

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
JULIE ALLYSON

L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE DES RÉCEPTEURS NMDA PROTÈGE
LA PROTÉINE TAU CONTRE L'ÉTAT D'HYPERPHOSPHORYLATION :
UNE NOUVELLE PISTE THÉRAPEUTIQUE POUR
LA MALADIE D'ALZHEIMER?

SEPTEMBRE 2011

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

*À ma grand-maman Mado, pour qui
les souvenirs s'estompent peu à peu...*

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce projet de maîtrise en neurobiologie. En particulier, je voudrais remercier mes directeurs de recherche, les professeurs Michel Cyr et Guy Massicotte, pour leur support, leur disponibilité et leur rigueur scientifique. J'ai appris beaucoup en vous côtoyant et j'espère conserver au moins une chose qui caractérise vos interventions; c'est un brin de sagesse et de patience. Geneviève, je te témoigne ma plus grande appréciation pour ton aide technique, tes sages recommandations et ton oreille attentive. Ève, toi dont la bonté n'a d'égal que ta détermination et ta joie de vivre, mes plus sincères remerciements. Laure, Manon, Julie et Christine, j'ai appris à vous connaître et à vous apprécier. Merci pour vos encouragements.

Chers parents, vous avez toujours été d'une patience exemplaire et vous avez su défendre vos convictions avec l'ardeur et la délicatesse qui vous caractérisent. Je défendrai maintenant les miennes dans le respect de valeurs que vous m'avez transmises.

À toi mon beau Gabriel, ma reconnaissance est le reflet de ta fierté. Toi qui as supporté mes matins ensoleillés et parfois mes après-midi orageux, mes plus tendres et sincères remerciements. Je t'aime.

Madame Catarina Leote Franco Pio, je tiens finalement à vous témoigner ma reconnaissance pour votre support indéfectible dans la préparation de ce document.

RÉSUMÉ

Inconnus il y a trente ans, les récepteurs NMDA du neurotransmetteur glutamate apparaissent aujourd’hui comme un système essentiel de la machinerie neuronale. Dans des conditions normales, ces récepteurs joueraient un rôle primordial pour la mise en œuvre des mécanismes physiologiques sous-jacents à la mémoire, notamment dans une région du cerveau nommée hippocampe. Ironiquement, ces récepteurs se sont vus attribuer, au fil du temps, une réputation peu enviable de par leur capacité à accroître la mort des neurones de l’hippocampe lors de multiples conditions pathologiques, dont l’Alzheimer. Par conséquent, des molécules anti-NMDA ont été développées par l’industrie pharmaceutique dans l’espoir de limiter les processus dégénératifs résultant de l’action néfaste du glutamate. Or, les études cliniques tendent malheureusement à démontrer que les bénéfices thérapeutiques de l’une de ces molécules, l’hydrochlorure de mémantine (ou Mémantine), n’intéressent qu’une infime partie des sujets souffrant de la maladie d’Alzheimer. Pour certains chercheurs, ces données cliniques sont en fait la preuve que les récepteurs NMDA ne jouent qu’un rôle accessoire dans le développement de cette terrible maladie. Pour d’autres, c’est une indication que les connaissances fondamentales concernant les effets physiopathologiques de ces récepteurs restent encore parcellaires. Dans les faits, on sait depuis quelques années que les récepteurs NMDA sont le fruit d’une organisation complexe de protéines membranaires qui peuvent, selon leur agencement, encourager ou encore limiter les processus de la dégénérescence neuronale. Dans cette foulée, les résultats obtenus dans le cadre du présent mémoire de maîtrise tentent à démontrer que la perte d’influence des récepteurs NMDA composés par les sous-unités protéïniques NR1/NR2A aboutit à une hausse de phosphorylation de la

protéine Tau dans l'hippocampe de rats. Sur le plan biochimique, nous avons mis en évidence que la perte d'activité des récepteurs NR1/NR2A entraîne une phosphorylation accrue du site Ser199 de la protéine Tau, alors que l'état de phosphorylation des sites Ser262 et Ser409 de la protéine s'avère épargné. Une observation pertinente sur le plan clinique, puisque l'augmentation de phosphorylation de la Ser199 a été proposée comme l'un des mécanismes précoce affligeant les neurones Alzheimer. Nos données biochimiques montrent également que l'hyperphosphorylation du site Ser199 de la protéine Tau témoigne probablement de la perturbation des membranes neuronales qui impliquerait, d'abord, une entrée accrue de l'ion calcium dans les neurones et l'activation subséquente d'une protéine phosphorylante, la protéine kinase 5 cycline-dépendante (ou Cdk5). Les études de comparaison avec des agents pharmacologiques bloquant une autre population de récepteurs NMDA formés, cette fois-ci, par les sous-unités NR1/NR2B indiquent que l'état de phosphorylation de la protéine Tau n'est pas affecté par la perte d'activité de ces récepteurs. Ces observations font évidemment naître une perspective de recherche attrayante dans ce vaste domaine qu'est la maladie d'Alzheimer, à savoir que la perte d'activité des récepteurs NR1/NR2A serait à même d'encourager le processus d'hyperphosphorylation de la protéine Tau et de faciliter, ultimement, la mort neuronale. Cette découverte nous laisse croire que le développement de molécules susceptibles d'activer les récepteurs NR1/NR2A pourrait s'avérer utile dans l'optique de limiter l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau, un scénario original qui s'oppose à l'idée générale acceptée voulant que le traitement de la maladie d'Alzheimer repose essentiellement sur l'utilisation de molécules anti-NMDA.

Mots-clés : Maladie d'Alzheimer, récepteurs NMDA, NVP-AAM077, RO25-6981, protéine Tau, neuroprotection, hippocampe

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ	iv
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Généralités	1
1.2 La maladie d'Alzheimer	3
1.2.1 Rappel historique.....	3
1.2.2 Les stades de la maladie d'Alzheimer.....	4
1.2.2.1 Le stade précoce	5
1.2.2.2 Le stade modéré	5
1.2.2.3 Le stade sévère	6
1.2.2.4 Le stade terminal.....	6
1.2.3 Aspects histopathologiques	6
1.2.3.1 Les amas d'amyloïde (ou plaques séniles).....	8
1.2.3.2 Le métabolisme de l'APP et les traitements anti- amyloïde.....	8
1.2.4 Les enchevêtements fibrillaires et la protéine Tau	10
1.2.4.1. La protéine Tau : isoformes et phosphorylation....	11
1.2.4.2 État de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer.....	16
1.3 Les récepteurs NMDA du neurotransmetteur glutamate	18
1.3.1 La toxicité induite par le glutamate	20
1.3.2 Les récepteurs NMDA : ils ne sont pas tous toxiques.....	22

CHAPITRE II	
HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	24
2.1 Rationnelle et hypothèse du projet de recherche.....	24
2.2 Originalité de la recherche proposée.....	27
CHAPITRE III	
MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE	29
3.1 Les antagonistes des récepteurs NMDA.....	29
3.2 Les tranches d'hippocampe de rats	30
3.3 Le dosage membranaire des récepteurs au glutamate.....	31
CHAPITRE IV	
BLOCKADE OF NR2A-CONTAINING NMDA RECEPTORS INDUCES TAU PHOSPHORYLATION IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES	34
Résumé.....	34
Contribution des auteurs de l'article.....	35
Article scientifique.....	36
CHAPITRE V	
DISCUSSION GÉNÉRALE	69
5.1 Les récepteurs NMDA du glutamate : bon et mauvais garnements.....	70
5.2 Phosphorylation de la protéine Tau et maladie d'Alzheimer	73
5.3 Conclusion et perspectives thérapeutiques.....	77
BIBLIOGRAPHIE.....	80

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Alzheimer et ses collaborateurs	4
1.2 Les stades cliniques de la maladie d'Alzheimer	7
1.3 Le métabolisme du peptide amyloïde	9
1.4 La dégénérescence neurofibrillaire	13
1.5 La protéine Tau et ses isoformes	15
3.1 Les antagonistes des récepteurs NMDA	30
3.2 Caractéristiques morphologiques des tranches d'hippocampe.....	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPA	“Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid”
ARNm	ARN messagé
APP	“Amyloid precursor protein”
BDNF	“Brain-derived neurotrophic factor”
CDK5	“Cyclin-dependent kinase 5”
CREB	“CRE-binding protein”
CRMP	“Collapsin response mediator protein 2”
ERK	“Extracellular-signal regulated kinase”
FHP	Filaments hélicoïdaux pathologiques
GSK3β	“Glycogen-synthase kinase 3 β”
Kb	Kilo-base
KDa	Kilo-Dalton
LTD	“Long Term Depression”
LTP	“Long Term Potentialisation”
MAGUK	“Membrane Associated Guanylate kinase”
MAPK	“Microtubules-associated protein kinase”
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NMDAR	Récepteurs sensible au N-Méthyl-D-Aspartate
NVP	NVP-AAM077 ou « [(R)-[(S)-1-(4-bromo-phenyl)-ethylamino]- (2,3-dioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydro-quinoxalin-5-yl)-methyl]- phosphonic acid »
PDPK	“Pro-directed protein kinase”

PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PSD	“Post Synaptic Density”
PP	Protéine phosphatase
RO	RO26-6981 ou « ($\alpha R, \beta S$)- α -(4-Hydroxyphenyl)- β -methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidinepropanol maleate »
SAP	“Synaptic Associated Protein”
SAPK	“Synaptic-associated protein kinase”
Ser	Sérine
SH	« Src Homology domain »
SNC	Système Nerveux Central
Thr	Thréonine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Généralités

Selon des estimations récentes révélées par la Société canadienne de la maladie d'Alzheimer, plus de 103,000 concitoyens développeront une quelconque forme de démence au cours de l'année 2011. D'ici 2038, on estime que l'incidence des différentes formes de démence doublera et que les sommes allouées pour la prise en charge des patients pourraient passer de 15 à 150 milliards de dollars par année d'ici 30 ans. Évidemment, les spécialistes de la santé publique n'osent à peine imaginer l'impact d'une telle épidémie sur les finances du pays, compte tenu du vieillissement constant de la population. Dans ce contexte, on aura vite compris l'urgence de mettre au point des stratégies thérapeutiques novatrices qui pourront, à tout le moins, ralentir la progression des symptômes démentiels, ceux affligeant les sujets Alzheimer notamment, qui comptent pour près de 70 % des cas de démence au pays.

Actuellement, les cliniciens peuvent compter sur des molécules inhibitrices de l'enzyme acétylcholinestérase, comme Aricept et Exelon, pour freiner l'élagage des fonctions cognitives chez les sujets Alzheimer. Ces substances ont pour but d'accroître la communication entre les neurones, en favorisant la stimulation des récepteurs du cerveau sensibles à l'action du neurotransmetteur acétylcholine. Une action neurochimique certes intéressante, mais qui ne s'attaque malheureusement pas à la cause première de cette terrible maladie. On rappellera, à ce sujet, que les manifestations cliniques de la maladie d'Alzheimer sont principalement liées à la disparition des neurones dans

des régions préférentielles du cerveau. Dans cette perspective, les nouvelles molécules mises au point par les compagnies pharmaceutiques sont développées dans le but d'enrayer la mise en œuvre des mécanismes intracellulaires contribuant à la mort des neurones, particulièrement dans une région du cerveau nommée hippocampe (une structure du cerveau dont la forme rappelle celle de l'animal marin portant le même nom).

Ces substances ont actuellement comme principale cible moléculaire les récepteurs pour le neurotransmetteur glutamate, sensibles à l'action d'une molécule apparentée au glutamate et dénommée N-méthyle-D-aspartate (ou NMDA). L'intérêt de cette approche pharmacologique tient au fait que l'inactivation des récepteurs sensibles au NMDA (ou récepteur NMDA) serait, en partie, susceptible de freiner la mort des neurones dans le cerveau en enrayer le pouvoir excitotoxique du neurotransmetteur glutamate. De fait, c'est en agissant sur ces récepteurs que la Mémantine (ou Ebixa) freinerait l'apparition des dommages au cerveau chez les sujets Alzheimer. Les données cliniques concernant l'utilisation de ce médicament indiquent toutefois que les bénéfices cognitifs qui résultent de la consommation de la Mémantine sont malheureusement modestes et que son efficacité thérapeutique n'intéresse qu'un nombre très limité de patients touchés par la maladie (environ 10 %). Nous sommes donc encore très loin de la coupe aux lèvres dans la compréhension de cette terrible maladie.

Avant toute chose, je vous propose un petit voyage au cœur des connaissances actuelles concernant la maladie d'Alzheimer.

1.2 La maladie d'Alzheimer

1.2.1 Rappel historique

Alois Alzheimer, psychiatre et neuropathologiste allemand du début du XX^e siècle, étudia avec les membres de son équipe le cerveau des sujets atteints de démence. Il décrivit pour la première fois des altérations anatomiques inédites sur le cerveau d'une patiente (Auguste D.) décédée des suites d'une démence se caractérisant par des hallucinations visuelles, des troubles de l'orientation et de la mémoire. C'est grâce à une nouvelle technique de coloration à l'aniline et d'imprégnation argentique qu'il fut en mesure de rapporter des anomalies se caractérisant par l'apparition de fibrilles disséminées tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des neurones. Lors de la 37^e Conférence des psychiatres allemands, il présenta les résultats de ses recherches et il récidiva en 1911, rapportant un cas identique à celui d'Auguste D (Maurer & Hoyer, 2006). C'est finalement le psychiatre renommé Emil Kraepelin qui, alors responsable de la chaire de psychiatrie de Munich, proposa de désigner ce type de démence par le nom de son collègue Alois Alzheimer.

Malheureusement, l'histoire nous enseigne que derrière chaque grande découverte scientifique se cachent souvent des acteurs importants qui sont sous-estimés. Le cas Alzheimer ne fait pas exception à cette règle. En fait, les rapports historiques relatifs à la découverte de la maladie d'Alzheimer tendent à démontrer que l'essentiel des observations recueillies sur cette maladie fut le fruit d'un travail minutieux effectué par Solomon Carter Fuller, un assistant de recherche d'origine afro-américaine recruté par Alzheimer lui-même. En effet, c'est à Fuller que nous devons vraisemblablement la description des

paramètres *post-mortem* indispensables pour le diagnostic de cette affection (Kaplan & Henderson, 2000). Nous y reviendrons.



Figure 1.1 Alzheimer et ses collaborateurs.

Dans l'ordre habituel : le Dr Alois Alzheimer et le Dr Solomon Fuller assis à sa gauche. Debout, les autres membres de l'équipe du laboratoire d'Alzheimer entre 1904-1905 (Kaplan & Henderson, 2000).

1.2.2 Les stades de la maladie d'Alzheimer

En pratique, le diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer est posé chez une personne présentant des signes de démence d'apparition et d'évolution progressive et pour lesquels les autres causes (démences vasculaires, en particulier) ont été éliminées. Bien que provisoire, ce diagnostic s'avère toujours complexe et repose essentiellement sur une batterie de tests neuropsychologiques de même que sur la mise en évidence d'une atrophie corticale qui touche, d'abord, le lobe temporal interne et plus particulièrement l'hippocampe.

1.2.2.1 Le stade précoce

L'hippocampe, une région du cerveau riche en récepteurs glutamatergiques de type NMDA, est précocement affligé dans la maladie d'Alzheimer. Elle assure, notamment, la consolidation des souvenirs déclaratifs, une forme de mémoire qui dépend de processus cognitifs tels que l'évaluation, la comparaison et la déduction. En particulier, elle implique la récupération d'un événement complet basé sur des empreintes mnésiques associatives; comme, par exemple, le fait de se rappeler le nom d'une personne récemment rencontrée dans le cadre de circonstances précises. Dans la phase précoce de la maladie d'Alzheimer, la perte graduelle des fonctions de l'hippocampe est responsable des symptômes cliniques qui se définissent normalement en des pertes de mémoire déclaratives, se manifestant également par des distractions mineures s'accentuant avec la progression de la maladie (Rolston et al., 2009); les souvenirs plus anciens restant normalement bien préservés.

1.2.2.2 Le stade modéré

Les atteintes neurologiques s'aggravant, la perte d'autonomie devient significative et les symptômes comportementaux et les troubles mnésiques s'accentuent. Ce stade présente les symptômes inéluctables de la maladie d'Alzheimer. Le patient perd souvent ses repères spatiaux et temporels, résultat des pertes fonctionnelles accrues de l'hippocampe, du lobe temporal, mais également des lobes pariétaux et frontaux. En matière de communication, le langage se détériore peu à peu, c'est-à-dire que le malade ne s'exprime plus de façon spontanée et démontre un discours généralement incohérent. Au-delà des troubles mnésiques et langagiers, on peut observer des modifications de la personnalité, la survenue de comportements agressifs, une perte d'intérêt ou encore des

troubles de l'alimentation et du sommeil. Le patient se trouve alors coupé de la réalité et il éprouve même des difficultés à reconnaître ses proches; signe d'une atteinte plus prononcée des cortex associatifs.

1.2.2.3 Le stade sévère

Lors de ce stade, les processus de mémorisation sont totalement dysfonctionnels, conséquence directe d'une atteinte extrême du cerveau. En plus des souvenirs récents, le patient oublie également les événements survenus tout au long de sa vie. Son langage devient incompréhensible : le patient s'avère incapable de saisir le sens des mots. Les troubles physiques font maintenant leur entrée en scène, le patient ayant de la difficulté à se déplacer. Il lui arrive même de s'écrouler au sol.

1.2.2.4 Le stade terminal

Le patient a évidemment perdu toute son autonomie. L'évolution conduit irrémédiablement le malade vers un état paralytique qui se terminera irrévocablement par une atteinte du système nerveux autonome. Le décès survient rapidement après le début de ce stade.

1.2.3 Aspects histopathologiques

La vitesse et l'évolution de la maladie sont variables d'un individu à l'autre, ce qui rend difficile tout pronostic précis, l'espérance de vie variant de trois à huit ans selon l'âge du patient au moment du diagnostic clinique (Ferri et al., 2005). En pratique, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est posé chez une personne présentant des signes de démence d'apparition progressive et pour lesquels les autres causes

(démences vasculaires, en particulier) ont été éliminées. Néanmoins, sur la base du diagnostic clinique, on parle de maladie probable ou provisoire. De ce fait, il est impératif de souligner que seule l'autopsie permet une confirmation de la maladie d'Alzheimer avec l'examen histopathologique du cerveau. Or, le cerveau affligé par l'Alzheimer est victime d'un double processus de dégénérescence neuronale et d'inflammation, caractérisé par deux types de lésions circonscrites participant à l'élagage global du cerveau. Les lésions histopathologiques caractéristiques des cerveaux Alzheimer sont, en réalité, les amas extracellulaires d'amyloïde et les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires.

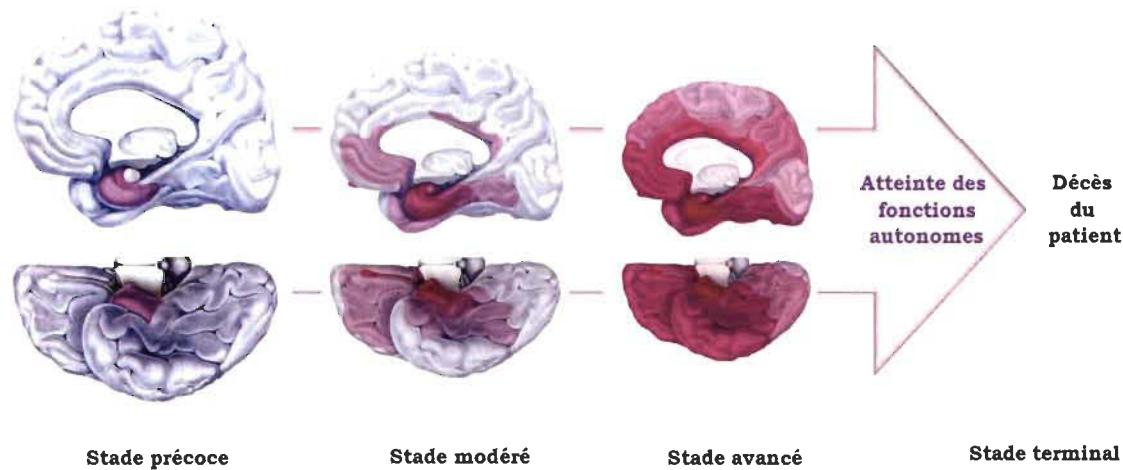


Figure 1.2 Les stades cliniques de la maladie d'Alzheimer.

