27
Figure 4	Le gradient de sucrose	p. 41
Figure 5	Niveaux des protéines et activation des kinases CDK5, ROCKII, CaMKII, PKA et GSK3 $\beta$ dans la moelle épinière de souris témoins et JNPL3	p. 47
Figure 6	SMI34, un marqueur axonal et MAP2, un marqueur dendritique	p. 51
Figure 7	Compartimentation de la protéine tau	p. 53
Figure 8	Localisation de CaMKII active	p. 57
Figure 9	Localisation de la sous-unité p35 de CDK5	p57-C
Figure 10	Localisation de GSK3 $\beta$	p. 59
Figure 11	Localisation de la sous-unité RII $\alpha$ de PKA	p. 61
Figure 12	Localisation de ROCKII	p. 63
Figure 13	Caractérisation biochimique des fractions membranaires isolées à partir d'un cerveau d'une souris	p. 66
Figure 14	Localisation des kinases dans les fractions subcellulaires isolées à partir d'un cerveau de souris témoins ou de souris JNPL3	p. 70
Tableau 1	Surexpression des isoformes humaines de tau chez la souris	p. 30
Tableau 2	Les anticorps primaires	p. 39
Tableau 3	Enrichissement des kinases dans les fractions subcellulaires isolées à partir d'un cerveau de souris témoins ou de souris JNPL3	p. 71

# Sigles et abréviations

A $\beta$	Amyloïde beta
AKAP	Protéine associée à la PKA
AMP	Adénosine monophosphate
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde
ARN	Acide ribonucléique
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
Ca <sup>2+</sup> /CaM	Complexe Calcium/Calmoduline
CaMKII	Kinase dépendante du complex Calcium/Calmoduline II
CBD	Dégénérescence cortico-basale
CDK5	Kinase dépendante des cyclines 5
FTDP-17	Démence fronto-temporale et parkinsonisme liés au chromosome 17
GSK3 $\beta$	Glycogène synthase kinase beta 3
HP	Région homologue à pleckstrine
IB	Immunobuvardage
IHC	Immunohistochimie
LTP	Potentialisation à long terme
MAP	Protéine associée aux microtubules
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
NF	Neurofilament
NTF	Enchevêtrement neurofibrillaire
PBS	Solution saline tamponée au phosphate
PHF	Filaments appariés en hélice
PiD	Maladie de Pick
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique
PS1	Préséniline 1
PSD	Densités post-synaptiques
PSP	Paralysie supranucléaire progressive
RB	Domaine de liaison à Rho
SDS	Sodium dodecyl sulfate

# Remerciements

Je remercie Nicole Leclerc de m'avoir donné ma première chance dans un laboratoire de recherche et par la suite de m'avoir acceptée comme étudiante à la maîtrise. J'ai beaucoup aimé mon expérience dans le laboratoire et je la remercie d'avoir créé un climat propice à la recherche et au travail, dans un environnement amical et même quelquefois festif. Je tiens aussi à remercier chaleureusement les membres du laboratoire : Carole, Dalinda, Mylène et Sébastien, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler et avec qui j'ai appris plusieurs choses. Un merci aux membres des laboratoires de Dre McKerracher et de Dre Di Polo, pour leur aide généreuse et pour les nombreuses discussions enrichissantes.

Enfin, je remercie ma famille pour son soutien tout au long de mes études. Merci à mon frère Sébastien pour son aide technique et à mon amoureux, François, pour ses encouragements; même dans les moments difficiles.

# Introduction

## 1. Le neurone : une cellule polarisée et compartimentée

C'est à la fin du 19<sup>e</sup> siècle que Santiago Ramon y Cajal bouleversa la communauté scientifique en démontrant que le cerveau n'était pas constitué d'une seule cellule géante ramifiée, comme plusieurs scientifiques le pensaient à cette époque, mais bien de milliards de petites entités séparées (Saremsky, 2003 ; Nobel e-museum, 2004). Effectivement, le cerveau est formé de plusieurs types de neurones et de cellules gliales. Ces cellules neurales ont comme fonction principale la transmission de l'information, sous forme d'un signal électrique, dans les différentes parties du cerveau (Kandel et al., 2000).

Grâce à ses nombreuses observations, Ramon y Cajal fut le premier à caractériser les différents compartiments du neurone (Saremsky, 2003; Nobel e-museum, 2004). La plupart des cellules eucaryotes se composent simplement du cytoplasme, entouré par la membrane plasmique et qui contient le noyau et les organelles. De son côté, la cellule neuronale est un peu plus complexe puisqu'elle contient trois compartiments différenciés : corps cellulaire, dendrite et axone. Cette compartimentation est responsable de la polarité du neurone, i.e. le sens unidirectionnel de la transmission des informations. En effet, les informations sont reçues par les dendrites et le corps cellulaire, puis acheminées dans l'axone sous forme de courant électrique. Le relais entre les neurones s'effectue à la terminaison de l'axone, aux boutons synaptiques. Puisque chaque compartiment a un rôle spécifique dans la transmission de l'information, ils sont différents tant par leur morphologie que par leur contenu protéique (Kandel et al., 2000). Dans la prochaine section, il sera question de la formation de ces compartiments et des éléments qui différencient l'axone des dendrites.

## 1.1 Établissement de la polarité neuronale

Il a été possible de déterminer les différentes étapes qui conduisent à la différenciation des dendrites et de l'axone dans des cultures primaires de neurones de l'hippocampe (Dotti et Banker, 1987). Quatre stades ont été identifiés lors de cette étude. Au premier stade, les neurones sont de forme ronde et présentent une lamelle tout autour du corps cellulaire. Au deuxième stade, il y a consolidation de la lamelle en neurites mineures. Au troisième stade, une de ces neurites s'allonge et devient l'axone. À ce moment, si l'axone est coupé, une autre neurite peut prendre la relève et devenir un axone. Au cours du quatrième stade, les autres neurites mineures deviennent les dendrites et leurs ramifications forment l'arbre dendritique. De plus, les dendrites présentent plusieurs structures ressemblant à des filopodes au cours de leur différenciation. Ces filopodes sont des projections très dynamiques qui explorent l'environnement. Si un contact synaptique est créé, ce filopode devient une épine dendritique (Dailey et Smith, 1996).

En plus d'être formés à des stades différents, la morphologie de l'axone et des dendrites matures comporte d'autres éléments distinctifs. En effet, les dendrites sont ramifiées et ont un diamètre qui diminue en s'éloignant du corps cellulaire. L'axone, quant à lui, a la forme d'un petit cylindre de diamètre radial constant, n'étant pas aussi ramifié que les dendrites (Kandel et al., 2000). De plus, il existe des différences au niveau de l'enrichissement des organelles membranaires dans ces deux compartiments. En effet, il a été démontré que dès la formation des neurites mineures, une diminution importante de polyribosomes et une concentration prononcée d'éléments membranaires de type réticulum endoplasmique lisse se trouvaient dans la neurite mineure qui deviendra l'axone (Deitch et Banker, 1993). Par contre, plusieurs polyribosomes et l'appareil de Golgi sont enrichis dans les autres neurites mineures qui deviendront les dendrites (Horton et Ehlers, 2003).

Dans le neurone mature, il y a du réticulum endoplasmique rugueux, des ribosomes libres et l'appareil de Golgi, qui sont présents dans les dendrites (Craig et Banker, 1994). Une synthèse locale de protéines est donc possible et elle serait probablement très importante lors d'une réponse impliquant des modifications synaptiques à long terme (Horton et Ehlers, 2003). Dans l'axone, il y a peu de ribosomes, mais il y a beaucoup plus de mitochondries que dans les dendrites (Deitch et Banker, 1993).

La polarité neuronale est aussi créée par la ségrégation de certaines protéines dans l'axone ou les dendrites. Voici quelques exemples des mécanismes impliqués lors de cette compartimentation protéique. Une séquence en C-terminal du récepteur glutamatergique mGluR2, est nécessaire à son ciblage uniquement dendritique (Stowell et Craig, 1999), tandis qu'une séquence dans la sous-unité Nav1 des canaux à sodium a comme fonction de localiser ce type de canal dans le segment initial de l'axone (Garrido et al., 2003). De plus, la protéine dendritique MAP2 peut se lier à la sous-unité RII $\alpha$  de PKA afin de localiser cette kinase dans le compartiment somato-dendritique (Carr et al., 1992), tandis que la protéine ankyrine localise les canaux à sodium et la neurofascine dans le segment initial de l'axone (Zhou et al., 1998). La polarité neuronale implique donc plusieurs mécanismes afin de créer des différences au niveau de la morphologie, de la distribution des organelles membranaires et des protéines présentes dans les dendrites ou dans l'axone.

Le cytosquelette est l'élément structural qui est impliqué dans la formation et le maintien des dendrites et de l'axone. La prochaine section présentera donc les protéines qui composent le cytosquelette neuronal. Leur contribution à l'établissement de la polarité neuronale y sera aussi discuté.

## 2. Le cytosquelette

Dans les neurones, le cytosquelette est composé de trois types de filaments : les neurofilaments, les microfilaments d'actine et les microtubules. Comme nous le verrons dans cette section, ces filaments sont composés de différents types de protéines, leur processus de polymérisation leur est spécifique, et ils ont des rôles importants dans le neurone. Par contre, il ne faut pas oublier que ces trois filaments interagissent ensemble. Par exemple, il existe des interactions entre des protéines associées aux microtubules (MAP1, MAP2 et tubuline) et les neurofilaments (Frappier et al., 1991; Allende et al., 1989; Furtner et Wiche, 1987). De plus, certaines protéines, dont BPAG1, ont comme rôle de faire des liens entre les trois filaments du cytosquelette (Bauer et al., 1999). Ces quelques exemples démontrent à quel point les filaments du cytosquelette peuvent s'influencer entre eux.

### 2.1 Les neurofilaments

Les neurofilaments (NFs) font partie de la famille des filaments intermédiaires, et ne sont présents que dans les cellules neuronales. Chez les mammifères, les NFs sont composés de trois sous-unités de faible (NF-L), moyen (NF-M) et haut (NF-H) poids moléculaire. La différence est une séquence riche en lysine et en acide glutamique, plus ou moins longue selon la sous-unité. D'autres protéines de la famille des filaments intermédiaires (i.e.  $\alpha$ -internexine et périphérine) peuvent s'associer aux NFs (voir les articles de revue de Ludin et Matus, 1993 et de Grant et Pant, 2000).

Pour former un NF, il faut d'abord un tétramère composé de la sous-unité NF-L et des sous-unités NF-H et/ou NF-M. Ensuite, un tétramère forme un protofilament et huit protofilaments vont former un neurofilament. La polymérisation des neurofilaments se fait dans l'axone, à partir d'oligomères formés dans le corps cellulaire et transportés jusque dans l'axone (voir l'article de revue de Grant et Pant, 2000).

Durant le développement embryonnaire, seules les isoformes NF-L et NF-M sont exprimées. Elles forment des NFs plus dynamiques qui contribuent à l'instabilité du cytosquelette nécessaire à la croissance et au guidage des axones. L'expression plus tardive de la sous-unité NF-H au cours de la différenciation neuronale a comme conséquence la stabilisation des NFs (Carden et al., 1987). Ceux-ci sont alors beaucoup plus stables que l'actine et les microtubules. C'est pourquoi ils sont présents dans les gros neurones et les axones long et de haut calibre; des endroits où le neurone a besoin de stabilité accrue (voir l'article de revue de Grant et Pant, 2000).

Des études chez différentes souris transgéniques ont permis de mieux comprendre le rôle des NFs lors de la croissance radiale des axones, ainsi que de leurs effets sur l'organisation des microtubules. Ainsi, la suppression de NF-H ou de NF-L augmente la concentration des microtubules dans l'axone (Julien et al., 1995; Elder et al., 1998; Rao et al., 1998; Williamson et al., 1998; Zhu et al., 1998). La suppression de NF-L ou de NF-M diminue l'accroissement du diamètre de l'axone (Sakaguchi et al., 1993; Elder et al., 1998; Williamson et al., 1998). Les doubles suppressions ont des effets encore plus sévères. En effet, la suppression de NF-M et de NF-H induit une accumulation de NF-L dans le corps cellulaire (Elder et al., 1998; Jacomy et al., 1999). De plus, il se produit une réduction du calibre de l'axone liée à une diminution du nombre de neurofilaments (Elder et al., 1998). Ceci serait causé par une diminution du transport axonal des sous-unités NF-L nouvellement synthétisées (Jacomy et al., 1999).

La surexpression de NF-L (Xu et al., 1993), NF-M (Wong et al., 1995; Xu et Tung, 2000) ou de NF-H (Marszalek et al., 1996) induit une désorganisation et une accumulation des NFs dans le corps cellulaire et dans l'axone. De plus, en surexprimant NF-M et NF-H, il se produit aussi une diminution de l'arborisation dendritique (Xu et al., 1996). Par contre, lorsque NF-L et NF-M, ou alors NF-L et NF-H ont été surexprimées, aucune différence dans la croissance radiale des axones n'a été notée (Xu et al., 1996). Selon ces études, le ratio d'expression de chacune des sous-unités est donc important lors de la formation et du maintien des NFs.

Dans le neurone, les neurofilaments sont phosphorylés selon un gradient; les NFs les plus phosphorylés étant dans l'axone, les NFs peu ou pas phosphorylés étant dans le

compartiment somato-dendritique. Ainsi, certains résidus ne sont phosphorylés que dans le cas des NFs situés dans l'axone (Grant et Pant, 2000). La phosphorylation des NFs a plusieurs utilités dont la régulation de la polymérisation de NFs (Lee et al., 1993; Ching et Liem, 1999), de la stabilité des NFs (Nixon, 1998; Grant et Pant, 2000), de l'accroissement du diamètre radial de l'axone (Nixon, 1998), du transport des NFs, des interactions avec d'autres protéines du cytosquelette et de leur dégradation (voir l'article de revue de Perrone Capano et al., 2001).

## 2.2 Les microfilaments d'actine

Les microfilaments d'actine sont composés d'isoformes d'actine. Dans les neurones, seules les isoformes  $\beta$  et  $\gamma$  sont exprimées. Près de la moitié de l'actine n'est pas polymérisée, ce qui lui permet de former spontanément des microfilaments en forme d'hélice lorsqu'elle est en présence d'ATP; un trimère d'actine étant suffisant pour initier la polymérisation. Les filaments sont polarisés; l'extrémité (+) est le lieu de la polymérisation, et l'extrémité (-) est le site de nucléation (voir l'article de revue de Ludin et Matus, 1993). Les filaments d'actine sont formés par de l'actine filamenteuse (F-actine) ainsi que des protéines de liaison à l'actine (ABPs). Grâce aux ABPs, différents types de structures plus ou moins dynamiques peuvent être formés. Par exemple, dans les filopodes, il y a des faisceaux parallèles, tandis que dans les lamellipodes, l'actine forme un réseau en forme de treillis (voir l'article de revue de Luo, 2002).

Les protéines de liaison à l'actine ont plusieurs fonctions différentes. Par exemple, la liaison de certaines ABPs à un monomère d'actine inhibe la nucléation et peut empêcher le monomère de s'associer à un filament. Certaines ABPs peuvent se lier aux extrémité (+) ou (-) et ainsi réguler la longueur des filaments en contrôlant leur polymérisation. La stabilisation des filaments d'actine est régulée par les ABPs qui se lient sur le côté du filament. Les faisceaux parallèles ou les treillis d'actine sont possibles grâce aux ABPs qui peuvent lier deux filaments ensemble. Finalement, la stabilisation de certains éléments membranaires est possible grâce à des ABPs qui ont la possibilité de lier les filaments d'actine à la membrane plasmique (Kandel et al., 2000).

L'actine a un rôle très important dans la pousse neuritique. Des quantités importantes d'actine sont présentes dans les cônes de croissance et dans les filopodes, permettant un remodelage rapide du cytosquelette (Fischer et al., 1998). Le cytosquelette d'actine serait aussi responsable du remodelage dendritique nécessaire à la formation de l'arborisation dendritique (Kita et al., 1998). De plus, l'actine présente dans les épines dendritiques et les densités post-synaptiques permettrait une plus grande plasticité, soit en remodelant et en rendant possible la formation de nouvelles synapses (Zhang et Benson, 2001; Zhou et al., 2002).

### 2.3 Les microtubules

Les microtubules sont formés de dimères constitués des deux sous-unités de tubuline ( $\alpha$  et  $\beta$ ). L'assemblage des dimères se fait en présence de GTP et d'un site de nucléation; c'est les centrosomes qui rendent possible la nucléation des microtubules. Une fois polymérisés, les microtubules sont ensuite acheminés dans les différents compartiments neuronaux (Ahmad et Baas, 1995; Yu et al., 1993). La polymérisation de la tubuline forme un protofilament, et pour former un microtubule, treize protofilaments sont nécessaires. Tout comme le microfilament d'actine, le microtubule contient deux extrémités différentes; c'est à l'extrémité (+) que la polymérisation est la plus rapide. Dans les cellules non-neurales, l'extrémité (-) est associée au centrosome, et l'extrémité (+) projette en périphérie. Dans l'axone et les dendrites, les microtubules sont parallèles et orientés dans leur axe longitudinal. Dans l'axone, les extrémités (-) sont toutes orientées vers le corps cellulaire et les extrémités (+) vers les terminaisons axonales. Dans les dendrites, les microtubules sont organisés différemment puisque les extrémités (+) des microtubules peuvent pointer vers le corps cellulaire ou vers la périphérie (voir l'article de revue de Ludin et Matus, 1993).

Puisque la majeure partie de la synthèse protéique se fait dans le corps cellulaire, il est essentiel d'avoir un système de transport afin d'acheminer les protéines dans les dendrites et jusqu'aux terminaisons de l'axone. Bien que l'actine puisse être utilisée pour le transport des organelles, la majorité du transport axonal et dendritique se fait le long des microtubules. Les vésicules produites et excrétées de l'appareil de Golgi et même des organelles entières (mitochondries et peroxisomes) sont attachées et voyagent le long des

microtubules grâce aux protéines motrices (kynésine et dynéine) (voir l'article de revue de Ludin et Matus, 1993).

Les microtubules sont aussi très importants durant le développement et ce rôle est déterminé par des protéines de liaison aux microtubules. Dans le présent travail, nous nous concentrerons sur ces protéines. Comme il en sera question dans la prochaine section, les protéines associées aux microtubules (MAPs) sont essentielles aux différentes fonctions des microtubules dans le neurone et ce, très tôt au cours du développement neuronal.

## 2.4 Les protéines associées aux microtubules (MAPs)

Les MAPs sont des protéines qui induisent la formation et la stabilisation des microtubules. Dans le système nerveux, les MAPs jouent un rôle essentiel à l'élaboration des neurites mineures, à la formation de l'axone et des dendrites et à leur maintien dans le neurone mature (voir l'article de revue de Mandell et Banker, 1996). Trois types de MAPs, soit MAP1, MAP2 et Tau, ont été particulièrement étudiés dans les neurones.

Les MAPs contiennent un domaine de liaison aux microtubules et un domaine de projection (figure 1, p.12). MAP2 et tau ont une très grande homologie dans le domaine de liaison à la tubuline, puisque ces deux MAPs contiennent des séquences répétées contenant dix-huit acides aminés (Lee et al., 1988; Lewis et al., 1988). De son côté, MAP1 contient une séquence de quatre acides aminés répétées vingt-et-une fois qui agit comme domaine de liaison aux microtubules (Noble et al., 1989).

### 2.4.1 MAP1

Il existe deux isoformes de MAP1 (MAP1A et MAP1B) qui proviennent de deux gènes différents. MAP1 se trouve autant dans les dendrites que dans l'axone, elle n'est donc pas compartimentée. L'étude sur l'inhibition de l'expression de MAP1B dans les cellules PC12 indique qu'elle joue un rôle dans l'initiation de la formation des neurites mineures (Brugg et al., 1993). Chez les souris qui ont une suppression du gène de MAP1B, le développement du système nerveux se fait d'une manière désorganisée, ce qui diminue la survie des souris. Des études sur des neurones en culture provenant de cette souris

transgénique ont permis de démontrer que la suppression de MAP1B cause un ralentissement important de l'élongation de l'axone et une augmentation de la grosseur du cône de croissance (Gonzalez-Billault et al., 2002). Ce phénotype est encore plus sévère chez les souris dont l'expression de MAP1B et de tau a été supprimée (Takei et al., 2000).

MAP1A est exprimée plus tard au cours du développement. Elle serait impliquée dans la stabilisation des microtubules lorsque la formation des neurites mineures est terminée (Langkopf et al., 1992).

#### 2.4.2 MAP2

Le gène codant pour MAP2 se situe sur le chromosome 2 et contient vingt exons (Neve et al., 1986). Les isoformes MAP2A, MAP2B, MAP2C et MAP2D sont générées par épissage alternatif (voir l'article de revue de Sanchez et al., 2000). MAP2A et MAP2B sont présentes dans le cerveau adulte, tandis que MAP2C est exprimée durant les premières phases du développement seulement (Shafit-Zagardo et Kalcheva, 1998). Finalement, l'isoforme MAP2D se trouve principalement dans les cellules gliales (voir les articles de revue de Ludin et Matus, 1993; et de Sanchez et al., 2000). MAP2 est une protéine dendritique; elle n'est présente que dans le compartiment somato-dendritique.

MAP2 aurait un rôle important lors de la cessation de la division cellulaire des neurones. Ceci a été démontré dans des cellules neuronales encore indifférenciées transfectées avec un ARN antisens de MAP2 (Dinsmore et Solomon, 1991). Ces cellules sont alors incapables de se différencier et elles ont la capacité de continuer à se diviser.

La suppression de MAP2 chez la souris affecte la longueur des dendrites, sans toutefois contrevenir à l'élongation des neurites mineures (Harada et al., 2002). Il semblerait donc que d'autres MAPs peuvent compenser lors de la formation des dendrites. C'est d'ailleurs ce qui a été démontré lorsque les gènes de MAP1B et de MAP2 étaient supprimés (Teng et al., 2001). Le phénotype était beaucoup plus grave puisque les souris meurent durant la période prénatale. De plus, la morphologie des dendrites est beaucoup plus affectée que chez les souris MAP2 -/-.

### 2.4.3 Tau

Le gène de la protéine tau est constitué de seize exons. Le gène est situé sur le chromosome 17, à la position 17q21 (Neve et al., 1986). Dans le cerveau humain, il existe six isoformes de tau générées par un épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 (figure 1, p.12). Il est à noter que l'exon 3 doit absolument être exprimé avec l'exon 2. Chez l'humain, l'épissage alternatif de l'exon 10 forme trois isoformes contenant trois séquences répétées de liaison aux microtubules (tau 3R) et trois isoformes qui en contiennent quatre (tau 4R). Le nombre de séquences répétées influence l'affinité de tau pour les microtubules. Ainsi, tau 4R a une plus grande facilité à se lier aux microtubules (voir les articles de revue Maccioni et Cambiasso, 1995; et de Buee et al., 2000). Tau est une protéine axonale; elle n'est donc pas exprimée dans les dendritiques.

Différentes approches ont été utilisées pour démontrer le rôle de tau dans la pousse neuritique. Dans certaines lignées cellulaires neuronales (ex. PC12) la suppression de l'expression de tau par des ARN antisens a induit une diminution de la pousse neuritique (Hanemaaijer et Ginzburg, 1991), alors que dans des cultures de neurones du cervelet, l'inhibition de l'expression de tau a seulement affecté la pousse axonale (Caceres et Kosik, 1990; Caceres et al., 1991).

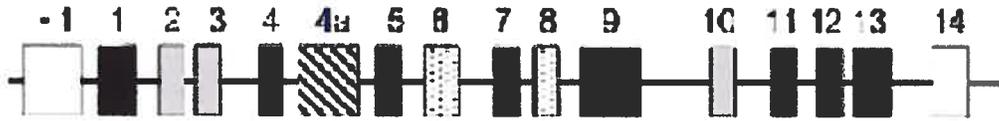
**Figure 1.** *Du gène à la protéine tau.*

A) Le gène de la protéine tau contient seize exons. Seulement quatorze exons seront présents sur l'ARN. L'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 permet la formation des six isoformes de la protéine tau humaine. Figure modifiée provenant de l'article de Lee et al., 2001.

B) MAP2 et tau contiennent un domaine de projection qui comprend une région acide et une région riche en proline. Le domaine de liaison contient trois ou quatre séquences répétées qui permettent la liaison avec les microtubules.

