

Université de Montréal

Étude de l'apprentissage d'une tâche motrice : Implication de la voie Akt-GSK-3

Par Bruno Ouimet

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales, option médecine expérimentale

Mars 2018

© Bruno Ouimet, 2018

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.

Résumé

La production des mouvements chez l'humain, et également chez plusieurs autres mammifères, s'exécute naturellement lors de la réalisation d'une tâche motrice complexe. Ces mouvements hautement coordonnés nécessitent l'intégration de plusieurs commandes provenant de différentes régions du cerveau, notamment les aires motrices du cortex cérébral, les ganglions de la base et le cervelet. Malgré les progrès récents en neurosciences, l'apprentissage de tâches motrices complexes n'est pas très bien compris. La manière dont le cerveau intègre et mémorise la séquence motrice reliée à une activité motrice n'est pas bien connue. La protéine kinase B (PKB/Akt) est sérine/thréonine kinase hautement conservée parmi les mammifères et régule plusieurs métabolismes cellulaires tels que la prolifération, la survie et la plasticité cellulaire. Akt possède trois isoformes (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β et Akt3/PKB γ) qui sont encodées par trois gènes distincts. Il est important de noter qu'Akt3 est significativement plus exprimée dans le cerveau que ses deux autres isoformes Akt1 et Akt2. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) comporte deux isoformes, soit GSK-3 α et GSK-3 β . Akt et la protéine kinase GSK-3 sont intimement connectés. En effet, il est établi qu'Akt réduit l'activité de GSK-3 α/β par sa phosphorylation sur la sérine 21/9 respectivement. Une perturbation de la voie de signalisation Akt/GSK-3 a été reliée à plusieurs pathologies telles que la dépression, la schizophrénie et les troubles bipolaires. Le cœur de mes recherches a été d'étudier la capacité d'apprentissage, de performance et de mémorisation d'une tâche motrice complexe chez des souris ayant une délétion génétique d'Akt3 (Akt3 KO). Les résultats sur le rotarod ont démontré un ralentissement de l'apprentissage moteur chez les souris Akt3 KO en comparaison aux souris sauvage (WT). De plus, les résultats obtenus démontrent un changement de la phosphorylation de GSK-3 α/β et ainsi suggèrent que le déficit d'apprentissage moteur serait causé par une hyperactivation de GSK-3 α/β , induite par la délétion génétique d'Akt3. Il est intéressant de noter qu'un traitement chronique au lithium, connu pour inhiber directement et indirectement la protéine GSK-3, a corrigé le déficit d'apprentissage des souris Akt3 KO. Nos résultats ont pu établir une implication importante de la voie Akt3/GSK-3 dans l'apprentissage moteur.

Mots-clés : Akt3, GSK-3 α/β , Rotarod, Apprentissage moteur, Lithium, Striatum

Abstract

The production of the human's movements, and among many other animals, can be effortlessly executed during the realization of a complex motor task. These highly coordinated movements require the integration of several orders coming from different regions of the brain, notably the motor areas of the cerebral cortex, basal ganglia and the cerebellum. Despite the recent progress in neuroscience, motor learning mechanism is still not completely understood. The way that the brain integrates and memorizes the motor movements during a motor activity is still not completely known. The protein kinase B (PKB/Akt) is a serine/threonine kinase highly conserved among the mammals and control several cellular metabolisms such as the proliferation, the survival and the cellular plasticity. Akt has three isoforms (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β and Akt3/PKB γ) that are encoded by three distinct genes. It is important to note that Akt3 is more expressed in the brain than Akt1 and Akt2. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) includes two isoforms, GSK-3 α and GSK-3 β . Akt and the protein kinase GSK-3 are closely connected. Certainly, it is well established that Akt reduces the activity of GSK-3 α/β by its phosphorylation on the serine 21/9 respectively. A disruption of the Akt/GSK-3 pathway has been linked to several pathologies such as depression, schizophrenia and the bipolar disorder. The mainstream of my research was to study the capacity of training, performance and memorization of a complex motor task among mice having a genetic Akt3 deletion (Akt3 KO). The results on the rotarod demonstrated that Akt3 deletion compromised rotarod performances in comparison to wild type mice (WT). Interestingly, my results demonstrated a change of the phosphorylation of GSK-3 α/β and propose that the motor training deficit would be caused by GSK-3 α/β hyperactivation, induced by the genetic deletion of Akt3. It is interesting to note that lithium chronic treatment, which is known to inhibit directly and indirectly the GSK-3 protein, corrected the training deficit of Akt3 KO mice. Our results have established an important implication of the Akt3/GSK-3 pathway in motor training.