Une coupe sagittale démontrant l'évolution graduelle, mais prévisible de la perte fonctionnelle des différentes structures affectées selon l'évolution de la maladie suivant le stade précoce, modéré, avancé et terminal de la maladie. Notons que l'hippocampe est atteint dès le stade précoce.

1.2.3.1 Les amas d'amyloïde (ou plaques séniles)

Le fil conducteur biochimique reliant bon nombre de pathologies neurodégénératives est celui d'un processus de modification structurale des protéines (dénaturation et agrégation) associé à la formation de dépôts, qui « volent » leurs qualités fonctionnelles aux neurones. Dans la maladie d'Alzheimer, on constate une accumulation extracellulaire d'une protéine, la β -amyloïde, qui est à l'origine de la formation d'agrégats appelés également plaques séniles. La β -amyloïde est une protéine formée de 39-43 acides aminés et provient de l'hydrolyse d'une protéine précurseur, l'APP (sigle de l'anglais “amyloid precursor protein”).

L'APP est une protéine transmembranaire comptant 770 acides aminés issue de la transcription du gène situé sur le chromosome 21. Les fonctions de l'APP demeurent assez énigmatiques, mais certaines études laissent croire à son implication dans les processus adaptatifs requis lors du développement neuronal (Barsottini et al., 2011; Maynard et al., 2005; Mimuro et al.) et dans la mise en œuvre des mécanismes cellulaires assurant le stockage des souvenirs, tels la régulation de l'homéostasie calcique et le contrôle du nombre de récepteurs à la surface membranaire (Colodner & Feany, 2010; Guerrero et al., 2009).

1.2.3.2 Le métabolisme de l'APP et les traitements anti-amyloïde

Physiologiquement, les transformations post-traductionnelles de l'APP se résument en un clivage central de l'APP par l'enzyme α -sécrétase, générant ainsi deux fragments protéiniques essentiels au développement de la plasticité synaptique (Maynard et al., 2005; Turner et al., 2003). Pour des raisons encore mystérieuses, le clivage du PPA peut aussi s'effectuer par des voies protéolytiques inhabituelles impliquant d'autres formes de sécrétases, les isoformes γ et β . On estime

depuis longtemps que chez le sujet Alzheimer, l'activation de ces voies enzymatiques participerait à la formation des fragments β -amyloïdes solubles (aussi appelés oligomères), qui se retrouveraient ultimement au sein des plaques séniles sous formes insolubles (Figure 1.3). On a cru longtemps que l'accumulation des amas insolubles de β -amyloïdes constituerait l'élément décisif de la neurodégénérescence de type Alzheimer, et plusieurs études biochimiques ont en fait impliqué le stress oxydatif comme mécanisme assurant les effets toxiques de l'amyloïde sur les neurones (Varadarajan et al., 2000).

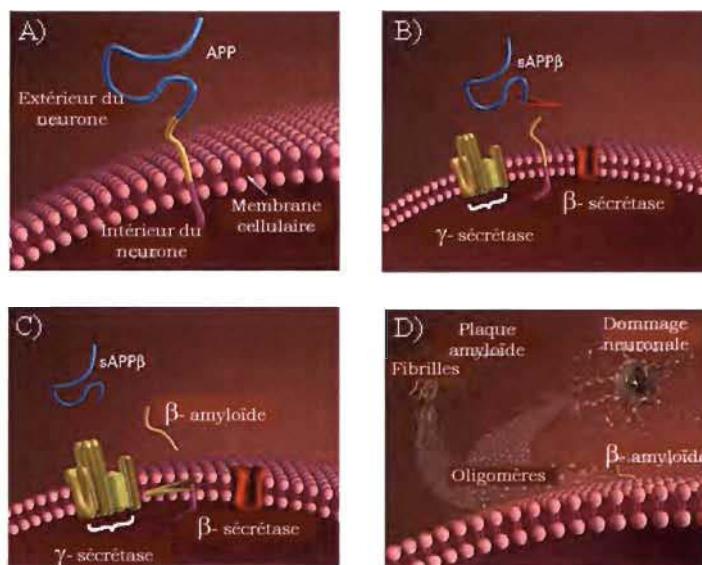


Figure 1.3 Le métabolisme du peptide amyloïde.

Le peptide amyloïde provient de l'APP (A), une protéine transmembranaire qui, découpée par l'action successive de deux enzymes protéolytiques, la bêta (B) puis la gamma-sécrétase (C), induit la production de la β -amyloïde qui formera des oligomères solubles (D), qui eux se regrouperont éventuellement en plaque sénile (adaptation <http://www.kobisiteniz.com>)

Au début des années 2000, beaucoup d'espoir a été mis dans l'idée qu'un vaccin ayant pour cible la β -amyloïde pourrait s'avérer

profitable au freinage de la progression de la maladie d'Alzheimer. En fait, Dale Schenk et ses collaborateurs présentaient dans la revue *Nature* les indices qu'une telle approche constituait une démarche valable permettant de guérir des souris transgéniques présentant certaines manifestations de la maladie d'Alzheimer (Wang & Liu, 2008). En immunisant ces souris transgéniques contre la β -amyloïde, ils arrivaient à prévenir l'apparition de dépôts amyloïdes chez les jeunes animaux et à limiter, voire à réduire leur extension chez les individus âgés. Ensuite, un premier essai clinique de phase 1 chez l'homme, conduit en Angleterre, a permis l'analyse suivante : 80 patients traités supportent bien la vaccination et le quart d'entre eux produit bien des anticorps contre la β -amyloïde. Un second essai a malheureusement été interrompu en raison d'effets indésirables graves (c'est-à-dire méningo-encéphalites). Le suivi ultérieur des patients qui ont reçu le vaccin est toutefois mitigé : même si chez certains patients traités les dépôts amyloïdes intracérébraux étaient moins importants, le vaccin n'a pas empêché la progression de la détérioration intellectuelle jusqu'au stade terminal (Ballatore et al., 2010). Encore aujourd'hui, on argumente sur la pertinence d'enrayer l'action de l'amyloïde dans le cerveau Alzheimer, car il existe un nombre de plus en plus important d'études scientifiques qui laissent penser que la production de fragments d'amyloïde n'est pas nécessairement néfaste pour le cerveau (Tabaton et al., 2010).

1.2.4 Les enchevêtrements fibrillaires et la protéine Tau

En plus des lésions impliquant l'amyloïde, les neurones en cours de dégénérescence dans les cerveaux Alzheimer présentent des inclusions filamenteuses intracellulaires (ou enchevêtrements fibrillaires) que l'on retrouve dans plusieurs autres situations pathologiques, telles la maladie de Pick (Mimuro et al.; Rizzini et al.,

2000), la paralysie progressive supranucléaire (Barsottini et al.; Corsetti et al., 2008), la démence fronto-temporale liée au chromosome 17 (FTDP-17) (Guerrero et al., 2009; Nagahara et al., 2009) et la dégénérescence corticobasale (Colodner & Feany, 2010). Dans toutes ces situations, les enchevêtements fibrillaires découlent essentiellement d'un état d'hyperphosphorylation d'une protéine du cytosquelette, la protéine Tau (Badiola et al., 2010; Medina, 2011). Une caractéristique propre à la maladie d'Alzheimer est que les enchevêtements fibrillaires se retrouvent exclusivement dans les neurones, alors que dans les autres affections, les enchevêtements en question affligen également les cellules gliales (Martinez-Coria et al., 2010).

La protéine Tau est une macromolécule essentielle requise pour la stabilité du transport neuronal qui se lie principalement au système axonal des microtubules. Dans l'état d'hyperphosphorylation, la protéine Tau en arrive à se détacher des microtubules axonaux pour ainsi se conformer en paire de filaments appariée en hélice (PHF; sigle de l'anglais “paired helical filament”). Ils finissent ultimement par former des amas de neurofibrilles (en anglais “Tangle”) causant une neurodégénérescence fibrillaire progressive (Figure 1.5). Les substances nécessaires au fonctionnement du neurone ne pouvant plus être acheminées jusqu'au corps cellulaire par le système de microtubules, le neurone finit éventuellement par mourir (Badiola et al., 2010).

1.2.4.1 La protéine Tau : isoformes et phosphorylation

Les protéines Tau jouent un rôle essentiel dans la polymérisation et la stabilisation des microtubules, la croissance des dendrites et le transport axonal, mais exercent également des interactions avec le cytosquelette de la membrane plasmique permettant ainsi l'ancrege de

diverses enzymes (Massicotte & Baudry, 2004; Takahashi et al., 2002). Chez l'humain, le gène de la protéine Tau est situé sur le chromosome 17. Il s'agit d'un gène d'environ 100 kilo-base (Kb) constitué de 16 exons (Andreadis et al., 1992). L'épissage alternatif de l'ARN messager (ARNm) primaire entraîne la synthèse de plusieurs isoformes différents caractérisée par la présence ou l'absence de trois types d'insertions (Figure 1.5). En somme, les protéines Tau constituent une famille de protéines possédant de 352 à 441 acides aminés, avec des poids moléculaires se situant entre 45 et 62 kilo-Dalton (kDa). L'expression de ces différents isoformes est évolutive au cours du développement. Chez l'adulte, six isoformes sont exprimées dans le cerveau, tandis que chez le fœtus, une seule (la plus courte) est présente. Il est à souligner que l'on retrouve également la protéine Tau dans le système nerveux périphérique, mais sous une forme particulière (Badiola et al., 2010; Thies & Mandelkow, 2007).

La phosphorylation de la protéine Tau est la principale modification post-traductionnelle qui ajuste le fonctionnement du système microtubulaire. Au cours du développement, la protéine Tau est transitoirement hyperphosphorylée par rapport à celle de l'adulte (Matteucci & Giampietro, 2010; Wang & Liu, 2008), conférant des propriétés plus dynamiques au réseau de microtubules dans les prolongements nerveux en croissance. De plus, la phosphorylation de Tau dans la région riche en proline, située en amont des motifs répétés, entraîne la dépolymérisation des microtubules. La phosphorylation des résidus 262 et 356 situés dans la région des motifs répétés (KXGS) module également l'affinité des protéines Tau pour les microtubules (Hardingham et al., 2002) (Figure 1.5). On envisage la possibilité que la

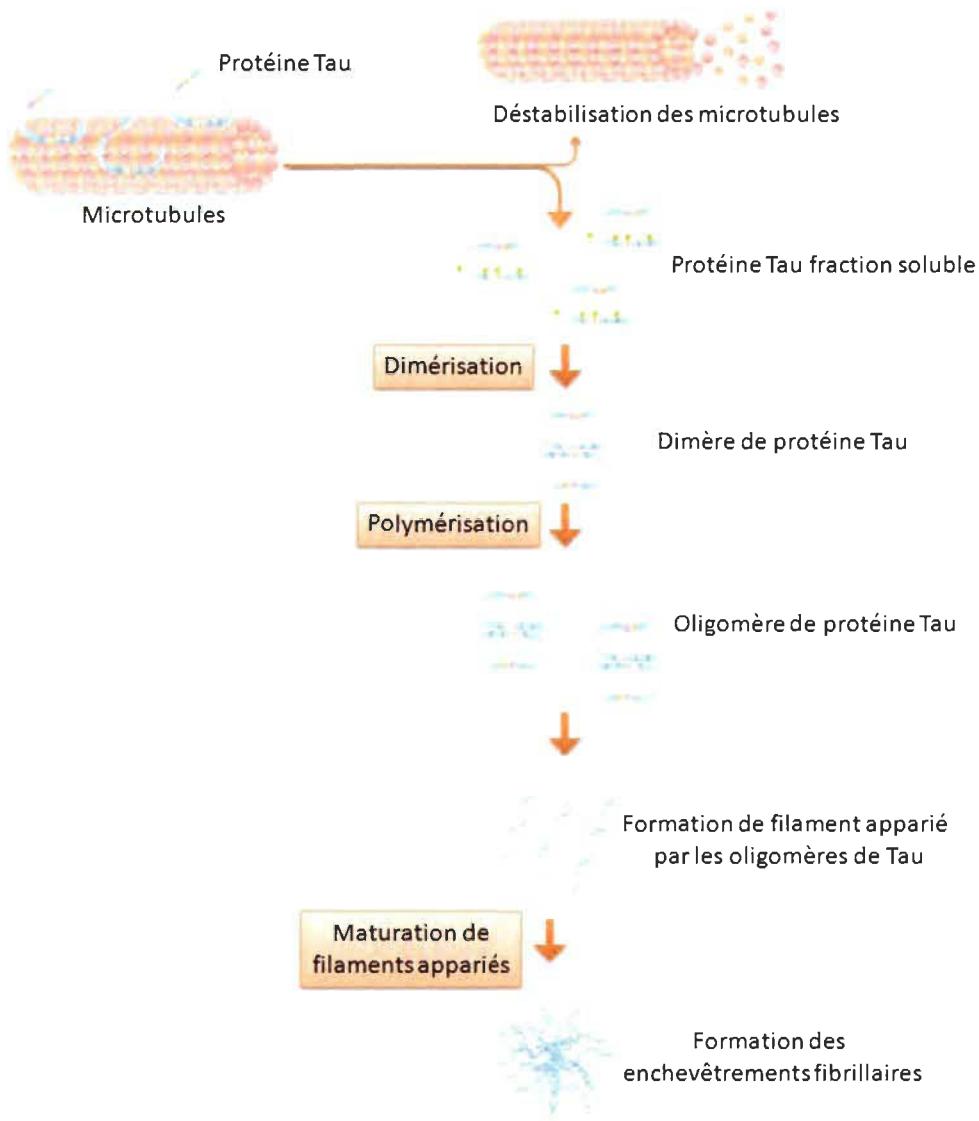


Figure 1.4 La dégénérescence neurofibrillaire.

Physiologiquement, des protéines Tau se détachent périodiquement des microtubules, sont remplacées et rapidement dégradées. Lorsqu'il y a une augmentation inhabituelle de phosphate sur certains sites, les protéines Tau se détachent des microtubules et s'accumulent dans le cytosol. Les protéines Tau s'enroulent alors l'une autour de l'autre pour former les filaments appariés en hélice.

phosphorylation puisse également jouer un rôle important dans la compartimentation de la protéine, puisqu'on a démontré que les protéines Tau retrouvées dans le compartiment somatodendritique démontrent un niveau de phosphorylation plus élevé (Papadia et al., 2008).

Or, les protéines kinases impliquées dans la phosphorylation des protéines Tau *in vitro* sont nombreuses puisqu'il existe près de 80 sites de phosphorylation différents sur cette protéine. Parmi les plus communes, citons les protéines kinases, dirigées contre les motifs riches en prolines (les PDPK) – comme les kinases dépendantes des cyclines (Cdk) –; la protéine kinase-3 β , connue pour affecter l'activité de l'enzyme glycogène synthase (GSK3 β); enfin la famille des kinases susceptibles de favoriser la phosphorylation des protéines associées aux microtubules (MAP-kinases), telles que les kinases ERK et SAPK. Parmi les kinases n'appartenant pas au groupe ciblant la région riche en prolines, on retrouve les kinases régulatrices de l'affinité pour les microtubules (les MARK), la phosphorylase K, la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) et la Tau-tubuline kinase. Outre les kinases, plusieurs données expérimentales démontrent également qu'il existe un équilibre phosphorylation-déphosphorylation des protéines Tau, réglé principalement par des enzymes de déphosphorylation impliquant, par exemple, les phosphatases 1, 2A et 2B (Patrick et al., 1999; Wang & Liu, 2008).

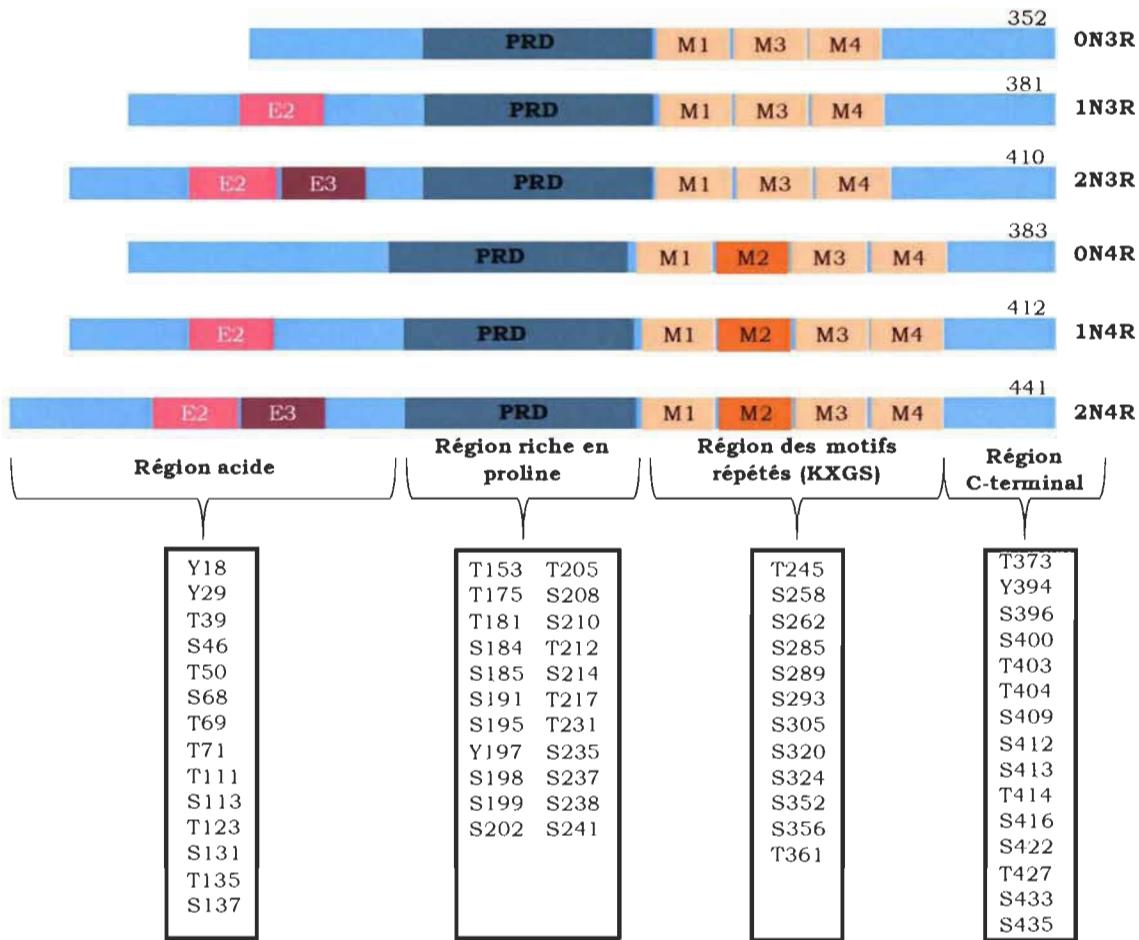


Figure 1.5 La protéine Tau et ses isoformes.

Suite à un épissage alternatif, le gène de la protéine Tau se traduit en 6 isoformes. Ces isoformes diffèrent par l'absence ou la présence d'un ou deux inserts N-terminal codés par l'exon 2 (boîte rose pâle) et 3 (boîte rose foncé), ainsi que la présence de trois ou quatre régions de répétition codées par les exons 9, 11, 12 (boîtes orange pâle) et 10 (boîte orange foncé) dans la partie C-terminale. La protéine est divisée en quatre régions distinctes comprenant la région acide, riche en proline, à motifs répétés et C-terminal offrant au total près de 80 sites de phosphorylation.