A)

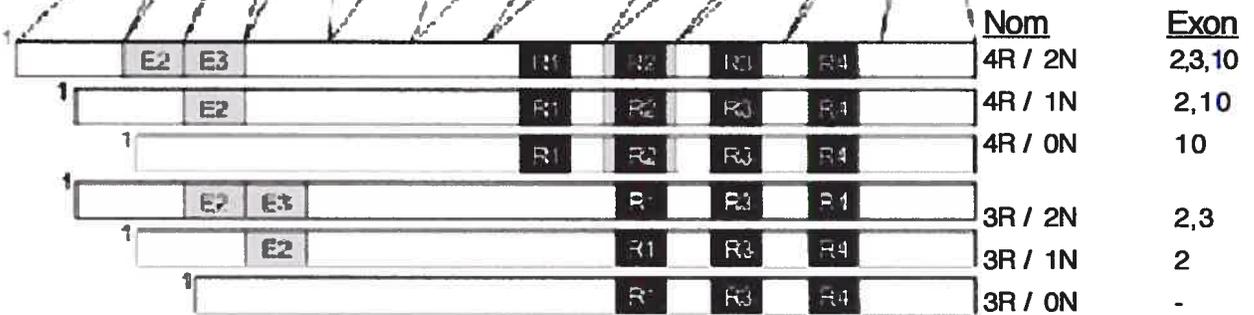
Gène de la protéine tau humaine



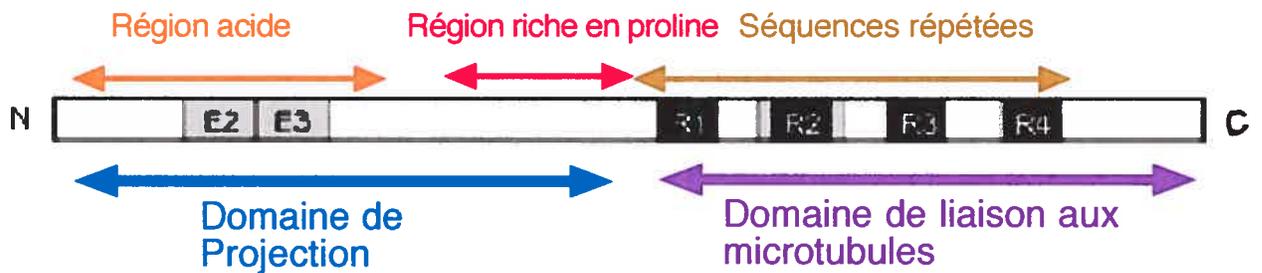
ARN



Les six isoformes de tau



B)



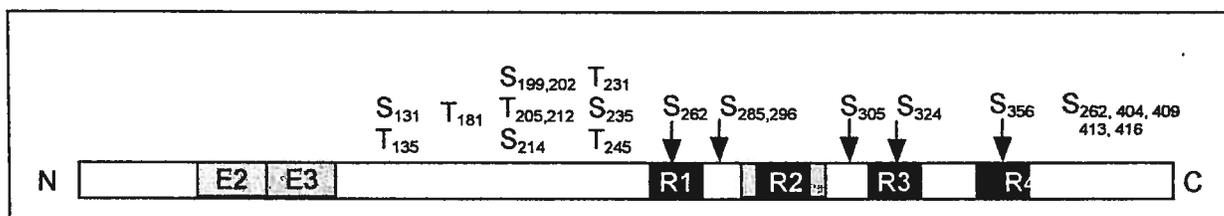
### 3. Phosphorylation de tau

Tau est une protéine qui contient une cinquantaine de résidus Ser et Thr qui ont le potentiel d'être phosphorylés (Buee et al., 2000). Tau semble être phosphorylée différemment au cours du développement. En effet, il a été démontré que tau, dès le troisième stade de la différenciation neuronale, devient déphosphorylée aux épitopes Ser199 et Ser202 et ce, de manière à créer un gradient afin que la partie distale de l'axone ait le moins de tau phosphorylée (Mandell et Banker, 1996). Il y a donc une différence de l'état de phosphorylation dans les différents compartiments qui s'effectue au cours du développement axonal. La phosphorylation de tau semble avoir plusieurs fonctions dont celle de réguler l'affinité de tau pour les microtubules. En effet, pour inhiber complètement la liaison de tau aux microtubules, les résidus Thr231 et Ser262 doivent être phosphorylés (Sengupta et al., 1998).

Comme il en sera question plus loin dans ce travail, l'état de la protéine tau peut devenir problématique lorsqu'elle est anormalement phosphorylée. En effet, une vingtaine de résidus se sont révélés être anormalement phosphorylés dans les cerveaux atteints de différentes maladies neuropathologiques dont la maladie d'Alzheimer (voir l'article de revue de Buee et al., 2000). Des études *in vitro* ont démontré que cette phosphorylation anormale de tau pouvait provoquer une diminution de la liaison de tau aux microtubules (Sengupta et al., 1998; Flaherty et al., 2000), une plus grande tendance à s'agréger et former des filaments (Zheng-Fischhofer et al., 1998), ainsi qu'une perturbation de la dégradation de cette protéine (Litersky et Johnson, 1992).

Les kinases qui peuvent phosphoryler tau *in vitro* sont nombreuses (voir l'article de revue de Pelech, 1995 pour des informations sur la phosphorylation de tau par les MAP kinases, RAF1, PKC, GSK3 et CDK5). De plus, une étude a démontré que la phosphatase 2B est moins active dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer (Lian et al., 2001). L'hyper-phosphorylation pourrait être une conséquence de la diminution de l'activation des phosphatases, ou d'une augmentation de l'activité des kinases. Pour ce travail, nous nous sommes limités à l'étude des kinases seulement.

Malgré l'abondance des publications sur le sujet, la séquence des sites phosphorylés qui conduit à une phosphorylation anormale de tau dans les maladies neurodégénératives reste à être déterminée. Afin de mieux comprendre l'implication des kinases dans le développement de ces maladies, nous en avons sélectionné cinq pour notre étude : CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII. Comme il en sera question dans cette section, ces cinq kinases peuvent phosphoryler tau *in vitro* à plusieurs épitopes différents (figure 2, p.14). L'implication de CDK5 et GSK3 $\beta$  dans les maladies neurodégénératives a fait l'objet de plusieurs études (voir les articles de revue de Maccioni et al., 2001 pour CDK5, et de Kaytor et Orr, 2002 pour GSK3 $\beta$ ). CaMKII, PKA et ROCKII sont des kinases impliquées dans le maintien et le remodelage du cytosquelette, leur implication dans ces maladies n'est pas aussi bien étudiée. Ces trois kinases sont enrichies dans le compartiment somato-dendritique. Puisque la protéine tau est redistribuée dans le compartiment somato-dendritique et qu'elle est hyper-phosphorylée, ces kinases pourraient donc avoir la possibilité de phosphoryler tau à cet endroit. Nous voulions donc mieux comprendre l'implication de GSK3 $\beta$  et de CDK5 dans les maladies neurodégénératives, ainsi que de savoir si PKA, CaMKII et ROCKII sont elles aussi impliquées dans ce processus. La prochaine section présentera la structure de ces kinases, leur mécanisme d'activation, leur distribution et les résidus de tau qu'elles peuvent phosphoryler *in vitro*.



**Figure 2.** Les sites de phosphorylation de la protéine tau par CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII

Schéma présentant les sites de phosphorylation de tau par ces kinases. Selon les articles qui seront cités dans les pages suivantes. Site de phosphorylation de chacune des kinases :

CaMKII: S131, T135, T212, S214, S262, S356

CDK5: S202, T205, S235, S404

GSK3 $\beta$ : T181, S199, S202, T231, S396, S404, S413

PKA: S214, S262, S324, S356, S409, S416

ROCKII: T245, S262, T377, S409

### 3.1 La calcium / calmoduline kinase II (CaMKII)

Dans les cellules neuronales, seules les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de CaMKII sont exprimées. Chaque sous-unité contient en N-terminal une région catalytique, un domaine de régulation qui contient une séquence d'auto-inhibition, un site de liaison au complexe de calcium / calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}$  / CaM), une séquence variable et finalement, en C-terminal, le domaine d'association entre les sous-unités. La séquence variable est modifiée par épissage alternatif d'une séquence de 9 à 127 acides aminés, créant ainsi plusieurs isoformes très semblables entre elles. Néanmoins, la séquence variable influence la localisation de CaMKII vers différents sites cellulaires, ainsi que l'affinité pour la  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM; ces paramètres étant donc modifiés selon l'isoforme. Dans les neurones, CaMKII est constituée d'un complexe de douze sous-unités formant une structure hexamérique (voir l'article de revue de Lisman et al., 2002).

#### 3.1.1 Activation

L'activation de CaMKII est régulée par le niveau de calcium intracellulaire et par sa liaison avec la calmoduline. En absence de calcium, la séquence d'inhibition interfère avec le domaine catalytique, ce qui rend la kinase inactive. Lorsque le niveau intracellulaire de calcium augmente, il se produit un changement de conformation. La liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}$  / CaM sur chacune des sous-unités de CaMKII provoque un détachement de la séquence inhibitrice au site actif; la kinase est alors activée (voir l'article de revue de Lisman et al., 2002). De plus, CaMKII est capable de s'autophosphoryler, ce qui lui permet de rester active indépendamment du niveau de calcium. L'autophosphorylation n'est pas obligatoire pour l'activité de la kinase, elle ne permet qu'une plus longue activité et cela bien après que le niveau de calcium soit retourné à un niveau normal (voir l'article de revue de Fink et Meyer, 2002). L'autophosphorylation se fait à l'épitope Thr286 de la sous-unité  $\alpha$ ; ce qui correspond à la Thr287 de la sous-unité  $\beta$  (Fong et al., 1989).

### 3.1.2 Localisation

CaMKII est une kinase qui est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes. Par contre, sa concentration dans le système nerveux est particulièrement élevée, principalement dans les densités post-synaptiques. Des marquages avec des anticorps contre les formes active et non active de CaMKII sur des tranches d'hippocampe ont permis de voir que ces deux formes sont présentes dans les dendrites, les synapses et dans le corps cellulaire (Ouyang et al., 1997). De plus, les auteurs de cette étude ont décrit un marquage uniforme et pointillé et ils ont supposé que ces points représentaient les densités synaptiques, bien que des tests supplémentaires auraient été nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Une étude sur la localisation des isoformes de CaMKII dans les astrocytes a permis d'observer certaines isoformes dans l'appareil de Golgi et dans le noyau (Takeuchi et al., 1999). L'ischémie semble induire la formation d'agrégats de CaMKII juxtaposés au réticulum endoplasmique. Par contre, ces agrégats sont réversibles puisqu'un apport en oxygène peut les faire disparaître (Tao-Cheng et al., 2002).

### 3.1.3 Phosphorylation de Tau

CaMKII aurait la capacité de phosphoryler tau aux épitopes Ser262 et Ser356 *in vivo* (Bennechib et al., 2001; Yamamoto et al., 2002). Une toute nouvelle étude *in vitro* démontre que CaMKII peut aussi phosphoryler tau aux épitopes Ser131, Thr135, Thr212 et Ser214 (Yoshimura et al., 2003).

## 3.2 La kinase 5 dépendante à des cyclines (CDK5)

Les kinases dépendantes à des cyclines (CDKs) forment une famille de sérine/thréonine kinases impliquées principalement dans la régulation de la division cellulaire des cellules eucaryotes. Par contre, il existe différentes CDKs qui ont des rôles très différents. En effet, CDK5 est principalement exprimée dans les cellules post-mitotiques du système nerveux central. Elle est impliquée dans la différenciation neuronale. Au stade adulte, elle semble contribuer au processus de neurodégénérescence (voir l'article de revue de Maccioni et al., 2001).

### 3.2.1 Activation

Les CDKs ont besoin de s'associer à une cycline pour devenir actives. Ainsi, l'activité de CDK5 dans le système nerveux central est principalement régulée par les sous-unités régulatrices p39, p25 et p35 (p35 étant aussi nommée Tau protéine kinase II). Ces trois sous-unités ne sont pas vraiment considérées comme des cyclines puisque leur séquence diffère largement des autres cyclines, bien qu'il ait été démontré que leur conformation est tout de même très semblable à celle des cyclines (Tang et al., 1997).

Les sous-unités p35 et p39 ont 57 % d'homologie entre-elles (Tang et al., 1995). p25 est un fragment protéolytique de p35, créé après l'activation de calpaines par suite de différentes lésions que subit le neurone (i.e. augmentation de calcium intracellulaire, de glutamate ou d'amyloïde- $\beta$  dans le milieu) (Tsai et al., 1994). La conversion de p35 en p25 serait un événement associé à la neurodégénérescence, puisque l'augmentation de p25 aurait un effet neurotoxique (Lee et al., 2000), notamment par sa capacité d'augmenter le niveau d'activation de CDK5 (Patrick et al., 1999).

CDK5 est une des rares CDKs qui peuvent être activées sans être phosphorylées; seule sa liaison avec une sous-unité régulatrice suffit. Par contre, lorsque CDK5 est phosphorylée à la Ser159, l'activité de la kinase augmente à un niveau supérieur (Sharma et al., 1999). À l'opposé, la phosphorylation de Thr15 diminue l'activité de CDK5 (Lazaro et al., 1996).

### 3.2.2 Localisation

CDK5 est exprimée dans plusieurs tissus, mais elle est particulièrement concentrée dans le système nerveux, spécifiquement dans les neurones. p25, p35 et p39 se trouvent uniquement dans le système nerveux central et ce, dès les premières phases du développement (Lew et al., 1994; Tsai et al., 1994). À l'âge adulte, p39 est plus exprimée dans la moelle épinière que dans le cerveau, à l'opposé du patron d'expression de p35 (Zheng et al., 1998).

CDK5 est exprimée dans la plupart des neurones du cerveau. Elle est distribuée dans le soma et les dendrites, ainsi que dans certains axones (Ino et Chiba, 1996). p25 et p35

sont présentes dans le compartiment somato-dendritique, dans l'axone (Terada et al., 1998), ainsi que dans les cônes de croissances (Nikolic et al., 1996).

CDK5 et p35 sont localisées à la membrane golgienne et elles seraient impliquées dans la formation des vésicules membranaires (Paglini et al., 2001). p39 est associée à la membrane plasmique, possiblement par sa liaison avec l'actine (Humbert et al., 2000), tandis que p35 contient un site de myristoylation qui la cible directement à la membrane plasmique. Puisque p25 ne contient plus cette séquence de ciblage, elle n'est pas liée à la membrane. Elle se trouve plutôt dans le cytoplasme et dans le noyau, étant absente des neurites (Patrick et al., 1999).

Des études ont démontré que CDK5 contribue au processus de neurodégénérescence. Ainsi, l'inhibition de CDK5 a un effet neuroprotecteur en protégeant l'intégrité et le fonctionnement des mitochondries (Weishaupt et al., 2003). De plus, une étude sur la localisation de CDK5 durant l'apoptose a permis de découvrir qu'elle peut être localisée dans le noyau dans ces conditions (Neystat et al., 2001).

### 3.2.3 Phosphorylation de tau

CDK5 peut phosphoryler tau, *in vitro*, aux épitopes Ser202, Thr205, Ser235 et Ser404 (Michel et al., 1998). Seul CDK5/p25 aurait la possibilité de phosphoryler Thr205 et seulement lorsque le site Ser202 est saturé (Hashiguchi et al., 2002).

Puisque l'activité de CDK5 est augmentée lorsque le complexe p25/CDK5 est formé, une augmentation de p25 pourrait favoriser une plus grande phosphorylation de tau par CDK5. Ce phénomène a été étudié dans des souris transgéniques qui surexpriment p25. Seuls les sites normalement phosphorylés par p35/CDK5 sont phosphorylés dans une plus grande mesure chez ces souris (Takashima et al., 2001). Selon ces données, p25 ne favoriserait donc pas la phosphorylation de tau à d'autres sites que ceux normalement phosphorylés par CDK5/p35.

### 3.3 La kinase de la glycogène synthase 3 (GSK3)

GSK3 est une sérine/thréonine kinase qui se présente sous trois isoformes différentes : GSK3 $\alpha$ , GSK3 $\beta$  et GSK3 $\beta$ 2. Les isoformes GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  ont un poids moléculaire de 51kDa et 47kDa respectivement et elles contiennent 85 % d'homologie (Woodgett, 1990). L'isoforme GSK3 $\beta$ 2 est créée par l'épissage alternatif du gène de GSK3 $\beta$ , une séquence supplémentaire de treize acides aminés située dans le domaine catalytique étant préservée (Mukai et al., 2002).

#### 3.3.1 Activation

L'activation de GSK3 $\beta$  se fait par sa phosphorylation au résidu Tyr216 (Tyr279 dans le cas de GSK3 $\alpha$ ) (Hughes et al., 1993). À l'opposé, GSK3 $\beta$  est inactivée lorsque le résidu Ser9 (ou Ser21 dans le cas de GSK3 $\alpha$ ) est phosphorylé (Cross et al., 1995).

#### 3.3.2 Localisation

GSK3 est présente dans la majorité des tissus, mais elle est spécialement enrichie dans le cerveau (Woodgett, 1990). Dans les neurones, GSK3 $\beta$  se trouve principalement dans le soma et dans la partie proximale des dendrites (Leroy et Brion, 1999), bien que l'isoforme GSK3 $\beta$ 2 soit uniquement dans le soma (Mukai et al., 2002). Les isoformes GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  sont associées aux microtubules et au réticulum endoplasmique rugueux, particulièrement aux ribosomes (Hoshi et al., 1995). Seule l'isoforme GSK3 $\beta$  est présente sur les mitochondries (Hoshi et al., 1995).

L'activation de GSK3 $\beta$  régulerait le maintien et l'assemblage de l'appareil de Golgi. Ainsi, son inhibition bloquerait la désorganisation du Golgi dans les neurones en cultures exposés à des toxines qui induisent normalement ce processus (Elyaman et al., 2002).

### 3.3.3 Phosphorylation de Tau

GSK3 $\beta$  a d'abord été identifiée comme la tau protéine kinase I, puisqu'elle peut phosphoryler tau aux épitopes Ser199, Thr231, Ser396, Ser413 (Ishiguro et al., 1992; Ishiguro et al., 1993). D'autres sites (Thr181, Ser202 et Ser404) peuvent aussi être phosphorylés par GSK3 $\beta$  (Sperber et al., 1995). En plus de la phosphorylation de tau, GSK3 serait impliquée dans l'épissage de l'exon 10, favorisant ainsi la formation de tau 4R (Hernandez et al., 2004). GSK3 $\beta$  semble avoir un rôle important dans le processus d'hyper-phosphorylation de tau. Par exemple, la sur-expression de GSK3 $\beta$  chez la souris induit une hyper-phosphorylation de tau, une accumulation de tau dans le compartiment somato-dendritique et de la neurodégénérescence (Lucas et al., 2001). Seule l'isoforme GSK3 $\beta$  a démontré la capacité de phosphoryler tau lors de ces études.

## 3.4 La protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA)

PKA est une kinase formée par deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques (Beebe, 1994). Il existe quatre gènes différents codant pour la sous-unité régulatrice (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  et RII $\beta$ ) et trois gènes pour la sous-unité catalytique (C $\alpha$ , C $\beta$  et C $\gamma$ ). De plus, l'épissage alternatif de ces gènes favorise une grande variété d'isoformes (voir l'article de revue de Brandon et al., 1997).

### 3.4.1 Activation

Lorsque le complexe est formé, les sous-unités régulatrices empêchent l'activité constitutive des sous-unités catalytiques. En effet, il a été démontré que deux acides aminés (Arg92 et Arg93) de la sous-unité RII étaient indispensables à l'inactivation de PKA puisqu'ils occupaient le site actif (Wang et al., 1991). Lorsque l'AMP cyclique se lie aux unités régulatrices, celles-ci se détachent des sous-unités catalytiques. Les domaines catalytiques sont alors libérés; PKA est activée (Skalhegg et Tasken, 2000).

Puisqu'il existe différentes isoformes de chacune des sous-unités, les paramètres de la sensibilité à l'AMP cyclique, de l'activité et de l'inactivation de la kinase dépendent des sous-unités qui forment PKA. Un effet modulateur de l'excitabilité synaptique serait donc

créé selon les différentes sous-unités présentes dans les différentes populations de neurones (voir l'article de revue de Brandon et al., 1997).

### 3.4.2 Localisation des sous-unités

PKA est une kinase exprimée dans différents tissus, mais elle est enrichie dans l'hippocampe et le cortex cérébral (Cadd et McKnight, 1989; Ludvig et al., 1990; Glantz et al., 1992). Règle générale, il semble que la PKA de type I (qui contient un dimère RI) est principalement localisée dans le cytoplasme des neurones (Meinkoth et al., 1990). Par contre, PKA de type II (qui contient un dimère RII) est majoritairement liée aux organelles membranaires et à l'enveloppe nucléaire (Scott, 1991). Les sous-unités C $\alpha$  et RII $\alpha$  sont présentes dans l'appareil de Golgi cis et trans (Keryer et al., 1999; Martin et al., 1999). La phosphorylation de PKA et PKC serait nécessaire à la sortie du réticulum endoplasmique de certaines protéines, i.e. les récepteurs NMDA, afin d'être transportées dans les synapses (Scott et al., 2003). La sous-unité RII $\alpha$  aurait aussi la propriété de se lier à des vésicules associées aux microtubules, l'activation de PKA étant nécessaire au transport des vésicules partant de l'appareil de Golgi-trans (Muniz et al., 1997; Keryer et al., 1999).

L'association des sous-unités RII aux divers éléments présents dans la cellule est possible grâce aux différentes protéines associées à PKA (AKAP). Par exemple, AKAP79 aurait la tâche de localiser PKA dans les densités post-synaptiques et de favoriser sa liaison à diverses protéines synaptiques (Carnegie et Scott, 2003). MAP2 est une AKAP puisqu'elle permet la localisation de la sous-unité RII $\alpha$  dans les dendrites (Carr et al., 1992).

### 3.4.3 Phosphorylation de tau

Des études démontrent que PKA peut phosphoryler tau aux épitopes Ser214, Ser262, Ser324, Ser356, Ser409 et Ser416 (Scott et al., 1993; Jensen et al., 1999). Une étude a démontré que cette phosphorylation interfère avec les calpaines, ralentissant la dégradation de tau (Litersky et Johnson, 1992). La phosphorylation de tau par PKA à l'épitope Ser409 précéderait la formation des filaments (Jicha et al., 1999a). Finalement, deux résidus (Ser214 et Ser409) sont phosphorylés dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer et ils semblent n'être phosphorylés que par PKA (Jicha et al., 1999c).

### 3.5.1 La kinase ROCK

Rho est une GTPase qui agit comme un interrupteur de plusieurs molécules de signalisation. Un des nombreux effecteurs connus de Rho est ROCK, une kinase qui fait partie de la famille des Serine/Thréonine kinase. ROCK contient en N-terminal un domaine catalytique, une structure en alpha-hélice, un domaine de liaison à Rho (RB), un domaine riche en cystéines formant un motif doigt de zinc et, finalement, une région homologue à la pleckstrine (HP) en C-terminal (Ishizaki et al., 1996; Matsui et al., 1996).

Chez l'humain, il existe deux isoformes qui ont plus de 90 % d'homologie et qui proviennent de deux gènes différents: ROCK I (aussi nommée p160 ROCK ou ROK $\beta$ ) (Leung et al., 1996; Nakagawa et al., 1996) et ROCKII (aussi nommée Rho kinase, ROK $\alpha$ ) (Leung et al., 1995; Nakagawa et al., 1996; Takahashi et al., 1999).

#### 3.5.1 Activation

À l'état inactif, le domaine de liaison à Rho et le domaine HP bloquent l'accès au domaine catalytique. L'activation de ROCK se fait lorsqu'il y a liaison avec Rho-GTP, ce qui libère alors le domaine catalytique. Les domaines RB et HP sont donc essentiels à l'inactivation de ROCK. Lorsque cette partie en C-terminal est tronquée, la kinase devient constitutivement active (Amano et al., 1999).

#### 3.5.2 Localisation

ROCKI et ROCKII démontrent une expression très différente selon les tissus. Dans le cerveau humain, l'ARN messager de ROCKII est plus abondant que celui de ROCKI (Nakagawa et al., 1996). ROCKI est tout de même présente dans les neurones dans le compartiment somato-dendritique uniquement (Hashimoto et al., 1999). À notre connaissance, aucune autre étude n'a étudié la localisation de ROCKI ou ROCKII au niveau subcellulaire.

ROCKI est exprimée très tôt durant le développement puisqu'elle est impliquée dans la pousse neuritique, soit par la rétraction des cônes de croissance (Hirose et al., 1998) et des neurites mineures (Kato et al., 1998). Elle est aussi impliquée dans la pousse axonale (Bito et al., 2000). L'action de ROCK se fait principalement par le remodelage du

cytosquelette d'actine. En effet, ROCKII est majoritairement dans le cytoplasme, mais son activation localise le complexe Rho/ROCK à la membrane plasmique (Kranenburg et al., 1997). Cette activation provoque la formation et la contraction des fibres de stress d'actine, ce qui augmente la rigidité du cytosquelette (voir l'article de revue de Riento et Ridley, 2003).

### 3.5.3 Phosphorylation de tau

Il a été démontré tout récemment que ROCKII pouvait phosphoryler tau aux épitopes Thr245, Thr377, Ser409 et Ser262 (Amano et al., 2003). Cette découverte laisse supposer que ROCKII puisse intervenir dans la morphologie du réseau des microtubules et qu'elle puisse être impliquée dans le processus d'hyper-phosphorylation de tau.

## 4. Les mutations de tau :

### la cause génétique de certaines tauopathies

Il existe un groupe de neuropathologies, regroupées sous le nom des tauopathies, qui se caractérisent par des inclusions filamenteuses intracellulaires composées de la protéine tau. Ces accumulations, nommées enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs), sont liées à la neurodégénérescence de différentes parties du cerveau, produisant des déficits cognitifs qui peuvent varier selon le type de la tauopathie (voir l'article de revue de Lee, 2001, pour plus d'informations sur les symptômes cliniques de chacune des tauopathies).

#### 4.1 Les enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs)

Les NFTs sont des structures anormales, retrouvées dans les cerveaux de patients atteints d'une tauopathie. Ces agrégats de filaments denses contiennent principalement de la protéine tau hyper-phosphorylée sous forme de filaments appariés en hélices (PHF) et d'autres protéines du cytosquelette, dont MAP2 et des neurofilaments anormalement phosphorylés (voir l'article de revue de Johnson et Jenkins, 1999). Bien que tau soit une protéine axonale, les NFTs sont présents dans la région péri-nucléaire et dans certaines dendrites proximales (Kowall et Kosik, 1987).

Les NFTs et les PHFs sont insolubles lorsqu'ils sont isolés en présence de SDS. Néanmoins, une certaine population de PHFs est soluble en présence de SDS (Ksiezak-Reding et al., 1994). Il est probable que certaines modifications contribuent à ce que les PHFs solubles deviennent insolubles et que cela contribue à la formation des NFTs. La formation des PHFs, des filaments droits ou en forme de rubans entremêlés, serait induite par la phosphorylation de tau et impliquerait possiblement d'autres protéines (voir le texte de revue de Johnson et Jenkins, 1999; et de Buée, 2001). De plus, une étude chez l'humain a démontré que la phosphorylation de tau précédait l'apparition des NFTs et que cette hyper-phosphorylation se produisait lors du stade précoce de la maladie d'Alzheimer (Baner et al., 1989). Malheureusement, les processus impliqués dans la phosphorylation

de tau, la formation de ces filaments et, finalement, de la formation des NFTs ne sont pas encore très bien connus.