Keywords: Akt3, GSK-3 α/β , Rotarod, Motor learning, Lithium, Striatum

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures	v
Liste des sigles et abréviations.....	vi
Remerciements.....	ix
Introduction.....	1
Chapitre I : L'apprentissage moteur	3
1.1 Généralités	3
1.1.1 Le cortex moteur.....	4
1.1.2 Le cervelet.....	5
1.1.3 Les ganglions de la base	6
1.1.4 Rôle des ganglions de la base dans l'apprentissage moteur	7
1.1.5 Neurotransmetteurs	8
Chapitre II : Voies de signalisation cellulaire.....	11
2.1 Généralités	11
2.2 Phosphatidylinositol 3-kinase	11
2.3 Protéine kinase B	12
2.4 Glycogen Synthase Kinase-3	14
2.4.1 Rôle de GSK-3 dans le développement de maladies neurodégénératives et psychiatriques	16
Chapitre III : Hypothèses de recherche et méthodologie.....	18
1. Est-ce que les souris Akt3 KO ont des troubles d'apprentissage moteur ?	18
2. Est-ce que la voie Akt-GSK-3 est impliquée?	19
Chapitre IV : Article scientifique.....	20
4.1 Contribution des auteurs	20

4.2 Résumé.....	21
ABSTRACT.....	23
INTRODUCTION	23
MATERIAL AND METHODS.....	25
STATISTICAL ANALYSIS	28
RESULTS	28
DISCUSSION.....	31
AUTHOR CONTRIBUTIONS.....	34
FUNDING AND DISCLOSURE.....	34
ACKNOWLEDGEMENTS.....	35
REFERENCE.....	35
Chapitre V : Discussion générale.....	43
5.1 La délétion génétique d'Akt3 KO induit des troubles d'apprentissage moteur	43
5.2 Implication de la voie Akt-GSK-3 dans l'apprentissage moteur	45
5.3 Perspectives et objectifs à long terme	47
Chapitre VI : Conclusion	50
Bibliographie.....	51

Liste des figures

Figure 1.	Principales structures impliquées dans la mémoire procédurale.....	4
Figure 2.	Localisation et principales structures formant les ganglions de la base	6
Figure 3.	Cascade cellulaire impliquant l'activation du récepteur D2.....	9
Figure 4.	Protéines activées par l'interaction avec le PIP3 produit par la PI3K	12
Figure 5.	Mécanisme d'activation et d'inactivation d'Akt.....	13
Figure 6.	Voie PI3K/Akt/GSK-3	15
Figure 7.	Mécanisme d'inhibition de GSK-3 par le LiCl.....	17
Figure 8.	Conception expérimentale.....	48
Figure 9.	Moyenne des deux premiers et deux derniers essais pour chaque journée d'entraînement.....	48
Figure 10.	Courbe d'apprentissage sur le rotarod par les souris Akt3 KO et WT	49

Liste des sigles et abréviations

5-HT : Sérotonine

Akt : Protéine kinase B

AMPA : Acide- α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxasole-propionique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

DOPA : Dihydroxyphénylalanine

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GPCR : Récepteurs couplés à des protéines G

GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase-3

HT : Hétérozygotes

IGF-1 : Insulin-like growth factor 1

IMPA : Inositol monophosphatases

ISRS : Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine

KO : Knockout

LiCl : Lithium

DLT : Dépression à long terme

PLT : Potentialisation à long terme

mTORC2 : Mammalian target of rapamycin complex 2

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

PDK1 : Phosphoinositide-dependent kinase-1

PHLPP : PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PP2A : Phosphatase 2A

RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase

WT : Wildtype

β -Arr2 : β -Arrestin2

La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre.

Albert Einstein, Mathématicien, Physicien, Scientifique (1879 - 1955)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de recherche, Michel Cyr. Sans son support, son énorme générosité et sa disponibilité, je n'aurais pu réaliser tout ce que j'ai accompli au cours des dernières années. Merci de m'avoir initié à la recherche et de surtout de m'avoir fait confiance. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'approfondir mes connaissances en neurosciences. J'ai énormément appris en le côtoyant. J'en garde d'innombrables souvenirs.