1.2.4.2 État de la protéine Tau dans la maladie d'Alzheimer

Un marquage positif des PHF Alzheimer peut être observé avec des anticorps dirigés contre de multiples protéines comme l'apolipoprotéine E, des protéines du cycle cellulaire, les glycoaminoglycans/protéoglycans, les neurofilaments et l'ubiquitine. Cependant, en immunohistochimie, on préconise davantage la mise en évidence des PHFs Alzheimer en ciblant des sites anormalement phosphorylés de la protéine Tau. La majorité des analyses *post-mortem* indiquent que les protéines Tau isolées des PHFs Alzheimer sont anormalement phosphorylées et qu'elles possèdent des sites pathologiques de phosphorylation qui leur sont spécifiques. Par exemple, les PHFs peuvent être dévoilés par l'utilisation d'anticorps tels que l'AP422/988 reconnaissant l'état d'hyperphosphorylation du résidu Ser422, l'AT100 dirigé contre les sites hyperphosphorylés Ser212/214 et le PHF-27/TG3 ciblant les résidus hyperphosphorylés Thr231/235 de la protéine Tau (voir la Figure 1.5 afin de situer les résidus sur la protéine). Certains marquages immunologiques sont typiques de la pathologie Alzheimer, comme celui de la Ser422, qui n'est phosphorylée que dans les protéines Tau agrégées et non dans les protéines du cerveau sain. Selon toute vraisemblance, des études effectuées dans les cerveaux Alzheimer tendent à démontrer que dans le stade précoce de la maladie l'état d'hyperphosphorylation de la protéine afflige préférentiellement la Ser199, un résidu situé dans la région riche en proline de la protéine Tau (Maurage et al., 2003). Le mécanisme moléculaire produisant cet effet prématûré sur la protéine Tau n'est pas encore établi, mais on peut certes imaginer qu'il représente l'une des premières anomalies biochimiques susceptibles de contribuer à la pathologie neurofibrillaire.

Les approches thérapeutiques visant la protéine Tau sont évidemment axées vers le développement de drogues qui inhibent

l'activité des protéines kinases et/ou qui activent les protéines phosphatases dans le but de normaliser l'état de phosphorylation de la protéine (Iqbal & Grundke-Iqbal, 2004). Les approches impliquent, par ailleurs, l'administration des composés susceptibles de stabiliser le système microtubulaire (Michaelis et al., 2005; Zhang et al., 2005), de réduire l'agrégation de la protéine Tau (MacFabe et al., 2007) ou d'en favoriser la dégradation via des interactions avec des protéines impliquées dans les processus d'autophagie (Hoover et al., 2010). Un traitement visant à réduire l'agrégation de la protéine Tau a été testé, en phase II, sur 321 patients présentant des symptômes cliniques caractéristiques des stades précoce et modéré de la maladie d'Alzheimer. Or, les données cliniques répertoriées tendent à démontrer que l'inhibition de l'agrégation de la protéine Tau n'améliore guère les capacités cognitives des sujets soumis à l'action de ce traitement expérimental (Ballatore et al., 2010).

Ces résultats, certes décevants, corroborent toutefois une étude récente effectuée chez des souris transgéniques pour le gène Tau humain, qui développaient avec l'âge les manifestations caractéristiques de la dégénérescence neurofibrillaire. Étonnamment, la toxicité de Tau serait davantage l'apanage des fragments solubles de la protéine hyperphosphorylée retrouvés dans les compartiments dendritiques des neurones. Selon toute vraisemblance, ce dopage dendritique en protéine Tau pourrait engendrer des anomalies de la fonction synaptique et induire un dysfonctionnement de communication indispensable au maintien de l'intégrité neuronale (Thies & Mandelkow, 2007). Une hypothèse avancée depuis plusieurs années par le professeur Paul Greengard, supportant l'idée que la mort des neurones dans le cerveau Alzheimer est, avant toute chose, le résultat d'une perte inexorable de la fonction synaptique (c'est-à-dire synaptodégénérescence) (Takahashi et al., 2002).

Contrairement à la β -amyloïde, l'immunothérapie ciblant la protéine Tau est une approche encore peu documentée, essentiellement utilisée chez les modèles animaux reproduisant certaines manifestations de la maladie d'Alzheimer (M. S. Lee et al., 2000; Noble et al., 2003). Dans cette perspective, Asuni et ses collaborateurs ont immunisé des souris transgéniques présentant des dégénérescences neurofibrillaires avec un fragment issu de la protéine Tau (acides aminés 379 à 408). Une diminution des protéines Tau agrégées et un ralentissement dans les altérations comportementales ont été observés après l'administration du vaccin. Une autre étude préliminaire sur des rats transgéniques, immunisés avant l'apparition des altérations comportementales avec une protéine Tau recombinante tronquée, a montré que cette vaccination retardait les altérations cognitives, empêchait la formation de dégénérescences neurofibrillaires et réduisait les niveaux de Tau (Medina, 2011; Sigurdsson, 2008). Des études complémentaires seront bien sûr nécessaires pour valider la pertinence d'une immunothérapie ciblant la protéine Tau dans le cerveau humain.

1.3 Les récepteurs NMDA du neurotransmetteur glutamate

La communication entre les neurones du cerveau est évidemment d'une extrême importance pour la mise en œuvre des processus cognitifs. On considère aujourd'hui que chez les mammifères, les capacités de mémorisation s'expriment à la suite de modifications durables des synapses, structures qui permettent le passage des influx nerveux entre les cellules neuronales. Or, les études comportementales, biochimiques et électrophysiologiques tendent à démontrer que le stockage des souvenirs dans le système nerveux correspond à des changements de la force de communication synaptique impliquant le neurotransmetteur glutamate. Le glutamate, un acide aminé excitateur

très répandu dans le cerveau, joue un rôle primordial dans l'activation des neurones, et ce, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécialisés présentant des caractéristiques biochimiques variées. Ces derniers agissent d'une part en favorisant le passage rapide des influx nerveux au niveau de la synapse, d'autre part en régularisant la force de communication neuronale par des altérations des niveaux de calcium dans les structures postsynaptiques des neurones. De ce fait, le calcium jouerait un rôle prépondérant dans le développement de la potentialisation à long terme de la transmission synaptique hippocampale (Massicotte & Baudry, 2004).

Alors qu'on est normalement habitué à considérer les neurotransmetteurs comme des substances utiles au bon fonctionnement du cerveau, un grand nombre de données expérimentales nous indiquent que certains d'entre eux peuvent, curieusement, exercer des effets néfastes sur les neurones. De nos jours, on reconnaît que le glutamate peut, dans certaines circonstances, devenir une substance particulièrement toxique pour le cerveau. Les chercheurs ont, par exemple, démontré que la libération d'une grande quantité de glutamate permet d'engager une cascade biochimique délétère conduisant éventuellement à la mort des neurones. Les scientifiques utilisent fréquemment le terme d'excitotoxicité pour désigner cette forme de neurodégénérescence qui implique l'action néfaste du glutamate et autres acides aminés excitateurs apparentés, comme l'aspartate. Or, sur le terrain de l'excitotoxicité, les récepteurs du glutamate connus pour être sensibles à l'action du NMDA font vraiment figure de « diablotins moléculaires ».

1.3.1 La toxicité induite par le glutamate

La littérature scientifique est riche d'information quant à cette capacité du glutamate à agir comme agent toxique dans le cerveau. Par exemple, on reconnaît depuis plus de 30 ans l'excitotoxicité glutamatergique comme mécanisme initiateur des lésions cérébrales survenant à la suite d'une période ischémique. Dès 1966, Levine et Payan ont démontré que l'occlusion des carotides chez les rongeurs est à même de produire des dommages caractéristiques au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe (Levine & Payan, 1966). Selon toute vraisemblance, les effets délétères de l'ischémie dans cette région du cerveau passeraient initialement par une relâche accrue de glutamate et, subséquemment, par l'activation des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, comme le montre l'effet protecteur des molécules anti-NMDA que sont le MK801 et la kétamine (Church et al., 1988).

D'autres types de lésions cérébrales, en particulier celles consécutives à l'hypoglycémie, pourraient avoir la même origine. En effet, il a été démontré que les effets délétères des hypoglycémies expérimentales dans le cerveau des rongeurs sont enravés par l'administration préalable d'antagonistes NMDA (Wieloch, 1985). De même, les lésions de caractère traumatique paraissent s'accompagner d'une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate, les effets étant là aussi réduits par les antagonistes NMDA (Faden et al., 1989). On sait maintenant que c'est en grande partie la capacité des récepteurs NMDA à favoriser l'entrée de calcium dans les neurones qui serait un des éléments critiques du déterminisme de la mort cellulaire. De fait, la toxicité des récepteurs NMDA serait liée à de trop fortes augmentations de la concentration de calcium intracellulaire qui activerait une cascade de réactions enzymatiques impliquant notamment des caspases, et une production accrue de radicaux libres

qui détruirraient la cellule nerveuse. On rappellera à ce sujet que l'équipe du professeur Massicotte a déjà mis en évidence chez des souris transgéniques produisant une expression accrue de l'enzyme glutathionne peroxydase, une diminution des effets toxiques du glutamate dans un modèle *in vitro* d'ischémie cérébrale. L'article publié par ce groupe dans la revue *Proceedings of the National Academy of Sciences* implique que l'élimination des radicaux libres par l'enzyme en question serait à même de protéger les processus électrophysiologiques assurant le stockage des souvenirs dans le cerveau (Massicotte et al., 1991). Il va sans dire, la recherche de molécules susceptibles de freiner l'action néfaste des radicaux libres oxydatifs demeure toujours une voie privilégiée par les chercheurs dans le contexte du traitement des maladies neurodégénératives; bien qu'il existe depuis peu certaines évidences démontrant que la réduction du pouvoir oxydatif des cellules puisse malheureusement engendrer elle-même des effets délétères incompatibles avec le maintien des mécanismes régissant la durée de vie des organismes.

Bien que la relation entre les récepteurs NMDA et l'excitotoxicité soit bien établie, il n'en demeure pas moins que le grand défi actuel des scientifiques est de mettre en lumière la relation existante entre la phosphorylation de la protéine Tau et l'excitotoxicité. Initialement, les efforts se sont déployés vers l'étude des protéines kinases dépendantes du calcium énumérées précédemment, ce qui pour certains, peut paraître une hypothèse logique vue le rôle de celles-ci sur la protéine Tau. Une théorie qui, selon Tsai et ses collaborateurs, ferait intervenir plus particulièrement la protéine kinase Cdk5 (Patrick et al., 1999). En effet, les auteurs suggèrent que l'augmentation radicale de calcium conduit à l'hyperactivation de cette dernière par l'entremise d'une protéase cytosolique, la calpaïne (M. S. Lee et al., 2000; Patzke & Tsai, 2002). Des données prometteuses lorsque combinées à de récentes

études démontrant que cette action délétère de la Cdk5 conduit irrévocablement à la formation des agrégats de la protéine Tau non seulement chez l'animal (Noble et al., 2003), mais également chez les cerveaux de patients décédés des suites de la maladie d'Alzheimer (Augustinack et al., 2002).

1.3.2 Les récepteurs NMDA : ils ne sont pas tous toxiques

Au-delà des données pharmacologiques, celles plus récentes de la biologie moléculaire rendent plus complexe encore la notion d'excitotoxicité glutamatergique. De nos jours, les gènes de plus de 20 sous-unités protéiniques susceptibles de former des récepteurs au glutamate ont été clonés, dont six pour les récepteurs NMDA seulement (NR1, NR2A - NR2D ainsi que NR3). Les chercheurs ont démontré que dans les neurones de l'hippocampe, sensibles à la dégénérescence Alzheimer, les effets toxiques du glutamate découlent principalement de l'activation de récepteurs NMDA formés des sous-unités NR1/NR2B. On pense que ces récepteurs « toxiques » seraient préférentiellement localisés dans les segments extrasynaptiques de l'arborisation dendritique des neurones. On envisage l'hypothèse selon laquelle dans les segments synaptiques, où s'effectue la communication rapide des influx nerveux, les récepteurs NMDA soient formés principalement des sous-unités protéiniques NR1/NR2A. Ces récepteurs synaptiques semblent différer des autres récepteurs NMDA puisqu'ils auraient tendance à protéger les cellules neuronales. En fait, on soupçonne maintenant l'activation continue des récepteurs NR1/NR2A d'être indispensable au maintien de l'activation de mécanismes nécessaires requis pour la survie cellulaire, et à l'opposé, on pense que l'activation des récepteurs NR1/NR2B pourrait ultimement induire une cascade biochimique délétère. Conformément à cette hypothèse, des chercheurs

italiens ont récemment mis en évidence le fait que l'augmentation du nombre de récepteurs synaptiques NR1/NR2A est à même de réduire l'excitotoxicité induite par le NMDA dans une population de cellules rétiniennes portées en cultures (Matteucci & Giampietro, 2010).

Sur le plan mécanistique, de nombreuses observations biochimiques tendent à confirmer l'existence d'une relation potentielle entre le degré de survie cellulaire et le niveau d'expression de la protéine CREB (de l'anglais “CRE-binding protein”), une protéine exprimée dans toutes les cellules. Elle agit comme un facteur de transcription en se liant directement avec l'ADN du noyau cellulaire. En se liant spécifiquement aux éléments de réponse, dits séquences CRE (de l'anglais “cAMP response element”), CREB induirait la transcription de divers gènes. La fixation de ce facteur de transcription sur l'ADN requiert vraisemblablement la phosphorylation de la Ser133 de CREB, laquelle contribue à l'augmentation de synthèse de gènes favorisant l'expression de protéines gardiennes de l'intégrité cellulaire comme le BDNF (de l'anglais “brain-derived neurotrophic factor”) et la protéine c-fos (Papadia & Hardingham, 2007). Or, il appert que l'activité des récepteurs synaptiques NR1/NR2A accentue la phosphorylation de CREB, ce qui a pour conséquence de promouvoir la survie cellulaire (Hardingham et al., 2002; B. Lee et al., 2005; Papadia & Hardingham, 2007). Au contraire, la stimulation des récepteurs extrasynaptiques NR1/NR2B inhiberait la phosphorylation de CREB (Ivanov et al., 2006) et rendrait ainsi plus vulnérables les cellules soumises à un traumatisme excitotoxique. On ne sait toujours pas très bien comment les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques du NMDA peuvent affecter la progression de la pathologie Alzheimer. Or, le présent mémoire de maîtrise s'applique à élucider cette question en analysant l'influence des activités NMDA sur l'état de phosphorylation de la protéine Tau dans la région hippocampale du cerveau.

CHAPITRE II

HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

2.1 Rationnelle et hypothèse du projet de recherche

Le tout semblait relativement simple. En sachant que la suractivation des récepteurs NMDA pouvait contribuer à l'apparition de dommages neuronaux, il s'avérait bien sûr approprié de développer des outils thérapeutiques ciblant spécifiquement ces récepteurs. Or, dans le cas de la Mémantine, une molécule anti-NMDA spécifique, les données cliniques recueillies à ce jour tendent à démontrer que sur le plan neuropsychologique, les bénéfices de l'utilisation de cette molécule sont malheureusement mitigés. Ces données ne signent pas obligatoirement la fin de cette approche thérapeutique, mais elles nous rappellent que sur le plan pharmacologique, la découverte d'un médicament efficace pour le traitement de la démence Alzheimer ne se réalisera pas sans difficulté. En fait, pour les chercheurs initiés au domaine de la neurobiologie, il s'avère toujours impératif de cerner sur le plan fondamental les mécanismes sous-jacents au développement de cette terrible maladie.

Rappelons-le, la théorie de l'excitotoxicité glutamatergique postule que la mort des neurones dans le cerveau Alzheimer découle de la suractivation des récepteurs au glutamate, un phénomène particulièrement manifeste au niveau des neurones de l'hippocampe. Or, les données expérimentales des dernières années apportent un éclairage nouveau quant à l'implication potentielle des récepteurs NMDA dans la mise en œuvre des mécanismes de la neurodégénérescence. Elles révèlent que les effets toxiques du glutamate découlent principalement de l'activité des récepteurs NR1/NR2B situés dans les composantes

extrasynaptiques de l'arborisation dendritique. Fait étonnant, l'activation des récepteurs synaptiques formés des sous-unités NR1/NR2A favoriserait, pour sa part, l'activation de mécanismes intracellulaires reconnus pour enrayer l'apparition de dommages infligés aux neurones du cerveau. Ces travaux nous invitent donc à poser un regard différent sur l'implication des récepteurs NMDA dans la maladie d'Alzheimer et nous conduisent à imaginer que l'inactivation des récepteurs NR1/NR2A par des molécules anti-NMDA non spécifiques peut s'avérer dommageable pour les neurones. Or, dans la mesure où la phosphorylation de la protéine Tau constitue une étape cruciale liée au dysfonctionnement neuronal lors de la maladie d'Alzheimer, je me suis intéressée à la possibilité selon laquelle l'inactivation des récepteurs NR1/NR2A par les antagonistes NMDA puisse, en fait, contribuer au développement de cette manifestation histopathologique. Dans cette perspective, le présent projet de maîtrise s'efforcera de répondre aux quatre (4) questions suivantes :

Est-ce que la phosphorylation de la protéine Tau est accentuée après l'inactivation des récepteurs NR1/NR2A?

Le premier volet de ce travail de maîtrise en neurobiologie consiste à évaluer la possibilité qu'un état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau se manifeste dans le temps après l'inactivation des récepteurs NR1/NR2A situés dans l'hippocampe. Rappelons que c'est dans cette région du cerveau qu'on observe généralement les premières manifestations histopathologiques de l'Alzheimer. Cette question implique l'utilisation d'un antagoniste sélectif des récepteurs NR1/NR2A, le NVP-AAM077 (ou NVP), et consiste à évaluer par la technique d'immunobuvardage de type Western, l'état de phosphorylation de la protéine Tau isolée à partir de tranches minces d'hippocampe de rats. Or, les données préliminaires obtenues dans le

cadre de ce projet laissent présager que l'inactivation des récepteurs synaptiques NR1/NR2A aboutit à une hausse de l'état de phosphorylation de Tau sur le site Ser199 de la protéine. Une première série d'expériences viendra vérifier si l'accroissement de la phosphorylation évolue dans le temps et si elle survient simplement à la suite d'une augmentation du contenu intracellulaire de la protéine Tau.

Est-ce que l'état d'hyperphosphorylation intéresse d'autres sites de la protéine Tau?

On sait que Tau possède à elle seule près de 80 sites de phosphorylation, lesquels sont distribués dans des domaines distincts de la protéine. De ce fait, des expériences sont prévues afin de vérifier si l'hyperphosphorylation du site Ser199 induite par le NVP implique également des changements de l'état de phosphorylation de sites situés dans d'autres domaines de la protéine. Nous mettrons ici l'accent sur l'analyse de deux (2) sites de phosphorylation situés dans les domaines de liaison des microtubules (c'est-à-dire le site Ser262) de même que dans le domaine C-terminal (c'est-à-dire le site Ser409) de Tau. On pense que le domaine C-terminal de la protéine Tau pourrait être susceptible d'interagir avec les filaments d'actine.

Est-ce que l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau implique la participation des protéines kinases activables par l'ion calcium?

On a appris au fil du temps que l'état de phosphorylation du site Ser199 est sous l'influence de protéines kinases comme la Cdk5 et la GSK3. À propos de ces enzymes, il semble que leur activité dépend directement (ou indirectement) des variations intracellulaires en ions calcium. Pour comprendre davantage les mécanismes responsables de

l'hyperphosphorylation du site Ser199, des expériences seront effectuées afin d'établir l'implication potentielle du calcium et des protéines kinases Cdk5 et GSK3. On tirera ici avantage des nombreux composés pharmacologiques piégeurs de l'ion calcium et inhibiteurs des protéines kinases Cdk5 et GSK3.

Est-ce que l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau implique des perturbations compensatoires des récepteurs glutamatergiques NR1/NR2B?