Dans certains cas de tauopathies, les NFTs sont les seuls changements pathologiques présents. Le rôle de la protéine tau est donc clairement associé à la pathologie. Dans certaines maladies, comme la maladie d'Alzheimer, on retrouve aussi des plaques séniles, i.e. des dépôts diffus contenant un fragment toxique nommé amyloïde- $\beta$ , produit à partir de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Ermak et Davies, 2002). L'implication directe de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer est donc plus difficile à établir dans ces conditions, puisque ce n'est pas le seul changement pathologique à survenir. Par contre, depuis les années 1990, plusieurs mutations de tau ont été décrites comme étant des causes familiales de tauopathies. Par exemple, certains cas de démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP-17), de maladie de Pick (PiD), de dégénérescence cortico-basale (CBD) et de paralysie supranucléaire progressive (PSP), sont liés à une mutation dans le gène de tau. Jusqu'à maintenant, une quinzaine de mutation faux-sens, une délétion et trois mutations silencieuses, ont été identifiées dans un cinquantaine de familles atteintes d'une de ces tauopathies (Buee et al., 2000; Hutton, 2000; van Slegtenhorst et al., 2000; Lee et al., 2001; van Herpen et al., 2003) (figure 3, p.27). De plus, il a été démontré que certaines mutations (E10 +3 à 16) font partie de la séquence d'ARN nécessaire à l'épissage de l'exon 10 (Hutton et al., 1998). Ces mutations sont responsables de l'augmentation du tau 4R (avec l'exon 10) au détriment du tau 3R (sans l'exon 10). Ce changement du ratio tau 3R/4R serait, à lui seul, capable d'induire la neuropathologie (Spillantini et al., 1998).

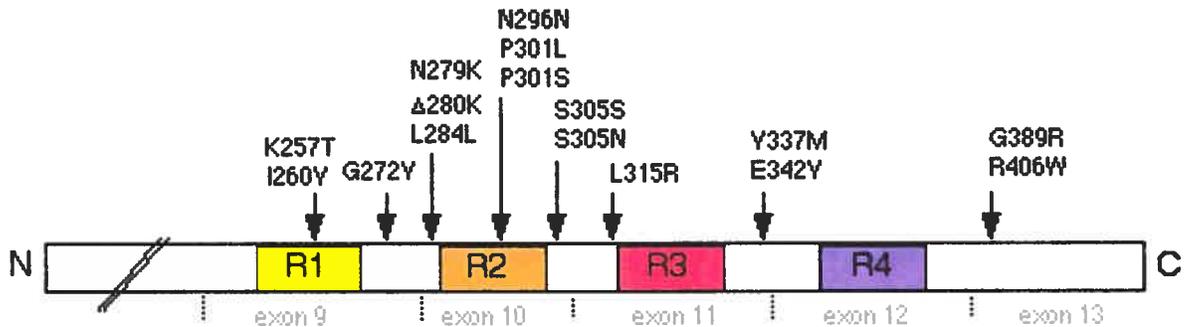
Nous nous sommes concentrés sur une de ces mutations en particulier, soit la mutation P301L, qui est la première mutation de tau à avoir été décrite comme étant la cause de la FTDP-17 (Mirra et al., 1999). Plusieurs études ont démontré que cette mutation affectait grandement les propriétés physiques de la protéine tau. De plus, des modèles vivants (dont la souris JNPL3 qui a été utilisée pour ce projet) ont été produits afin d'étudier le rôle de cette mutation. Les prochaines sections présenteront les études *in vitro* et *in vivo* qui ont été réalisées afin d'en savoir plus sur les propriétés de la protéine mutante tau P301L.

**Figure 3.** *Les mutations de tau impliquées dans certaines tauopathies*

Les différentes mutations trouvées dans les familles atteintes d'une tauopathie sont présentées dans cette figure. Le tableau présente le type de mutation, l'exon impliqué, les isoformes générées par la mutation, la formation des filaments et la tauopathie associée à la mutation. Le schéma illustre la position de ces mutations au niveau de la protéine tau, dans le domaine de liaison aux microtubules contenant les séquences répétées (R1 à R4).

Les informations présentées ont été tirées de ces articles : (Buee et al., 2000; Hutton, 2000; van Slegtenhorst et al., 2000; Lee et al., 2001; van Herpen et al., 2003).

Mutation de tau	Type de mutation	Exon	Isoformes générées	Filaments		Tauopathie
				Type des filaments	Localisation	
K257T	Faux-sens	E9, R1	3R et 4R	Corps de Pick		PiD
I260V	Faux-sens	E9, R1	3R et 4R			
G272V	Faux-sens	E9	3R et 4R	Droits et PHF	Neurone	FTDP-17
N279K	Faux-sens	E10	4R	Rubans entortillés	Neurone et gliale	PSP
Δ280K	Délétion	E10	3R			FTDP-17
L284L	Silencieuse	E10	4R		Neurone et gliale	Maladie d'Alzheimer
N296N	Silencieuse	E10, R2	3R et 4R			CBD
P301L	Faux-sens	E10, R2	3R et 4R	Rubans entortillés, majorité de Tau 4R	Neurone et gliale	FTDP-17, PSP, CBD
P301S						FTDP-17, CBD
S305N	Faux-sens	E10	4R	Droits	Neurone et gliale	CBD
S305S	Silencieuse	E10	3R et 4R			PSP
L315R	Faux-sens	E11	3R et 4R	Corps de Pick	Neurone et gliale	FTFP-17
E10+3	Intronique (problème au niveau de l'épissage de l'exon 10)	I10	4R	Rubans entortillés, majorité de Tau 4R	Neurone et gliale	FTDP-17
E10+12						FTDP-17
E10+13						
E10+14						FTDP-17, PSP
E10+16						FTDP-17, PSP, CBD
E9+33						
V337M	Faux-sens	E12	3R et 4R	Droits, PHF	Neurone	FTDP-17
E342V	Faux-sens	E12	3R et 4R			FTDP-17
G389R	Faux-sens	E13	3R et 4R	Corps de Pick		PiD
R406W	Faux-sens	E13	3R et 4R	Droits, PHF	Neurone	PSP



## 4.2 Études *in vitro* de la mutation tau P301L

La mutation faux-sens P301L est localisée dans la deuxième séquence répétée de dix-huit acides aminés responsable de la liaison de tau aux microtubules. Des études en spectroscopie circulaire dichroïque ont démontré que cette mutation provoque un changement de la structure 3D de la protéine tau, au niveau des séquences répétées dans le domaine de liaison, diminuant ainsi l'affinité de tau pour les microtubules (Jicha et al., 1999b). Cette différence de conformation a aussi des répercussions sur la dégradation de la protéine, puisque le temps de dégradation de tau P301L est beaucoup plus lent que celui de la protéine tau normale. Cette différence serait attribuée à l'inaccessibilité de la caspase-1 à certains sites de coupures de la protéine mutante (Yen et al., 1999). De plus, cette mutation facilite la formation de filaments en présence d'héparine ou d'acide arachidonique (Nacharaju et al., 1999). Finalement, l'aptitude de P301L à se lier à la phosphatase 2A diminue significativement; ce qui pourrait avoir un impact important sur l'état de phosphorylation de la protéine tau (Goedert et al., 2000).

Ces observations effectuées *in vitro* démontrent bien que les changements de conformation de la protéine mutante tau P301L se répercutent tant au niveau fonctionnel qu'au niveau des propriétés biophysiques de la protéine tau. Cependant, les répercussions de ces changements sur le fonctionnement du neurone demeurent inconnues. Afin de mieux comprendre les effets de la protéine tau, différents modèles animaux ont été produits. Certains sur-expriment la protéine tau humaine normale, d'autres, la protéine humaine mutante P301L.

## 5. Surexpression de la protéine tau : les modèles *in vivo* des tauopathies

Plusieurs questions subsistent toujours quant aux différentes étapes impliquées dans la formation des NFTs. L'hypothèse généralement acceptée implique d'abord des facteurs génétiques ou environnementaux qui induiraient une hyper-phosphorylation de la protéine tau et/ou une perte de fonction de cette protéine. L'accumulation dans le cytoplasme de la protéine tau (ne pouvant se lier aux microtubules) favoriserait son agrégation, la formation de filaments et puis, par la suite, la formation des NFTs. Ces filaments, ayant un effet neurotoxique, induiraient les processus de neurodégénérescence.

Plusieurs modèles animaux ont été générés afin d'étudier les conséquences de l'hyper-phosphorylation de tau, de l'accumulation somato-dendritique de la protéine tau et de la formation des NFTs sur la survie et la fonction neuronales. Dans cette section, nous nous concentrerons sur les études faites chez la souris, la drosophile et *C. elegans*. Ces modèles, créés dans le but d'étudier le processus pathologique impliqué dans les tauopathies, ont été induits par une surexpression de certaines isoformes de la protéine tau humaine.

### 5.1 Phosphorylation de tau

Plusieurs souris transgéniques ont été produites, afin d'observer les effets de la surexpression des différentes isoformes de la protéine tau humaine (tableau 1, p.30). Certaines souris ont une surexpression des isoformes de type tau 4R (Götz et al., 1995; Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000; Duff et al., 2000), d'autres de type 3R (Brion et al., 1999; Ishihara et al., 1999; Ishihara et al., 2001). De plus, deux modèles de souris transgénique expriment toutes les isoformes de tau (tau génomique) (Duff et al., 2000; Andorfer et al., 2003) et l'un de ces modèles est en plus accompagné d'une suppression du tau endogène (Andorfer et al., 2003). Toutes ces souris transgéniques ont démontré une hyper-phosphorylation de la protéine tau (tableau 1, p.30). De plus, la surexpression de tau chez la drosophile (Jackson et al., 2002; Wittmann et al., 2001) et *C. elegans* (Kraemer et al., 2003) produit aussi cette phosphorylation anormale de la protéine tau.

Des études chez *C. elegans* ont permis de mieux comprendre les conséquences de l'hyper-phosphorylation de tau au niveau de la fonction neuronale. En effet, une première étude chez *C. elegans* a permis de démontrer que les neurones sont perturbés dès que la protéine tau hyper-phosphorylée devient cytoplasmique et que son expression augmente, même à un niveau qui ne forme pas encore d'accumulations visibles, et avant même que des signes de neurodégénérescence soient notés. D'après cette étude, la perte de tau aux microtubules (causée par une hyper-phosphorylation de tau) induit un déficit important au niveau de la fonction des neurones moteurs; ce qui se traduit par des troubles locomoteurs (Kraemer et al., 2003).

Isoformes humaines exprimées	Présence dans le soma	Hyper-Phospho.	Phospho. des sites des PHFs	Formation des NFTs	Références
Tau 4R (plus grande isoforme humaine)	Oui	Oui	Oui	Non	Götz et al., 1995 Spittaels et al., 1999 Probst et al., 2000 Duff et al., 2000
Tau 3R (plus petite isoforme humaine)	Oui	Oui	Oui	Non	Brion et al., 1999 Ishihara et al., 1999
	Oui	Oui	Oui	Oui	Ishihara et al., 2001
Tau génomique (3R et 4R)	Non	Oui	Oui	Non	Duff et al., 2000
Tau 3R et 4R et suppression de Tau 4R souris	Oui	Oui	Oui	Oui	Andorfer et al., 2003

**Tableau 1.** *Surexpression des isoformes humaines de tau chez la souris.*

La surexpression de la protéine tau humaine peut induire son hyper-phosphorylation, son accumulation somato-dendritique et la formation des NFTs chez la souris.

## 5.2 Distribution somato-dendritique

Les processus impliqués dans la perte de compartimentation de la protéine tau restent encore incompris. Il se pourrait que la phosphorylation anormale de la protéine tau axonale provoque sa relocalisation dans le compartiment somato-dendritique et la formation des NFTs. Puisque le corps cellulaire contient la majorité des organelles indispensables au métabolisme du neurone, il se pourrait qu'une accumulation de la protéine tau chamboule la routine du neurone et aurait même un effet neurotoxique.

Chez les souris transgéniques, *C. elegans* et la drosophile, des accumulations de tau dans le corps cellulaire sont observées, à l'exception de la souris transgénique qui exprime tau humaine génomique (toutes les isoformes humaines de tau 3R et 4R) (Duff et al., 2000). Chez cette souris, l'hyper-phosphorylation de tau n'est pas nécessairement liée à une redistribution de la protéine tau. En effet, tau est phosphorylée puisqu'elle est reconnue par les anticorps phospho-dépendants PHF-1 et CP13. Cependant, tau ne semble pas s'accumuler dans les corps cellulaires des motoneurones. Une explication probable de ce phénomène a été décrite par les auteurs de cette étude. En effet, ceux-ci proposent que le transgène de tau génomique qu'ils ont utilisé cible efficacement la protéine tau dans le compartiment axonal. Ainsi, cela aurait comme effet de diminuer l'accumulation de tau dans le corps cellulaire des neurones. Cette hypothèse est fondée sur la découverte d'une région en 3' de l'ARN messager de la protéine tau. Cette région a comme fonction de cibler l'ARN, ainsi que la protéine tau, dans le compartiment axonal (Aronov et al., 2001). Selon la théorie des auteurs, si la région en 3' est mutée ou n'est pas conservée, la protéine tau surexprimée n'est plus dirigée vers le compartiment axonal; elle peut ainsi s'accumuler dans le compartiment somato-dendritique. Il serait donc avantageux de séquencer la région en 3' des ARN messagers des différents modèles transgéniques créés jusqu'à maintenant, afin de vérifier si cette région est conservée et si elle est toujours fonctionnelle.

### 5.3 Formation des NFTs et le processus de neurodégénérescence

Chez les modèles animaux, la formation des NFTs n'a pas toujours été observée. Les différentes souris qui surexpriment l'isoforme tau 4R, les souris qui surexpriment tau génomique (Duff et al., 2000) et les drosophiles (Jackson et al., 2002; Wittmann et al., 2001) ne forment pas de NFTs. Dans le cas de *C. elegans*, les auteurs ne font pas mention de la présence ou non des NFTs (Kraemer et al., 2003). Dans ces modèles, il est donc difficile d'étudier la formation et les conséquences des NFTs. Par contre, lorsque l'isoforme 3R est surexprimée à un niveau suffisant, la formation des NFTs apparaît, bien que très tard, chez les souris, soit vers 18 à 20 mois (Ishihara et al., 2001). Le vieillissement de la souris serait donc impliqué dans la formation des NFTs, d'une façon toutefois encore inconnue. De plus, des NFTs ont été observés chez les souris qui surexpriment les formes 3R et 4R de la protéine tau humaine, conjuguée à la suppression du tau endogène de la souris (Andorfer et al., 2003). L'expression du tau endogène pourrait donc avoir un rôle protecteur dans l'apparition de la pathologie, bien que cette protection soit moins efficace à un âge avancé.

Dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer, la présence des NFTs est liée à de la neurodégénérescence (Buée, 2001). Chez les modèles animaux, la relation entre les NFTs et le processus de neurodégénérescence semble être plus difficile à associer. Chez la drosophile, il a été démontré que l'expression de tau humaine induisait de la neurodégénérescence, avant même la formation des NFTs (Wittmann et al., 2001; Jackson et al., 2002). La formation des NFTs ne serait donc pas un événement indispensable au processus de neurodégénérescence. En effet, seule l'accumulation importante de la protéine tau dans les neurones semble être suffisante. Chez *C. elegans*, une neurodégénérescence importante n'apparaît que lorsque la protéine tau insoluble s'accumule de façon importante dans les neurones (Kraemer et al., 2003). Ainsi, les problèmes locomoteurs apparaissent dès que la protéine tau commence à devenir cytoplasmique et ce déficit s'aggrave davantage lorsque les accumulations intracellulaires induisent de la neurodégénérescence.

À la lumière de ces études chez les organismes vivants, la phosphorylation de tau semble être une étape précoce de la pathologie. La phosphorylation de tau, induisant une accumulation de tau dans le cytoplasme, semble être suffisante pour provoquer des troubles

au niveau du fonctionnement du neurone et, dans certains cas, induire de la neurodégénérescence. La formation des filaments et des NFTs ne serait donc pas essentielle au déclenchement du processus de neurodégénérescence. Ces études laissent croire que la perte de fonction de la protéine tau serait un événement perturbateur important qui pourrait peut-être induire, à lui seul, de la neurodégénérescence.

#### 5.4 Études *in vivo* de la mutation P301L

Les modèles présentés jusqu'à maintenant surexprimaient la forme humaine normale de la protéine tau. D'autres modèles animaux ont aussi été créés afin de surexprimer diverses formes mutantes de la protéine tau dont tau G272 (Gotz et al., 2001c; Lim et al., 2001), P301S (Allen et al., 2002), P301L (Lewis et al., 2000; Gotz et al., 2001a; Lim et al., 2001), V337 (Tanemura et al., 2002) et R406W (Lim et al., 2001). Puisque nous nous intéressons particulièrement à la mutation tau P301L, la section suivante présentera les modèles de souris transgéniques et de *C. elegans*, qui surexpriment cette mutation seulement.

Des souris qui surexpriment la protéine humaine mutante P301L ont été produites dans trois laboratoires différents (Lewis et al., 2000; Gotz et al., 2001a; Lim et al., 2001). Chez ces souris transgéniques, tau est hyper-phosphorylée, insoluble et forme des agrégats. Dans la moelle épinière, il y a formation des NFTs et une forte diminution du nombre des motoneurones. Cette neurodégénérescence affecte l'activité motrice des souris, jusqu'à provoquer une paralysie complète. Dans le cortex cérébral, la protéine tau est présente dans le compartiment somato-dendritique, mais il n'y a pas de NFTs (Lewis et al., 2000; Gotz et al., 2001a).

Une étude sur le niveau d'expression de certains ARN messager chez ces souris transgéniques a permis de noter une diminution d'expression des ARN codant pour des inhibiteurs d'apoptose et des médiateurs de l'inflammation (Ho et al., 2001). Malheureusement, la concentration d'ARN codant pour des kinases ou d'autres modulateurs connus de la phosphorylation de tau n'a pas été investiguée dans cet article.

Selon l'article de Lewis et al., 2000, le niveau d'expression de la protéine tau humaine P301L n'est pas le même chez toutes les souris ce qui provoque une grande variabilité dans l'apparition des symptômes. En effet, nous avons observé, chez les souris JNPL3 que nous avons utilisées, que la sévérité de la pathologie s'accroissait avec l'âge et qu'elle pouvait différer légèrement entre les souris. Une surveillance accrue a donc été nécessaire afin de s'assurer que les souris utilisées pour nos expériences présentaient des symptômes similaires au moment de leur utilisation.

L'expression de tau P301L a aussi été étudiée chez *C. elegans*. L'expression de tau humaine P301L accentue les effets pathologiques induits par la sur-expression de tau humaine normale. En effet, chez les vers qui expriment la mutation P301L, tau devient insoluble et la neurodégénérescence apparaît beaucoup plus rapidement que chez les vers qui expriment la forme humaine normale de tau (Kraemer et al., 2003). Chez les souris, la forme mutante P301L a aussi cet effet pathologique plus rapide que la forme normale de la protéine tau. En effet, si l'on compare les études utilisant la forme 4R de tau (Götz et al., 1995; Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000; Duff et al., 2000) avec celles utilisant tau P301L (une forme 4R elle aussi) (Lewis et al., 2000), la forme mutante de tau P301L accentue dramatiquement les effets pathologiques observés.

Pour ce travail, nous avons utilisé des souris JNPL3, puisque ces souris présentent des accumulations de la protéine tau hyper-phosphorylée dans le compartiment somato-dendritique, des NFTs et des signes de neurodégénérescence dans les neurones de la moelle épinière. Les souris JNPL3 présentent donc les mêmes caractéristiques pathologiques que les tauopathies, c'est pourquoi nous avons choisi ce modèle pour notre projet.

## 5.5 Objectif de ce travail

Les tauopathies sont caractérisées par des inclusions intra-neuronales nommées NFTs. Les NFTs sont composés de la protéine tau sous une forme anormalement hyperphosphorylée. Dans certains cas familiaux de tauopathie, une mutation dans le gène de tau a été trouvée. Par exemple, la mutation tau P301L est liée à l'apparition de la tauopathie de type FTDP-17.

Il existe un modèle animal, soit la souris JNPL3, qui exprime la protéine tau humaine mutante P301L (Lewis et al., 2000). Dans les neurones moteurs de la moelle épinière, il se produit une accumulation importante de la protéine tau anormalement phosphorylée dans le compartiment somato-dendritique et la présence de NFTs. Dans le cerveau, les NFTs sont moins nombreux (Lewis et al., 2000; Gotz et al., 2001). Cette souris est donc un excellent modèle pour étudier les changements qui surviennent avant, pendant et après la formation des NFTs.

L'objectif de notre projet était de mieux comprendre les étapes qui mènent à l'hyperphosphorylation de tau. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Premièrement, tau peut se faire hyper-phosphoryler, alors qu'elle est dans l'axone, par des kinases qui sont anormalement redistribuées du compartiment somato-dendritique vers l'axone. À l'opposé, tau pourrait se faire phosphoryler par des kinases dendritiques, lorsqu'elle s'accumule dans le compartiment somato-dendritique.

Un des buts de ce travail était donc d'examiner la distribution des kinases au cours du processus de neurodégénérescence dans les souris JNPL3. Pour ce faire, nous nous sommes concentrés sur cinq kinases soit CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA, et ROCKII, puisqu'il a été démontré que ces kinases peuvent phosphoryler tau à plusieurs endroits différents et qu'elles sont normalement localisées dans le compartiment somato-dendritique (sauf dans le cas de CDK5 qui est aussi présente dans l'axone).

Puisque la moelle épinière de ces souris contient plusieurs motoneurones qui présentent une accumulation de la protéine tau dans le compartiment somato-dendritique, nous avons premièrement étudié le niveau protéique et l'activation des kinases dans la

moelle épinière. Pour cela, nous avons fait des immunobuvardages à partir d'homogénats de moelle épinière de souris JNPL3 et de souris témoins.

Deuxièmement, nous avons examiné par immunohistochimie la distribution des kinases dans les souris JNPL3. Grâce à des doubles marquages effectués avec le marqueur axonal SMI34 et des anticorps contre les kinases, nous avons comparé la compartimentation des kinases dans les motoneurones de la moelle épinière des souris témoins et des souris JNPL3 âgées de dix mois.

Afin de mieux comprendre l'implication des kinases au cours du processus de la neurodégénérescence, nous avons étudié la localisation subcellulaire des kinases dans le cerveau des souris JNPL3. Grâce à la technique du fractionnement subcellulaire, des fractions enrichies de différentes organelles membranaires ont été isolées. Ceci nous a permis d'étudier la localisation subcellulaire des kinases dans le cerveau des souris JNPL3 et des souris témoins.

# Matériel et Méthodes

## 6. Anticorps primaires

Dans la présente étude, les anticorps primaires énumérés au tableau 2 (p. 39) ont été utilisés pour étudier la quantité, l'activation et la localisation des kinases CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII. Ces anticorps ont été utilisés pour l'immunohistochimie et l'immunobuvardage. Des anticorps dirigés contre les protéines Tau, MAP2 et les neurofilaments ont aussi été utilisés en immunohistochimie.

## 7. Immunohistochimie

Les souris transgéniques JNPL3 qui expriment la protéine tau humaine mutante P301L (Lewis et al., 2000) ont été achetées de la compagnie Taconic. Les souris ont été sacrifiées vers 10 mois, lorsqu'elles commençaient à démontrer de légers troubles moteurs. L'utilisation des animaux ainsi que les procédures chirurgicales décrites dans ce rapport respectent *Le manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation du Conseil canadien de protection des animaux*.

### 7.1 Coupe de moelle épinière

Les souris ont été perfusées par voie intracardiaque en injectant, dans le ventricule gauche, 10 ml de salin 0,9 % suivis de 30 ml de paraformaldéhyde 4 %, avant de procéder à l'extraction de la moelle épinière. Après une incubation de douze heures dans le paraformaldéhyde, la moelle a été coupée à l'aide d'un vibratome. L'épaisseur des coupes était de 50  $\mu$ m. Les coupes ont été mises dans une solution d'antigel (30 % glycérol et 30 % éthylène glycol dans du PBS) et conservées à -20°C.

**Tableau 2.** *Les anticorps primaires*

Les caractéristiques et concentrations des différents anticorps utilisés en immunohistochimie (IHC) et en immunobuvardage (IB) sont décrites dans ce tableau.

SC : Santa Cruz Biotechnology Inc., Bio : Biosource international, BD : BD Transduction Laboratories, Chem : Chemicon international.

Anticorps	Animal	Clone	Source	Phospho-dépendant	Épitope, résidu ou sous-unité	Concentration	
						IHC	IB
CaMKII	Souris		BD	Non		-	1 : 200
CaMKII active	Lapin	pT286	Promega	Oui	Thr286	Selon le protocole du manufacturier	
CDK5	Lapin	C-8	SC	Non	C-terminal	1 : 20	1 : 50
pCDK5	Lapin	Ser159	SC	Oui	Ser159	1 : 10	1 : 50
P35	Lapin	C-19	SC	Non	C-terminal	1 : 20	1 : 50
GSK3β	Lapin	H-76	SC	Non	Résidus 345 à 420	1 : 20	1 : 100
GSK3 active	Lapin		Bio	Oui		Selon le protocole du manufacturier	
PKA RIα	Lapin	RIα	Chem	Non	Sous-unité RIα	1 : 20	1 : 500
ROCKII	Lapin	H-85	SC	Non	Résidus 775 à 860	1 : 25	1 : 100
Tau PHF-1	Souris		Dr Peter Davis	Oui	Ser396 et Ser404	1 : 10	-
Tau polyclonal	lapin		Dr Virginia Lee	Non	Tau 4R (tau total)	1 : 250	1 : 2000
MAP2 polyclonal	Lapin			Non		1 : 200	-
MAP2	Souris	AP20	Neomarkers	Non		1 : 20	-
SMI34	Souris		Sternberger Monoclonals	Oui	Neurofilaments de l'axone	1 : 1000	-
Tubuline	Souris		DSHB	Non	Sous-unité β	-	1 : 100

## 7.2 Incubation des anticorps

Les coupes ont été rincées avec du PBS avant d'être incubées dans une solution de blocage contenant 0,1 g d'albumine sérique bovine (BSA), 200 µl de sérum d'âne, et 0,5 % de Triton X-100 dans le tampon phosphate. Les deux anticorps primaires (anti-MAP2 et SMI34, anti-tau et anti-MAP2, ou anti-kinase et SMI34) ont été incubés pendant vingt-quatre heures dans cette solution de blocage. Après plusieurs rinçages, deux anticorps secondaires, soit un anti-lapin conjugué à la rhodamine (dilution 1:500) et un anti-souris conjugué à la FITC (dilution 1:200) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), ont été incubés dans du PBS contenant 0,5 % de Triton X-100, pendant deux heures. Les coupes ont été montées sur des lames de verre avec du moviol.