Je veux également remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont aidé de près ou de loin, soit, Geneviève Bureau, Yan Bergeron, Laure Chagniel et Élise Pépin. Merci d'avoir bien voulu me partager votre expertise. Votre aide m'a été très précieuse. Remerciement spécial à Geneviève qui m'a chaleureusement accueilli lors de mon arrivée dans le laboratoire. Je me suis immédiatement senti faire partie intégrante de l'équipe. Grâce à son enseignement, elle a incontestablement contribué à développer ma curiosité scientifique qui me sera utile pour le reste de ma carrière.

Merci également à mes amis, ma famille et spécialement ma conjointe, Marie-Lyne, qui m'ont supporté et encouragé à me dépasser.

Introduction

Au quotidien, plusieurs activités telles que conduire une bicyclette, une voiture ou même lacer nos souliers ont été apprises, non pas en une journée, mais au fil du temps. Tous ces activités ou comportements ne sont pas innés et ont nécessité à un moment ou à un autre un apprentissage afin d'être acquis. Les mouvements successifs et coordonnés nécessaires à la réalisation de ces activités motrices sont une combinaison entre action volontaire et réflexes. Le processus d'apprentissage d'une tâche motrice prend du temps, mais après avoir répété à plusieurs reprises le même mouvement, l'action motrice devient automatique et pratiquement inoubliable. Bien que ces séquences de mouvements nous paraissent des plus simples à réaliser, elles nécessitent l'intégration de nombreuses commandes très complexes provenant de plusieurs régions distinctes du cerveau, notamment les aires motrices du cortex cérébral, les ganglions de la base et le cervelet. Au cours des années, plusieurs chercheurs se sont penchés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant la mémorisation des tâches motrices complexe. Depuis, plusieurs régions du cerveau ont été identifiées comme très importantes à la mémorisation, mais encore aujourd'hui l'apprentissage de tâches motrices complexes n'est pas très bien compris. La manière dont le cerveau intègre et mémorise les mouvements moteurs reliés à une activité motrice n'est pas bien connue. Chose certaine, lors de l'apprentissage d'une tâche motrice complexe, beaucoup de neurones s'activent et des changements permanents (Morales, 2008) se produisent dans plusieurs régions du cortex cérébral. Très actif au début de la vie, ce processus de remodelage synaptique est appelé plasticité synaptique. Il est crucial, car il nous permet d'apprendre et de nous adapter à de nouvelles expériences, et ce tout au long de notre existence. Certains gènes sont transcrits, certaines protéines sont activées et plusieurs autres sont synthétisées *de novo*. Ainsi, plusieurs structures, protéines et voies de signalisation cellulaire sont impliquées dans le processus de mémorisation. Parmi ces protéines se retrouvent les protéines kinase Akt et GSK-3. Akt et GSK-3 sont des protéines bien connues pour leur implication dans plusieurs désordres neurologiques ainsi que pour leur rôle dans le développement neuronal et la plasticité synaptique, essentielle à l'apprentissage. Leur rôle dans l'apprentissage d'une tâche motrice complexe est cependant moins défini. Dans le cadre de ce mémoire, j'ai principalement étudié l'implication de la voie de signalisation Akt-GSK-3 dans

l'apprentissage moteur. En premier lieu, un survol des différentes régions de cerveau impliquées dans l'exécution et apprentissage moteur sera fait en portant une attention particulière pour le striatum, région très importante dans l'encodage d'une tâche motrice complexe. Par la suite, la voie de signalisation Akt-GSK-3 serait décrite en détail afin de bien comprendre son rôle dans le développement normal et ainsi comprendre comment la perturbation dans cette voie pourrait induire des troubles d'apprentissage moteur.