Dans de nombreux travaux effectués sur des neurones portés en cultures, l'inhibition des récepteurs NMDA par divers antagonistes généraux, comme l'AP-5 et le MK-801, semble entraîner des perturbations inhabituelles des récepteurs glutamatergiques, et ce, en faveur d'un accroissement compensatoire de certaines sous-unités formant la famille des récepteurs ionotropes de type AMPA (Sutton et al., 2006). Ce phénomène se traduit, par exemple, par une hausse des sous-unités GluR1 dans les membranes neuronales qui, d'un point de vue opérationnel, favorise l'entrée d'ions calcium dans les neurones. Ainsi, une dernière série d'expériences est prévue pour vérifier si l'hyperphosphorylation de Tau induite par le NVP implique des perturbations de l'flux calcique par les canaux ionotropes glutamatergiques de type AMPA ou NMDA. Là encore, cette possibilité sera validée par l'utilisation de composés pharmacologiques reconnus pour inactiver la fonction des différents sous-types de récepteurs glutamatergiques.

2.2 Originalité de la recherche proposée

À l'origine, les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs NMDA laissaient entrevoir une relative simplicité quant au traitement de

maladies neurodégénératives impliquant le processus d'excitotoxicité glutamatergiques. À l'évidence, les informations récentes démontrant que l'activation de certains sous-types de récepteurs NMDA est nécessaire pour contrer les mécanismes de la mort neuronale nous invitent à reconsidérer la théorie actuelle qui prône l'utilisation de molécules anti-NMDA non spécifiques pour le traitement de la démence Alzheimer. Or, le présent mémoire s'intéresse à cette problématique et on peut d'ores et déjà imaginer que les retombées de nos recherches sur l'implication des récepteurs NR1/NR2A dans le contrôle de la phosphorylation de Tau pourront s'avérer cruciales quant au développement de substances spécifiques susceptibles de réduire la toxicité induite par cette protéine dans les cerveaux Alzheimer.

CHAPITRE III

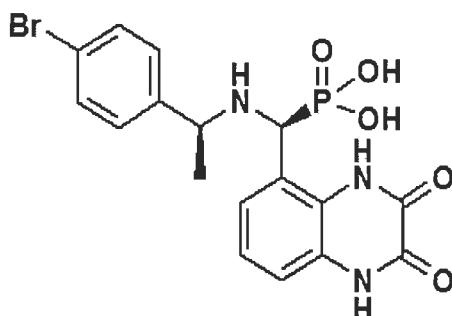
MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

Les substances pharmacologiques et les protocoles expérimentaux requis pour répondre aux grands objectifs précédemment énoncés sont décrits dans l'article scientifique qui constitue le cœur de ce mémoire. Pour le lecteur, il s'avère toutefois important de préciser, d'entrée de jeu, les caractéristiques pharmacologiques des antagonistes NMDA. Les généralités concernant l'utilisation du modèle de tranches d'hippocampe de même que les informations relatives à la purification des membranes dites de surfaces sont exposées dans les sections subséquentes.

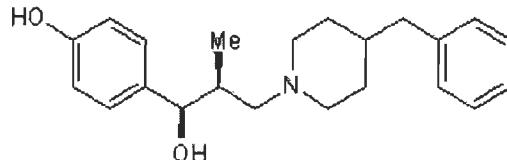
3.1 Les antagonistes des récepteurs NMDA

Nombre d'études portant sur la fonction des récepteurs NMDA ont été effectuées avec l'aide d'antagonistes généraux comme l'AP-5 et le MK-801. Au fil du temps, des antagonistes agissant plus spécifiquement sur les récepteurs synaptiques NR1/NR2A, ou encore sur les récepteurs extrasynaptiques NR1/NR2B ont été développés. La compagnie Novartis (un collaborateur important dans le cadre du présent ouvrage) a développé un antagoniste capable d'interférer préférentiellement avec la mise œuvre des courants synaptiques dépendants des récepteurs NMDA de type NR1/NR2A. Le produit en question, le NVP, est reconnu pour bloquer presque exclusivement l'activation des récepteurs NR1/NR2A, et ce, sans affecter les réponses des récepteurs extrasynaptiques de type NR1/NR2B; du moins à une concentration n'excédant pas 50 nM (Martel et al., 2009). L'inverse est vrai pour le composé RO25-6981 (RO), qui s'intéresse davantage à l'inactivation préférentielle des récepteurs

NR1/NR2B, à une concentration qui ne dépasse pas le 1 µM. La structure chimique des molécules utilisées est présentée à la figure 3.1.



NVP-AAM077



RQ25-6981

Figure 3.1 Les antagonistes des récepteurs NMDA.

Le NVP est un antagoniste relativement propre aux récepteurs NMDA formés des sous-unités NR1/NR2A, alors que RO est plutôt l'apanage des récepteurs formés des sous-unités NR1/NR2B.

3.2 Les tranches d'hippocampe de rats

On a examiné l'effet de l'inactivation des récepteurs NR1/NR2A synaptiques sur l'état de phosphorylation de la protéine Tau dans une préparation de tranches d'hippocampe de rats. Cette préparation s'avère des plus intéressantes puisqu'on peut y étudier une panoplie de processus physiologiques, comme le comportement électrophysiologique des cellules nerveuses de même que les phénomènes de plasticité fonctionnelle que sont la potentialisation et la dépression à long terme de la transmission synaptique. La procédure vise essentiellement à maintenir en vie pendant plusieurs heures les neurones hippocampiques en plaçant des tranches minces de cette structure du

cerveau dans une chambre perfusée par un liquide cérébrospinal artificiel (ou ACSF) saturé en oxygène. La procédure exige que l'animal soit d'abord soumis à une légère anesthésie, puis décérébré. Le cerveau est ensuite placé dans une boîte de Pétri maintenue sur la glace afin d'y prélever les portions corticales du cerveau. Le bloc de tissu est alors collé sur un support à Vibratome avec lequel des coupes frontales du cerveau sont préparées. De ces coupes de cerveau, on isole chirurgicalement des tranches d'hippocampe d'une épaisseur de 350 µm (Figure 3.2).

Cette approche expérimentale assure que les régions spécifiques de l'hippocampe gardent leur intégrité fonctionnelle et morphologique. On sait, par exemple, que les neurones hippocampiques maintenus dans de telles conditions sont en mesure de conserver leur capacité à induire spontanément des réponses synaptiques glutamatergiques qui impliquent, entre autres, l'activation des récepteurs NMDA. Partant, nous avons exploité ce modèle *in vitro* pour étudier les relations potentielles existant entre l'activation des récepteurs NMDA et le statut de la protéine Tau.

3.3 Le dosage membranaire des récepteurs au glutamate

On sait que bon nombre de substances pharmacologiques sont à même de dérégler l'organisation des protéines se trouvant normalement à la surface des membranes neuronales. Dans la présente étude, nous avons évalué cette possibilité en effectuant le dosage des récepteurs membranaires du glutamate, et ce, à la suite de l'inactivation des récepteurs NMDA. Les étapes relatives à cette approche sont bien décrites dans l'article accompagnant cet ouvrage. Le lecteur se rappellera toutefois que les expériences concernant le dosage des

récepteurs glutamatergiques exigent au préalable la purification des membranes de surface par une technique dite de biotinylation. La biotine, utilisée sous la forme *N*-Hydroxysulfosuccinimide (NHS-SS-biotin), est un agent qui se voit capable de fixer uniquement tout ce qui se trouve à la surface des membranes cytoplasmiques (Hall et al., 1997; Holman & Henley, 2007). Ces membranes riches en biotine sont ensuite isolées par fixation à des billes de streptavidine. Les protéines membranaires sont finalement obtenues en exposant pendant quelques minutes le mélange lié à la streptavidine à une solution bouillante légèrement acide contenant du glycérol, du β-mercaptopropanoïde et du bleu de bromophénol. L'approche permet, au final, d'étudier par immunobuvardage de type "Western blot" le comportement spécifique des récepteurs de surface, une information qui sera capitale afin de vérifier si des processus compensatoires sont mis en œuvre au cours de l'inactivation des récepteurs par les antagonistes NMDA.

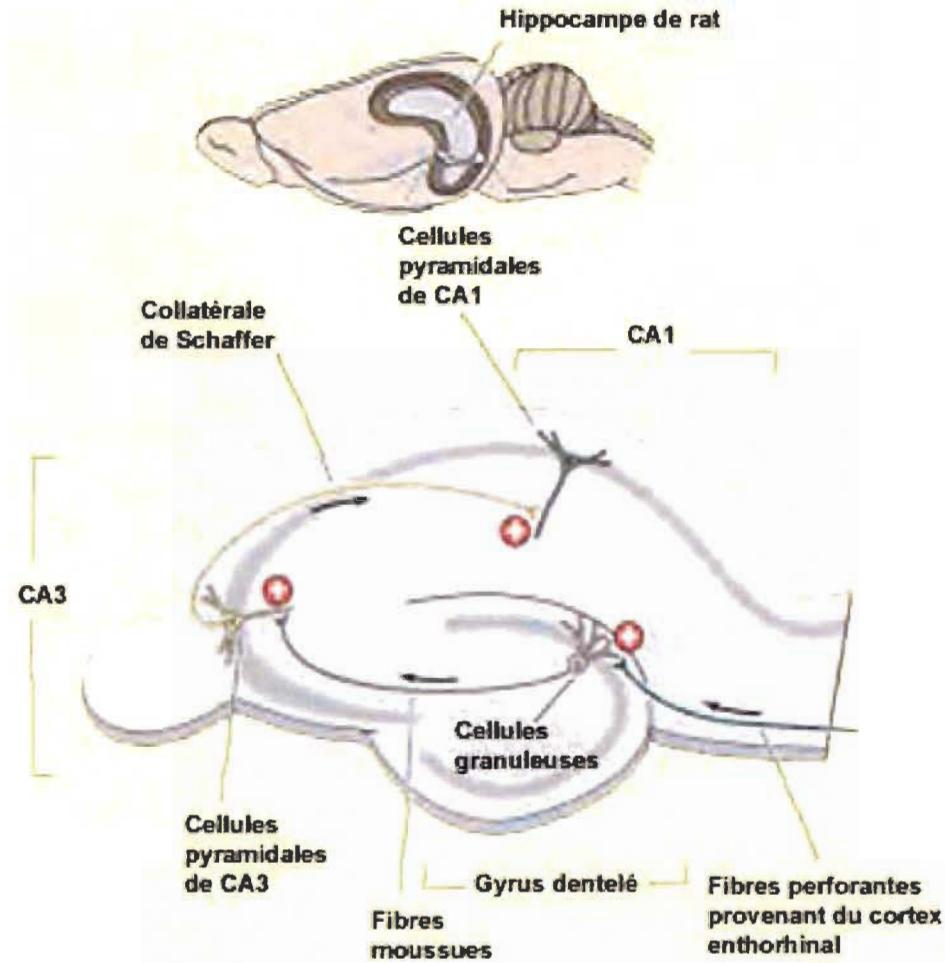


Figure 3.2 Caractéristiques morphologiques des tranches d'hippocampe.

L'hippocampe est souvent considéré comme un carrefour unidirectionnel crucial pour le traitement de l'information. L'entrée des influx nerveux se fait par les projections émanant du cortex entorhinal. Ces projections font synapses avec les neurones du gyrus dentelé. De cette région de l'hippocampe, partent alors les fibres moussues qui font synapses avec les dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA3. Les projections de l'aire CA3 se ramifient et forment les fibres collatérales de Schaeffer qui font synapses avec les cellules pyramidales de l'aire CA1; ce dernier secteur de l'hippocampe étant particulièrement riche en récepteurs NMDA.

CHAPITRE IV

BLOCKADE OF NR2A-CONTAINING NMDA RECEPTORS INDUCES TAU PHOSPHORYLATION IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES

Résumé

Les récepteurs NMDA du glutamate sont connus pour participer à l'élaboration des mécanismes physiologiques de la mémoire et de l'activation de processus intracellulaires délétères menant à la mort des neurones. Dans la présente étude, l'implication des sous-unités NR2A et NR2B dans l'effet modulateur de l'activité des récepteurs NMDA sur la phosphorylation de la protéine Tau est étudiée. En présence de l'antagoniste des récepteurs NR1/NR2A (NVP-AAM077), les tranches d'hippocampes de rats présentent une hausse de l'état de phosphorylation de la protéine Tau sur un résidu situé dans le domaine riche en proline (i.e. Ser199). Cet effet s'avère vraisemblablement spécifique n'affectant que minimalement la phosphorylation des résidus Ser262 et Ser409 situés, respectivement, dans les domaines de liaison aux microtubules et dans la portion C-terminale de la protéine Tau. D'un point de vue moléculaire notre étude a révélé que cette hausse de phosphorylation du résidu Ser199, résultant de l'inactivation des récepteurs synaptiques NR1/NR2A, découle d'une entrée de l'ion calcium dans les neurones hippocampiques et de l'activation subséquente d'une protéine kinase spécifique, la protéine kinase dépendante des cyclines (Cdk5). Selon toute vraisemblance, l'hyperphosphorylation induite à la suite de l'inactivation des récepteurs NR1/NR2A serait la conséquence d'une altération des membranes neuronale qui favoriserait une accumulation inhabituelle des récepteurs NR1/NR2B à la surface cellulaire. Ces données suggèrent que le traitement des maladies neurodégénératives caractérisées par un état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau, comme dans la pathologie

Alzheimer, ne devrait pas impliquer l'inactivation des récepteurs NMDA de type NR1/NR2A.

Mots clés : Récepteurs NMDA, sous-unités NR2A, protéine Tau, hyperphosphorylation

Contribution des auteurs de l'article

L'article scientifique qui constitue le cœur de cet ouvrage a fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Neural Plasticity*. Étant première auteure de l'article, j'ai rédigé cet ouvrage suivant les conseils judicieux de la part de mes directeurs de recherche, les professeurs Guy Massicotte et Michel Cyr. L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette maîtrise est le fruit du travail de recherche expérimental accompli par moi-même, Julie Allyson. Seules les expériences de biotinylation concernant l'étude des modifications des récepteurs membranaires du glutamate ont été effectuées par Eve Dontigny, candidate à la maîtrise en biophysique et biologie cellulaires.

Publication de l'ouvrage : Neural Plasticity, Volume 2010, Article ID 340168, 10 pages doi:10.1155/2010/340168

**Blockade of NR2A-containing NMDA Receptors Induces Tau
Phosphorylation in Rat Hippocampal Slices**

***Julie ALLYSON, *Eve DONTIGNY, **Yves AUBERSON
*Michel CYR and *Guy MASSICOTTE**

*Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada

**Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland

Number of pages: 32
Number of figures: 6
Number of words: 6,927

Corresponding author's address: **Guy Massicotte, Ph.D.**
Département de chimie-biologie
U.Q.T.R.
C.P. 500
Trois-Rivières, Québec
Canada G9A 5H7
Telephone: (819) 376-5053
Fax: (819) 376-5084
E-mail: Guy.Massicotte@uqtr.ca

Summary

Physiological activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of glutamate receptors has been proposed to play a key role in both neuronal cell function and dysfunction. In the present study, we used selective NMDA receptor antagonists to investigate the involvement of NR2A and NR2B subunits in the modulatory effect of basal NMDA receptor activity on the phosphorylation of Tau proteins. We observed, in acute hippocampal slice preparations, that blockade of NR2A-containing NMDA receptors by the NR2A antagonist NVP-AAM077 provoked the hyperphosphorylation of a residue located in the proline-rich domain of Tau (i.e. Ser199). This effect seemed to be Ser199 specific as there was no increase in phosphorylation at Ser262 and Ser409 residues located in the microtubule-binding and C-terminal domains of Tau proteins, respectively. From a mechanistic perspective, our study revealed that blockade of NR2A-containing receptors influences Tau phosphorylation probably by increasing calcium influx into neurons, which seems to rely on accumulation of new NR1/NR2B receptors in neuronal membranes and could involve the cyclin-dependent kinase 5 pathway.

1. Introduction

The N-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype of ionotropic glutamate receptors is known to play essential roles in the mammalian central nervous system [1-3]. For instance, in several pathological circumstances associated with neuronal damage, excessive levels of calcium influx through NMDA receptor channels are well-recognized to promote cell death mechanisms, such as excitotoxicity and apoptosis [4, 5]. Over the years, however, a growing number of reports have revealed that, in contrast to the destructive effects of excessive NMDA receptor activity, synaptic NMDA receptor stimulation under physiological conditions could result in the activation of prosurvival mechanisms [6-9]. Along this line, tonic activation of NMDA receptors in hippocampal neurons was demonstrated to be important in maintaining synaptic stability, through a mechanism involving modulation of dendritic protein synthesis. In fact, it has been reported that tonic NMDA receptor activation acts as a crucial mechanism regulating calcium mobilization in neurons, as NMDA receptor deprivation rapidly increases the synaptic expression of surface GluR1 subunits and the incorporation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors at synapses [10].

There are also several indications that physiological levels of NMDA receptor activation could play an active role in regulating cytoskeleton integrity and function. For example, a recent study by Fiumelli et al. [11] revealed that suppression of NMDA receptor activity by global antagonists (MK801 or AP5) can interfere with both phosphorylation and solubility of neurofilament subunit M in isolated cortical neurons. In this particular case, neurite outgrowth is promoted by the inactivation of NMDA receptors, suggesting that basal levels of NMDA receptor activity are crucial for regulating cytoskeleton stability and growth processes. Some authors have reported that tonic NMDA receptor activity in

cerebellar granule cells and hippocampal neurons also regulates microtubule-associated protein 2 (MAP2) phosphorylation and neurite growth in the cerebellum [12, 13], while others have shown that activation of NMDA receptors in physiological conditions is likely to influence Tau phosphorylation in the hippocampal area [11, 14]. Tau proteins are well-known for their involvement in the outgrowth of neural processes, the development of neuronal polarity and the maintenance of normal neuron morphology [15]. Several investigations have demonstrated that disruption of normal Tau phosphorylation could be a key factor contributing to neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) [16-18].

Although the detailed molecular mechanisms by which NMDA receptors can regulate both physiological and pathophysiological processes remain to be elucidated, it has been proposed that NMDA receptor function may be highly dependent on the composition of their subunits, which are heteromeric assemblies of at least 1 NR1 subunit and various NR2 (A-D) subunits [19-21]. In the hippocampus, extensive evidence indicates that, in the mature stage, pyramidal cells mainly express NMDA receptors containing NR1/NR2A and NR1/NR2B subunits [22]. From a functional perspective, it has been argued by many that NR1/NR2A subunit activation could favour the action of pro-survival mechanisms, whereas NR1/NR2B subunit stimulation could lead to neuronal cell death by the involvement of various damaging signalling pathways [23, 24]. Accordingly, using different pharmacological agents, we observed that the tonic stimulation of NR2A-containing NMDA receptors in acute hippocampal slices might be a crucial component influencing Tau phosphorylation.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics approval. Animal care procedures were reviewed by the Institutional Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières and found to be in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

2.2. Animals and pharmacological agents. Male Sprague-Dawley rats (6-7 weeks of age), purchased from Charles River Laboratories (Montréal, QC, Canada), were housed for 1 week prior to any experiments in a temperature-controlled room, with free access to laboratory chow and water. The selective NR2A antagonist NVP-AAM077 (NVP) was a gift from Dr. Yves Auberson (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland). NR2B (RO25-6981) and AMPA (NBQX) receptor antagonists were obtained from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA), while the glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) inhibitor SB-216367 were procured from BioMol (Plymouth, PA, USA). Cyclin-dependent kinase 5 (roscovitine), calpain (calpeptin) as well as protease and phosphatase inhibitor cocktails were acquired from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The membrane-impermeable and the membrane-permeable calcium chelator BAPTA were purchased from BioMol (Plymouth, PA, USA). The biotinylation reagent Sulfo-NHS-SS-Biotin was bought from Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada). All other chemicals were supplied by Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

2.3. Antibodies. Most antibodies reacting with Tau proteins were purchased from AbCam (Cambridge, MA, USA). The mouse polyclonal antibody Tau-5 was used (dilution 1:500) to estimate the total levels of Tau proteins in hippocampal extracts, along with rabbit polyclonal antibodies recognizing Tau phosphorylated at Ser199 (dilution 1:1,000), Ser262 (dilution 1:1,000), and Ser409 (dilution 1:1,000). GAPDH

antibody also was purchased from AbCam, and rabbit polyclonal antibodies against NR1- (dilution 1:200), NR2A- (dilution 1:200) and NR2B-containing (dilution 1:200) NMDA receptors were obtained from Santa Cruz Biotechnology (San Diego, CA, USA). Rabbit anti-GluR1 (dilution 1:20) was provided by Calbiochem. Goat anti-rabbit or goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies (dilution 1:5,000) and SuperSignal chemiluminescent substrate kits were from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA).