## 7.3 Microscopie

L'observation des coupes s'est faite avec un objectif 63X sous un microscope confocal *Leica DM IRBE* et avec le logiciel *Leica Confocal Software*. Les images de microscopie présentées dans ce travail ont été prises dans la corne ventrale, à la limite de la matière blanche et grise, là où se retrouve la majorité des corps cellulaires des motoneurones. Les montages photos ont été faits avec Photoshop et Illustrator.

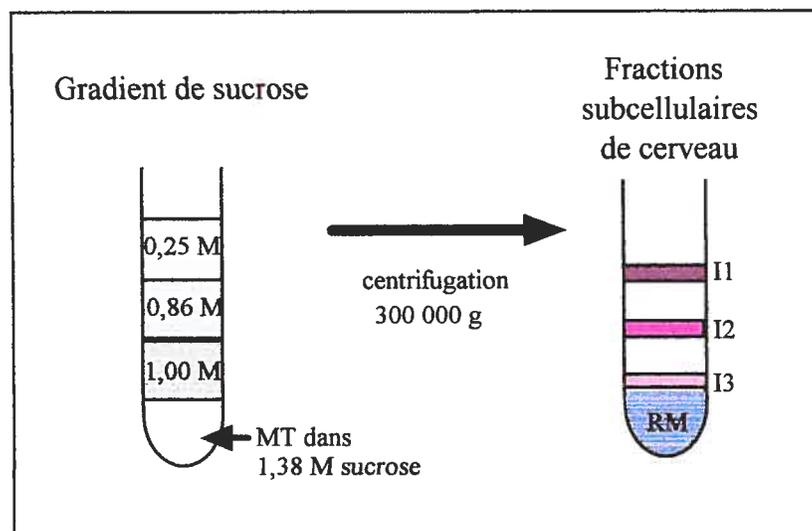
## 8. Homogénats de la moelle épinière

L'extraction des moelles épinières a été faite sur des souris transgéniques et témoins de 10 mois qui ont été anesthésiées puis sacrifiées par décapitation. Les moelles ont ensuite été gardées à -80 °C jusqu'au moment de leur utilisation. L'homogénéisation a été faite dans un tampon contenant de l'urée, du SDS et des inhibiteurs de protéase (48 % urée, 0,5 % SDS). Une centrifugation à 12 000 g a été faite afin d'enlever les débris. La méthode de Lowry a été utilisée pour doser la concentration des protéines dans les homogénats.

## 9. Fractionnement du cerveau

Les souris transgéniques et témoins de 10 mois ont été anesthésiées puis sacrifiées par décapitation. Le cerveau a été disséqué afin de ne garder que le cortex cérébral et le cervelet, puis il a été homogénéisé dans une solution de sucrose à 0,25 M. Après une centrifugation à 8700 g, le culot obtenu a été resuspendu dans du sucrose à 0,25 M puis centrifugé une fois de plus à 43 700 g. Le culot a été resuspendu dans du sucrose à 0,25 M et centrifugé une dernière fois à 110 000 g. Le surnageant alors obtenu représentait la partie cytosolique (S100) et le culot, les microsomes totaux (Mt). Les Mt ont été resuspendus dans une solution de sucrose à 2,0 M.

Les microsomes totaux (Mt) ont été fractionnés à l'aide d'un gradient de sucrose à 0,25 M, 0,86 M et 1,0 M (figure 4, p.41). Après centrifugation à 300 000 g, les différentes fractions ont été récupérées. Les fractions I3 et RM ont été resuspendues et homogénéisées, puis centrifugées à 110 000 g. La quantité de protéines contenues dans chacune des fractions a été déterminée par la méthode de Lowry.



**Figure 4.** *Le gradient de sucrose*

Différentes concentrations de sucrose forment le gradient. Les microsomes totaux (MT) ont été déposés au fond du tube. Après une centrifugation à 300 000 g, les fractions golgiennes I1, I2 et I3 sont obtenues ainsi que la fraction RM qui contient du réticulum endoplasmique.

## 10. Immunobuvardage

Afin de séparer les protéines contenues dans les fractions de cerveau et les homogénats de moelle, la technique d'immunobuvardage a été utilisée. Pour l'immunobuvardage, nous avons utilisé 60 ug d'homogénat de moelle épinière ou 5 ug des fractions de cerveau. Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5 % en présence de SDS a permis de séparer les protéines qui ont ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose.

Les membranes ont été bloquées durant 30 minutes dans du PBS contenant 5 % de lait en poudre. Les anticorps primaires ont été dilués dans le PBS contenant 5 % de lait en poudre, sauf dans le cas des anticorps reconnaissant la forme active de CaMKII et de GSK3, ceux-ci ayant été utilisés selon le protocole du fabricant.

Après plusieurs rinçages dans le PBS contenant 0,1 % de Tween, les membranes ont été incubées dans les anticorps secondaires de lapin ou souris couplés à la peroxydase (dilution 1:1000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). Finalement, les anticorps ont été visualisés par une réaction de chimioluminescence en utilisant le réactif *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*.

### 10.1 Décapage (*Stripping*)

Nous avons eu recours à la technique de décapage décrite ci-dessous afin de pouvoir marquer une même membrane de nitrocellulose plusieurs fois avec différents anticorps. Afin d'enlever les anticorps primaires, les membranes ont été incubées dans une solution de mercaptoéthanol (100 mM 2-mercaptoéthanol, 2 % SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) pendant trente minutes, à 52 °C. Les membranes ont ensuite été rincées dans du PBS afin d'enlever toute trace de la solution de décapage.

# Résultats

Plusieurs kinases phosphorylent tau dont CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII. Afin de mieux comprendre le rôle de ces kinases dans les tauopathies, nous avons mesuré la quantité des protéines, leur niveau d'activation et leur localisation dans un modèle de souris transgénique JNPL3 qui exprime la forme humaine mutante P301L de tau. Dans ces souris, tau devient hyper-phosphorylée et elle s'accumule dans le compartiment somato-dendritique. Dans la moelle épinière, tau forme des agrégats insolubles nommés NFTs.

## 11. Niveau d'expression des kinases

Dans les souris JNPL3, la moelle épinière est la région du système nerveux central où l'on trouve les NFTs et la mort neuronale les plus abondants. Nous avons donc étudié les effets de la mutation P301L sur la quantité et l'activation des kinases de cette région. Nous avons pour cela prélevé la moelle épinière de quatre souris témoins (T 1 à 4) et de quatre souris JNPL3 (J 1 à 4) âgées de 10 mois. Ces moelles ont été homogénéisées puis 30  $\mu$ g de chacun des homogénats ont été séparés sur un gel de polyacrylamide et transférés sur une membrane de nitrocellulose. La quantité des kinases a été comparée par immunobuvardage, entre les souris JNPL3 et les souris témoins. Des anticorps dirigés contre CaMKII, CDK5, la sous-unité p35 de CDK5, l'isoforme GSK3 $\beta$ , la sous-unité RII $\alpha$  de PKA, et ROCKII ont été utilisés. Les caractéristiques de ces anticorps ont été présentées précédemment (tableau 2, p.37). Seul l'anticorps contre CDK5 n'a jamais fonctionné en immunobuvardage (résultats non montrés).

Nous avons utilisé deux anticorps supplémentaires, soit un anti-tubuline et un anticorps polyclonal anti-tau. Le marquage de la tubuline a permis de s'assurer que la même quantité de protéines a été chargée dans chacun des puits. L'anticorps anti-tau a permis de montrer qu'il y avait effectivement une surexpression de la protéine tau dans la moelle épinière des souris JNPL3. La figure 5 (p. 47) présente les résultats obtenus avec les différents anticorps que nous avons utilisés.

L'anticorps contre la sous-unité p35 de CDK5 ne semblait pas démontrer une augmentation significative de p35 dans les souris JNPL3. Bien que l'anticorps anti-p35 que nous avons utilisé puisse aussi se lier à la sous-unité p25, nous n'avons jamais réussi à visualiser p25 par notre technique d'immunobuvardage.

L'anticorps reconnaissant l'isoforme ROCKII (150 kDa) n'a pas démontré un changement d'expression significatif chez les souris transgéniques JNPL3.

L'anticorps anti-CaMKII a révélé plusieurs bandes autour de 50 kDa, puisque CaMKII est formée, dans le système nerveux, de différentes isoformes des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Le niveau de la protéine CaMKII ne semble pas être augmenté de manière significative chez les souris JNPL3. Seule une différence entre les souris T2 et J2 seulement a été visible (figure 5, p.47).

Nous avons utilisé un anticorps qui reconnaît la sous-unité RII $\alpha$  de PKA. Cette sous-unité présente un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Étonnamment, nous avons observé une très forte augmentation de cette sous-unité chez les souris JNPL3. Cette sous-unité est probablement présente dans les souris témoins, mais à un niveau non détectable dans nos conditions de révélation. La mutation P301L aurait donc un effet important sur l'expression de la sous-unité RII $\alpha$ .

Nous avons finalement utilisé un anticorps qui reconnaît l'isoforme GSK3 $\beta$ . Cette isoforme se retrouvant à 37 kDa. Nous avons observé une légère augmentation de GSK3 $\beta$  chez les souris JNPL3.

Selon nos résultats, la surexpression de la protéine humaine mutante P301L de tau induirait une augmentation de GSK3 $\beta$  et de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA.

## 12. Activation des kinases

Dans la présente section, nous avons voulu vérifier si des kinases présentaient une augmentation d'activité chez les souris JNPL3. Il existe des anticorps phospho-dépendants qui reconnaissent les épitopes phosphorylés lors de l'activation ou de l'augmentation de l'activité des kinases CaMKII (Thr286), CDK5 (Ser159) et GSK3 (GSK3 $\alpha$  : Tyr279 et GSK3 $\beta$  : Tyr216). Les caractéristiques des anticorps ont été présentées au tableau 2, p.37. Puisque l'activation de PKA et ROCKII n'implique pas leur phosphorylation, cette approche n'a pu être utilisée pour celles-ci et leur niveau d'activation n'a pas été examiné lors de cette étude.

Nous n'avons pas réussi à faire fonctionner les anticorps contre CaMKII (Thr286) et CDK5 (Ser159) par immunobuvardage. Le marquage avec l'anticorps CaMKII (Thr286) était très faible sur les coupes de moelle épinière et ne marquait que quelques neurones (figure 8, p.57). Ceci nous laissait croire que le niveau d'activation de CaMKII n'était pas assez élevé pour permettre sa détection par immunobuvardage. Par contre, l'anticorps reconnaissant les isoformes activées GSK3 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  a très bien fonctionné (figure 5, p.47).

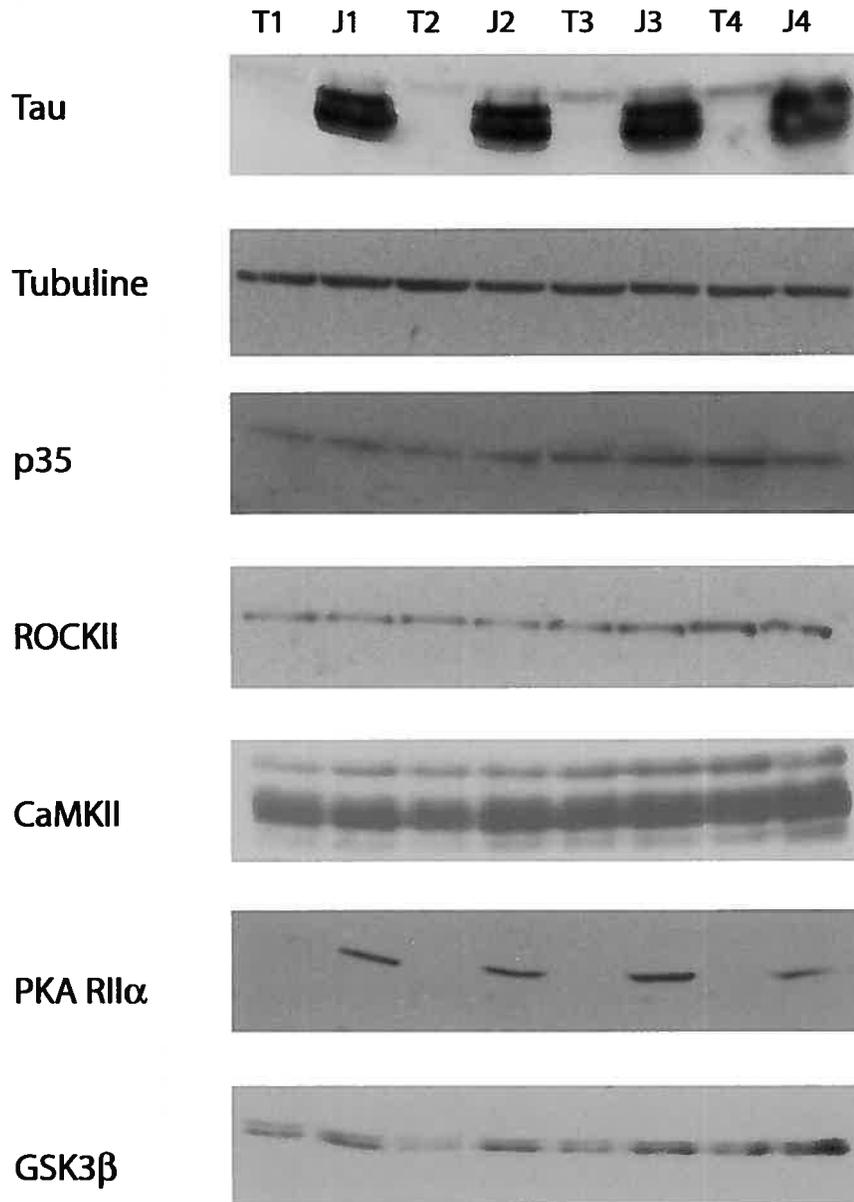
Puisqu'il a été démontré que seule l'isoforme GSK3 $\beta$  a la possibilité de phosphoryler tau, nous ne nous attarderons ici que sur l'activation de l'isoforme GSK3 $\beta$ . Chez les souris transgéniques J2, J3 et J4, nous avons observé une légère augmentation de l'activité de l'isoforme GSK3 $\beta$ . Cette augmentation d'activation concorde avec l'augmentation de la protéine GSK3 $\beta$  que nous avons observée (figure 5, p.73). Par contre, chez la souris J1, une diminution de l'activité de cette isoforme a été notée.

**Figure 5.** *Niveaux des protéines et activation des kinases CDK5, ROCKII, CaMKII, PKA et GSK3 $\beta$  dans la moelle épinière de souris témoins et JNPL3.*

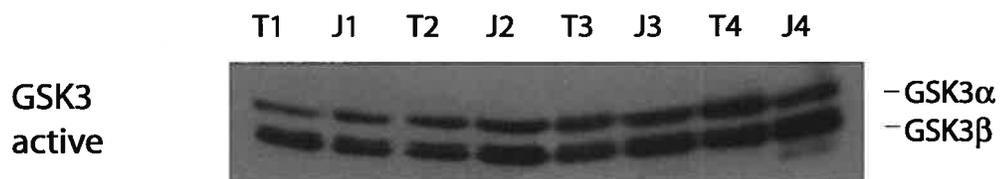
Des immunobuvardages ont été effectués sur des homogénats de moelle épinière provenant de quatre souris témoins (T1 à T4) et quatre souris JNPL3 (J1 à J4). L'anticorps anti-tubuline démontre que la même quantité de protéine (30 ug) a été placée dans les puits. Les souris JNPL3 présentent une surexpression de la protéine tau, comparées aux souris témoins.

- A) Des anticorps anti-p35, ROCKII, CaMKII, la sous-unité RI $\alpha$  de PKA et GSK3 $\beta$ , ont été utilisés afin de comparer les niveaux des protéines chez les souris témoins et les souris JNPL3.
- B) Un anticorps contre la forme active de GSK3 a été utilisé afin de comparer le niveau d'activation de cette kinase chez les souris témoins et les souris JNPL3.

## A) Niveau protéique



## B) Niveau d'activation



### 13. Localisation de tau et de CaMKII, p35, GSK3 $\beta$ , RII $\alpha$ et ROCKII dans les motoneurones des souris témoins et JNPL3

Tau est une protéine qui est normalement enrichie dans l'axone. Cependant, en conditions pathologiques, elle est relocalisée dans le compartiment somato-dendritique. Ce phénomène est aussi observable chez les souris JNPL3. En effet, la surexpression de la protéine tau P301L induit une accumulation intracellulaire de cette protéine dans près de la moitié des corps cellulaires des motoneurones de la moelle épinière (figure 7 E, p. 53).

Selon les études antérieures, CaMKII, GSK3 $\beta$ , la sous-unité RII $\alpha$  de PKA et ROCKII se trouvent principalement dans le compartiment somato-dendritique, tandis que p35 et CDK5 peuvent se trouver aussi dans l'axone (voir la section de ce travail portant sur la localisation de ces kinases et sous-unités). Dans les tauopathies, il est possible que tau soit phosphorylée par ces kinases normalement présentes dans le compartiment somato-dendritique. Ce phénomène peut-être expliqué de deux façons :

- 1) Tau est redistribuée dans le compartiment somato-dendritique où elle est phosphorylée par les kinases contenues dans ce compartiment.
- 2) Les kinases du compartiment somato-dendritique se localisent dans l'axone où elles phosphorylent tau, conduisant à une redistribution de tau dans le compartiment somato-dendritique.

Un de nos objectifs était de savoir si les kinases CaMKII, GSK3 $\beta$ , ROCKII, les sous-unité RII $\alpha$  de PKA et p35 de CDK5, étaient redistribuées de façon anormale dans le compartiment axonal. Pour ce faire, nous avons examiné la localisation de ces kinases par immunohistochimie, sur des coupes de moelle épinière des souris témoins et JNPL3, en microscopie confocale.

### 13.1 Marqueurs du compartiment somato-dendritique et axonal

Afin de distinguer le compartiment somato-dendritique du compartiment axonal dans les souris JNPL3, nous avons eu recours à un anticorps dirigé contre les neurofilaments phosphorylés de l'axone, soit l'anticorps SMI34 et un anticorps contre MAP2, une MAP dendritique. Comme le montre la figure 6, le marquage de MAP2 (rose) et de SMI34 (turquoise) étaient complémentaires et ne se chevauchaient pas dans les souris témoins et les souris JNPL3 (figure 6 C et F, p. 51). SMI34 semblait donc être un bon marqueur axonal et MAP2, un bon marqueur dendritique chez ces souris.

### 13.2 Compartimentation de la protéine tau

Chez les souris JNPL3, tau s'accumule dans le compartiment somato-dendritique dans les motoneurons de la moelle épinière. Afin d'étudier l'étendue de la redistribution de la protéine tau dans le compartiment somato-dendritique, nous avons fait un marquage avec des anticorps anti-tau (polyclonal lapin) et anti-MAP2 (clone AP20).

Puisque nous avons utilisé les mêmes conditions de révélation, le marquage de tau chez les souris témoins (figure 7 B, p. 53) était beaucoup plus faible que chez les souris JNPL3; la surexpression de la protéine tau P301L produisant un marquage plus intense (figure 7 E, p. 53).

Lorsque les marquages de tau et de la protéine dendritique MAP2 étaient superposés (figure 7 F, p. 53), le marquage de tau était dans le corps cellulaire et dans un prolongement qui était aussi marqué avec AP20 (figure 7 E, flèche bleue). La couleur blanche traduit la superposition du marquage de tau (vert) et de MAP2 (rose) et révèle la nouvelle localisation somato-dendritique de la protéine tau. Il y avait par contre des prolongements qui n'étaient marqués que par tau, présumément parce que la protéine était encore dans le compartiment axonal.

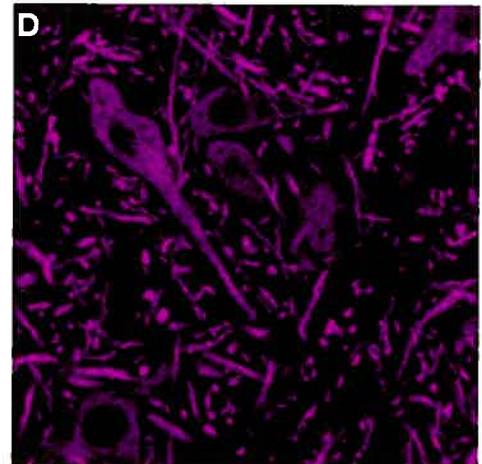
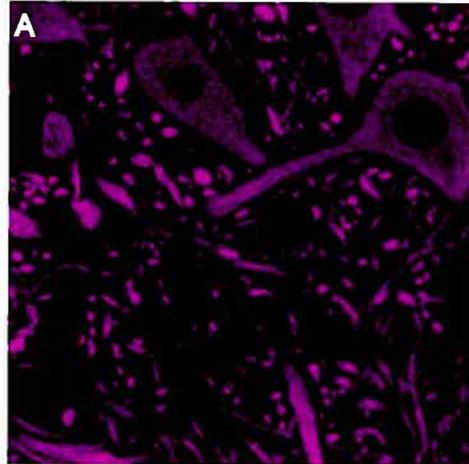
**Figure 6.** *SMI34, un marqueur axonal, et MAP2, un marqueur dendritique.*

Des doubles marquages avec des anticorps dirigés contre les neurofilaments phosphorylés de l'axone (SMI34) et la protéine dendritique MAP2 (anticorps polyclonal lapin) ont été effectués sur des coupes de moelle épinière de souris témoins (A à C) et de souris JNPL3 (D à F) âgées de 10 mois. Les images de superpositions (C et F) montrent que ces marquages sont complémentaires. SMI34 (turquoise) est compartimenté dans l'axone et MAP2 dans les dendrites (rose) et cela, même dans les souris JNPL3. Images prises par microscopie confocale, utilisant un objectif de 63X.

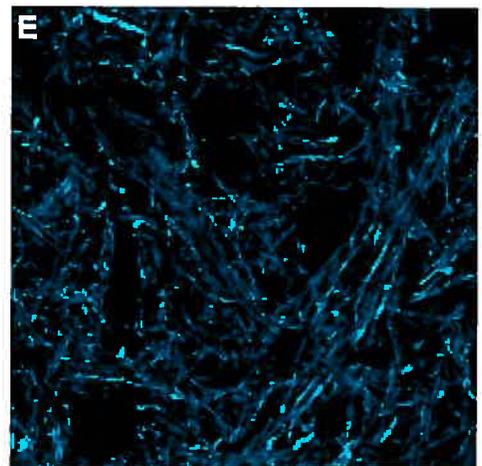
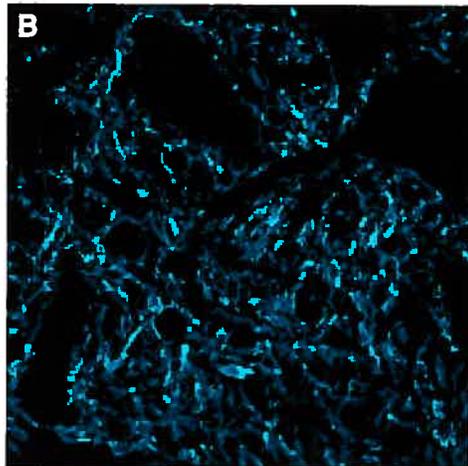
Souris témoin

Souris JNPL3

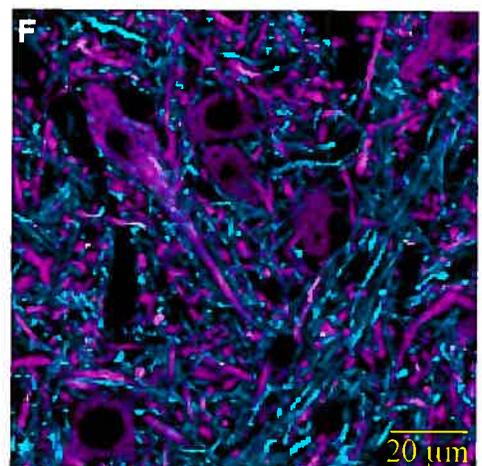
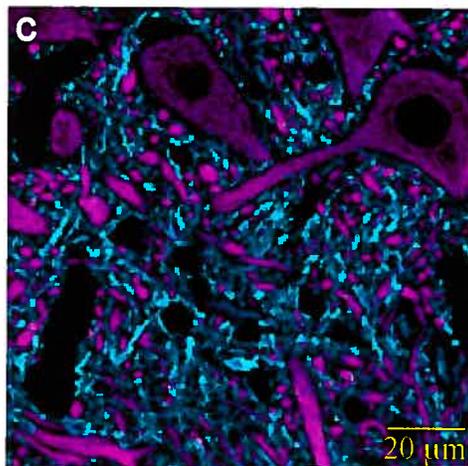
Dendrites  
(MAP2)



Axones  
(SMI34)



MAP2  
+  
SMI34



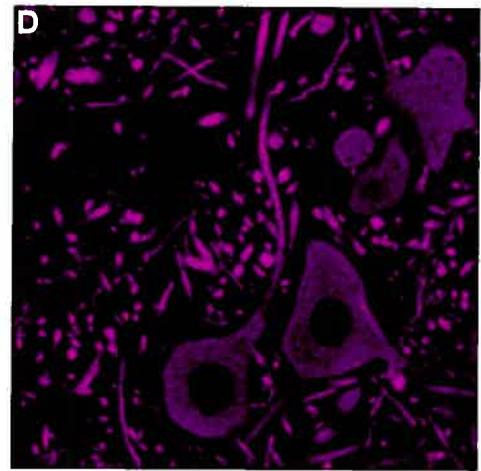
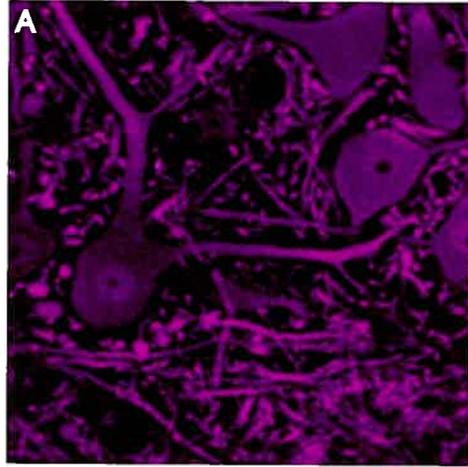
**Figure 7.** *Compartimentation de la protéine tau.*

Doubles marquages avec l'anticorps AP20, qui reconnaît la protéine dendritique MAP2 (rose), et l'anticorps polyclonal dirigé contre tau (vert). Les marquages ont été effectués sur des coupes de moelle épinière de souris témoin (A à C) et de souris JNPL3 (D à F) âgées de 10 mois. Les images de superposition (C et F) indiquent que tau s'accumule dans le compartiment somato-dendritique des souris JNPL3, puisqu'un prolongement est marqué par tau et par MAP2 (F, flèche bleue). Images prises par microscopie confocale, utilisant un objectif de 63X.