Chapitre I : L'apprentissage moteur

1.1 Généralités

Il est bien connu que l'entraînement régulier est la meilleure méthode d'apprentissage d'une tâche motrice complexe. Après de nombreuses répétitions, elle pourra même s'effectuer automatiquement et elle ne sera pratiquement pas oubliée à long terme. Le meilleur exemple est probablement celui de l'apprentissage de la bicyclette. Plusieurs personnes se souviendront du cheminement qu'elles ont dû parcourir afin de pouvoir se maintenir en équilibre et de pouvoir avancer sans tomber de leur vélo. Sans s'en rendre compte, plusieurs étapes ont été franchies afin de réussir cet exploit. Certaines personnes ont certainement eu plus de facilité que d'autres, mais tout le monde est vraisemblablement tombé de son vélo tôt ou tard lors des premiers essais. Par la suite, après plusieurs autres tentatives, et beaucoup de persévérance, une amélioration progressive a été possible jusqu'à l'atteinte d'une certaine maîtrise de l'activité. À cette étape, la tâche peut être considérée comme entièrement apprise et il est par la suite très difficile de continuer à s'améliorer. Ce type de mémorisation est spécifique à l'apprentissage moteur et est appelé mémoire procédurale (ou implicite). La mémoire implicite fait référence aux habiletés motrices, aux associations, aux aptitudes pour la résolution de puzzles, etc. Inversement, un événement peut être retenu par la mémoire déclarative (ou explicite) après seulement une seule exposition (sans répétition), mais ce type de souvenir ne sera habituellement pas conservé durant une aussi longue période. La mémorisation de l'apprentissage moteur utilise donc un mécanisme de stockage différent de celui de la mémoire explicite. L'apprentissage moteur est généralement divisé en phases (Karni et al., 1998; Ungerleider et al., 2002). La première phase est appelée phase d'apprentissage rapide (ou phase d'acquisition), car c'est durant cette période que la plus grande amélioration des performances sera observée. Cette phase d'apprentissage rapide se déroule durant la première session d'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice complexe. Par exemple, lors de la première tentative de manœuvrer un vélo, il est tout à fait normal d'avoir de la difficulté à se maintenir en équilibre et de tomber sur le sol. En revanche, dès le deuxième essai durant la même session, il est fréquent de constater une amélioration et les progrès augmenteront très rapidement. La deuxième phase d'apprentissage, appelée phase lente d'apprentissage, se manifeste durant les séances subséquentes à la première et permet la

continuation de l'apprentissage de la tâche motrice, mais à un rythme beaucoup moins rapide que lors de la première séance (Costa et al., 2004). La phase lente ne se déroule pas lors des premiers essais durant la première session, mais bien seulement après avoir atteint une certaine dextérité. Cette deuxième phase peut durer quelques jours à quelques années dépendant de l'ampleur et de la difficulté de la tâche à apprendre. Entre les deux phases d'apprentissage, il existe une période de consolidation. Cette phase permet le consolidement des acquis et elle est généralement très active durant le sommeil (Walker et al., 2003). L'apprentissage moteur est certainement très complexe

et plusieurs structures sont

impliquées afin de

permettre un mouvement

bien organisé. Chez l'être

humain et les rongeurs,

l'apprentissage moteur

implique plusieurs

structures cérébrales telles

que les aires motrices du

cortex cérébral, le cervelet

et les ganglions de la base

(Lynch, 2004; Doyon et al.,

2009). Par ailleurs, une

perte neuronale dans ces

structures entraîne certains

troubles moteurs comme

une hypokinésie (maladie de Parkinson) (Lloyd, 1977; Sulzer, 2007) ou une hyperkinésie (chorée de Huntington) (Cowan et al., 2006). Les principales régions engagées dans l'apprentissage moteur sont décrites ci-dessous.

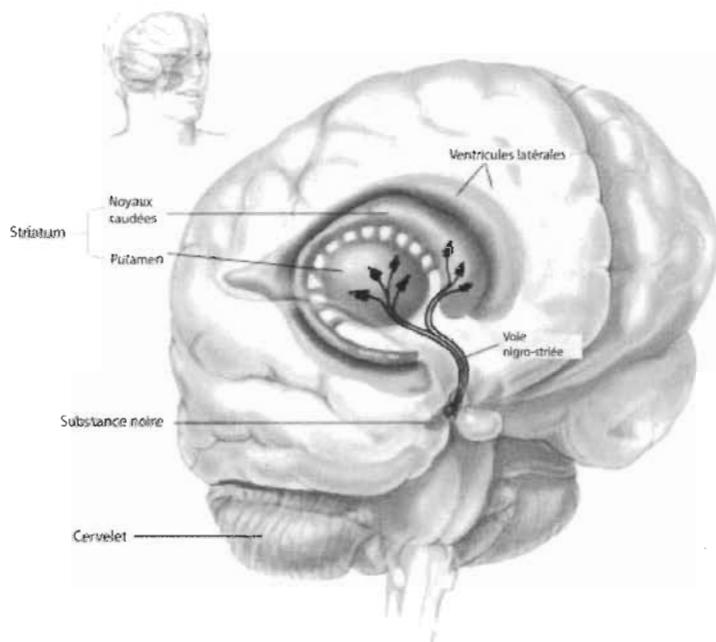


Figure 1. Principales structures impliquées dans la mémoire procédurale

(Tirée et adaptée de <http://brainmind.com/BasalGanglia.html>)