2.4. Hippocampal slices and tissue samples. Sprague-Dawley rats were anesthetized by isoflurane inhalation (Baxter Corp., Toronto, ON, Canada) and decapitated. Their brains were quickly removed and placed in cold cutting buffer containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.3 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ and 11 mM glucose, saturated with 95% O₂/5% CO₂ (pH 7.4). Coronal brain sections of 350 µm containing the hippocampus were sliced in a Vibratome Series 1000 tissue sectioning system (Technical products international Inc., St. Louis, MO, USA). Sections were then transferred to artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 1.3 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃ and 11 mM glucose, bubbled continuously with 95% O₂/5% CO₂ at 32°C. The brain sections were pre-incubated for 60 min before pharmacological treatment. After pharmacological treatment, hippocampal slices were dissected from the brain sections and homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktails.

2.5. Cell surface biotinylation. Hippocampal slices were incubated for 2 hr with or without NVP-AAM0077. After several washes with ACSF bubbled constantly with 95% O₂/5% CO₂, each hippocampal slice was

incubated in 1 mg/ml sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido) ethyl-dithiopropionate (sulfo-NHS-SS-biotin), followed by several washes with sulfo-NHS-SS-biotin blocking reagent (50 mM NH₄Cl in PBS containing 1 mM MgCl₂ and 0.1 mM CaCl₂) at 4°C to quench free sulfo-NHS-SS-biotin, followed by more than a few washes in ACSF at 4°C. Each slice was homogenized in 100 µl of Tris-acetate buffer (50 mM, pH 7.4) containing 1 mM EGTA, 1 mM EDTA and numerous protease and phosphatase inhibitors (leupeptin 10 µM, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 µg/ml, and N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone 1 µg/ml). The samples were centrifuged for 10 min at 11,070 rpm at 4°C. The supernatants were removed and the pellets were suspended in fresh, ice-cold Tris acetate buffer. Streptavidin beads (50 µl/300 µg of proteins) were washed 3 times with Tris acetate buffer. Biotinylated samples (300 µg of protein) were added to the beads and mixed at room temperature for 4 hr. The beads were recovered by brief centrifugation, and the supernatants were removed. The beads were washed 3 times with Tris acetate buffer, and biotinylated samples were eluted from the beads with 4 X sodium dodecyl sulphate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) loading buffer (containing β-mercaptoethanol) at 100°C for 10 min. The supernatants were removed, and biotinylated protein levels were detected by SDS-PAGE and immunoblotting.

2.6. Western blotting. Protein levels extracted from rat hippocampus sections were measured by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Electrophoresis of protein lysates (40 µg), except for the NR2B subunits which required 80 µg of homogenized protein, was performed on 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and nonspecific binding sites were blocked by incubation for 1 hr at room temperature in phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 5% bovine serum albumin (BSA)

fraction V) purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA). Then, selected primary antibodies were incubated overnight at 4°C. After several washes with 0.1% Tween 20, the blots were incubated for 2 hr at room temperature in specific secondary HRP-conjugated antibody solution. Both primary and secondary antibodies were diluted in TBS/0.1% Tween 20/1% BSA. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence reactions, and the intensity of the bands was quantified by densitometric scanning through Vision Work LS software (UVP Bioimaging, Upland, CA, USA). The densitometry data were expressed as relative optical density.

2.7. Statistical analysis. The results are expressed as mean average ± SEM. Statistical significance of the changes was determined using Graph Prism version 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). P<0.05 values were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Blockade of NR2A-containing NMDA receptors selectively enhances phosphorylation of Tau proteins at Ser199 residues. In this study, we investigated the influence of tonic NMDA receptor activity on Tau status by quantifying phosphorylation and protein levels in the hippocampus. Acute hippocampal slices from rats were treated for different time periods with NMDA receptor antagonists and then processed by Western blotting. We first examined Tau phosphorylation levels on Ser199 after pre-incubating hippocampal slices with NVP-AAM077 (NVP) and R025-6981 (RO), 2 compounds that preferentially block, respectively, NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. Our experiments were performed with 50 nM NVP and 1 μ M RO, concentrations that are known to be highly selective for NR2A and NR2B, respectively [25, 26]. In initial experiments, we observed that hippocampal tissues were strongly and consistently stained with an antibody recognizing the phosphorylated Ser199 epitope of a Tau isoform estimated to 62 kDa (Figure 1, top panels). As presented in the Figure 1 histogram, we observed that this Tau isoform became progressively hyperphosphorylated at the Ser199 residue after blockade of NR2A-containing NMDA receptors with NVP (Figure 1, black bars). In fact, when normalized with Tau-5 (an antibody that recognized phosphate-independent epitopes of Tau), it became evident that overtime NVP elevated phosphorylated Tau levels at its Ser199 site, with a maximal increase observed in slices pre-incubated for a period of 2 hr ($n=5$, $P<0.01$). Time-course analysis showed, however, that Ser199 was not subjected to substantial change in phosphorylation after exposure to the NR2B antagonist RO (Figure 1, grey bars). It is noteworthy that treatments of rat hippocampal slices with both NVP and RO failed to produce significant changes in Tau-5 staining intensity (Figure 1, top panels), indicating that Ser199 hyperphosphorylation resulting from

blockade of NR2A-containing receptors is not dependent on variations in Tau synthesis and/or degradation.

So far, Tau has been found to possess 70 different phosphorylation sites. The Ser199 epitope is known to be located in the proline-rich domain of Tau proteins. This observation led us to investigate whether other Tau phosphorylation sites are also under the influence of NMDA receptors containing NR1/NR2A subunits. Figure 2 shows that pre-incubation of hippocampal slices with NVP (50 nM for 2 hr) failed to elicit any changes in phosphorylation at the Ser409 residue of Tau proteins, a phosphorylation site positioned in the C-terminal domain. Similarly, Western blotting experiments indicated that phosphorylation of an epitope located in the microtubule-binding domain of Tau (Ser262) was not accentuated after blockade of NR2A-containing NMDA receptors. If anything, quantification and averaging of data obtained from several slices indicated that, in contrast to Ser199, after 2-hr NVP exposure, phosphorylated Ser262 levels were slightly but significantly reduced (Figure 2).

3.2. Role of calcium and Cdk5 signalling in NVP-induced Tau phosphorylation. Previous studies in rat hippocampal cultures indicated that NMDA receptor antagonists, such as MK801, rapidly increased calcium permeability in neurons [10]. Thus, we sought to investigate whether NVP-induced phosphorylation might, in fact, be dependent on calcium mobilization. We observed that pre-exposure of hippocampal slices to BAPTA-AM, a cell-permeable agent with very high affinity for calcium, completely abolished the increased levels of phosphorylated Tau at its Ser199 residue (Figure 3(a)). Similarly, pre-exposure of hippocampal slices to the cell-impermeable form of BAPTA also completely blocked the NVP-induced phosphorylation of Ser199

(Figure 3(a)), indicating that Tau hyperphosphorylation after inhibition of NR2A-containing receptors mainly relies on calcium entrance from the extracellular space.

The observation that the effect of NVP is dependent on calcium entrance predicts that selective phosphorylation at Ser199 residue could involve the action of protein kinases. The proline-directed protein kinases known to influence phosphorylation of Ser199 residue include GSK-3 β and Cdk5 (Figure 3(b)). Therefore, based on this information, we examined whether inhibitors of Cdk5 or GSK-3 β signalling pathways might prevent NVP-induced phosphorylation at the Ser199 site. To assess a possible role of GSK-3 β in Tau phosphorylation induced by blockade of NR2A-containing receptors, we used the selective GSK-3 β inhibitor SB216367. In these experiments, the inhibitor was applied 45 min before NVP exposure to ensure optimal inhibition of GSK-3 β . We observed that pre-exposure of slices to 10 μ M of SB216367 did not interfere with NVP-induced phosphorylation. On the contrary, Ser199 hyperphosphorylation in slices pre-exposed to 10 μ M roscovitine was totally prevented; indicating that NVP-induced Tau phosphorylation at Ser199 primarily involves the Cdk5 pathway. We also evaluated whether calpain-mediated activation of Cdk5 could be responsible for the effects on Tau phosphorylation. Here, calpeptin did not prevent NVP-induced Tau phosphorylation, suggesting that this phenomenon occurs independently of calpain activation (Figure 3(b)).

3.3. NVP-induced Tau phosphorylation relies on activation of NR2B-containing NMDA receptors. Taken together, the above findings indicate that blockade of NR2A-containing NMDA receptors promotes Tau phosphorylation at Ser199 residue, implicating both calcium and the Cdk5 signalling pathway. The exact mechanisms by which NVP

induces calcium mobilization, however, remain to be clarified. One possibility is that blockade of NR2A-containing NMDA receptors could have led to calcium entrance in neurons by favouring the dysregulation of other glutamate receptor subtypes. Thus, we initiated a series of experiments to determine the effects of glutamate receptor antagonisms on NVP-induced Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. Here, we report the results obtained with an antagonist acting on the AMPA subtype of glutamate receptors (NBQX) and the antagonist acting on NR2B-containing NMDA receptors (i.e. RO). Figure 4 shows that pre-exposure of hippocampal slices to 10 μ M NBQX did not significantly reduce Tau phosphorylation at Ser199 residue resulting from inhibition of NR2A-containing receptors by NVP. However, NVP-induced Tau phosphorylation was completely reversed by the pre-incubation of slices in the presence of RO, suggesting that the ability of NVP to enhance phosphorylation of the Ser199 epitope is possibly dependent on alterations of NR2B-containing NMDA receptors. Indeed, we decided to test this scenario by measuring the surface expression of both AMPA and NMDA receptor subunits on biotinylated membranes [27]. As shown in Figure 5(a), the surface level of GluR1 subunits of AMPA receptors was not significantly modified in slices treated with NVP. In contrast, a significant effect on NR1 subunits of NMDA receptors was observed in hippocampal slices 2 hr after NVP exposure. The NR2A antagonist was found to increase NR1 subunit levels by more than 60% in biotinylated membranes prepared from hippocampal slices (Figure 5(b)), while similar results were obtained with NR2B subunit levels (Figure 5(c)).

4. Discussion

In this study we examined the effects of inhibition of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors on Tau phosphorylation in acute hippocampal slices. We demonstrated that pharmacological blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces a robust and selective increase of the phosphorylation level of the serine residue Ser199 of Tau. Moreover, we showed that calcium mobilization and activation of the Cdk5 signalling pathway are directly involved in this effect, which probably rely on the insertion of new NR1/NR2B subunits in neuronal membranes. A putative biochemical model that accounts for the control of Tau phosphorylation by NVP is illustrated in Figure 6.

According to our results inactivation of NR2A-containing NMDA receptors by NVP in acute hippocampal slices elicits a significant increase in the phosphorylation state of Tau, suggesting that the tonic activity of these receptors contributes to limit Tau phosphorylation in basal physiological conditions. This is in line with previous *in vitro* studies showing that suppression of NMDA receptor activity by global antagonists (MK801 or AP5) can enhance Tau phosphorylation [11]. In the present report, we demonstrate that hyperphosphorylation of Ser199 residue resulting from inactivation of NR2A-containing NMDA receptors is totally abrogated by the non-permeable form of BAPTA, indicating that the effect likely relies on calcium entry into neuronal cells. In this context, we have investigated the potential signalling pathways underlying NVP-induced tau phosphorylation in hippocampal slice preparations. The phosphorylation state of Tau epitopes is known to be under the regulation of various kinase pathways, which are directly or indirectly influenced by calcium ions. Generally, Tau is phosphorylated by 2 major categories of kinases, which are divided according to motif specificity: proline-directed protein kinases (PDPK) and non-proline-

directed protein kinases (non-PDPK)[28]. Cdk5, mitogen-activated protein kinase, and several stress-activated protein kinases are included in the PDPK family. GSK-3 β is habitually described as a PDPK, although proline is not always necessary for Tau phosphorylation by GSK-3 β . Non-PDPK include cyclic AMP-dependent protein kinase A, calcium- and calmodulin-dependent protein kinase II, and microtubule affinity regulating kinase (MARK), the mammalian homologue of PAR-1 present in *Drosophila* [29]. MARK selectively phosphorylates a KXGS motif, within the microtubule binding repeat domains of Tau (serine residues at 262, 293, 324 and 356) [28]. The present data show that blockade of NR2A subunits with NVP significantly increased the phosphorylation of Ser199 epitope located in the proline-rich domain of Tau. From a mechanistic perspective, we demonstrated that this effect is possibly not dependent on GSK-3 β activity, since blockade of the system by SB216367 had no effect on NVP-induced phosphorylation at Ser199 residue. However, application of a specific inhibitor of the Cdk5 pathway completely abolished NVP-induced Tau phosphorylation at Ser199 residue.

Indeed, we have yet to fully characterize the mechanism by which Cdk5 enhances Tau phosphorylation at Ser199 but, according to the present investigation, this phenomenon appears to be independent of the activation of calpain enzymes, which are known to favour intracellular accumulation of the potent p25 activator of Cdk5 [30, 31]. In this line, our findings imply that other Cdk5 activators might be involved in the above-mentioned effects of NVP on Tau. This hypothesis is strongly supported by recent studies showing that Cdk5 activation can depend on IC53 production, a new potential activator of this kinase system [32]. In terms of cellular distribution, there are several indications that Tau proteins mainly localised in axonal compartments of neurons. Predictably, because of the preferential localization of NR2A-containing

receptors in synapses, our findings implicate potential biochemical links between a presumable increase in dendritic calcium and subsequent stimulation of axonal Cdk5 in neurons subjected to NMDA receptor deprivation. However, as Tau proteins are also known to be localized in somatodendritic compartments of neurons, our results highlighted the need to also explore the possibility that NR2A-containing NMDA receptors could differentially influence Tau phosphorylation in axonal and somatodendritic compartments of neurons.

There are several lines of evidence that phosphorylation of other cytoskeletal proteins is accentuated after inhibition of NMDA receptors [11, 13]. For instance, it has been proposed that tonic NMDA receptor activation plays an essential role in limiting MAP2 phosphorylation in hippocampal slices through a mechanism involving stimulation of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin [13, 14]. Accordingly, one can speculate that the effect reported here would be dependent on inhibition of phosphatase activities after the blockade of NR2A-containing NMDA receptors by NVP. However, although this antagonist was found to markedly enhance the phosphorylation of Ser199 residue, it did not similarly augment the phosphorylation of other residues located in both the C-terminal (Ser409) and microtubule-binding (Ser262) domains of Tau, suggesting that dephosphorylation processes are not impaired by the blockade of NR2A-containing receptors. Nevertheless, it is worth mentioning that according to previous studies, Ser199 residues might represent unusual phosphorylation sites of Tau as they appear to be influenced by a very specific type of phosphatase activity (i.e. PP5) [33]. Indeed, experiments are required to directly examine whether inhibition of NR2A-containing receptors could lead to preferential reduction of PP5 activity in hippocampal slices. Independently of the mechanisms involved, the current study reinforces the recent observation that the serine residues

of Tau can be differentially modulated in diverse circumstances. Along this line, by interfering with PLA₂ activity in embryonic rat hippocampal neurons, De-Paula et al. [34] observed that Tau proteins may become hyperphosphorylated on Ser214 residue, sparing other epitopes, including Ser199, Ser202, Ser205 and Ser396 phosphorylation sites.

The biochemical demonstration that NVP-induced Tau phosphorylation is completely abolished by pre-exposure of slices to RO indeed supports the notion that NMDA receptor inhibition influences the molecular properties of this neurotransmission system. Our results are in line with several reports showing that the number of NMDA receptors, the composition of their subunits and their postsynaptic linkers can be altered after the administration of NMDA receptor antagonists, including MK-801, ethanol and phencyclidine [24, 35-37]. It is of interest that according to the present investigation, a significant increase in the levels of NR1 and NR2B subunits was observed after the blockade of NR2A-containing receptors, suggesting that the molecular mechanism underlying NVP-induced Tau phosphorylation in acute hippocampal slices might involve NMDA receptor enrichment at the membrane surface. We do not know the mechanism through which inhibition of NR2A-containing NMDA receptors could up-regulate NR1/NR2B subunits on hippocampal membranes. It is worth mentioning, however, that the surface expression and mobility of NR2A- and NR2B-containing receptors are differentially regulated, depending on scaffolding proteins interacting with the NR2 subunits. For instance, surface NR2B-containing NMDA receptors appear to be more mobile within neurons, possibly due in part to preferential interaction with synapse-associated protein 102 (SAP-102), over postsynaptic protein 95 [38]. Indeed, it remains to be determined whether NR1/NR2B receptor enrichment at the membrane surface depends on higher expression of NR2B subunit-SAP-102 complexes after NVP application. It is interesting that calcium

mobilization is one of the consequences of NMDA receptor inactivation by global antagonists through mechanisms involving the incorporation of calcium-permeable AMPA receptors in neuronal membranes [10]. This issue needs to be further explored, but the present investigation strongly indicates that this scenario does not account for the capacity of NVP to induce Tau phosphorylation.

4.1. Summary and Conclusions. The current study argues that tonic activation of NR2A-containing NMDA receptors is required to limit Tau hyperphosphorylation at its Ser199 site. It is indeed premature to speculate on the functional significance of this effect, and the next challenge resulting from our observation will be to directly demonstrate that such increases in Tau phosphorylation may engage alterations in hippocampal functions. As reported previously, Tau predominantly localizes to neuronal axons where it modulates the stability and assembly of microtubules [39, 40]. In so doing, Tau generates a partially stable, but still dynamic, state in microtubules that is important for axonal growth and effective axonal transport [41]. In addition to binding microtubules, some but not all studies provide evidence that Tau can interact, either directly or indirectly, with actin and affect actin polymerization as well as the interaction of actin filaments with microtubules [42, 43]. Furthermore, Tau appears to interact with the plasma membrane and with several proteins involved in signal transduction [44-52]. From a pathological perspective, Tau dysfunction resulting from biochemical defects (i.e. aberrant phosphorylation, truncation and glycosylation) has been proposed to be an important factor contributing to the initiation and development of several neuropathological conditions such as AD [16, 28, 53-56]. Thus, the fact that NR2A subunits are down-regulated [57], coupled with the observation that hyperphosphorylation of Tau at Ser199 is present in

the early stage of this disease [54], strongly suggests that the effect reported here may have interesting implications for understanding the mechanisms of AD. Collectively, our findings suggest that drugs acting as NMDA receptor antagonists could increase Ca^{2+} influx through inhibition of NR2A-containing receptors and enrichment of NR1/NR2B subunits. Such a change in receptor subunit composition could theoretically favour the appearance of adverse neuropathological effects [58], and should be evaluated further.

Acknowledgements

The present work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to Michel Cyr (Grant 311763-07) and Guy Massicotte (Grant 105942). The authors thank Ovid Da Silva for editing this manuscript.