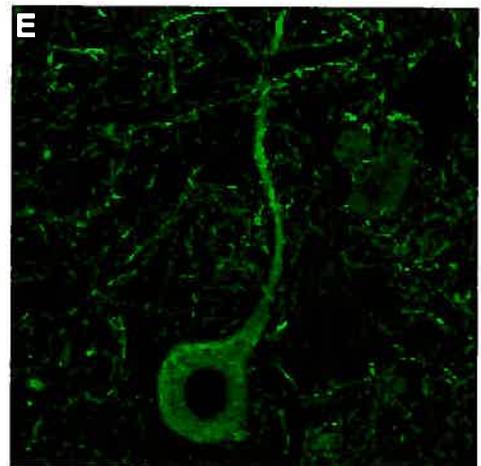
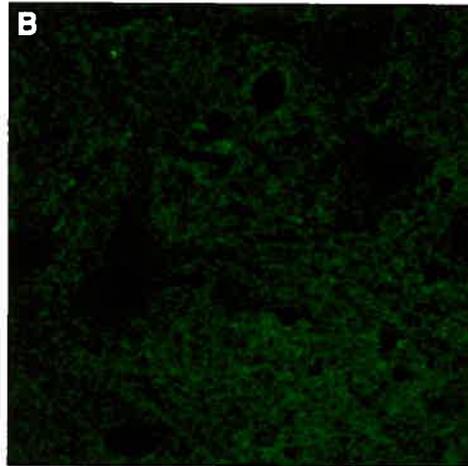
Souris témoin

Souris JNPL3

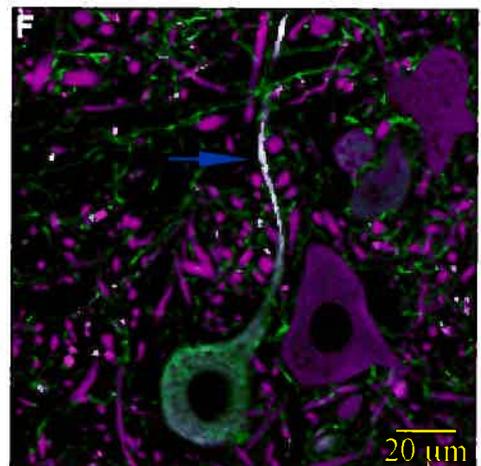
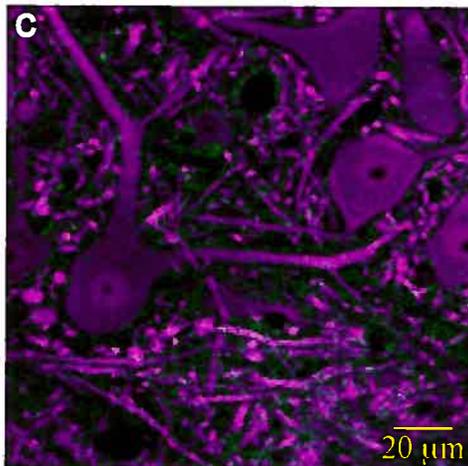
MAP2  
(AP20)



Tau  
(tau poly)



MAP2  
+  
Tau



### 13.3 Compartimentation des kinases et sous-unités

Afin de détecter, chez les souris JNPL3, une éventuelle perte de compartimentation somato-dendritique de CaMKII, p35, GSK3 $\beta$ , RII $\alpha$  de PKA et ROCKII, nous avons fait des doubles marquages avec SMI34 et un anticorps dirigé contre une de ces kinases. Puisque l'anticorps SMI34 a été produit chez la souris, il nous fallait donc choisir des anticorps contre ces kinases qui provenaient d'un autre animal. L'anticorps contre CaMKII a été produit chez la souris et n'a donc pu être utilisé. À cause de cette contrainte, nous avons seulement examiné la localisation de CaMKII active, GSK3 $\beta$ , la sous-unité RII $\alpha$  de PKA, et ROCKII. L'anticorps contre la forme active de GSK3 n'a pas fonctionné en immunohistochimie.

La localisation des kinases et sous-unité a principalement été examinée dans la corne antérieure de la moelle épinière, où se trouvent les motoneurones qui sont grandement affectés par la surexpression de tau P301L, car ils présentent des accumulations intracellulaires de tau et de la neurodégénérescence. Malheureusement, il nous a été impossible de trouver un anticorps contre tau fabriqué chez un animal autre que la souris ou le lapin. Ceci nous aurait permis d'effectuer des triples marquages afin de visualiser tau, les neurofilaments axonaux (anticorps SMI34) (souris) et une kinase (lapin). De cette façon, nous aurions été en mesure de comparer la localisation des kinases dans les motoneurones qui présentent des accumulations intracellulaires de tau, de ceux qui n'en ont pas. Par contre, puisque nous avons estimé que près de la moitié des motoneurones avaient des accumulations intracellulaires de tau, nous estimons qu'au moins un de ces neurones était présent dans au moins un des champs photographiés. Voici donc les observations que nous avons faites sur la localisation des kinases dans la moelle épinière des souris témoins et JNPL3.

Bien que le marquage de CaMKII active n'était pas très évident et ce, même à de plus fortes concentrations d'anticorps, la majorité des corps cellulaires, à l'exception du noyau, et certains débuts de prolongements étaient marqués par l'anticorps (figure 8 A et E, p. 57). Le marquage intracellulaire était très diffus, avec un motif pointillé (figure 8 D et H, p. 57). Il ne semblait pas y avoir d'endroits où le marquage co-localisait avec SMI34 (figure 8 C et

G, p. 57). Cette kinase semblait donc avoir la même compartimentation chez les souris témoins et JNPL3.

Bien qu'il ait été démontré que p35 et CDK5 pouvaient se trouver dans les compartiments somato-dendritique et axonale (voir la section de ce travail portant sur la localisation de la kinase CDK5), nous avons obtenu un marquage uniquement somato-dendritique avec l'anticorps anti-p35 (figure 9, p. 57-C). Les corps cellulaires étaient marqués de façon à créer certains endroits plus intenses (figure 9 C, D, G et H). Ce marquage somato-dendritique nous a semblé très similaire dans les motoneurones des souris témoins et JNPL3 (figure 9 D et H). La compartimentation de p35 ne semble pas être perturbée chez les souris JNPL3.

L'anti-isoforme GSK3 $\beta$  marquait intensément tous les corps cellulaires des motoneurones (figure 10 A et E, p. 59). Le marquage était situé autour du noyau et dans tout le cytoplasme, sans présenter d'enrichissements importants (figure 10 D et H, p. 59). Plusieurs prolongements étaient marqués par GSK3 $\beta$  et ceux-ci semblaient être non axonaux puisqu'ils ne co-localisaient pas avec SMI34 (figure 10 C et G, p. 59).

L'anticorps contre la sous-unité RII $\alpha$  de PKA marquait très faiblement les corps cellulaires et certains prolongements des motoneurones. Par contre, certaines cellules de plus petite taille étaient très fortement marquées par cet anticorps (figure 11 A et E, p. 61). Il ne semblait pas y avoir d'endroits où les deux marquages co-localisaient. Les marquages de RII $\alpha$  et SMI34 semblaient donc complémentaires; RII $\alpha$  n'étant pas présente dans l'axone.

L'anti-isoforme ROCKII marquait tous les corps cellulaires et les prolongements, de manière très diffuse (figure 12 A et E, p. 63). C'est le seul anticorps que nous avons utilisé qui a marqué le noyau (figure 12 D et H, p. 63). De plus, une légère accumulation du marquage autour de la membrane plasmique était visible dans quelques motoneurones (figure 12 H, flèche bleue). ROCKII ne semblait pas être relocalisée dans l'axone (figure 12 C et G, p. 63).

Les marquages des kinases et sous-unité ne montraient ainsi aucune co-localisation avec le marqueur axonal SMI34. Nous avons plutôt observé une complémentarité entre les deux marquages, tant chez les souris témoins que les souris JNPL3. Il n'y aurait donc pas de perte de compartimentation importante pour ces kinases et sous-unités chez les souris JNPL3. Ces kinases ne semblent donc pas être impliquées dans la phosphorylation de tau au stade où cette protéine est encore dans l'axone.

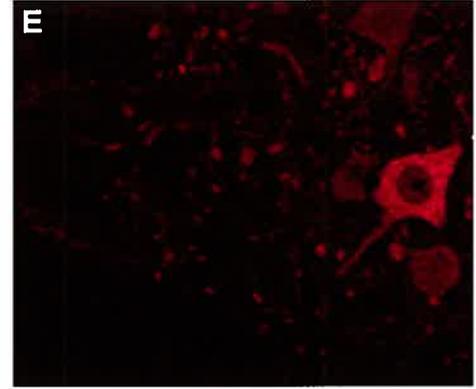
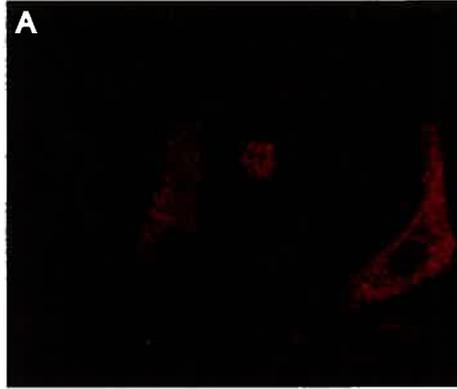
**Figure 8.** *Localisation de CaMKII active*

Des doubles marquages avec SMI34 et CaMKII (forme active) ont été faits sur des coupes de moelle épinière de souris témoin (A à D) et JNPL3 (E à H) âgées de 10 mois. CaMKII active est représentée en rouge (A et E) tandis que SMI34 est en vert (B et F). Des superpositions du marquage de la kinase et de SMI34 (C et G) ont été zoomés (D et H) à différents grossissements. Les images ont été prises en microscopie confocale, en utilisant un objectif de 63 X.

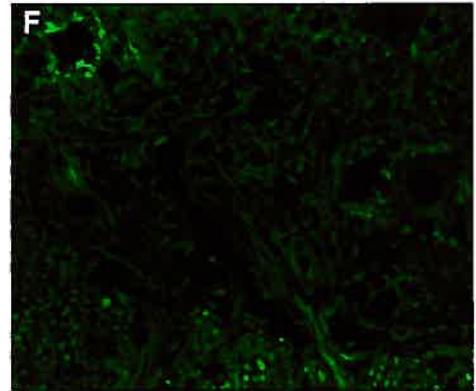
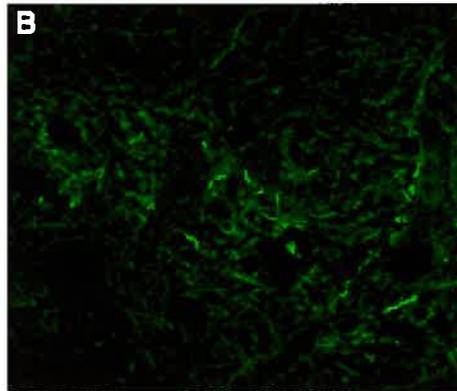
Souris témoin

Souris JNPL3

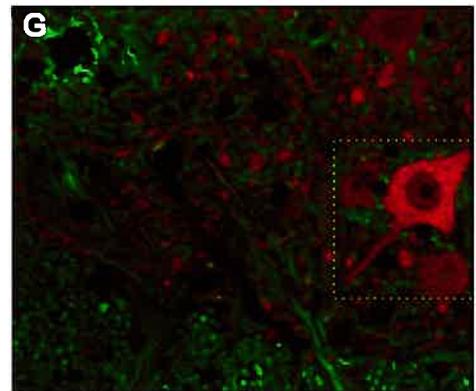
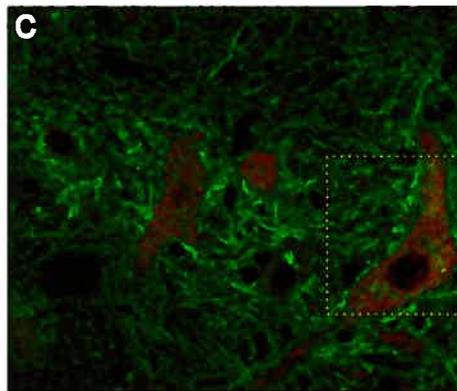
CaMKII  
active



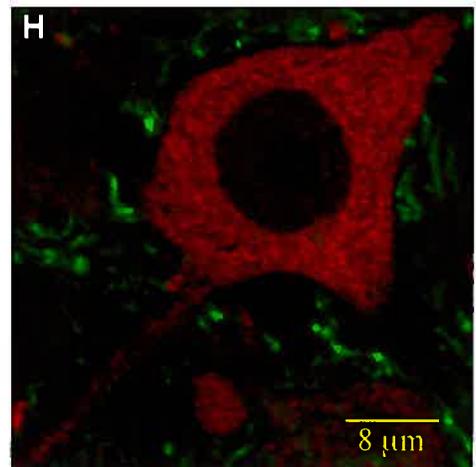
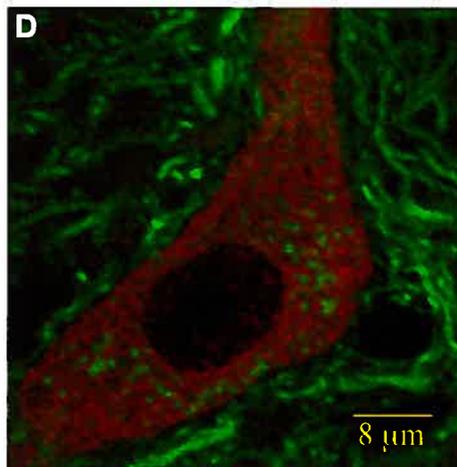
SMI34



CaMKII  
active  
+  
SMI34

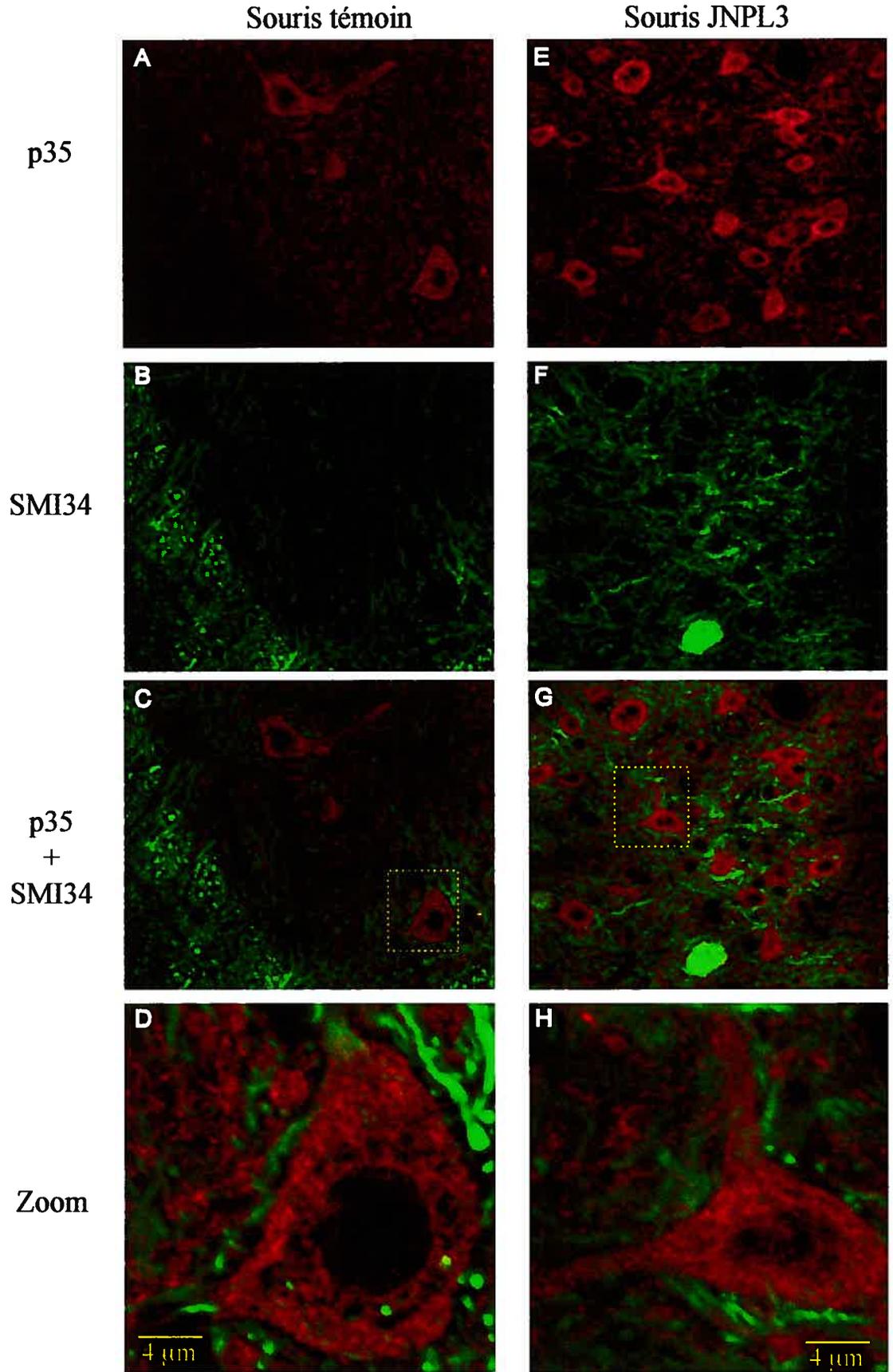


Zoom



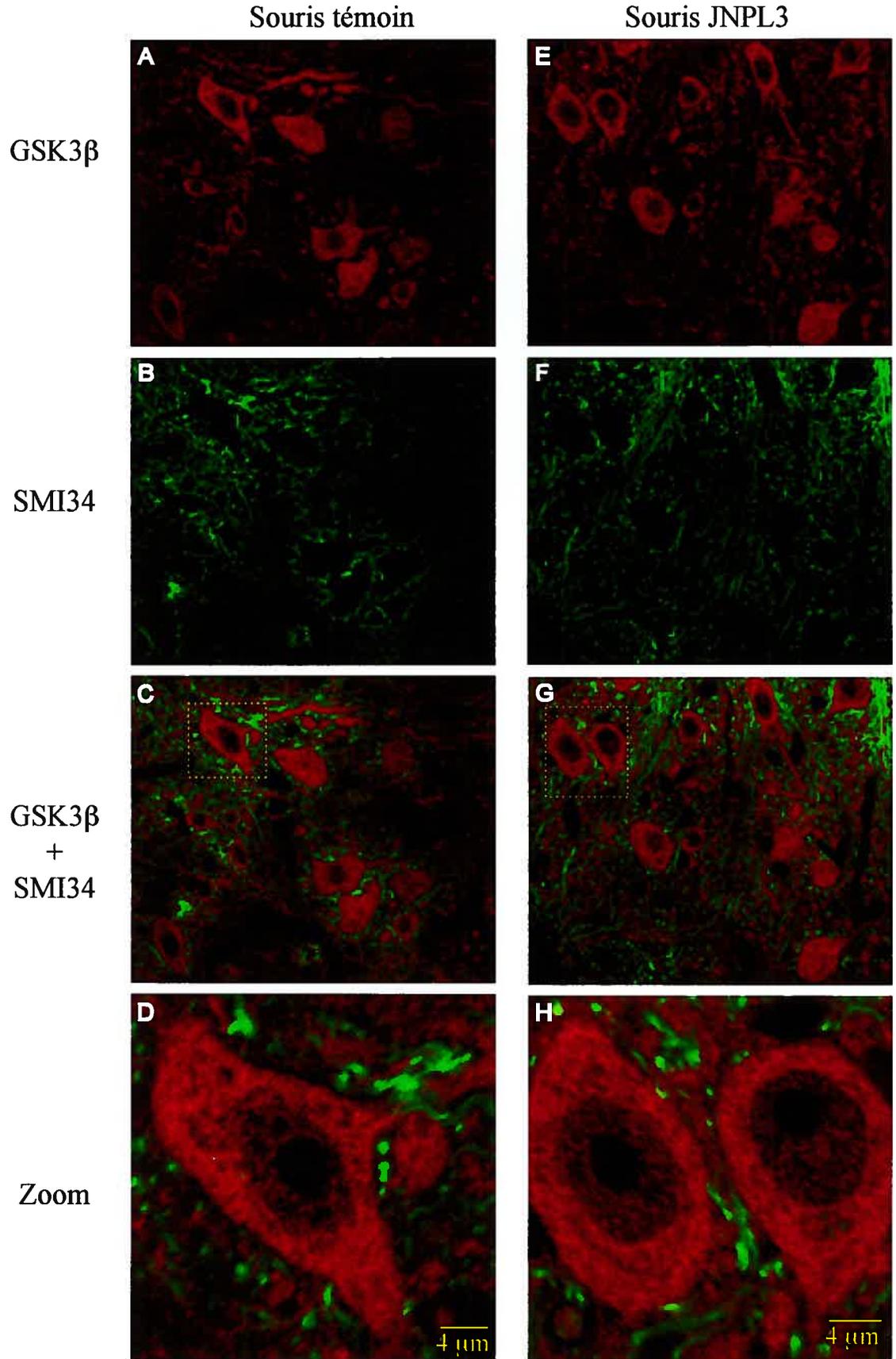
**Figure 9.** *Localisation de la sous-unité p35 de CDK5*

Des doubles marquages avec SMI34 et p35 ont été faits sur des coupes de moelle épinière de souris témoin (A à D) et JNPL3 (E à H) âgées de 10 mois. p35 est représentée en rouge (A et E) tandis que SMI34 est en vert (B et F). Des superpositions du marquage de la sous-unité et de SMI34 (C et G) ont été zoomés (D et H) à différents grossissements. Les images ont été prises en microscopie confocale, en utilisant un objectif de 63 X.



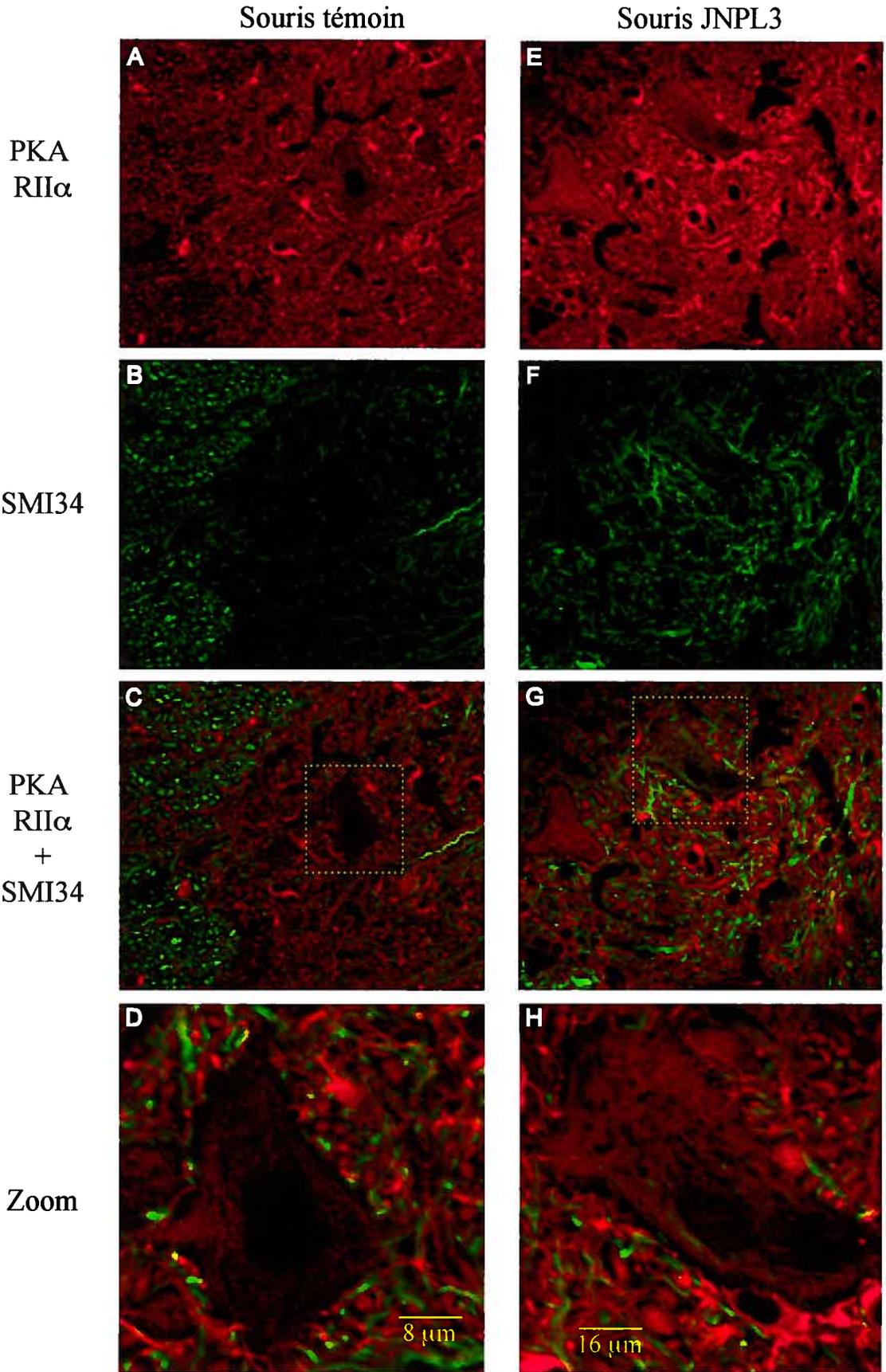
**Figure 10.** *Localisation de GSK3 $\beta$* 

Des doubles marquages avec SMI34 et GSK3 $\beta$  ont été faits sur des coupes de moelle épinière de souris témoin (A à D) et JNPL3 (E à H) âgées de 10 mois. GSK3 $\beta$  est représentée en rouge (A et E) tandis que SMI34 est en vert (B et F). Des superpositions du marquage de la kinase et de SMI34 (C et G) ont été zoomés (D et H) à différents grossissements. Les images ont été prises en microscopie confocale, en utilisant un objectif de 63 X.