1.1.1 Le cortex moteur

Chez l'humain, le cortex moteur primaire est le centre de contrôle volontaire du mouvement. En effet, il est bien établi que lorsqu'une lésion survient dans cette région (par

exemple lors d'un AVC), il en résulte une paralysie selon la zone impliquée. À la suite d'une lésion du cortex moteur, il est toujours possible de produire un mouvement par stimulation directe des circuits spinaux, mais ces mouvements seront évidemment induits de façon involontaire et hautement imprécis (Purves, 2011). En effet, il pourra toujours avoir des mouvements de types réflexes malgré une lésion du motoneurone supérieur, car ces réflexes font relais directement au niveau de la moelle épinière. Par contre, cette lésion au niveau du cortex cérébral peut induire la perte de l'inhibition du motoneurone inférieure, située dans la corne antérieure de la moelle épinière et ainsi causer une hyperréflexie (Blumenfeld, 2010). Adjacentes au cortex moteur primaire, d'autres régions du cerveau telles que les aires prémotrices dans le lobe frontal participent également à la planification des mouvements. Les projections du cortex moteur forment deux voies ou faisceaux qui se terminent soit dans le tronc cérébral (faisceaux corticobulbaires) ou dans la moelle épinière (faisceaux corticospinaux) (Purves, 2011). Ceci étant dit, le cortex moteur n'est pas qu'un simple exécuteur, mais il a aussi un rôle à jouer dans l'apprentissage moteur. En effet, le cortex moteur subit des modifications importantes au cours de l'apprentissage d'une tâche motrice. Plusieurs de ces modifications incluent des changements au niveau des synapses (Sanes, 2000a; Lee et al., 2014). De plus, plusieurs études ont démontré une modification de l'activité du cortex moteur durant la phase d'apprentissage rapide (Sanes, 2000b; Muellbacher et al., 2002).

1.1.2 Le cervelet

Les principales afférences du cervelet proviennent du cortex cérébral, particulièrement de cortex moteur primaire et des aires prémotrices frontales (Blumenfeld, 2010; Purves, 2011). Contrairement au cortex moteur, le cervelet n'agit pas directement sur les motoneurones α . En effet, il agit indirectement en ayant des effets sur le cortex moteur (en passant préalablement par le thalamus) et dans la moelle (après relais dans le tronc cérébral). Ceci ne le rend pas pour autant moins important. Typiquement, une maladie ou une lésion du cervelet se solde en un trouble de la coordination des mouvements volontaires, une condition appelée ataxie. Ce manque de coordination et de précision des mouvements démontre bien le rôle essentiel du cervelet dans la correction et la modulation des mouvements. À l'instar du cortex moteur et des ganglions de la base, le cervelet est aussi impliqué dans l'apprentissage moteur. Des études

faites par neuroimagerie ont démontré que le cervelet est très actif durant la phase rapide d'apprentissage, mais que par la suite son activité diminue jusqu'à être indétectable lorsque le mouvement est complètement appris (Ungerleider et al., 2002; Doyon et al., 2003).

1.1.3 Les ganglions de la base

Les ganglions de la base sont un regroupement de plusieurs noyaux situés profondément dans le cerveau. Pour cette raison, ils sont aussi nommés noyaux gris centraux. Les principales structures des ganglions de la base sont le noyau caudé, le putamen, le globus pallidus, les noyaux subthalamiques et la substance noire (*pars reticulata* et *pars compacta*). Le putamen et le globus pallidus forment le noyau lenticulaire alors que le noyau caudé et le putamen sont regroupés pour former une structure appelée striatum. Le striatum peut être divisé en deux parties : soit sa partie dorsale et ventrale. Sa région dorsale est composée du putamen et du noyau caudé alors que sa partie ventrale est composée en majeure partie par le noyau accumbens (Blumenfeld, 2010) (Figure 2). Les ganglions de la base sont impliqués dans plusieurs fonctions