References

- [1] H. Komuro, and P. Rakic, "Modulation of neuronal migration by NMDA receptors," *Science*, vol. 260, no. 5104, pp. 95-97, 1993.
- [2] R. Dingledine, K. Borges, D. Bowie, and S. F. Traynelis, "The glutamate receptor ion channels," *Pharmacol Rev*, vol. 51, no. 1, pp. 7-61, 1999.
- [3] R. Balazs, O. S. Jorgensen, and N. Hack, "N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture," *Neuroscience*, vol. 27, no. 2, pp. 437-451, 1988.
- [4] S. A. Lipton, and P. A. Rosenberg, "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders," *N Engl J Med*, vol. 330, no. 9, pp. 613-622, 1994.
- [5] D. W. Choi, "Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage," *Trends Neurosci*, vol. 11, no. 10, pp. 465-469, 1988.
- [6] S. Papadia, and G. E. Hardingham, "The dichotomy of NMDA receptor signaling," *Neuroscientist*, vol. 13, no. 6, pp. 572-579, 2007.
- [7] G. E. Hardingham, and H. Bading, "The Yin and Yang of NMDA receptor signalling," *Trends Neurosci*, vol. 26, no. 2, pp. 81-89, 2003.
- [8] M. Hetman, and G. Kharebava, "Survival signaling pathways activated by NMDA receptors," *Curr Top Med Chem*, vol. 6, no. 8, pp. 787-799, 2006.
- [9] C. Ikonomidou, F. Bosch, M. Miksa, P. Bittigau, J. Vockler, K. Dikranian, T. I. Tenkova, V. Stefovská, L. Turski, and J. W. Olney, "Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain," *Science*, vol. 283, no. 5398, pp. 70-74, 1999.
- [10] M. A. Sutton, H. T. Ito, P. Cressy, C. Kempf, J. C. Woo, and E. M. Schuman, "Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis," *Cell*, vol. 125, no. 4, pp. 785-799, 2006.
- [11] H. Fiumelli, I. M. Riederer, J. L. Martin, and B. M. Riederer, "Phosphorylation of neurofilament subunit NF-M is regulated by activation of NMDA receptors and modulates cytoskeleton stability and neuronal shape," *Cell Motil Cytoskeleton*, vol. 65, no. 6, pp. 495-504, 2008.
- [12] D. H. Baird, E. Trenkner, and C. A. Mason, "Arrest of afferent axon extension by target neurons in vitro is regulated by the NMDA receptor," *J Neurosci*, vol. 16, no. 8, pp. 2642-2648, 1996.
- [13] E. M. Quinlan, and S. Halpain, "Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors," *Neuron*, vol. 16, no. 2, pp. 357-368, 1996.
- [14] L. M. Fleming, and G. V. Johnson, "Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP," *Biochem J*, vol. 309 (Pt 1), pp. 41-47, 1995.
- [15] J. Z. Wang, and F. Liu, "Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons," *Prog Neurobiol*, vol. 85, no. 2, pp. 148-175, 2008.

- [16] M. A. Burack, and S. Halpain, "Site-specific regulation of Alzheimer-like tau phosphorylation in living neurons," *Neuroscience*, vol. 72, no. 1, pp. 167-184, 1996.
- [17] C. X. Gong, F. Liu, I. Grundke-Iqbali, and K. Iqbali, "Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2006, no. 3, pp. 31825, 2006.
- [18] C. X. Gong, and K. Iqbali, "Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease," *Curr Med Chem*, vol. 15, no. 23, pp. 2321-2328, 2008.
- [19] G. Kohr, "NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution," *Cell Tissue Res*, vol. 326, no. 2, pp. 439-446, 2006.
- [20] S. Berberich, V. Jensen, O. Hvalby, P. H. Seburg, and G. Kohr, "The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction," *Neuropharmacology*, vol. 52, no. 1, pp. 77-86, 2007.
- [21] A. Wenzel, J. M. Fritschy, H. Mohler, and D. Benke, "NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins," *J Neurochem*, vol. 68, no. 2, pp. 469-478, 1997.
- [22] S. Cull-Candy, S. Brickley, and M. Farrant, "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease," *Curr Opin Neurobiol*, vol. 11, no. 3, pp. 327-335, 2001.
- [23] Y. Liu, T. P. Wong, M. Aarts, A. Rooyakkers, L. Liu, T. W. Lai, D. C. Wu, J. Lu, M. Tymianski, A. M. Craig, and Y. T. Wang, "NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo," *J Neurosci*, vol. 27, no. 11, pp. 2846-2857, 2007.
- [24] N. C. Anastasio, Y. Xia, Z. R. O'Connor, and K. M. Johnson, "Differential role of N-methyl-D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in mediating phencyclidine-induced perinatal neuronal apoptosis and behavioral deficits," *Neuroscience*, vol. 163, no. 4, pp. 1181-1191, 2009.
- [25] M. A. Martel, D. J. Wyllie, and G. E. Hardingham, "In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death," *Neuroscience*, vol. 158, no. 1, pp. 334-343, 2009.
- [26] G. Fischer, V. Mutel, G. Trube, P. Malherbe, J. N. Kew, E. Mohacsi, M. P. Heitz, and J. A. Kemp, "Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 283, no. 3, pp. 1285-1292, 1997.
- [27] R. A. Hall, A. Hansen, P. H. Andersen, and T. R. Soderling, "Surface expression of the AMPA receptor subunits GluR1, GluR2, and GluR4 in stably transfected baby hamster kidney cells," *J Neurochem*, vol. 68, no. 2, pp. 625-630, 1997.
- [28] T. F. Gendron, and L. Petrucelli, "The role of tau in neurodegeneration," *Mol Neurodegener*, vol. 4, pp. 13, 2009.
- [29] I. Nishimura, Y. Yang, and B. Lu, "PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in Drosophila," *Cell*, vol. 116, no. 5, pp. 671-682, 2004.

- [30] G. Kusakawa, T. Saito, R. Onuki, K. Ishiguro, T. Kishimoto, and S. Hisanaga, "Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 22, pp. 17166-17172, 2000.
- [31] M. S. Lee, Y. T. Kwon, M. Li, J. Peng, R. M. Friedlander, and L. H. Tsai, "Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain," *Nature*, vol. 405, no. 6784, pp. 360-364, 2000.
- [32] D. H. Cho, J. Seo, J. H. Park, C. Jo, Y. J. Choi, J. W. Soh, and I. Jo, "Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates endothelial nitric oxide synthase at serine 116," *Hypertension*, vol. 55, no. 2, pp. 345-352.
- [33] F. Liu, I. Grundke-Iqbali, K. Iqbali, and C. X. Gong, "Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation," *Eur J Neurosci*, vol. 22, no. 8, pp. 1942-1950, 2005.
- [34] V. J. De-Paula, E. L. Schaeffer, L. L. Talib, W. F. Gattaz, and O. V. Forlenza, "Inhibition of phospholipase A(2) increases Tau phosphorylation at Ser214 in embryonic rat hippocampal neurons," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, pp., 2009.
- [35] N. C. Anastasio, and K. M. Johnson, "Differential regulation of the NMDA receptor by acute and sub-chronic phencyclidine administration in the developing rat," *J Neurochem*, vol. 104, no. 5, pp. 1210-1218, 2008.
- [36] R. Sircar, P. Follesa, and M. K. Ticku, "Postnatal phencyclidine treatment differentially regulates N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression in developing rat cerebral cortex," *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 40, no. 2, pp. 214-220, 1996.
- [37] M. Zhou, and M. Baudry, "Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors," *J Neurosci*, vol. 26, no. 11, pp. 2956-2963, 2006.
- [38] L. Groc, M. Heine, S. L. Cousins, F. A. Stephenson, B. Lounis, L. Cognet, and D. Choquet, "NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no. 49, pp. 18769-18774, 2006.
- [39] M. D. Weingarten, A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner, "A protein factor essential for microtubule assembly," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 72, no. 5, pp. 1858-1862, 1975.
- [40] D. W. Cleveland, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner, "Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly," *J Mol Biol*, vol. 116, no. 2, pp. 227-247, 1977.
- [41] N. Shahani, and R. Brandt, "Functions and malfunctions of the tau proteins," *Cell Mol Life Sci*, vol. 59, no. 10, pp. 1668-1680, 2002.
- [42] P. S. Yamauchi, and D. L. Purich, "Microtubule-associated protein interactions with actin filaments: evidence for differential behavior of neuronal MAP-2 and tau in the presence of phosphatidyl-inositol," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 190, no. 3, pp. 710-715, 1993.
- [43] S. C. Selden, and T. D. Pollard, "Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments," *J Biol Chem*, vol. 258, no. 11, pp. 7064-7071, 1983.
- [44] R. Brandt, J. Leger, and G. Lee, "Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain," *J Cell Biol*, vol. 131, no. 5, pp. 1327-1340, 1995.

- [45] T. Maas, J. Eidenmuller, and R. Brandt, "Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 21, pp. 15733-15740, 2000.
- [46] S. M. Jenkins, and G. V. Johnson, "Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ," *Neuroreport*, vol. 9, no. 1, pp. 67-71, 1998.
- [47] G. Lee, S. T. Newman, D. L. Gard, H. Band, and G. Panchamoorthy, "Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases," *J Cell Sci*, vol. 111 (Pt 21), pp. 3167-3177, 1998.
- [48] H. Liao, Y. Li, D. L. Brautigan, and G. G. Gundersen, "Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau," *J Biol Chem*, vol. 273, no. 34, pp. 21901-21908, 1998.
- [49] E. Sontag, V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, G. S. Bloom, and M. C. Mumby, "Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A," *Neuron*, vol. 17, no. 6, pp. 1201-1207, 1996.
- [50] A. Agarwal-Mawal, H. Y. Qureshi, P. W. Cafferty, Z. Yuan, D. Han, R. Lin, and H. K. Paudel, "14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex," *J Biol Chem*, vol. 278, no. 15, pp. 12722-12728, 2003.
- [51] C. H. Reynolds, C. J. Garwood, S. Wray, C. Price, S. Kellie, T. Perera, M. Zvelebil, A. Yang, P. W. Sheppard, I. M. Varndell, D. P. Hanger, and B. H. Anderton, "Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases," *J Biol Chem*, vol. 283, no. 26, pp. 18177-18186, 2008.
- [52] I. E. Vega, E. E. Traverso, Y. Ferrer-Acosta, E. Matos, M. Colon, J. Gonzalez, D. Dickson, M. Hutton, J. Lewis, and S. H. Yen, "A novel calcium-binding protein is associated with tau proteins in tauopathy," *J Neurochem*, vol. 106, no. 1, pp. 96-106, 2008.
- [53] Y. Zhang, Q. Tian, Q. Zhang, X. Zhou, S. Liu, and J. Z. Wang, "Hyperphosphorylation of microtubule-associated tau protein plays dual role in neurodegeneration and neuroprotection," *Pathophysiology*, vol. 16, no. 4, pp. 311-316, 2009.
- [54] C. A. Maurage, N. Sergeant, M. M. Ruchoux, J. J. Hauw, and A. Delacourte, "Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology," *Acta Neuropathol*, vol. 105, no. 2, pp. 89-97, 2003.
- [55] X. Bi, T. S. Haque, J. Zhou, A. G. Skillman, B. Lin, C. E. Lee, I. D. Kuntz, J. A. Ellman, and G. Lynch, "Novel cathepsin D inhibitors block the formation of hyperphosphorylated tau fragments in hippocampus," *J Neurochem*, vol. 74, no. 4, pp. 1469-1477, 2000.
- [56] X. Bi, A. P. Yong, J. Zhou, C. E. Ribak, and G. Lynch, "Rapid induction of intraneuronal neurofibrillary tangles in apolipoprotein E-deficient mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 15, pp. 8832-8837, 2001.

- [57] S. W. Tsang, H. V. Vinters, J. L. Cummings, P. T. Wong, C. P. Chen, and M. K. Lai, "Alterations in NMDA receptor subunit densities and ligand binding to glycine recognition sites are associated with chronic anxiety in Alzheimer's disease," *Neurobiol Aging*, vol. 29, no. 10, pp. 1524-1532, 2008.
- [58] L. Li, T. H. Murphy, M. R. Hayden, and L. A. Raymond, "Enhanced striatal NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic currents in a mouse model of Huntington disease," *J Neurophysiol*, vol. 92, no. 5, pp. 2738-2746, 2004.

Figure Legends**Figure 1. Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau phosphorylation at Ser199 sites in rat hippocampal slices.**

Phosphorylation and protein levels were estimated by Western blotting on cell extracts (40 µg proteins) obtained from acute hippocampal slices treated with 2 NMDA receptor antagonists for periods ranging from 1 to 3 hr. Phosphorylated Tau levels at Ser199, expressed relative to total Tau (Tau-5) levels, were measured in slices treated with 50 nM NVP and 1 µM RO. The data were expressed as percentage of control values and are means±S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 7 different rats. Statistical analysis using two-way ANOVA followed by the *post hoc* Bonferroni test revealed that there was a main effect between treatment ($F(2,54)= 16.370$, $P<0.0001$), no effect between time ($F(2,54)=2.509$, $P=0.091$) and no significant interaction between treatment and time ($F(4,54)=1.337$, $P=0.268$). * $P<0.05$, *** $P<0.001$, drug-treated versus control.

Figure 2. Blockade of NR2A-containing NMDA receptors is not associated with increased Tau phosphorylation levels at Ser409 and Ser262 sites. Phosphorylation and protein levels were estimated by Western blotting on cell extracts (40 µg proteins) obtained from acute hippocampal slices treated with 50 nM NVP for 2 hr. Phosphorylated Tau levels, expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels, were measured using antibodies raised against Tau phosphorylated at Ser199, Ser262 and Ser409. The data were expressed as percentage of control values and are means±S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 6 different rats. Since these experiments were independently performed, we determined statistical significance using unpaired T-Test. * $P<0.05$, *** $P<0.0001$, NVP-treated versus control.

Figure 3. NVP-induced Tau phosphorylation is mediated by calcium and the Cdk5 pathway. A) Phosphorylated Tau levels at Ser199 were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from acute hippocampal slices treated with 50 nM NVP for 2 hr alone or in combination with 10 μ M BAPTA-AM or 10 μ M BAPTA. The data are expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels. B) As in A, except that the GSK-3 β inhibitor SB216367 (10 μ M), the Cdk5 inhibitor roscovitine (10 μ M) or the calpain inhibitor calpeptine (10 μ M) were employed. The data were expressed as percentage of control values and are means \pm S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 5 different rats. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Neuman-Keuls' post hoc test. ***P<0.001, drug-treated versus control.

Figure 4. NR2B-containing receptors play a role in Tau phosphorylation induced by NVP. Phosphorylated Tau levels at Ser199 were estimated by Western blotting on cell extracts obtained from acute hippocampal slices treated with 50 nM NVP for 2 hr alone or in combination with 10 μ M NBQX and 10 μ M RO25-6981. The data, expressed relative to total Tau (i.e. Tau-5) levels, are means \pm S.E.M. of 3 measurements per cell extract obtained from 4 different rats. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Neuman-Keuls' post hoc test. *P<0.05, ***P<0.001, drug-treated versus control.

Figure 5. Blockade of NR2A-containing NMDA receptors is associated with increased levels of NR1 and NR2B subunits in biotinylated membranes. Glutamate receptor subunit levels were estimated by Western blotting on biotinylated membranes obtained from acute hippocampal slices treated with 50 nM NVP for 2 hr. Biotinylated NR1, NR2B and GluR1 subunit levels were normalized with respective

total protein levels estimated in homogenates of hippocampal slices incubated with or without NVP. The data are means \pm S.E.M. of 3 measurements obtained from 4 different rats. Since these experiments were independently performed, we determined statistical significance using unpaired T-Test. **P<0.01, ***P<0.001, NVP-treated versus control.

Figure 6. Working model of NVP-induced Tau phosphorylation. Blockade of NR2A-containing receptors appears to initiate the insertion of new functional NMDA receptors containing a high proportion of NR2B subunits in neuronal plasma membranes, promoting calcium accumulation. Through an unknown mechanism, Cdk5 activity would selectively enhance the phosphorylation of Ser199 residue in the proline-rich domain of Tau. In parallel, blockade of NR2A-containing receptors may reduce specific phosphatase activity which could have an impact on Tau phosphorylation at Ser199 sites.

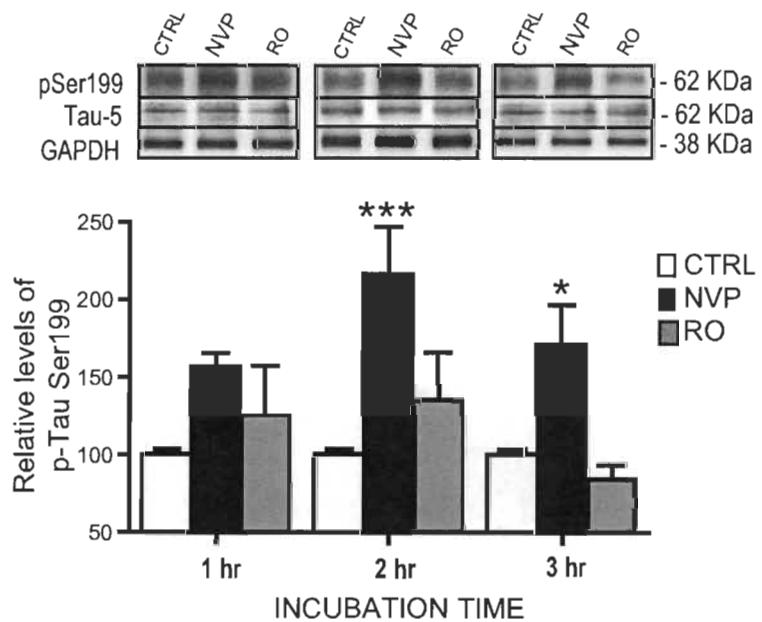


Figure 1 (Allyson et al.)

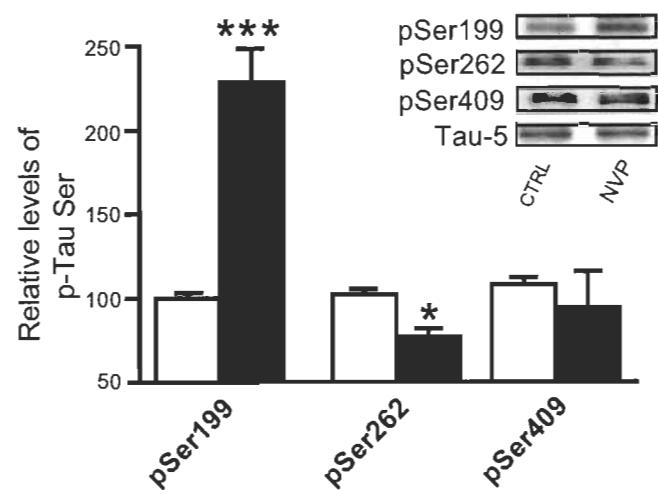


Figure 2 (Allyson et al.)