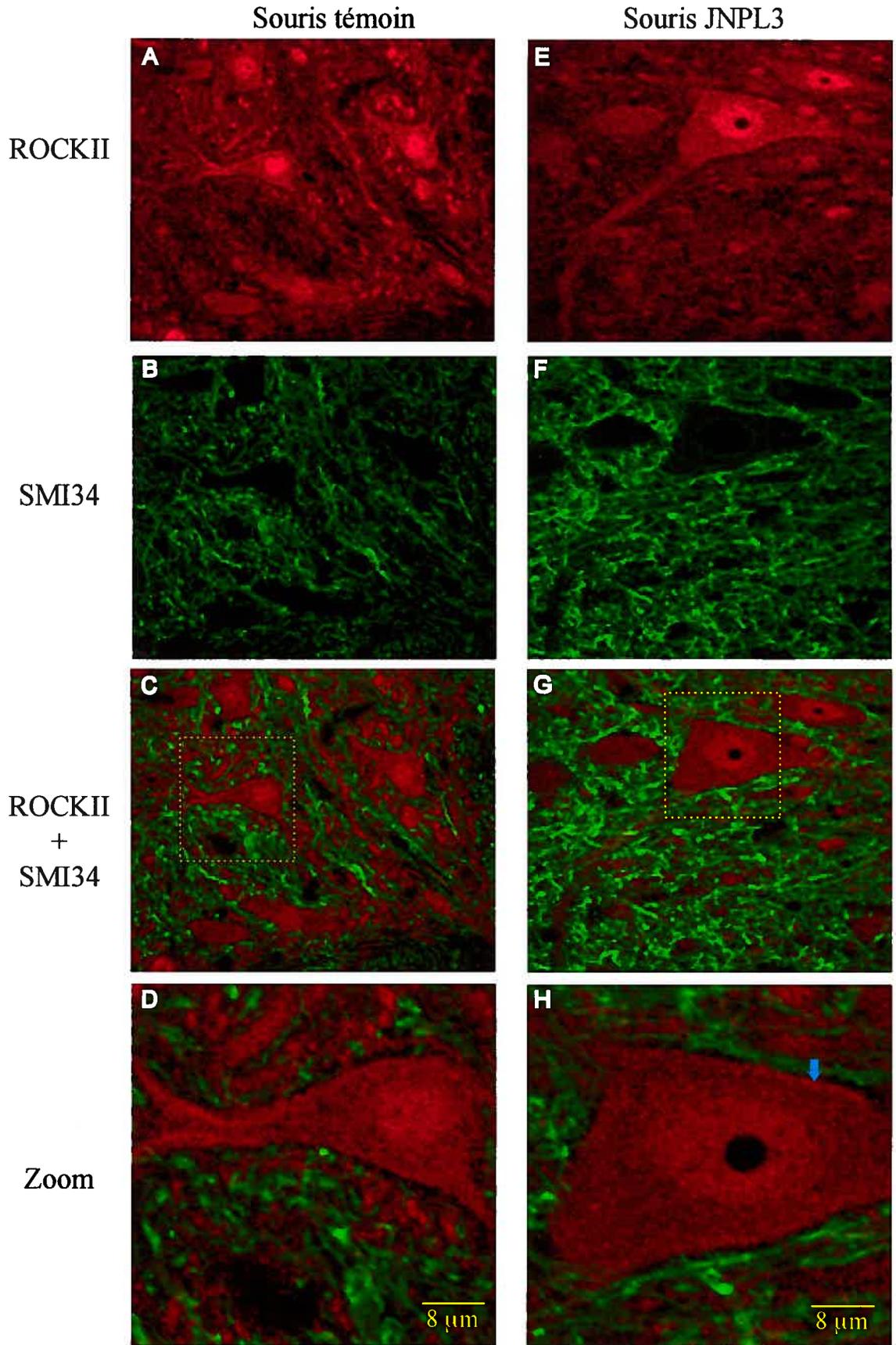
**Figure 11.** *Localisation de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA*

Des doubles marquages avec SMI34 et RII $\alpha$  ont été faits sur des coupes de moelle épinière de souris témoin (A à D) et JNPL3 (E à H) âgées de 10 mois. RII $\alpha$  est représentée en rouge (A et E) tandis que SMI34 est en vert (B et F). Des superpositions du marquage de la sous-unité et de SMI34 (C et G) ont été zoomés (D et H) à différents grossissements. Les images ont été prises en microscopie confocale, en utilisant un objectif de 63 X.



**Figure 12. Localisation de ROCKII**

Des doubles marquages avec SMI34 et ROCKII ont été faits sur des coupes de moelle épinière de souris témoin (A à D) et JNPL3 (E à H) âgées de 10 mois. ROCKII est représentée en rouge (A et E) tandis que SMI34 est en vert (B et F). Des superpositions du marquage de la kinase et de SMI34 (C et G) ont été zoomés (D et H) à différents grossissements. Les images ont été prises en microscopie confocale, en utilisant un objectif de 63 X.



## 14. Localisation subcellulaire des kinases et sous-unités

Les kinases étudiées dans la présente étude sont connues pour être associées à des éléments membranaires dans le neurone. Nous avons donc examiné leur distribution subcellulaire chez les souris JNPL3 pour ainsi vérifier si cette distribution était modifiée lors du processus de neurodégénérescence.

### 14.1 Caractérisation des fractions

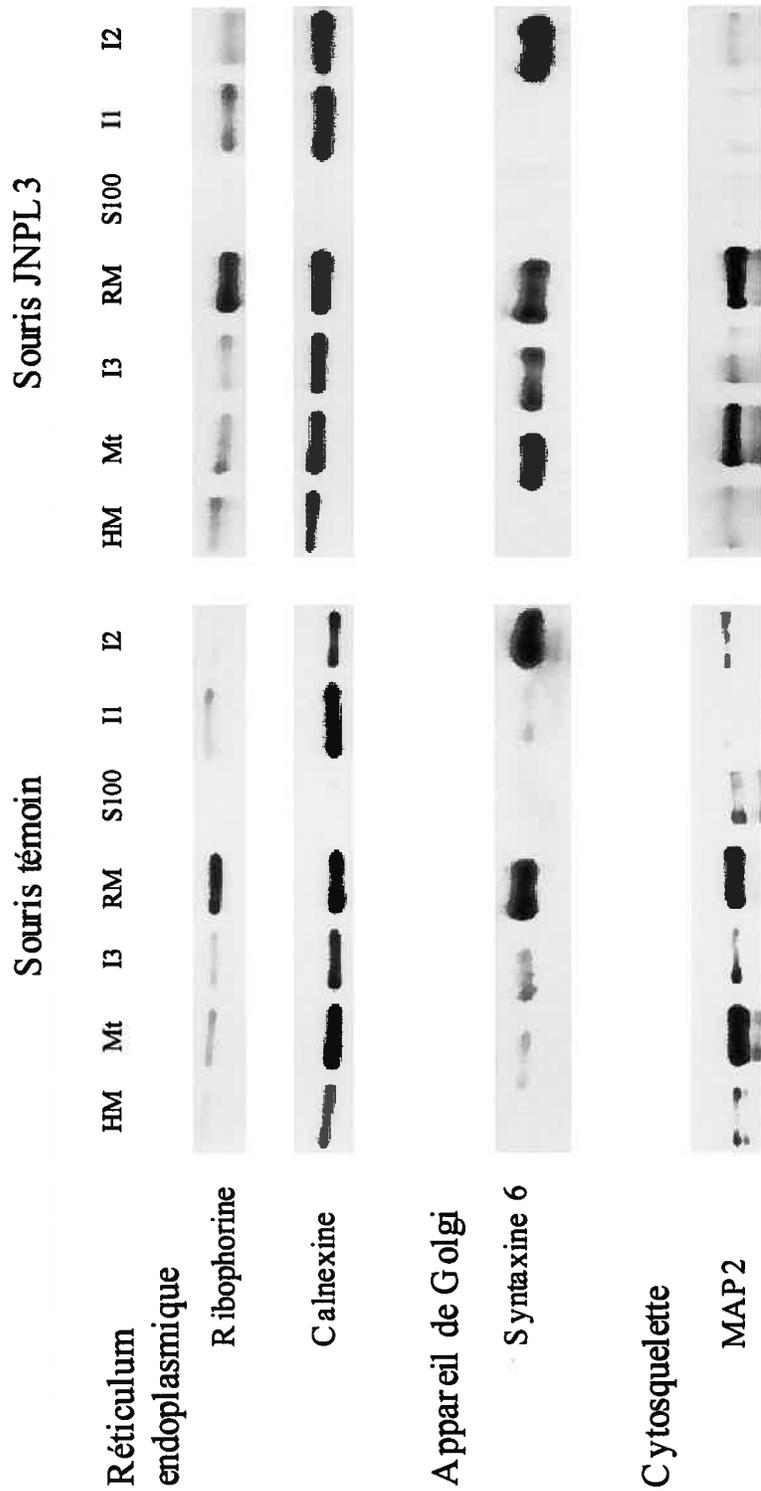
Les différents éléments membranaires du cerveau ont été séparés par un fractionnement subcellulaire (figure 4, p.41) mis au point par le Dr Jacques Paiement (Bergeron et al., 1979). La caractérisation des fractions obtenues par le fractionnement du cerveau de rats adultes, a été présentée dans une étude récente (Abi Farah et al., 2002). Selon cette étude, la fraction RM contient des marqueurs du réticulum endoplasmique (calnexine et ribophorine). De plus, une étude morphologique en microscopie électronique a montré que les membranes contenues dans cette fraction sont décorées de ribosomes. La fraction I1 contient des marqueurs du réticulum endoplasmique, ainsi que des marqueurs de l'appareil de Golgi. Les fractions I2 et I3 sont considérées comme les fractions golgiennes puisqu'elles sont enrichies de différents marqueurs de l'appareil de Golgi. De plus, ces deux fractions contiennent de la membrane plasmique comme l'indique la présence de  $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$  ATPase. Les mitochondries semblent être concentrées dans les fractions I3 et RM. La fraction S100 contient les protéines cytosoliques. La présence de tubuline, de la protéine tau, et un peu de MAP2 dans cette fraction a été notée.

Nos données récentes démontrent que les fractions obtenues à partir de cerveaux de souris sont similaires à celles obtenues à partir de cerveaux de rats dans le cas des marqueurs du réticulum endoplasmique et de MAP2, une protéine du cytosquelette (figure 13, p. 66). Par contre, les résultats obtenus avec l'anticorps anti-syntaxine 6 nous laissent croire que la surexpression de la mutation P301L de la protéine tau induit des changements au niveau de l'appareil de Golgi. En effet, la distribution de la syntaxine 6 est légèrement différente dans les fractions I3 et RM; une forte augmentation de cette protéine dans la fraction I3 étant observée chez les souris JNPL3. Les effets de la surexpression de la mutation P301L chez les souris JNPL3 au niveau de l'appareil de Golgi fait d'ailleurs l'objet d'une autre étude (Liazoghli et al., manuscrit en révision).

**Figure 13.** *Caractérisation biochimique des fractions membranaires isolées à partir d'un cerveau d'une souris.*

La caractérisation biochimique a permis d'identifier une fraction enrichie en membranes du réticulum endoplasmique (RM) et deux fractions enrichies en membranes golgiennes (I2 et I3). La fraction I1 semble être enrichie de réticulum endoplasmique ainsi que, dans une moins grande proportion, de membranes golgiennes. Les marqueurs des organelles (mis à part le marqueur de l'appareil de Golgi) et MAP2 semblent être distribués de façon similaire chez les souris témoins et les souris JNPL3 âgées de 10 mois.

HM : Homogénat, Mt : Microsomes totaux, S100 : partie cytosolique.



## 14.2 Distribution des kinases et sous-unités

Puisqu'il existe une certaine variabilité entre les souris JNPL3 au niveau de l'apparition et de la gravité des symptômes causés par la surexpression de la protéine humaine mutante P301L de tau, nous avons décidé de faire le fractionnement sur un seul cerveau à la fois. Les fractionnements ont été faits sur des cerveaux (cortex cérébral et cervelet) provenant de trois souris témoins et de cinq souris transgéniques JNPL3 âgées de dix mois. Les différentes fractions obtenues ont été analysées par immunobuvardage. Grâce au fractionnement de cerveau, nous avons étudié la localisation subcellulaire de GSK3 active, GSK3 $\beta$ , PKA RII $\alpha$ , p35 et ROCKII (figure 14, p.70 et tableau 3, p.71). Nous n'avons aucun résultat à présenter sur la localisation subcellulaire de CaMKII, à cause de problèmes techniques.

L'anticorps anti-GSK3 $\beta$  a principalement révélé des bandes situées dans la fraction RM et moins fortement dans la fraction I2. En fait, dans un fractionnement provenant d'une souris témoin et d'une souris JNPL3, l'anticorps n'a révélé que des bandes dans la fraction RM. Ces mêmes enrichissements ont été observés avec l'anticorps contre la forme active de GSK3. Chez les souris transgéniques, nous avons observé un changement dans la localisation subcellulaire de GSK3 $\beta$ . En effet, nous avons observé que chez les souris JNPL3, la protéine GSK3 $\beta$  des fractions S100 et I1 était diminuée, alors qu'elle était augmentée dans la fraction I3. Cependant, la distribution subcellulaire de la forme active de GSK3 était identique chez les souris témoins et transgéniques. Par contre, chez quatre souris transgéniques sur cinq, nous avons observé que la bande de GSK3 $\beta$  active, située dans la fraction I1, était plus faible que celle située dans la fraction S100.

La majorité de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA se trouvait dans la fraction S100, elle était donc majoritairement cytosolique. Elle se trouvait aussi dans les fractions I2 et I3, à un niveau beaucoup plus faible. Une légère augmentation dans la fraction I2 a été observée chez deux souris JNPL3. De plus, nous avons observé une augmentation de l'intensité du niveau de RII $\alpha$  dans le S100, chez trois souris JNPL3. Cette augmentation du niveau de RII $\alpha$  dans la fraction S100 et I2 corrobore l'augmentation de cette protéine observée dans les homogénats de moelle épinière des souris JNPL3 (figure 5, p. 47).

p35 était principalement localisée dans les fractions RM et I3 et, dans une moins grande proportion, dans la fraction I2. Chez deux souris JNPL3 sur trois, nous avons observé une diminution du niveau de p35 dans la fraction I3 et une augmentation dans la fraction RM.

La kinase ROCKII était majoritairement présente dans le cytosol (S100) et dans la fraction golgienne I2; cette fraction étant aussi enrichie de membranes plasmiques. Une différence importante a été observée entre les homogénats de cerveau, puisqu'il y avait une légère augmentation de ROCKII dans les homogénats de cerveau des trois souris transgéniques utilisées. Cette augmentation de la protéine ROCKII n'a pas été observée dans les homogénats de moelle épinières (figure 5, p. 47). Dans les autres fractions du cerveau, la distribution de ROCKII semblait identique chez les souris témoins et les souris JNPL3.

Grâce au fractionnement subcellulaire du cerveau, nous avons été en mesure d'observer certaines différences dans la localisation subcellulaire de la sous-unité p35, de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA et de la kinase GSK3 $\beta$ . Les résultats obtenus par immunobuvardage sont aussi présentés sous forme de tableau, afin de schématiser les enrichissements des kinases dans les différentes fractions du cerveau de souris (tableau 3, p. 71). Ce tableau présente les résultats obtenus chez la majorité des trois souris témoins et des cinq souris JNPL3 utilisées.

La surexpression de la forme humaine mutante tau P310L chez la souris semble donc influencer certaines kinases tant au niveau de leur expression, de leur activation, que de leur localisation subcellulaire. Ces changements sont peut-être impliqués dans le processus pathologique lié au développement des tauopathies.

**Figure 14.** *Localisation des kinases dans les fractions subcellulaires isolées à partir d'un cerveau de souris témoins ou de souris JNPL3.*

La localisation subcellulaire des kinases GSK3 $\beta$ , GSK3 active, PKA RII $\alpha$ , la sous-unité p35 de la kinase CDK5 et ROCKII a été étudiée par un fractionnement subcellulaire du cerveau de souris témoins et JNPL3.

HM : Homogénat, Mt : Microsomes totaux, S100 : partie cytosolique.

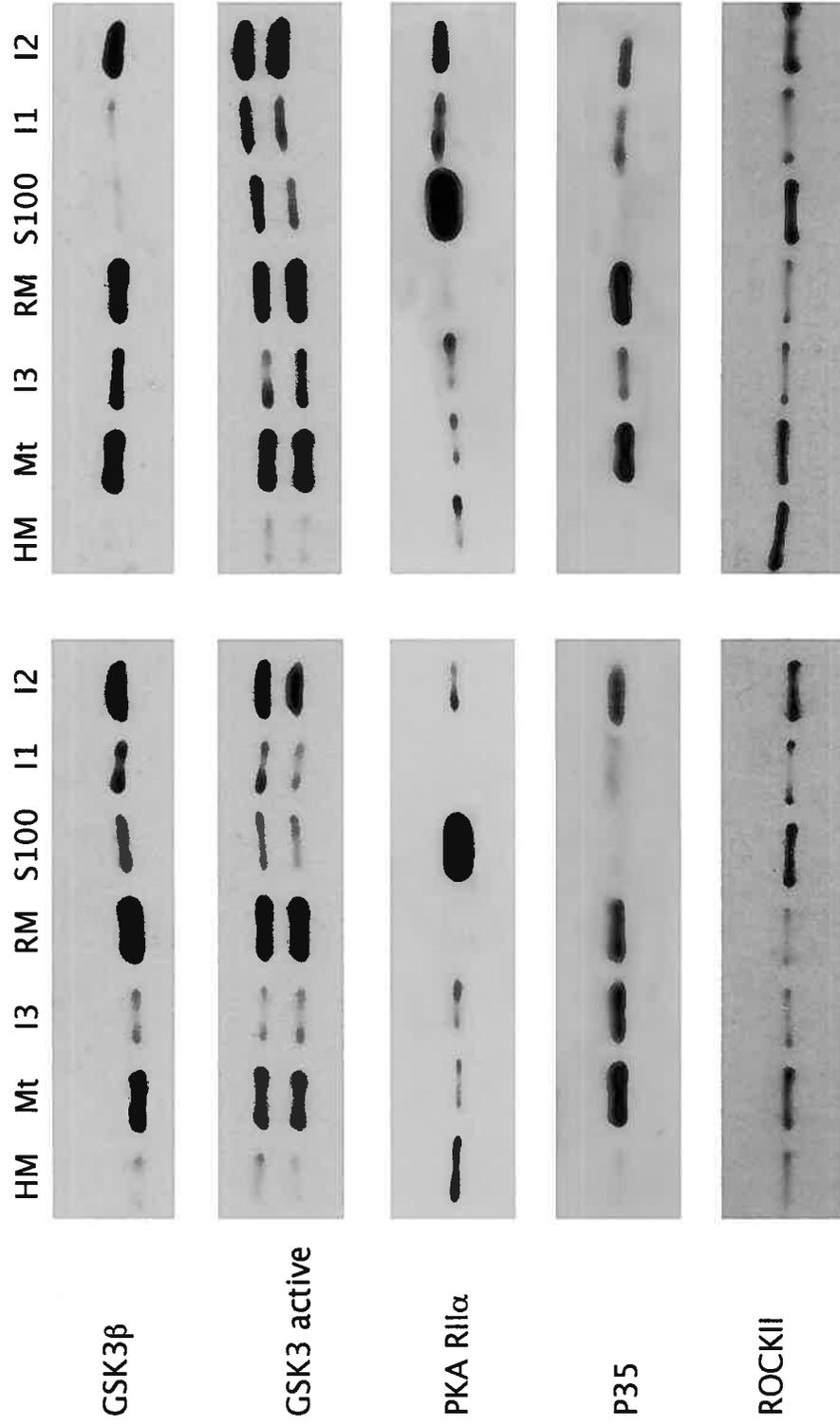
RM : Fraction enrichie de réticulum endoplasmique

I1 : Fraction enrichie de réticulum endoplasmique et contenant de l'appareil de Golgi

I2, I3 : Fractions golgiennes

Souris JNPL3

Souris témoin



	I3	RM	S100	I1	I2
<b>Kinase</b>					
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	+	+++	+	+	+++
	++	+++			+++
<b>GSK3 active</b>	+	+++	+	+	+++
	+	+++	+		+++
<b>PKA RI<math>\alpha</math></b>	+		+++		+
	+		+++		++
<b>p35</b>	+++	+++		+	++
	+	++++		+	++
<b>ROCKII</b>	+	+	+++	++	+++
	+	+	+++	++	+++

**Tableau 3.** *Enrichissement des kinases dans les fractions subcellulaires isolées à partir d'un cerveau de souris témoin ou de souris JNPL3.*

Ce tableau décrit les enrichissements des kinases dans les différentes fractions, selon les résultats obtenus de trois fractionnements de cerveau de souris témoins et cinq de souris JNPL3. Les cases blanches représentent les résultats obtenus chez les souris témoins et les cases grises les souris JNPL3.

+++ Enrichissement principal,  
 ++ enrichissement secondaire,  
 + peu enrichie.

# Discussion et conclusion

Les tauopathies ont comme caractéristique commune la phosphorylation anormale de la protéine tau qui s'accumule dans le compartiment somato-dendritique et forme des NFTs. Une hypothèse très répandue est qu'une dérégulation de certaines kinases favoriserait cette hyper-phosphorylation de tau. Il a été démontré dans différentes études que CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$ , PKA et ROCKII avaient la propriété de phosphoryler tau *in vitro*, comme il en a été question dans la section de ce document portant sur la phosphorylation de tau. De plus, ces kinases sont impliquées dans le développement et la fonction du neurone (voir la section sur la localisation de chacune des kinases). Outre la phosphorylation de tau, la dérégulation de ces kinases pourrait avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement du neurone.

Le rôle de ces kinases dans les tauopathies est loin d'être élucidé. C'est pourquoi nous avons décidé de mesurer les protéines, le niveau d'activation, la compartimentation et la localisation subcellulaire de ces cinq kinases, chez la souris JNPL3 qui exprime la forme humaine mutante tau P301L.

## 15. Expression, niveau protéique et activation des kinases

Nous avons observé, dans les moelles épinières des souris JNPL3, une très légère augmentation de la protéine GSK3 $\beta$ , ainsi qu'une très forte augmentation de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA (figure 5, p. 47). De plus, nous avons observé une augmentation de l'activité de GSK3 $\beta$  chez trois souris JNPL3 sur quatre. Évidemment, nous ne sommes pas les premiers à étudier le niveau protéique ou l'activation de CaMKII, CDK5, GSK3 $\beta$  ou PKA dans des modèles animaux ou chez des patients humains atteints d'une tauopathie.

### 15.1 CaMKII et plasticité synaptique

Une étude faite chez l'humain a décelé une augmentation de CaMKII spécifiquement dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (McKee et al., 1990), bien qu'une autre étude en hybridation *in situ* n'ait pas noté de différence au niveau de l'ARN messager dans les cerveaux atteints (Mah et al., 1992). De notre côté, nous n'avons pas observé une augmentation de protéine dans la moelle épinière des souris JNPL3 (figure 5, p.47).

### 15.2 Conséquences de l'inhibition de PKA

La plus forte augmentation du niveau protéique que nous avons observée dans les souris JNPL3 est celle de la sous-unité régulatrice RII $\alpha$  de PKA (figure 5, p. 47). Une étude précédente avait démontré que le niveau de la sous-unité RII $\beta$  était légèrement augmenté dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer, tandis que le niveau de C $\beta$  semblait être constant (Jicha et al., 1999c). Malheureusement, ce sont les seules sous-unités qui ont été étudiés dans les cerveaux atteints d'une tauopathie. De plus, une étude a démontré qu'il se produisait une diminution de l'activité de PKA dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer et du syndrome de Down (Kim et al., 2001).

Cette diminution d'activation de PKA pourrait être causée par une augmentation du nombre des sous-unités régulatrices. Conséquemment, les sous-unités régulatrices se lieraient davantage aux sous-unités catalytiques de PKA, inhibant ainsi son activité. Puisque nous avons remarqué que RII $\alpha$  était beaucoup plus abondante dans les souris JNPL3, nous pensons qu'il est très probable que les deux sous-unités (RII $\alpha$  et RII $\beta$ ) agissent de la même façon. C'est d'ailleurs ce qui a été observé lors d'une étude sur la régulation de PKA lors de l'axotomie du nerf facial chez le rat (Ohno et al., 1994). Cette étude a permis d'observer une diminution du niveau d'expression des sous-unités catalytiques et une augmentation des sous-unités RII. Le processus de neurodégénérescence induit par l'axotomie (et peut-être même induit par la surexpression de la protéine tau P310L dans la moelle épinière des souris JNPL3) provoque des mécanismes qui régulent le niveau d'expression des différentes sous-unités de PKA, diminuant ainsi le niveau d'activité de PKA dans les motoneurones affectés.

L'augmentation de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA que nous avons observée chez les souris JNPL3 (figure 5, p.47) pourrait être liée à une diminution de l'activation de PKA. Cela pourrait avoir des répercussions importantes au niveau de la plasticité synaptique (voir l'article de revue de Waltereit et Weller, 2003), de la transcription activée par le facteur de transcription CREB (voir l'article de revue de Deisseroth et al., 2003; Silva et al., 1998) et de la LTP (voir l'article de revue de Blitzler et al., 1998) puisque PKA est impliquée de façon importante dans tous ces processus. Évidemment, des études sur le niveau d'activation de PKA chez les souris JNPL3 seront nécessaires afin de démontrer cela.

### 15.3 GSK3 $\beta$ et neurodégénérescence

Le niveau d'expression de GSK3 $\beta$  dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer est un sujet très controversé. Une augmentation de l'expression de GSK3 $\beta$  a été notée dans deux études différentes (Pei et al., 1997; Imahori et al., 1998) tandis qu'une diminution a été démontrée dans une autre (Baum et al., 1996). Selon nos résultats obtenus chez la souris JNPL3, il semble y avoir une légère augmentation de la protéine et de l'activation de GSK3 $\beta$  dans la moelle épinière (figure 5, p. 47), ceci ayant été noté chez trois souris JNPL3 sur quatre.

L'activité de GSK3 $\beta$  est principalement régulée par la voie Akt/PKB (Mora et al., 2002; Ishii et al., 2003). Une étude a d'ailleurs démontré que cette voie était dérégulée dans les cerveaux atteints de la maladie d'Alzheimer ce qui avait comme effet d'augmenter le niveau d'activation de GSK3 $\beta$  (Ryder et al., 2004), induisant ainsi l'apoptose (Mora et al., 2002; Ishii et al., 2003). La neurodégénérescence observée dans la moelle épinière des souris JNPL3 pourrait donc être induite par l'augmentation de la protéine et de l'activation de GSK3 $\beta$  que nous avons observées (figure 5, p.47). Par contre, d'autres expériences devront être faites afin de savoir si la voie Akt/PKB est effectivement responsable de l'augmentation de l'activité de GSK3 $\beta$  chez les souris JNPL3.

### 15.4 CDK5, p25 et p35

Le niveau d'expression de CDK5, p35 et p25 dans les cerveaux atteints d'une tauopathie est un autre sujet très controversé. Des études ont décrit une augmentation du niveau d'expression de CDK5 (Pei et al., 1997; Borghi et al., 2002) tandis qu'aucune différence a été notée dans une étude plus récente, tant au niveau de l'expression de CDK5 que de p35 (Tandon et al., 2003). De plus, il a été démontré que le ratio p25/p35 pouvait varier d'un cerveau à l'autre à cause de l'activation post-mortem des calpaines, favorisant la dégradation de p35 en p25 (Taniguchi et al., 2001). Par contre, une étude a démontré que le niveau d'activation des calpaines était constant dans les cerveaux témoins et atteints de la maladie d'Alzheimer et qu'une augmentation de p25 était tout de même visible, principalement dans le cortex frontal des cerveaux atteints (Tseng et al., 2002).

Puisque nous n'avons pas été en mesure de visualiser p25 par immunobuvardage, nous ne pouvons conclure quoi que ce soit sur le niveau protéique de p25. Par contre, puisque nous avons remarqué que le niveau d'expression de p35 était constant dans les souris témoins et JNPL3 (figure 5, p. 47), nous pensons qu'une dégradation importante de p35 en p25 est peu envisageable.

Dans les neurones de la substance noire, il a été démontré que CDK5 est une kinase essentielle au processus d'apoptose induit par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (Crocker et al., 2003). Dans ces neurones dopaminergiques, le MPTP induit une augmentation de p25 et de l'activité de CDK5, une augmentation de la phosphorylation de tau et, finalement, de la neurodégénérescence (Smith et al., 2003). De plus, il a été démontré que CDK5 et p35 sont relocalisées dans le noyau des neurones de la substance noire (Neystat et al., 2001). D'autres études devront être faites afin d'en savoir plus sur le rôle du complexe CDK5/p35 dans le noyau.

### 15.5 Surexpression de p25 et de GSK3 $\beta$

Comme il en a été question dans la section sur la phosphorylation de tau, les kinases que nous avons étudiées ont la propriété de phosphoryler tau *in vitro*. Évidemment, il est encore trop tôt pour conclure qu'elles peuvent aussi phosphoryler tau *in vivo* et qu'elles sont impliquées dans les tauopathies. Des souris transgéniques ont été créées afin d'étudier les conséquences d'une surexpression de la sous-unité p25 de CDK5 et de GSK3 $\beta$ .

La sous-unité p25 active CDK5 à un niveau supérieur que les autres cyclines (Patrick et al., 1999). C'est pourquoi des souris qui surexpriment cette sous-unité ont été créées. Chez un modèle de souris transgénique, une phosphorylation de tau aux épitopes Ser202 et Ser404 a été observée, ainsi qu'une activation du cycle cellulaire dans la glande hypophyse (Takashima et al., 2001). Tau n'est pas devenue hyper-phosphorylée et il n'y a pas eu de signes importants de mort neuronale. Une autre souris transgénique qui surexprime, elle aussi, p25 démontre des caractéristiques différentes. Cette souris présente de la dégénérescence axonale et des agrégats de tau, bien que des NFTs n'ont pas été observés (Bian et al., 2002).

Chez la souris qui surexprime GSK3 $\beta$ , tau est hyper-phosphorylée et elle forme des agrégats dans le compartiment somato-dendritique (Lucas et al., 2001). De plus, des signes de neurodégénérescence ont été observés.

Selon ces modèles animaux, p25 et GSK3 $\beta$  ne semblent pas être les seules causes des symptômes pathologiques des tauopathies. Il est très probable que plusieurs kinases et d'autres protéines soient impliquées et qu'ensemble, elles peuvent induire tous les processus pathologiques caractéristiques des tauopathies. En effet, des articles de revue décrivent l'implication d'autres kinases dont MARK (Zhu et al., 2002), la voie JNK/c-Jun (Okazawa et Estus, 2002), p21Ras (Gartner et al., 1999), la phosphatase PP2B (Lian et al., 2001) et, finalement, du processus de l'ubiquitination (Iqbal et Grundke-Iqbal et al., 1991), lors du processus pathologique des tauopathies. Il ne faut pas oublier que l'hyper-phosphorylation n'est pas seulement restreinte à la protéine tau. En effet, les NFTs contiennent aussi d'autres protéines du cytosquelette, dont MAP2 et des neurofilaments anormalement phosphorylés (voir l'article de revue de Johnson et Jenkins, 1999). Cette

hyper-phosphorylation semble donc être un problème d'activation de certaines phosphoprotéines, incluant plusieurs kinases qui peuvent phosphoryler tau.

L'augmentation du niveau de GSK3 $\beta$  et RII $\alpha$  et de l'activation de GSK3 $\beta$  chez les souris JNPL3 semble donc concorder avec certaines études faites sur des cerveaux humains atteints d'une tauopathie. Nous pensons donc que la surexpression de la protéine tau P301L chez la souris induit des mécanismes communs aux tauopathies, pouvant déréguler le niveau et l'activation de certaines kinases et sous-unités.

## 16. Compartimentation des kinases

L'hyper-phosphorylation de tau n'est peut-être pas seulement liée à une augmentation du niveau protéique ou de l'activité des kinases, mais plutôt à leur proximité. En se basant sur cette hypothèse, nous étions intéressés à savoir si une perte de compartimentation s'effectuait chez les souris JNPL3. Les kinases et sous-unités que nous avons étudiées, mises à part CDK5 et p35, ne sont pas présentes dans le compartiment axonal. Par immunohistochimie, nous avons regardé si la compartimentation de CaMKII active, de GSK3 $\beta$ , de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA, de p35 et de ROCKII, était affectée chez les souris JNPL3. Selon nos résultats sur la compartimentation de ces kinases et sous-unité (figures 8 à 12, pp. 57 à 63), cette hypothèse semble se révéler contradictoire.

Selon nos résultats, nous pensons que ces kinases et sous-unité n'ont pas la possibilité de phosphoryler tau lorsque celle-ci se trouve dans l'axone, avant qu'elle ne s'accumule dans le soma. Il est donc peu probable que ces kinases soient impliquées dans les premières étapes de la phosphorylation anormale de tau. Il serait avantageux de faire d'autres marquages en utilisant d'autres kinases ou sous-unité. Il serait peut-être possible d'en découvrir une qui s'accumulerait dans l'axone lors des premières phases de la pathologie et ainsi mieux comprendre les kinases impliquées dans la phosphorylation de tau.

Il ne faut pas oublier qu'une certaine proportion des protéines tau est localisée dans le corps cellulaire des neurones adultes (Migheli et al., 1988). Il est possible que la pathologie débute par une phosphorylation anormale de ces protéines alors qu'elles sont toujours dans

le corps cellulaire. Une redistribution de tau axonale vers le corps cellulaire ne serait donc pas impliquée dans la pathologie, du moins, pas durant la phase précoce de la maladie. Évidemment, toutes les hypothèses expliquant l'apparition de la pathologie restent à être démontrées.

## 17. Localisation subcellulaire des kinases

Afin d'étudier la localisation subcellulaire des kinases, nous avons opté pour une autre technique, soit le fractionnement subcellulaire de cerveau. Malgré quelques difficultés techniques, nous avons été en mesure d'obtenir des résultats intéressants qui sont peut-être des indices du dysfonctionnement du neurone et peut-être même du processus de neurodégénérescence. En effet, cette technique nous a été fort utile pour détecter des différences dans la distribution de certaines kinases et sous-unités chez les souris JNPL3 (figure 14, p.70). Évidemment, la technique de fractionnement n'est pas parfaite. Probablement que des études en microscopie électronique seront nécessaires afin de documenter les changements de localisation que nous avons notés.

Une diminution de p35 dans la fraction golgienne I3 pourrait avoir des répercussions importantes à plusieurs niveaux, puisque p35 est localisée à la membrane golgienne (Paglini et al., 2001), à la membrane plasmique (Patrick et al., 1999); ces organelles membranaires étant présentes dans la fraction I3. De plus, cette protéine protège l'intégrité des mitochondries (Weishaupt et al., 2003). Évidemment, d'autres études seront nécessaires afin de mieux connaître la cause exacte de la diminution de p35 dans la fraction I3 et son impact sur une de ces organelles membranaires. Des fractions purifiées, afin de n'avoir qu'un seul type d'organelle membranaire, seraient nécessaires afin de savoir dans quelle organelle exactement se produit cette diminution de p35.

Le rôle de CDK5 dans le processus de mort neuronale a fait l'objet de plusieurs études. En effet, il a été démontré que CDK5 était relocalisée dans le noyau des neurones glutamatergiques en apoptose (Neystat et al., 2001). De plus, l'inhibition de CDK5 protège l'intégrité des mitochondries; ce qui a un effet neuroprotecteur (Weishaupt et al., 2003). Il serait intéressant de vérifier si le niveau de p35 et de CDK5 dans des fractions purifiées de

mitochondries ou de noyaux est différent chez les souris JNPL3. Ainsi, il sera possible de savoir si l'implication de CDK5 dans le processus de neurodégénérescence est similaire à ceux décrits dans ces articles.

Grâce au fractionnement subcellulaire de cerveau, nous avons noté certaines différences au niveau de la localisation subcellulaire de GSK3 $\beta$  et de GSK3 $\beta$  active, chez les souris témoins et JNPL3 (figure 14, p.70). Une étude avait déjà démontré que la surexpression de tau 4R induisait la fragmentation de l'appareil de Golgi dans les astrocytes en culture (Yoshiyama et al., 2003) et que l'inhibition de GSK3 stabilisait l'intégrité de l'appareil de Golgi dans des neurones exposés à des toxines (Elyaman et al., 2002). Selon ces études, GSK3 $\beta$  semble donc être une kinase impliquée dans le processus de mort neuronale. Afin de mieux comprendre le rôle de GSK3 $\beta$  dans la fragmentation de l'appareil de Golgi et son implication dans le processus de neurodégénérescence, il serait peut-être avantageux d'étudier ce phénomène dans la moelle épinière, puisque c'est à cet endroit que sont situés les motoneurones qui présentent des signes de neurodégénérescence. Par contre, nos résultats obtenus par fractionnement subcellulaire de cerveau nous donnent comme indication qu'une dérégulation de GSK3 $\beta$  s'effectue au niveau de la localisation subcellulaire, avant même que des signes évidents de mort neuronale soient présents dans le cerveau des souris JNPL3.

Chez les souris JNPL3, une augmentation de la sous-unité RII $\alpha$  de PKA a été notée dans la fraction I2, cette fraction contenant beaucoup du marqueur du Golgi-trans. Il a été démontré que RII $\alpha$  pouvait s'associer aux vésicules membranaires associées aux microtubules et que PKA était nécessaire à la phosphorylation du récepteur NMDA sortant du Golgi trans, afin d'être localisé vers les synapses (Scott et al., 2003). PKA a donc un rôle très important dans le ciblage et le transport des vésicules membranaires. Il serait donc très intéressant de faire d'autres études afin de voir si l'augmentation de RII $\alpha$  que nous avons observée peut avoir un impact important sur la fonction du Golgi-trans chez les souris JNPL3.

Finalement, nous n'avons pas observé de différence au niveau de la distribution de ROCKII, bien qu'une augmentation de son niveau protéique dans l'homogénat de cerveau

(et non de la moelle épinière) ait été observée. La surexpression de tau P301L induit donc des mécanismes différents qui s'opèrent afin d'augmenter le niveau de ROCKII spécifiquement dans le cerveau et non pas dans la moelle épinière des souris JNPL3. Des études devront être faites afin de mieux comprendre les mécanismes expliquant cette différence.

Les résultats obtenus par le fractionnement de cerveau indiquent qu'il se passe des changements dans la distribution subcellulaire des kinases. Évidemment, d'autres études seront nécessaires afin de mieux documenter les modifications de la distribution des kinases au niveau des organelles membranaires, ces modifications étant induites par la surexpression de la protéine tau P301L.

## 18. Un autre modèle de souris

Les résultats que nous avons obtenus avec les homogénats de moelle et le fractionnement subcellulaire de cerveau sont très prometteurs. Ils démontrent que la dérégulation des kinases, induite par la surexpression de la protéine tau humaine mutante P310L, se fait par des changements, tant du niveau des protéines et de leur activation, que de leur localisation subcellulaire. Par contre, il ne faut pas oublier que le cerveau n'est pas dans un état pathologique aussi avancé que la moelle épinière. En effet, les neurones du cerveau sont plutôt dans un état pré-NFTs, tandis que des NFTs sont beaucoup plus abondants dans les motoneurones de la moelle épinière (Lewis et al., 2000).

Puisque la technique de fractionnement ne peut se faire avec une seule moelle épinière, il serait peut-être avantageux de refaire ces expériences en utilisant la souris htau qui surexprime la protéine tau humaine avec une suppression du gène de la protéine tau de la souris (Andorfer et al., 2003). En effet, chez cette souris, les régions du cerveaux présentant des NFTs sont les mêmes que celles affectées dans le cerveau humain atteint de la maladie d'Alzheimer. Puisque le cerveau de la souris htau contient des neurones avec des filaments de tau, des changements plus significatifs que ceux de la souris JNPL3 seront peut-être observés au niveau de la localisation subcellulaire des kinases. De plus, une

comparaison entre un cerveau dans un état pré-NFTs (souris JNPL3) et un cerveau avec des NFTs (souris htau) sera possible. Ceci permettra d'avoir des indications sur la chronologie des différentes étapes impliquées dans le développement de la pathologie.

La souris htau démontre aussi, comme nous l'avons expliqué dans la section 5 sur les modèles *in vivo* des tauopathies, que la surexpression de la protéine tau normale peut aussi avoir des impacts importants sur le métabolisme du neurone. Selon l'isoforme utilisée pour produire une souris transgénique, il a été possible d'obtenir de l'hyperphosphorylation de la protéine tau, des accumulations somato-dendritiques et de la neurodégénérescence (tableau 1, p.30). Dans le cas de la souris htau, les déficits créés par la surexpression de la protéine tau ne sont donc pas causés par une mutation quelconque de cette protéine. Une étude a d'ailleurs étudié l'influence de la surexpression de tau sur des neurones en culture (Mandelkow et al., 2003). Il a été démontré dans cet article qu'une augmentation de l'expression de tau peut perturber le transport axonal. Ceci nous laisse donc croire que l'accumulation somato-dendritique de la protéine tau pourrait avoir plusieurs conséquences néfastes pour le neurone. Le rôle de tau dans les tauopathies reste néanmoins à être élucidé.

Un autre élément qu'il serait important d'améliorer est le fractionnement subcellulaire de cerveau. Il serait très avantageux de perfectionner la technique du fractionnement, afin d'obtenir des fractions beaucoup plus pures, ne contenant qu'un seul type d'organelle membranaire. Ceci permettrait d'étudier avec beaucoup plus d'exactitude la localisation subcellulaire des kinases.

Les résultats présentés dans ce travail ne constituent pas une fin en soi. Au contraire, nous pensons avoir plutôt démontré des pistes intéressantes qui peuvent être suivies lors de prochaines études. Ces futures études permettront de mieux comprendre le rôle des kinases CaMKII, CDK5, GSK3, PKA et ROCKII dans le développement des pathologies associées aux tauopathies. Une fois que le mécanisme d'action de ces kinases sera découvert, des cibles thérapeutiques pourront peut-être alors être mises sur le marché afin de ralentir la progression des tauopathies.

# Bibliographie

- Abi Farah, C., (2002). MAP2, a microtubule-associated protein. co-localizes with the endoplasmic reticulum in neuronal and non-neuronal cells. Proceedings of the American Society of Cell Biology.
- Ahmad, F. J. and Baas, P. W., (1995). Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 8), 2761-2769.
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P. C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R. A., Ghetti, B., Spillantini, M. G. and Goedert, M., (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 22, 9340-9351.
- Allende, M. L., Krauss, R. Y., Tremblay, C., Alvarez, J. and Inestrosa, N. C., (1989). Anti-200 kDa neurofilament antibody cross-reacts with microtubule-associated protein-2 (MAP-2). *J Neurosci Res.* 22, 130-133.
- Alier, K. A. and Morris, B. J., (2004). Differential regulation of MAP2 and alphaCamKII expression in hippocampal neurones by forskolin and calcium ionophore treatment. *Brain Res Mol Brain Res.* 122, 10-16.
- Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Kaneko, T., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K., (1999). The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem.* 274, 32418-32424.

- Amano, M., Kaneko, T., Maeda, A., Nakayama, M., Ito, M., Yamauchi, T., Goto, H., Fukata, Y., Oshiro, N., Shinohara, A., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K., (2003). Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem.* 87, 780-790.
- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y. A., Duff, K. and Davies, P., (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem.* 86, 582-590.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L. and Ginzburg, I., (2001). Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci.* 21, 6577-6587.
- Bergeron, J. J., (1979). Golgi fractions from livers of control and ethanol-intoxicated rats. Enzymic and morphologic properties following rapid isolation. *Biochim Biophys Acta.* 555, 493-503.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Wisniewski, H. M., (1989). Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 477, 90-99.
- Baum, L., Hansen, L., Masliah, E. and Saitoh, T., (1996). Glycogen synthase kinase 3 alteration in Alzheimer disease is related to neurofibrillary tangle formation. *Mol Chem Neuropathol.* 29, 253-261.
- Bennecib, M., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K., (2001). Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett.* 490, 15-22.

- Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R. N., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Pack, A., Wang, K. K. and Walker, L. C., (2002). Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J Comp Neurol.* 446, 257-266.
- Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T. and Narumiya, S., (2000). A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron.* 26, 431-441.
- Blitzer, R. D., Connor, J. H., Brown, G. P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R. and Landau, E. M., (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science.* 280, 1940-1942.
- Borghi, R., Giliberto, L., Assini, A., Delacourte, A., Perry, G., Smith, M. A., Strocchi, P., Zaccheo, D. and Tabaton, M., (2002). Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurology.* 58, 589-592.
- Brandon, E. P., Idzerda, R. L. and McKnight, G. S., (1997). PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection. *Curr Opin Neurobiol.* 7, 397-403.
- Brion, J. P., Tremp, G. and Octave, J. N., (1999). Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 154, 255-270.
- Brugg, B., Reddy, D. and Matus, A., (1993). Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience.* 52, 489-496.
- Buée, L., (2001). Tau et maladies neurodégénératives. INSERM.  
<http://www.lille.inserm.fr/u422/TauLuc.html>

- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. and Hof, P. R., (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 33, 95-130.
- Caceres, A. and Kosik, K. S., (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature.* 343, 461-463.
- Caceres, A., Potrebic, S. and Kosik, K. S., (1991). The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci.* 11, 1515-1523.
- Cadd, G. and McKnight, G. S., (1989). Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron.* 3, 71-79.
- Carden, M. J., Goldstein, M. E., Bruce, J., Cooper, H. S. and Schlaepfer, W. W., (1987). Studies of neurofilaments that accumulate in proximal axons of rats intoxicated with beta,beta'-iminodipropionitrile (IDPN). *Neurochem Pathol.* 7, 189-205.
- Carnegie, G. K. and Scott, J. D., (2003). A-kinase anchoring proteins and neuronal signaling mechanisms. *Genes Dev.* 17, 1557-1568.
- Carr, D. W., Stofko-Hahn, R. E., Fraser, I. D., Cone, R. D. and Scott, J. D., (1992). Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79. *J Biol Chem.* 267, 16816-16823.
- Ching, G. Y. and Liem, R. K., (1999). Analysis of the roles of the head domains of type IV rat neuronal intermediate filament proteins in filament assembly using domain-swapped chimeric proteins. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 13), 2233-2240.
- Craig, A. M. and Banker, G., (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17, 267-310.

- Crocker, S. J., Smith, P. D., Jackson-Lewis, V., Lamba, W. R., Hayley, S. P., Grimm, E., Callaghan, S. M., Slack, R. S., Melloni, E., Przedborski, S., Robertson, G. S., Anisman, H., Merali, Z. and Park, D. S., (2003). Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 23, 4081-4091.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A., (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378, 785-789.
- Dailey, M. E. and Smith, S. J., (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci.* 16, 2983-2994.
- Dawson, T. M., Sasaki, M., Gonzalez-Zulueta, M. and Dawson, V. L., (1998). Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res.* 118, 3-11.
- Deisseroth, K., Mermelstein, P. G., Xia, H. and Tsien, R. W., (2003). Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 13, 354-365.
- Deitch, J. S. and Banker, G. A., (1993). An electron microscopic analysis of hippocampal neurons developing in culture: early stages in the emergence of polarity. *J Neurosci.* 13, 4301-4315.
- Dinsmore, J. H. and Solomon, F., (1991). Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell.* 64, 817-826.
- Dotti, C. G. and Banker, G. A., (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature.* 330, 254-256.

- Duff, K., Knight, H., Refolo, L. M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., Burki, K. and Davies, P., (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis.* 7, 87-98.
- Elder, G. A., Friedrich, V. L., Jr., Bosco, P., Kang, C., Gourov, A., Tu, P. H., Lee, V. M. and Lazzarini, R. A., (1998). Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content. *J Cell Biol.* 141, 727-739.
- Elyaman, W., Yardin, C. and Hugon, J., (2002). Involvement of glycogen synthase kinase-3beta and tau phosphorylation in neuronal Golgi disassembly. *J Neurochem.* 81, 870-880.
- Ermak, G. and Davies, K. J., (2002). Gene expression in Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc).* 38, 509-516.
- Fink, C. C. and Meyer, T., (2002). Molecular mechanisms of CaMKII activation in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 12, 293-299.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D. and Matus, A., (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 20, 847-854.
- Flaherty, D. B., Soria, J. P., Tomasiewicz, H. G. and Wood, J. G., (2000). Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK3beta and cdk5 are key participants. *J Neurosci Res.* 62, 463-472.
- Fong, Y. L., Taylor, W. L., Means, A. R. and Soderling, T. R., (1989). Studies of the regulatory mechanism of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. Mutation of threonine 286 to alanine and aspartate. *J Biol Chem.* 264, 16759-16763.

- Frappier, T., Stetzkowski-Marden, F. and Pradel, L. A., (1991). Interaction domains of neurofilament light chain and brain spectrin. *Biochem J.* 275 ( Pt 2), 521-527.
- Furtner, R. and Wiche, G., (1987). Binding specificities of purified porcine brain alpha- and beta-tubulin subunits and of microtubule-associated proteins 1 and 2 examined by electron microscopy and solid-phase binding assays. *Eur J Cell Biol.* 45, 1-8.
- Garrido, J. J., Fernandes, F., Moussif, A., Fache, M. P., Giraud, P. and Dargent, B., (2003). Dynamic compartmentalization of the voltage-gated sodium channels in axons. *Biol Cell.* 95, 437-445.
- Gartner, U., Holzer, M. and Arendt, T., (1999). Elevated expression of p21ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration. *Neuroscience.* 91, 1-5.
- Glantz, S. B., Amat, J. A. and Rubin, C. S., (1992). cAMP signaling in neurons: patterns of neuronal expression and intracellular localization for a novel protein, AKAP 150, that anchors the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. *Mol Biol Cell.* 3, 1215-1228.
- Goedert, M., Sautumira, S., Jakes, R., Smith, M. J., Kamibayashi, C., White, C. L., 3rd and Sontag, E., (2000). Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *J Neurochem.* 75, 2155-2162.
- Gonzalez-Billault, C., Engelke, M., Jimenez-Mateos, E. M., Wandosell, F., Caceres, A. and Avila, J., (2002). Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res.* 67, 713-719.

- Gotz, J., Probst, A., Spillantini, M. G., Schafer, T., Jakes, R., Burki, K. and Goedert, M., (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *Embo J.* 14, 1304-1313.
- Gotz, J., Chen, F., Barmettler, R. and Nitsch, R. M., (2001a). Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem.* 276, 529-534.
- Gotz, J., Tolnay, M., Barmettler, R., Chen, F., Probst, A. and Nitsch, R. M., (2001c). Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur J Neurosci.* 13, 2131-2140.
- Grant, P. and Pant, H. C., (2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol.* 29, 843-872.
- Hanemaaijer, R. and Ginzburg, I., (1991). Involvement of mature tau isoforms in the stabilization of neurites in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 30, 163-171.
- Harada, A., Teng, J., Takei, Y., Oguchi, K. and Hirokawa, N., (2002). MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol.* 158, 541-549.
- Hashiguchi, M., Saito, T., Hisanaga, S. and Hashiguchi, T., (2002). Truncation of CDK5 activator p35 induces intensive phosphorylation of Ser202/Thr205 of human tau. *J Biol Chem.* 277, 44525-44530.
- Hashimoto, R., Nakamura, Y., Kosako, H., Amano, M., Kaibuchi, K., Inagaki, M. and Takeda, M., (1999). Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 263, 575-579.