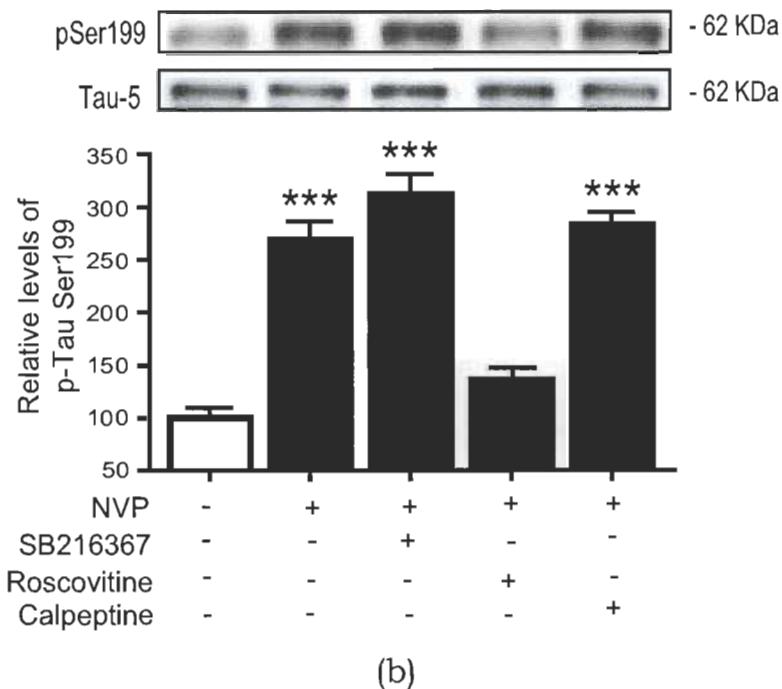
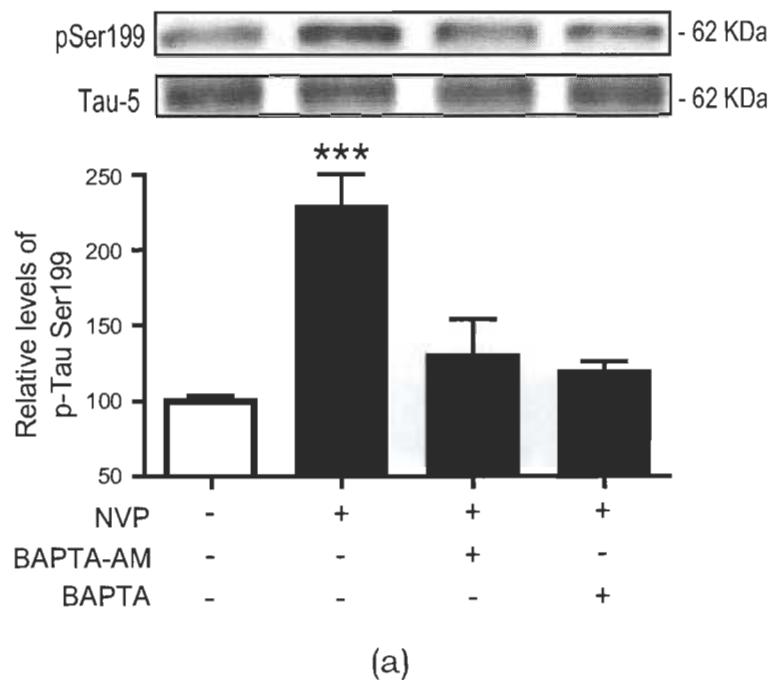


Figure 3 (Allyson et al.)

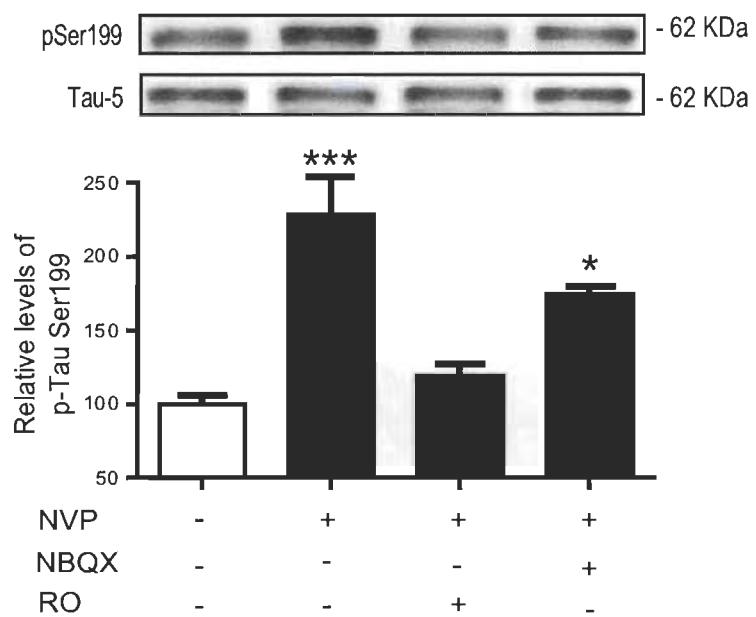


Figure 4 (Allyson et al.)

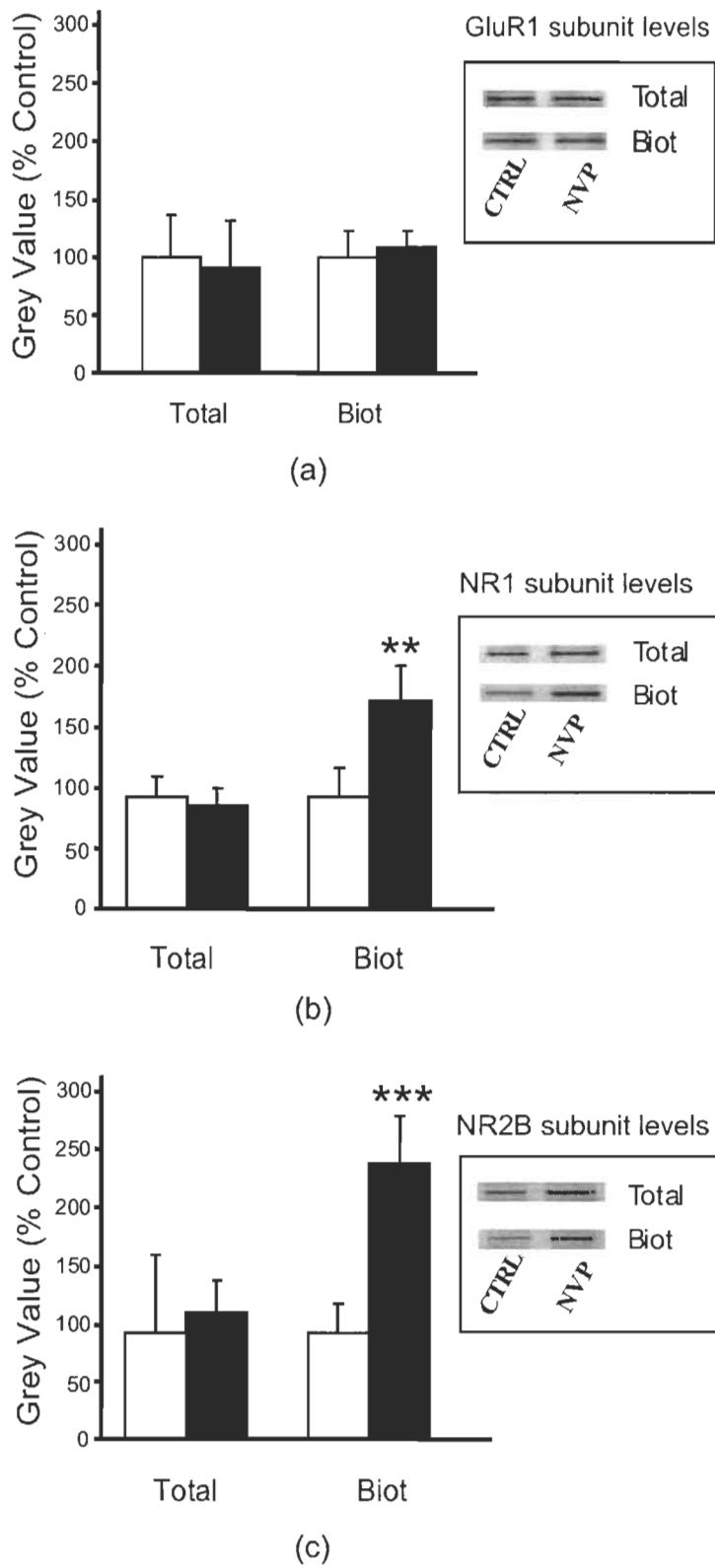


Figure 5 (Allyson et al.)

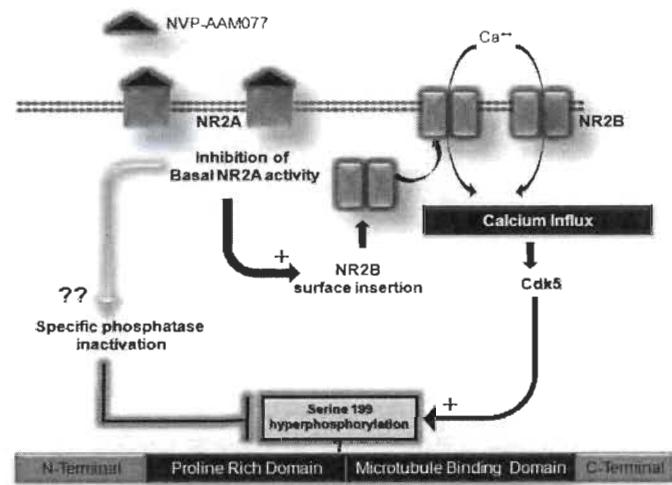


Figure 6 (Allyson et al.)

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE

De nombreuses études ont défendu l'hypothèse selon laquelle les récepteurs NMDA du neurotransmetteur glutamate seraient à la source du développement des nombreuses pathologies neurodégénératives; qu'ils seraient en mesure, lorsque suractivés par leur neurotransmetteur, d'enclencher l'activation d'une pléiade de processus intracellulaires incompatibles avec le maintien de l'intégrité neuronale. À la lumière des résultats recueillis dans le cadre du présent mémoire, une nouvelle hypothèse impliquant les récepteurs NMDA semble toutefois s'esquisser. Cette fois, n'en déplaise aux tenants de la théorie de la toxicité du glutamate, le récepteur NMDA y tiendrait un rôle d'acteur privilégié intervenant pour protéger les neurones contre les effets délétères du vieillissement.

Le lecteur se souviendra à la lecture de cet ouvrage que l'activité des récepteurs NMDA, évoquée par les sous-unités protéïniques NR1/NR2A, serait, en fait, susceptible de contrer l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau qui, comme on le sait, constitue l'une des manifestations biochimiques caractéristiques des neurones Alzheimer. En utilisant un inhibiteur préférentiel de ces récepteurs, nous avons démontré que l'inactivité synaptique des récepteurs NR1/NR2A était à même d'affecter les processus de signalisation cellulaire, de sorte qu'elle accroît la phosphorylation du site Ser199 de la protéine Tau. La discussion qui suit présente les principales observations recueillies dans notre modèle d'étude, resitue le rôle joué par les récepteurs NMDA et aborde l'implication de nos résultats sur le plan physiopathologique. En conclusion, je mettrai l'accent sur l'importance que représente cette étude quant à

l'élaboration de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des patients Alzheimer.

5.1 Les récepteurs NMDA du glutamate : bon et mauvais garnements

Le glutamate est un constituant majeur qui permet aux neurones de communiquer entre eux. Ce neurotransmetteur extrêmement régulé est à la base de mécanismes fondamentaux assurant les processus d'apprentissage et de mémorisation. Par exemple, nombreux d'arguments soulignent l'importance des récepteurs NMDA dans l'apparition du phénomène de la potentialisation à long terme (LTP) dans la région hippocampale du cerveau, un processus électrophysiologique de renforcement synaptique vraisemblablement indispensable pour le stockage de souvenirs, en particulier ceux impliquant la reconnaissance de l'environnement spatial. Aussi étrange que cela puisse paraître, le neurotransmetteur glutamate peut s'avérer extrêmement toxique pour les neurones et favoriser le développement de pathologies neurodégénératives diverses. De nos jours, on estime que le glutamate peut contribuer à la mort des neurones par un processus d'excitotoxicité impliquant, notamment, une entrée massive d'ions calcium dans les cellules. Cette toxicité calcique associée à certaines pathologies comme, par exemple, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, semble découler préférentiellement de la suractivation des récepteurs NMDA dans le cerveau. Selon de nombreuses données expérimentales et cliniques, les effets toxiques du glutamate sont davantage observés dans l'hippocampe qui, rappelons-le, est une région du cerveau riche en récepteurs NMDA et particulièrement vulnérable à la dégénérescence de type Alzheimer. Une des molécules actuellement utilisées en thérapeutique, la Mémantine, est d'ailleurs un antagoniste agissant afin de contrer l'activation des récepteurs NMDA dans le cerveau. On y reviendra.

La présente étude, qui s'intéresse à la régulation de l'état de phosphorylation de la protéine Tau, nous apprend beaucoup sur la complexité que pourraient entretenir les récepteurs NMDA avec le cytosquelette neuronal. En explorant l'influence des antagonistes des récepteurs NMDA dans l'hippocampe de rats, nous avons observé que l'activation des récepteurs synaptiques qui, rappelons-le, sont formés majoritairement par des sous-unités protéiniques NR1/NR2A, constitue un élément de protection contre l'activation de processus intracellulaires susceptibles d'engager l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Selon toute vraisemblance, cette perte de protection résultant de l'inhibition des récepteurs NR1/NR2A par le NVP se manifeste par l'intermédiaire d'une entrée intempestive d'ions calcium dans les neurones hippocampiques, laquelle serait éventuellement capable d'activer un système de phosphorylation bien connu des biochimistes, la protéine kinase Cdk5. Cette enzyme phosphoryle, il est vrai, plusieurs sites de la protéine Tau. En ce sens, les résultats de nos expériences indiquent que le site Ser199 est particulièrement sensible à l'action de cette kinase lorsqu'on procède à l'inactivation des récepteurs NR1/NR2A.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que les neurones dépourvus d'activité NR1/NR2A dans la région hippocampale montrent une hausse compensatoire des niveaux de récepteurs NMDA riches en sous-unités NR2B. Or, les recherches récentes s'intéressant aux récepteurs NR1/NR2B ont montré que leur localisation est probablement de nature extrasynaptique et qu'ils sont davantage susceptibles de favoriser une entrée inopportunne (voire néfaste) de calcium dans les neurones. Nos données biochimiques supportent l'idée que la hausse compensatoire du nombre de récepteurs NR2B survenant à la suite de la perte d'activité synaptique des récepteurs formés des sous-unités NR2A est de nature à accroître l'entrée de calcium et à favoriser, par le fait même,

l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les neurones exposés au NVP.

En définitive, tout porte à croire qu'une perte d'activité des récepteurs NR1/NR2A serait à même d'encourager la phosphorylation de la protéine Tau, le tout découlant d'un accroissement des réponses NR2B et de l'activation de l'enzyme Cdk5. Ces observations nous conduisent à avancer l'hypothèse suivante : lors du vieillissement, le maintien de l'activité des récepteurs synaptiques NR1/NR2A serait une composante physiologique essentielle capable de prévenir le dopage neuronal en récepteur NR2B et d'éviter, par la même occasion, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau par l'enzyme Cdk5.

Des découvertes récentes confirment notre hypothèse voulant que l'activité des récepteurs NR1/NR2A agisse comme mécanisme de neuroprotection. Par exemple, certaines études laissent croire que l'activité synaptique assurée par les récepteurs NR2A pourrait exercer des effets bénéfiques sur les neurones, et ce, en favorisant l'activation de diverses voies de signalisation qui ont la capacité de protéger l'intégrité des cellules neuronales (Papadia & Hardingham, 2007). Dans cette perspective, il a été démontré que des troubles importants de la mémoire se dévoilent chez des souris transgéniques chez qui le gène codant pour la sous-unité NR2A a été rendu muet (Sakimura et al., 1995). On a, par ailleurs, montré que le contenu des récepteurs NMDA en sous-unités NR2A était sélectivement réduit dans les cerveaux Alzheimer (Tsang et al., 2008) et dans des modèles animaux reproduisant certaines manifestations de cette forme de démence (MacFabe et al., 2007; MacFabe et al.); des observations qui s'accordent très bien avec notre hypothèse selon laquelle l'activité des récepteurs synaptiques NR1/NR2A pourrait être un régulateur physiologique important requis pour contrer le vieillissement prématûr du cerveau. Si notre hypothèse

s'avère exacte, il serait bien sûr attendu que la perte d'expression des sous-unités NR2A chez des souris dépourvues de ces récepteurs s'accompagne de l'apparition des signes biochimiques évocateurs d'une pathologie affligeant la protéine Tau. Une histoire à suivre.

Notre démonstration, voulant que l'activité des récepteurs NMDA soit essentielle pour la régulation de la protéine Tau, ne montre pas qu'un simple phénomène biochimique anecdotique. Elle est cohérente avec un précédent rapport montrant que l'activité des récepteurs NMDA est essentielle pour limiter l'état d'hyperphosphorylation d'une autre protéine impliquée dans la régulation de l'assemblage des microtubules dans les neurones, la protéine CRMP2 (de l'anglais “collapsin response mediator protein 2”). En fait, une hausse de l'activité des récepteurs NMDA serait à même de favoriser la déphosphorylation sur les sites cibles de cette protéine pour l'enzyme de phosphorylation Cdk5 (Coba et al., 2009). Dans le passé, une étude effectuée dans notre laboratoire a démontré que les protéines CRMP pouvaient s'avérer des acteurs cellulaires importants pour le développement de la potentiation à long terme de la transmission synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe (Quach et al., 2008). D'autres études, notamment des analyses plus approfondies avec les inhibiteurs des récepteurs NR2A et NR2B, devraient nous en apprendre davantage au sujet des liens potentiellement entretenus entre les différents sous-types de récepteurs NMDA et les protéines CRMP.

5.2 Phosphorylation de la protéine Tau et maladie d'Alzheimer

Dans la maladie d'Alzheimer, les neurones en dégénérescence neurofibrillaire sont principalement des neurones pyramidaux et ils présentent un aspect de flammèches. En microscopie électronique, les

filaments intraneuronaux forment des paires de filaments appariées en hélice (PHF; sigle de l'anglais “paired helical filaments”), constitués principalement de la protéine Tau. Ces protéines Tau incorporées dans les PHF sont modifiées, elles deviennent insolubles et leur migration électrophorétique sur SDS-PAGE est ralentie en raison de leur haut degré de phosphorylation. On sait maintenant qu'il existe plus de 80 sites potentiels de phosphorylation (sérine ou thréonine) sur la protéine Tau, mais sur le plan fonctionnel, on comprend toujours mal comment la phosphorylation de certains sites de cette protéine peut mettre en péril la survie neuronale chez les sujets Alzheimer. On peut soupçonner que cela est en relation avec la distribution intraneuronale de la protéine puisque l'on sait que dans les neurones en bonne santé, Tau s'associe principalement aux microtubules axonaux et que dans les neurones Alzheimer, l'état d'hyperphosphorylation ferait détacher la protéine Tau des microtubules à la faveur d'une localisation dendritique et somatique. Une étude récente de Karen Ashe et Dezhi Liao nous en apprend davantage à ce sujet (Hoover et al., 2010). Par des expériences de micro-mutagenèse, ils ont créé une anomalie de phosphorylation qui favorise la localisation préférentielle de la protéine Tau au sein des épines dendritiques. Celle-ci conduit à une altération du fonctionnement synaptique, elle-même associée à une expression diminuée de diverses protéines postsynaptiques. Il est intéressant de mentionner que ces modifications synaptiques associées à la localisation préférentielle de Tau dans les dendrites surviennent bien avant la perte neuronale et la formation des dégénérescences neurofibrillaires, ce qui pourrait expliquer l'affaiblissement des capacités mnésiques à un stade où les lésions caractéristiques de la maladie ne sont pas observées. Les auteurs de cette étude préconisent évidemment la mise au point de molécules capables d'empêcher la translocation de Tau vers les épines dendritiques.

Utilisant la microscopie multiphotonique *in vivo*, qu'il a introduite dans le champ de l'étude de la maladie d'Alzheimer, Bradley Hyman et ses collaborateurs de l'Université Harvard ont montré, dans un modèle de souris transgéniques surexprimant une protéine Tau humaine, que l'activation de certaines enzymes protéolytiques, les caspases, précède l'apparition des premiers signes biochimiques évocateurs de la dégénérescence neurofibrillaire. Étonnement, les auteurs en viennent à la conclusion que les PHFs sont dépourvus d'effets toxiques sur les neurones et que ce sont les espèces solubles de cette protéine qui joueraient un rôle délétère dans la maladie d'Alzheimer (de Calignon et al., 2010).

Dans le cadre de la présente étude, nous avons trouvé que le clivage de Tau par une autre famille d'enzymes protéolytiques, les calpaines, n'est probablement pas affecté suite à l'inhibition des récepteurs NR2A par le NVP. À cette étape de nos recherches, nous ne sommes toutefois pas en mesure d'exclure la possibilité que l'activité caspasique soit modifiée à la suite de la perte d'activité des récepteurs NR2A. Des études sur le sujet seront éventuellement effectuées en tirant avantage de l'utilisation d'inhibiteurs de caspases.

Bien sûr, on ne peut éviter de s'interroger sur le lien entre cette localisation dendritique anormale de la protéine Tau dans les neurones Alzheimer et la présente observation montrant que l'inactivation des récepteurs synaptiques de type NR1/NR2A augmente la phosphorylation de Tau. Dans ce contexte, il sera pertinent sur plan physiopathologique de vérifier si la phosphorylation de la Ser199, observée à la suite de l'inhibition des récepteurs NR1/NR2A par le NVP, est effectivement en mesure de favoriser le dopage dendritique en protéine Tau. Cette question n'est pas sans intérêt puisqu'il est connu que

l'hyperphosphorylation de la Ser199 constitue une anomalie caractérisant la phase précoce de la démence Alzheimer.

Des études d'immunocytochimie devraient nous en apprendre davantage à ce sujet et nous espérons, par ailleurs, pouvoir déterminer si l'activité des récepteurs NR1/NR2A n'est pas également impliquée dans l'agrégation de la protéine Tau. L'étude de l'état de phosphorylation du résidu Ser422 devrait nous permettre d'explorer ce scénario, car le niveau de phosphorylation du site en question est étroitement lié à l'apparition d'agrégats de Tau (Buee et al., 2000).

Par ailleurs, en étudiant les effets délétères du fragment N-terminal de Tau sur des cultures neuronales primaires, Amadoro et ses collaborateurs ont démontré que la protéine Tau hyperphosphorylée avait le potentiel d'accroître le processus d'excitotoxicité résultant de l'activation des récepteurs NMDA (Corsetti et al., 2008). En ce sens, le dopage dendritique de Tau pourrait s'avérer un processus délétère favorisant l'activation des récepteurs NMDA. Il sera donc pertinent de vérifier si les contenus membranaires des sous-unités NR2A et NR2B ne sont pas affectés lorsque Tau se voit localisée préférentiellement au niveau dendritique.

Aussi étrange que cela puisse paraître, on connaît toujours très peu la nature des liens qui peuvent unir les deux principales lésions associées à la maladie d'Alzheimer : celles qui concernent la β -amyloïde et celles qui affectent la protéine Tau. Selon des données récentes rapportées par deux équipes californiennes, la pathologie amyloïde ne peut à elle seule être mise en cause dans l'apparition de problèmes mnésiques découlant d'une perte de la fonction hippocampale chez des modèles de souris transgéniques Alzheimer (Blurton-Jones et al., 2009; Nagahara et al., 2009). Or, les travaux récemment publiés par l'équipe

de Mathias Jucker laissent croire que les effets toxiques de l'amyloïde deviennent, de fait, appréciables seulement en présence d'anomalies de la protéine Tau (Coomaraswamy et al., 2010). En effet, le croisement des souris transgéniques porteuses d'une mutation de Tau avec des consœurs héritant d'une mutation de la présénilin (se traduisant par un excès de β -amyloïde) génère des rejetons beaucoup plus malades que leurs parents. En présence d'amyloïde, les souris en viennent même à produire les lésions neurofibrillaires caractéristiques de l'Alzheimer.

Les auteurs en concluent que, somme toute, les effets délétères de l'amyloïde passent irrémédiablement par un dysfonctionnement de la protéine Tau. Dans ce contexte, nous en sommes actuellement à vérifier la possibilité que l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau résultant de la production des fragments β -amyloïdes dans l'hippocampe de rats résulte essentiellement d'un affaiblissement de l'activité des récepteurs synaptiques NR1/NR2A, et ce, au bénéfice de l'activité excitotoxique des récepteurs NR1/NR2B.

5.3 Conclusion et perspectives thérapeutiques

Nous l'avons mentionné précédemment, l'antagoniste des récepteurs NMDA, la Mémantine, a été homologué pour le traitement de la démence de type Alzheimer, et ce, conformément aux premières théories qui estimaient que la mort des neurones dans le cerveau survenait à la suite de l'activation des processus d'excitotoxicité glutamatergique. Aujourd'hui, on reconnaît que l'inhibition des récepteurs NMDA par la Mémantine constitue une approche pharmacologique souhaitable pour limiter le déclin des anomalies cognitives au cours des stades modéré et avancé de la maladie d'Alzheimer. Il ressort des études cliniques que la Mémantine ne serait

toutefois efficace que chez un nombre très restreint de sujets. Or, des données récentes recueillies chez des souris transgéniques reproduisant les manifestations histopathologiques de la maladie d'Alzheimer tendent à démontrer que les effets de la Mémantine s'avèrent effectivement modestes quant à la capacité du médicament à réduire les processus pathologiques observés chez ces animaux. Utilisant des souris transgéniques surexprimant des mutations humaines de la protéine précurseur de l'amyloïde, de la protéine Tau et de la présénilin (souris triples transgéniques), Martinez-Coria et ses collaborateurs viennent de démontrer que la consommation de Mémantine pour une période de plus de trois mois a pour effet de favoriser la récupération du phénomène fonctionnel de la LTP hippocampale (Martinez-Coria et al., 2010). Ce bénéfice électrophysiologique ne se traduit malheureusement pas par une récupération significative de la mémoire spatiale lorsqu'évaluée par l'épreuve classique de la piscine de Morris. Les chercheurs montrent également dans cette étude que la Mémantine s'avère à toutes fins utiles inefficace pour renverser l'état d'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les neurones de ces souris transgéniques.

Il faut donc en déduire que les effets neuroprotecteurs de la Mémantine sont, dans une certaine mesure, insuffisants pour renverser tous les aspects de la pathologie Alzheimer. Or, avec son équipe, John Olney de l'Université de Washington a montré que l'effet neuroprotecteur observé à l'échelle cellulaire de la Mémantine est validé, curieusement, à des doses qui sont en fait reconnues pour perturber la motricité, voire la mémoire des rats (Creeley et al., 2006). Il semble donc y avoir là paradoxe, mais nos résultats, qui montrent que l'activité des récepteurs NR2A s'avère essentielle pour limiter la phosphorylation de Tau, laissent présager que la Mémantine pourrait malencontreusement, en inhibant les récepteurs NR2A, activer des processus délétères affectant le

fonctionnement normal des neurones. Les résultats *in vivo* d'électrophysiologique laissent effectivement présager que les réponses des récepteurs NMDA, assurées par les sous-unités NR2A, ne sont vraisemblablement pas épargnées par l'administration de Mémantine, ce qui pourrait expliquer les effets toxiques de cette molécule et, incidemment, sa faible efficacité thérapeutique.

En tout état de cause, on peut assurément se questionner sur la pertinence d'utiliser des antagonistes NMDA non spécifiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. En fait, ce qui ressort de notre étude, c'est l'importance de développer des antagonistes NMDA qui auraient pour cible principale les récepteurs NMDA composés des sous-unités toxiques de type NR1/NR2B. Par ailleurs, notre étude se distingue du modèle traditionnel de toxicité glutamatergique. En effet, nous posons que l'administration d'agents activateurs des récepteurs NR1/NR2A devrait aussi être prise en compte dans le traitement des symptômes Alzheimer, puisque ces agents possèdent, selon toute vraisemblance, la capacité d'accroître la déphosphorylation de la protéine Tau et, par ricochet, l'effet toxique de cette protéine. Nous aurions donc ici affaire à une approche révolutionnaire, de type bithérapie, tenant compte de l'influence différentielle apportée par l'organisation moléculaire des récepteurs NMDA sur la phosphorylation de la protéine Tau, une hypothèse que nous aimerais évidemment valider dans des modèles transgéniques présentant les manifestations histopathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

BIBLIOGRAPHIE

- Andreadis, A., Brown, W. M., & Kosik, K. S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*, Vol. 31, No. 43, pp.10626-10633.
- Augustinack, J. C., Sanders, J. L., Tsai, L. H., & Hyman, B. T. (2002). Colocalization and fluorescence resonance energy transfer between cdk5 and AT8 suggests a close association in pre-neurofibrillary tangles and neurofibrillary tangles. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.] *J Neuropathol Exp Neurol*, Vol. 61, No. 6, pp.557-564.
- Badiola, N., Suarez-Calvet, M., & Lleo, A. (2010). Tau phosphorylation and aggregation as a therapeutic target in tauopathies. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, Vol. 9, No. 6, pp.727-740.
- Ballatore, C., Brunden, K. R., Piscitelli, F., James, M. J., Crowe, A., Yao, Y., et al. Discovery of brain-penetrant, orally bioavailable aminothienopyridazine inhibitors of tau aggregation. *J Med Chem*, Vol. 53, No. 9, pp.3739-3747.
- Ballatore, C., Brunden, K. R., Piscitelli, F., James, M. J., Crowe, A., Yao, Y., et al. (2010). Discovery of brain-penetrant, orally bioavailable aminothienopyridazine inhibitors of tau aggregation. *J Med Chem*, Vol. 53, No. 9, pp.3739-3747.
- Barsottini, O. G., Felicio, A. C., Aquino, C. C., & Pedroso, J. L. Progressive supranuclear palsy: new concepts. *Arq Neuropsiquiatr*, Vol. 68, No. 6, pp.938-946.
- Barsottini, O. G., Felicio, A. C., Aquino, C. C., & Pedroso, J. L. (2011). Progressive supranuclear palsy: new concepts. *Arq Neuropsiquiatr*, Vol. 68, No. 6, pp.938-946.
- Blurton-Jones, M., Kitazawa, M., Martinez-Coria, H., Castello, N. A., Muller, F. J., Loring, J. F., et al. (2009). Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 106, No. 32, pp.13594-13599.

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, Vol. 33, No. 1, pp.95-130.

Church, J., Zeman, S., & Lodge, D. (1988). The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology*, Vol. 69, No. 5, pp.702-709.

Coba, M. P., Pocklington, A. J., Collins, M. O., Kopanitsa, M. V., Uren, R. T., Swamy, S., et al. (2009). Neurotransmitters drive combinatorial multistate postsynaptic density networks. *Sci Signal*, Vol. 2, No. 68, pp.ra19.

Colodner, K. J., & Feany, M. B. Glial fibrillary tangles and JAK/STAT-mediated glial and neuronal cell death in a Drosophila model of glial tauopathy. *J Neurosci*, Vol. 30, No. 48, pp.16102-16113.

Colodner, K. J., & Feany, M. B. (2010). Glial fibrillary tangles and JAK/STAT-mediated glial and neuronal cell death in a Drosophila model of glial tauopathy. *J Neurosci*, Vol. 30, No. 48, pp.16102-16113.

Coomaraswamy, J., Kilger, E., Wolfing, H., Schafer, C., Kaeser, S. A., Wegenast-Braun, B. M., et al. Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 107, No. 17, pp.7969-7974.

Coomaraswamy, J., Kilger, E., Wolfing, H., Schafer, C., Kaeser, S. A., Wegenast-Braun, B. M., et al. (2010). Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 107, No. 17, pp.7969-7974.

Corsetti, V., Amadoro, G., Gentile, A., Capsoni, S., Ciotti, M. T., Cencioni, M. T., et al. (2008). Identification of a caspase-derived N-terminal tau fragment in cellular and animal Alzheimer's disease models. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 38, No. 3, pp.381-392.

- Creeley, C., Wozniak, D. F., Labruyere, J., Taylor, G. T., & Olney, J. W. (2006). Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci*, Vol. 26, No. 15, pp.3923-3932.
- de Calignon, A., Fox, L. M., Pitstick, R., Carlson, G. A., Bacskai, B. J., Spires-Jones, T. L., et al. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature*, Vol. 464, No. 7292, pp.1201-1204.
- de Calignon, A., Fox, L. M., Pitstick, R., Carlson, G. A., Bacskai, B. J., Spires-Jones, T. L., et al. (2010). Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature*, Vol. 464, No. 7292, pp.1201-1204.
- Faden, A. I., Demediuk, P., Panter, S. S., & Vink, R. (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, Vol. 244, No. 4906, pp.798-800.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, Vol. 366, No. 9503, pp.2112-2117.
- Guerrero, R., Navarro, P., Gallego, E., Garcia-Cabrero, A. M., Avila, J., & Sanchez, M. P. (2009). Hyperphosphorylated tau aggregates in the cortex and hippocampus of transgenic mice with mutant human FTDP-17 Tau and lacking the PARK2 gene. *Acta Neuropathol*, Vol. 117, No. 2, pp.159-168.
- Hall, R. A., Hansen, A., Andersen, P. H., & Soderling, T. R. (1997). Surface expression of the AMPA receptor subunits GluR1, GluR2, and GluR4 in stably transfected baby hamster kidney cells. *J Neurochem*, Vol. 68, No. 2, pp.625-630.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, Vol. 5, No. 5, pp.405-414.
- Holman, D., & Henley, J. M. (2007). A novel method for monitoring the cell surface expression of heteromeric protein complexes in dispersed neurons and acute hippocampal slices. *J Neurosci Methods*, Vol. 160, No. 2, pp.302-308.

- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, Vol. 68, No. 6, pp.1067-1081.
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*, Vol. 68, No. 6, pp.1067-1081.
- Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2004). Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies. *Curr Drug Targets*, Vol. 5, No. 6, pp.495-502.
- Ivanov, A., Pellegrino, C., Rama, S., Dumalska, I., Salyha, Y., Ben-Ari, Y., et al. (2006). Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol*, Vol. 572, No. Pt 3, pp.789-798.
- Kaplan, M., & Henderson, A. R. (2000). Solomon Carter Fuller, M.D. (1872-1953): American pioneer in Alzheimer's disease research. *J Hist Neurosci*, Vol. 9, No. 3, pp.250-261.
- Lee, B., Butcher, G. Q., Hoyt, K. R., Impey, S., & Obrietan, K. (2005). Activity-dependent neuroprotection and cAMP response element-binding protein (CREB): kinase coupling, stimulus intensity, and temporal regulation of CREB phosphorylation at serine 133. *J Neurosci*, Vol. 25, No. 5, pp.1137-1148.
- Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., & Tsai, L. H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, Vol. 405, No. 6784, pp.360-364.
- Levine, S., & Payan, H. (1966). Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol*, Vol. 16, No. 3, pp.255-262.

- MacFabe, D. F., Cain, D. P., Rodriguez-Capote, K., Franklin, A. E., Hoffman, J. E., Boon, F., et al. (2007). Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res*, Vol. 176, No. 1, pp.149-169.
- MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K. P., & Cain, D. P. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*, Vol. 217, No. 1, pp.47-54.
- Martel, M. A., Wyllie, D. J., & Hardingham, G. E. (2009). In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience*, Vol. 158, No. 1, pp.334-343.
- Martinez-Coria, H., Green, K. N., Billings, L. M., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., et al. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol*, Vol. 176, No. 2, pp.870-880.
- Martinez-Coria, H., Green, K. N., Billings, L. M., Kitazawa, M., Albrecht, M., Rammes, G., et al. (2010). Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol*, Vol. 176, No. 2, pp.870-880.
- Massicotte, G., & Baudry, M. (2004). Brain plasticity and remodeling of AMPA receptor properties by calcium-dependent enzymes. *Genet Eng (N Y)*, Vol. 26, pp.239-254.
- Massicotte, G., Vanderklish, P., Lynch, G., & Baudry, M. (1991). Modulation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/quisqualate receptors by phospholipase A2: a necessary step in long-term potentiation? *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 88, No. 5, pp.1893-1897.
- Matteucci, E., & Giampietro, O. (2010). Thiol signalling network with an eye to diabetes. *Molecules*, Vol. 15, No. 12, pp.8890-8903.

- Maurage, C. A., Sergeant, N., Ruchoux, M. M., Hauw, J. J., & Delacourte, A. (2003). Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathol*, Vol. 105, No. 2, pp.89-97.
- Maurer, K., & Hoyer, S. (2006). Alois Alzheimer revisited: differences in origin of the disease carrying his name. *J Neural Transm*, Vol. 113, No. 11, pp.1645-1658.
- Maynard, C. J., Bush, A. I., Masters, C. L., Cappai, R., & Li, Q. X. (2005). Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Int J Exp Pathol*, Vol. 86, No. 3, pp.147-159.
- Medina, M. (2011). Recent developments in tau-based therapeutics for neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*, Vol. 6, No. 1, pp.20-30.
- Michaelis, M. L., Seyb, K. I., & Ansar, S. (2005). Cytoskeletal integrity as a drug target. *Curr Alzheimer Res*, Vol. 2, No. 2, pp.227-229.
- Mimuro, M., Yoshida, M., Miyao, S., Harada, T., Ishiguro, K., & Hashizume, Y. Neuronal and glial tau pathology in early frontotemporal lobar degeneration-tau, Pick's disease subtype. *J Neurol Sci*, Vol. 290, No. 1-2, pp.177-182.
- Nagahara, A. H., Merrill, D. A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B. E., Shaked, G. M., et al. (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med*, Vol. 15, No. 3, pp.331-337.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., et al. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.] *Neuron*, Vol. 38, No. 4, pp.555-565.
- Papadia, S., & Hardingham, G. E. (2007). The dichotomy of NMDA receptor signaling. *Neuroscientist*, Vol. 13, No. 6, pp.572-579.

- Papadia, S., Soriano, F. X., Leveille, F., Martel, M. A., Dakin, K. A., Hansen, H. H., et al. (2008). Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci*, Vol. 11, No. 4, pp.476-487.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., & Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, Vol. 402, No. 6762, pp.615-622.
- Patzke, H., & Tsai, L. H. (2002). Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J Biol Chem*, Vol. 277, No. 10, pp.8054-8060.
- Quach, T. T., Massicotte, G., Belin, M. F., Honnorat, J., Glasper, E. R., Devries, A. C., et al. (2008). CRMP3 is required for hippocampal CA1 dendritic organization and plasticity. *FASEB J*, Vol. 22, No. 2, pp.401-409.
- Rizzini, C., Goedert, M., Hodges, J. R., Smith, M. J., Jakes, R., Hills, R., et al. (2000). Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, Vol. 59, No. 11, pp.990-1001.
- Rolston, R. K., Perry, G., Zhu, X., Castellani, R. J., Dwyer, B. E., Lee, H. G., et al. (2009). Iron: A Pathological Mediator of Alzheimer Disease? *Agro Food Ind Hi Tech*, Vol. 19, No. 6, pp.33-36.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., et al. (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature*, Vol. 373, No. 6510, pp.151-155.
- Sigurdsson, E. M. (2008). Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *J Alzheimers Dis*, Vol. 15, No. 2, pp.157-168.
- Sutton, M. A., Ito, H. T., Cressy, P., Kempf, C., Woo, J. C., & Schuman, E. M. (2006). Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. *Cell*, Vol. 125, No. 4, pp.785-799.

- Tabaton, M., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A., & Giliberto, L. (2010). Signaling effect of amyloid-beta(42) on the processing of AbetaPP. *Exp Neurol*, Vol. 221, No. 1, pp.18-25.
- Takahashi, R. H., Milner, T. A., Li, F., Nam, E. E., Edgar, M. A., Yamaguchi, H., et al. (2002). Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol*, Vol. 161, No. 5, pp.1869-1879.
- Thies, E., & Mandelkow, E. M. (2007). Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J Neurosci*, Vol. 27, No. 11, pp.2896-2907.
- Tsang, S. W., Vinters, H. V., Cummings, J. L., Wong, P. T., Chen, C. P., & Lai, M. K. (2008). Alterations in NMDA receptor subunit densities and ligand binding to glycine recognition sites are associated with chronic anxiety in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, Vol. 29, No. 10, pp.1524-1532.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, Vol. 70, No. 1, pp.1-32.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Aksenova, M., & Butterfield, D. A. (2000). Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol*, Vol. 130, No. 2-3, pp.184-208.
- Wang, J. Z., & Liu, F. (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol*, Vol. 85, No. 2, pp.148-175.
- Wieloch, T. (1985). Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science*, Vol. 230, No. 4726, pp.681-683.
- Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., et al. (2005). Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 102, No. 1, pp.227-231.