- Havik, B., Rokke, H., Bardsen, K., Davanger, S. and Bramham, C. R., (2003). Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of pre-existing alpha-CaMKII mRNA to synapses: a mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. *Eur J Neurosci.* 17, 2679-2689.
- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J. J., Mata, A. M., Bhat, R. and Avila, J., (2004). Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 279, 3801-3806.
- Ho, L., Xiang, Z., Mukherjee, P., Zhang, W., De Jesus, N., Mirjany, M., Yemul, S. and Pasinetti, G. M., (2001). Gene expression profiling of the tau mutant (P301L) transgenic mouse brain. *Neurosci Lett.* 310, 1-4.
- Horton, A. C. and Ehlers, M. D., (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron.* 40, 277-295.
- Hoshi, M., Sato, M., Kondo, S., Takashima, A., Noguchi, K., Takahashi, M., Ishiguro, K. and Imahori, K., (1995). Different localization of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta from glycogen synthase kinase-3 alpha in cerebellum mitochondria. *J Biochem (Tokyo).* 118, 683-685.
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F. and Woodgett, J. R., (1993). Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *Embo J.* 12, 803-808.
- Humbert, S., Dhavan, R. and Tsai, L., (2000). p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 6), 975-983.

- Hutton, M., Lendon, C. L., 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, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Heutink, P. and et al., (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 393, 702-705.
- Hutton, M., (2000). Molecular genetics of chromosome 17 tauopathies. *Ann N Y Acad Sci*. 920, 63-73.
- Imahori, K., Hoshi, M., Ishiguro, K., Sato, K., Takahashi, M., Shiurba, R., Yamaguchi, H., Takashima, A. and Uchida, T., (1998). Possible role of tau protein kinases in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 19, S93-98.
- Ino, H. and Chiba, T., (1996). Intracellular localization of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) in mouse neuron: CDK5 is located in both nucleus and cytoplasm. *Brain Res*. 732, 179-185.
- Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I., (1991). Ubiquitination and abnormal phosphorylation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 5, 399-410.
- Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Sato, K., Arioka, M., Uchida, T. and Imahori, K., (1992). Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett*. 148, 202-206.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. and Imahori, K., (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett*. 325, 167-172.

- Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M. K., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M., (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron*. 24, 751-762.
- Ishihara, T., Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M., (2001). Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol*. 158, 555-562.
- Ishii, T., Furuoka, H., Muroi, Y. and Nishimura, M., (2003). Inactivation of integrin-linked kinase induces aberrant tau phosphorylation via sustained activation of glycogen synthase kinase 3beta in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem*. 278, 26970-26975.
- Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. and Narumiya, S., (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *Embo J*. 15, 1885-1893.
- Jackson, G. R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T. K., Wagle, N., Brown, C. A., Massachi, S. and Geschwind, D. H., (2002). Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron*. 34, 509-519.
- Jacomy, H., Zhu, Q., Couillard-Despres, S., Beaulieu, J. M. and Julien, J. P., (1999). Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits. *J Neurochem*. 73, 972-984.
- Jensen, P. H., Hager, H., Nielsen, M. S., Hojrup, P., Gliemann, J. and Jakes, R., (1999). alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem*. 274, 25481-25489.

- Jicha, G. A., O'Donnell, A., Weaver, C., Angeletti, R. and Davies, P., (1999)a. Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem.* 72, 214-224.
- Jicha, G. A., Rockwood, J. M., Berenfeld, B., Hutton, M. and Davies, P., (1999)b. Altered conformation of recombinant frontotemporal dementia-17 mutant tau proteins. *Neurosci Lett.* 260, 153-156.
- Jicha, G. A., Weaver, C., Lane, E., Vianna, C., Kress, Y., Rockwood, J. and Davies, P., (1999)c. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 19, 7486-7494.
- Johnson, G. V. and Jenkins, S. M., (1999). Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis.* 1, 307-328.
- Julien, J. P., Cote, F. and Collard, J. F., (1995). Mice overexpressing the human neurofilament heavy gene as a model of ALS. *Neurobiol Aging.* 16, 487-490; discussion 490-482.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M., (2000). Principles of neural science. McGraw-Hill Health Professions Division, New York.
- Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A. and Negishi, M., (1998). p160 RhoA-binding kinase ROKalpha induces neurite retraction. *J Biol Chem.* 273, 2489-2492.
- Kaytor, M. D. and Orr, H. T., (2002). The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol.* 12, 275-278.
- Kennedy, M. B., Bennett, M. K. and Erondy, N. E., (1983). Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 7357-7361.

- Keryer, G., Skalhegg, B. S., Landmark, B. F., Hansson, V., Jahnsen, T. and Tasken, K., (1999). Differential localization of protein kinase A type II isozymes in the Golgi-centrosomal area. *Exp Cell Res.* 249, 131-146.
- Kim, S. H., Nairn, A. C., Cairns, N. and Lubec, G., (2001). Decreased levels of ARPP-19 and PKA in brains of Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 263-272.
- Kita, Y., Kimura, K. D., Kobayashi, M., Ihara, S., Kaibuchi, K., Kuroda, S., Ui, M., Iba, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Nagata, S. and Fukui, Y., (1998). Microinjection of activated phosphatidylinositol-3 kinase induces process outgrowth in rat PC12 cells through the Rac-JNK signal transduction pathway. *J Cell Sci.* 111 ( Pt 7), 907-915.
- Klucken, J., McLean, P. J., Gomez-Tortosa, E., Ingelsson, M. and Hyman, B. T., (2003). Neuritic alterations and neural system dysfunction in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurochem Res.* 28, 1683-1691.
- Kowall, N. W. and Kosik, K. S., (1987). Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 22, 639-643.
- Kraemer, B. C., Zhang, B., Leverenz, J. B., Thomas, J. H., Trojanowski, J. Q. and Schellenberg, G. D., (2003). Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 9980-9985.
- Kranenburg, O., Poland, M., Gebbink, M., Oomen, L. and Moolenaar, W. H., (1997). Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *J Cell Sci.* 110 ( Pt 19), 2417-2427.
- Ksiezak-Reding, H., Morgan, K. and Dickson, D. W., (1994). Tau immunoreactivity and SDS solubility of two populations of paired helical filaments that differ in morphology. *Brain Res.* 649, 185-196.

- Langkopf, A., Hammarback, J. A., Muller, R., Vallee, R. B. and Garner, C. C., (1992). Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *J Biol Chem.* 267, 16561-16566.
- Lazaro, J. B., Kitzmann, M., Cavadore, J. C., Muller, Y., Clos, J., Fernandez, A. and Lamb, N. J., (1996). cdk5 expression and association with p35nck5a in early stages of rat cerebellum neurogenesis; tyrosine dephosphorylation and activation in post-mitotic neurons. *Neurosci Lett.* 218, 21-24.
- Lee, G., Cowan, N. and Kirschner, M., (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science.* 239, 285-288.
- Lee, M. K., Xu, Z., Wong, P. C. and Cleveland, D. W., (1993). Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol.* 122, 1337-1350.
- Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M. and Tsai, L. H., (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature.* 405, 360-364.
- Lee, V. M., Goedert, M. and Trojanowski, J. Q., (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 24, 1121-1159.
- Leroy, K. and Brion, J. P., (1999). Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat.* 16, 279-293.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L. and Lim, L., (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem.* 270, 29051-29054.
- Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E. and Lim, L., (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 16, 5313-5327.

- Lew, J., Huang, Q. Q., Qi, Z., Winkfein, R. J., Aebbersold, R., Hunt, T. and Wang, J. H., (1994). A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*. 371, 423-426.
- Lewis, S. A., Wang, D. H. and Cowan, N. J., (1988). Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science*. 242, 936-939.
- 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, W. L., Yen, S. H., Dickson, D. W., Davies, P. and Hutton, M., (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 25, 402-405.
- Lian, Q., Ladner, C. J., Magnuson, D. and Lee, J. M., (2001). Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Exp Neurol*. 167, 158-165.
- Liazoghli, D., Perreault, S., Micheva, K., Desjardins, M. and Leclerc, N., (2004). Fragmentation of the Golgi apparatus induced by overexpression of wild type and mutant human tau forms in neurons. *Am J Pathol*. Article en révision.
- Lim, F., Hernandez, F., Lucas, J. J., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A. and Avila, J., (2001). FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci*. 18, 702-714.
- Lisman, J., Schulman, H. and Cline, H., (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci*. 3, 175-190.
- Litersky, J. M. and Johnson, G. V., (1992). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem*. 267, 1563-1568.
- Liu, C. W., Lee, G. and Jay, D. G., (1999). Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons. *Cell Motil Cytoskeleton*. 43, 232-242.

- Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R. and Avila, J., (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J.* 20, 27-39.
- Ludin, B. and Matus, A., (1993). The neuronal cytoskeleton and its role in axonal and dendritic plasticity. *Hippocampus.* 3 Spec No, 61-71.
- Ludvig, N., Ribak, C. E., Scott, J. D. and Rubin, C. S., (1990). Immunocytochemical localization of the neural-specific regulatory subunit of the type II cyclic AMP-dependent protein kinase to postsynaptic structures in the rat brain. *Brain Res.* 520, 90-102.
- Luo, L., (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18, 601-635.
- Maccioni, R. B. and Cambiazo, V., (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev.* 75, 835-864.
- Maccioni, R. B., Otth, C., Concha, II and Munoz, J. P., (2001). The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem.* 268, 1518-1527.
- Mah, V. H., Eskin, T. A., Kazee, A. M., Lapham, L. and Higgins, G. A., (1992). In situ hybridization of calcium/calmodulin dependent protein kinase II and tau mRNAs; species differences and relative preservation in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 12, 85-94.
- Mandelkow, E., Stamer, K., Vogel, R., Thies, E. and Mandelkow, E., (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging.* 24, 1079-1085.

- Mandell, J. W. and Banker, G. A., (1996). Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and the establishment of neuronal polarity. *Perspect Dev Neurobiol.* 4, 125-135.
- Marszalek, J. R., Williamson, T. L., Lee, M. K., Xu, Z., Hoffman, P. N., Becher, M. W., Crawford, T. O. and Cleveland, D. W., (1996). Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. *J Cell Biol.* 135, 711-724.
- Martin, M. E., Hidalgo, J., Vega, F. M. and Velasco, A., (1999). Trimeric G proteins modulate the dynamic interaction of PKAII with the Golgi complex. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 22), 3869-3878.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K., (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *Embo J.* 15, 2208-2216.
- Mattson, M. P. and Chan, S. L., (2001). Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci.* 17, 205-224.
- McKee, A. C., Kosik, K. S., Kennedy, M. B. and Kowall, N. W., (1990). Hippocampal neurons predisposed to neurofibrillary tangle formation are enriched in type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neuropathol Exp Neurol.* 49, 49-63.
- Meinkoth, J. L., Ji, Y., Taylor, S. S. and Feramisco, J. R., (1990). Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 9595-9599.

- Michel, G., Mercken, M., Murayama, M., Noguchi, K., Ishiguro, K., Imahori, K. and Takashima, A., (1998). Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim Biophys Acta.* 1380, 177-182.
- Migheli, A., Butler, M., Brown, K. and Shelanski, M. L., (1988). Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J Neurosci.* 8, 1846-1851.
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E. and Mayford, M., (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron.* 36, 507-519.
- Minami, Y., Murofushi, H. and Sakai, H., (1982). Interaction of tubulin with neurofilaments: formation of networks by neurofilament-dependent tubulin polymerization. *J Biochem (Tokyo).* 92, 889-898.
- Mirra, S. S., Murrell, J. R., Gearing, M., Spillantini, M. G., Goedert, M., Crowther, R. A., Levey, A. I., Jones, R., Green, J., Shoffner, J. M., Wainer, B. H., Schmidt, M. L., Trojanowski, J. Q. and Ghetti, B., (1999). Tau pathology in a family with dementia and a P301L mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58, 335-345.
- Mora, A., Sabio, G., Risco, A. M., Cuenda, A., Alonso, J. C., Soler, G. and Centeno, F., (2002). Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cell Signal.* 14, 557-562.
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y. and Fujita, S. C., (2002). Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem.* 81, 1073-1083.
- Muniz, M., Martin, M. E., Hidalgo, J. and Velasco, A., (1997). Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 14461-14466.

- Nacharaju, P., Lewis, J., Easson, C., Yen, S., Hackett, J., Hutton, M. and Yen, S. H., (1999). Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett.* 447, 195-199.
- Nakagawa, O., Fujisawa, K., Ishizaki, T., Saito, Y., Nakao, K. and Narumiya, S., (1996). ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 392, 189-193.
- Nakayama, A. Y., Harms, M. B. and Luo, L., (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* 20, 5329-5338.
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M. and Donlon, T. A., (1986). 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.
- Neystat, M., Rzhetskaya, M., Oo, T. F., Kholodilov, N., Yarygina, O., Wilson, A., El-Khodor, B. F. and Burke, R. E., (2001). Expression of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 in models of induced apoptotic death in neurons of the substantia nigra in vivo. *J Neurochem.* 77, 1611-1625.
- Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y. T., Ramos, Y. F. and Tsai, L. H., (1996). The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* 10, 816-825.
- Nixon, R. A., (1998). Dynamic behavior and organization of cytoskeletal proteins in neurons: reconciling old and new findings. *Bioessays.* 20, 798-807.
- Nobel e-museum. (2004). Ramon y Cajal-Biography. (2004).  
<http://www.nobel.se/medicine/articles/cajal/>

- Noble, M., Lewis, S. A. and Cowan, N. J., (1989). The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol.* 109, 3367-3376.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahljianian, M., Lau, L. F. and Duff, K., (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron.* 38, 555-565.
- Ohno, K., Kitahara, T., Takeda, N., Kubo, T. and Kiyama, H., (1994). Gene regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase subunits (C alpha, beta; RI alpha, beta and RII alpha, beta) in rat facial motoneurons after nerve transection. *Neuroscience.* 63, 1101-1109.
- Okazawa, H. and Estus, S., (2002). The JNK/c-Jun cascade and Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 17, 79-88.
- Ouyang, Y., Kantor, D., Harris, K. M., Schuman, E. M. and Kennedy, M. B., (1997). Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus. *J Neurosci.* 17, 5416-5427.
- Paglini, G., Peris, L., Diez-Guerra, J., Quiroga, S. and Caceres, A., (2001). The Cdk5-p35 kinase associates with the Golgi apparatus and regulates membrane traffic. *EMBO Rep.* 2, 1139-1144.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H., (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* 402, 615-622.

- Pei, J. J., Tanaka, T., Tung, Y. C., Braak, E., Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I., (1997). Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56, 70-78.
- Pelech, S. L., (1995). *Networking With Proline-Directed Protein Kinases Implicated in Tau Phosphorylation.* Elsevier Science, 247-256.
- Perrone Capano, C., Pernas-Alonso, R. and di Porzio, U., (2001). Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration. *Bioessays.* 23, 24-33.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R. and Akram, M., (2001). The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem.* 76, 1265-1274.
- Probst, A., Gotz, J., Wiederhold, K. H., Tolnay, M., Mistl, C., Jaton, A. L., Hong, M., Ishihara, T., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Crowther, R. A., Spillantini, M. G., Burki, K. and Goedert, M., (2000). Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl).* 99, 469-481.
- Rao, M. V., Houseweart, M. K., Williamson, T. L., Crawford, T. O., Folmer, J. and Cleveland, D. W., (1998). Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. *J Cell Biol.* 143, 171-181.
- Riento, K. and Ridley, A. J., (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4, 446-456.
- Ryder, J., Su, Y. and Ni, B., (2004). Akt/GSK3beta serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. *Cell Signal.* 16, 187-200.

- Sakaguchi, T., Okada, M., Kitamura, T. and Kawasaki, K., (1993). Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett.* 153, 65-68.
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J. and Avila, J., (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol.* 61, 133-168.
- Saremsky, P., (2003) History of Neuroscience. <http://www.columbia.edu/cu/psychology/courses/1010/mangels/neuro/history/history.html>
- Scott, C. W., Spreen, R. C., Herman, J. L., Chow, F. P., Davison, M. D., Young, J. and Caputo, C. B., (1993). Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Biol Chem.* 268, 1166-1173.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A. and Ehlers, M. D., (2003). Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology.* 45, 755-767.
- Scott, J. D., (1991). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther.* 50, 123-145.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K., (1998). 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.
- Shafit-Zagardo, B. and Kalcheva, N., (1998). Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Mol Neurobiol.* 16, 149-162.

- Sharma, P., Sharma, M., Amin, N. D., Albers, R. W. and Pant, H. C., (1999). Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 11156-11160.
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W. and Kida, S., (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci.* 21, 127-148.
- Skalhegg, B. S. and Tasken, K., (2000). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5, D678-693.
- Smith, P. D., Crocker, S. J., Jackson-Lewis, V., Jordan-Sciutto, K. L., Hayley, S., Mount, M. P., O'Hare, M. J., Callaghan, S., Slack, R. S., Przedborski, S., Anisman, H. and Park, D. S., (2003). Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 13650-13655.
- Sperber, B. R., Leight, S., Goedert, M. and Lee, V. M., (1995). Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett.* 197, 149-153.
- Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A. and Ghetti, B., (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 7737-7741.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A., Loos, R. and Van Leuven, F., (1999). Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol.* 155, 2153-2165.
- Stowell, J. N. and Craig, A. M., (1999). Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. *Neuron.* 22, 525-536.

- Takahashi, N., Tuiki, H., Saya, H. and Kaibuchi, K., (1999). Localization of the gene coding for ROCK II/Rho kinase on human chromosome 2p24. *Genomics*. 55, 235-237.
- Takashima, A., Murayama, M., Yasutake, K., Takahashi, H., Yokoyama, M. and Ishiguro, K., (2001). Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation in mouse brain. *Neurosci Lett*. 306, 37-40.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A. and Hirokawa, N., (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol*. 150, 989-1000.
- Takeuchi, Y., Yamamoto, H., Matsumoto, K., Kimura, T., Katsuragi, S., Miyakawa, T. and Miyamoto, E., (1999). Nuclear localization of the delta subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in rat cerebellar granule cells. *J Neurochem*. 72, 815-825.
- Takeuchi, Y., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Miyakawa, T. and Miyamoto, E., (2000). Identification of the isoforms of Ca(2+)/Calmodulin-dependent protein kinase II in rat astrocytes and their subcellular localization. *J Neurochem*. 74, 2557-2567.
- Tandon, A., Yu, H., Wang, L., Rogaeva, E., Sato, C., Chishti, M. A., Kawarai, T., Hasegawa, H., Chen, F., Davies, P., Fraser, P. E., Westaway, D. and St George-Hyslop, P. H., (2003). Brain levels of CDK5 activator p25 are not increased in Alzheimer's or other neurodegenerative diseases with neurofibrillary tangles. *J Neurochem*. 86, 572-581.
- Tanemura, K., Murayama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H. and Takashima, A., (2002). Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci*. 22, 133-141.
- Tang, D., Chun, A. C., Zhang, M. and Wang, J. H., (1997). Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activation domain of neuronal Cdk5 activator. Evidence of the existence of cyclin fold in neuronal Cdk5a activator. *J Biol Chem*. 272, 12318-12327.

- Taniguchi, S., Fujita, Y., Hayashi, S., Kakita, A., Takahashi, H., Murayama, S., Saido, T. C., Hisanaga, S., Iwatsubo, T. and Hasegawa, M., (2001). Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett.* 489, 46-50.
- Tao-Cheng, J. H., Vinade, L., Pozzo-Miller, L. D., Reese, T. S. and Dosemeci, A., (2002). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II clusters in adult rat hippocampal slices. *Neuroscience.* 115, 435-440.
- Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J. and Hirokawa, N., (2001). Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol.* 155, 65-76.
- Terada, M., Yasuda, H., Kogawa, S., Maeda, K., Haneda, M., Hidaka, H., Kashiwagi, A. and Kikkawa, R., (1998). Expression and activity of cyclin-dependent kinase 5/p35 in adult rat peripheral nervous system. *J Neurochem.* 71, 2600-2606.
- Tsai, L. H., Delalle, I., Caviness, V. S., Jr., Chae, T. and Harlow, E., (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature.* 371, 419-423.
- Tseng, H. C., Zhou, Y., Shen, Y. and Tsai, L. H., (2002). A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett.* 523, 58-62.
- van Herpen, E., Rosso, S. M., Serverijnen, L. A., Yoshida, H., Breedveld, G., van de Graaf, R., Kamphorst, W., Ravid, R., Willemsen, R., Dooijes, D., Majoor-Krakauer, D., Kros, J. M., Crowther, R. A., Goedert, M., Heutink, P. and van Swieten, J. C., (2003). Variable phenotypic expression and extensive tau pathology in two families with the novel tau mutation L315R. *Ann Neurol.* 54, 573-581.
- van Slegtenhorst, M., Lewis, J. and Hutton, M., (2000). The molecular genetics of the tauopathies. *Exp Gerontol.* 35, 461-471.

- Waltereit, R. and Weller, M., (2003). Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol Neurobiol.* 27, 99-106.
- Wang, Y. H., Scott, J. D., McKnight, G. S. and Krebs, E. G., (1991). A constitutively active holoenzyme form of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 2446-2450.
- Weishaupt, J. H., Kussmaul, L., Grotsch, P., Heckel, A., Rohde, G., Romig, H., Bahr, M. and Gillardon, F., (2003). Inhibition of CDK5 is protective in necrotic and apoptotic paradigms of neuronal cell death and prevents mitochondrial dysfunction. *Mol Cell Neurosci.* 24, 489-502.
- Williamson, T. L., Bruijn, L. I., Zhu, Q., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Julien, J. P. and Cleveland, D. W., (1998). Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 9631-9636.
- Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M. and Feany, M. B., (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science.* 293, 711-714.
- Wong, P. C., Marszalek, J., Crawford, T. O., Xu, Z., Hsieh, S. T., Griffin, J. W. and Cleveland, D. W., (1995). Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. *J Cell Biol.* 130, 1413-1422.
- Woodgett, J. R., (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J.* 9, 2431-2438.

- Xu, Z., Cork, L. C., Griffin, J. W. and Cleveland, D. W., (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell*. 73, 23-33.
- Xu, Z., Marszalek, J. R., Lee, M. K., Wong, P. C., Folmer, J., Crawford, T. O., Hsieh, S. T., Griffin, J. W. and Cleveland, D. W., (1996). Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *J Cell Biol.* 133, 1061-1069.
- Xu, Z. and Tung, V. W., (2000). Overexpression of neurofilament subunit M accelerates axonal transport of neurofilaments. *Brain Res.* 866, 326-332.
- Yamamoto, H., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Ono, T. and Miyamoto, E., (2002). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in its tubulin binding sites. *Arch Biochem Biophys.* 408, 255-262.
- Yang, Y., Bauer, C., Strasser, G., Wollman, R., Julien, J. P. and Fuchs, E., (1999). Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules. *Cell.* 98, 229-238
- Yen, S., Easson, C., Nacharaju, P., Hutton, M. and Yen, S. H., (1999). FTDP-17 tau mutations decrease the susceptibility of tau to calpain I digestion. *FEBS Lett.* 461, 91-95.
- Yoshimura, Y., Ichinose, T. and Yamauchi, T., (2003). Phosphorylation of tau protein to sites found in Alzheimer's disease brain is catalyzed by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II as demonstrated tandem mass spectrometry. *Neurosci Lett.* 353, 185-188.
- Yoshiyama, Y., Zhang, B., Bruce, J., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M., (2003). Reduction of detyrosinated microtubules and Golgi fragmentation are linked to tau-induced degeneration in astrocytes. *J Neurosci.* 23, 10662-10671.

- Yu, W., Centonze, V. E., Ahmad, F. J. and Baas, P. W., (1993). Microtubule nucleation and release from the neuronal centrosome. *J Cell Biol.* 122, 349-359.
- Zheng, M., Leung, C. L. and Liem, R. K., (1998). Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system. *J Neurobiol.* 35, 141-159.
- Zhang, W. and Benson, D. L., (2001). Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci.* 21, 5169-5181.
- Zheng-Fischhofer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Illenberger, S., Godemann, R. and Mandelkow, E., (1998). 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.
- Zhou, D., Lambert, S., Malen, P. L., Carpenter, S., Boland, L. M. and Bennett, V., (1998). AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol.* 143, 1295-1304.
- Zhou, F. Q., Waterman-Storer, C. M. and Cohan, C. S., (2002). Focal loss of actin bundles causes microtubule redistribution and growth cone turning. *J Cell Biol.* 157, 839-849.
- Zhu, Q., Lindenbaum, M., Levavasseur, F., Jacomy, H. and Julien, J. P., (1998). Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta'-iminodipropionitrile. *J Cell Biol.* 143, 183-193.
- Zhu, X., Lee, H. G., Raina, A. K., Perry, G. and Smith, M. A., (2002). The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 11, 270-281.

# Annexe

## Contribution externe

Ce travail a été rendu possible grâce à l'aide de Sébastien Perreault et de Nicole Leclerc.

## Coupe de moelle épinière

L'extraction et la coupe des moelles épinières pour l'immunohistochimie ont été effectuées par Sébastien Perreault.

## Caractérisation des fractions subcellulaires de cerveau de souris

La section de ce travail portant sur la caractérisation du fractionnement de cerveau chez la souris a été écrite selon les résultats obtenus par Sébastien Perreault. La figure 12, p. 66, a d'ailleurs été faite par Sébastien Perreault.

## Fractionnement subcellulaire d'un cerveau de souris

Les fractionnements de cerveau ont été faits par Sébastien Perreault et Nicole Leclerc. La majorité des membranes de nitrocellulose (six membranes sur huit) ont été faites et utilisées par Sébastien Perreault avant que nous les utilisions pour notre étude.