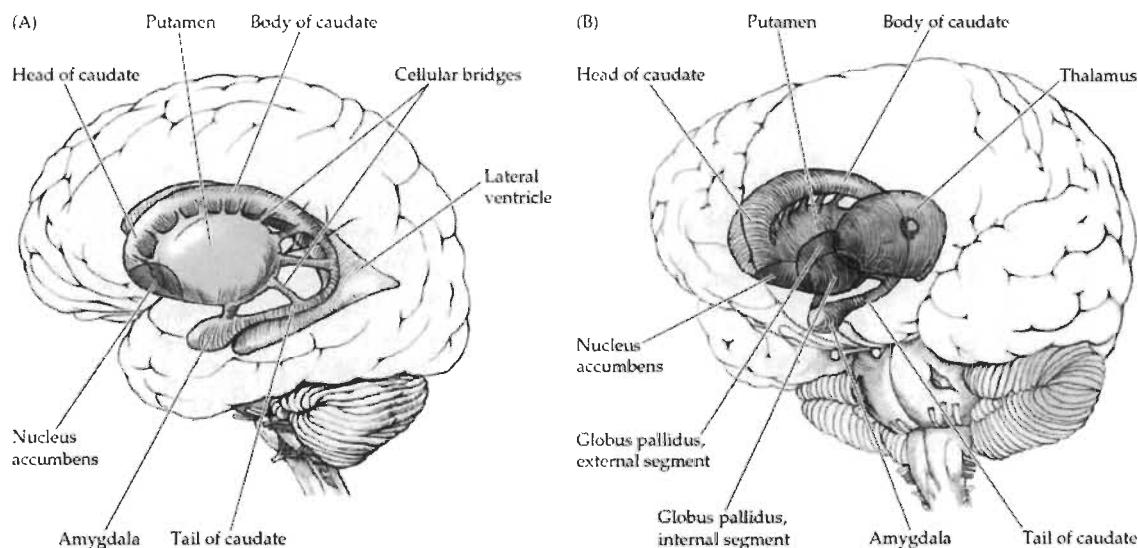


Figure 2. Localisation et principales structures formant les ganglions de la base

Tirée de (Blumenfeld, 2010)

telles que le contrôle moteur, les mouvements des yeux ainsi que certaines fonctions cognitives et émotionnelles. Le rôle des ganglions de la base peut être pleinement apprécié en étudiant certaines maladies qui affectent ces structures comme c'est le cas dans la maladie de Parkinson. Dans cette affection, les patients parkinsoniens présentent habituellement des tremblements au

repos, une bradykinésie (c'est-à-dire une lenteur à l'initiation et l'exécution d'un mouvement) et une rigidité en roue dentée accompagnant une posture instable. Ces symptômes sont le résultat de la dégénérescence des neurones dopaminergique de la substance noire *pars compacta* provoquant ainsi une diminution de la relâche de dopamine au niveau de striatum. À l'opposée, chez les patients atteints de la chorée d'Huntington, on peut observer des symptômes hyperkinétiques, c'est-à-dire des mouvements anormaux, désordonnés et involontaires, conséquence de la dégénérescence des neurones du noyau caudé et du putamen (Kim et al., 2014). Fait intéressant, aucune de ces maladies ne provoque une incapacité à produire un mouvement. Sachant les problèmes causés par son dysfonctionnement, beaucoup de chercheurs se sont alors penchés sur le rôle du striatum dans l'initiation et la régulation des mouvements. Contrairement au cortex moteur primaire, les ganglions de la base ne contrôlent pas directement l'activation des muscles squelettiques, mais permet plutôt la modulation des mouvements via une série de boucles motrices avec le cortex. Le striatum est une structure très importante des ganglions de la base, car il est le siège des afférences provenant de pratiquement tout le cortex cérébral, incluant le cortex moteur (Kreitzer et al., 2008). Plusieurs voies de contrôle motrices passent par le striatum et ainsi celui-ci reçoit en pratique toutes les afférences des ganglions de la base. Ces projections sont regroupées sous le nom de voie corticostriatale. De plus, le putamen est particulièrement important pour les voies de contrôles motrices étant donné les multiples afférences provenant du cortex moteur (Blumenfeld, 2010). En plus de recevoir plusieurs afférences, le striatum émet aussi beaucoup de projections vers d'autres structures cérébrales. Le globus pallidus et la substance noire *pars reticulata* constituent les principales structures émettrices des ganglions de la base.

1.1.4 Rôle des ganglions de la base dans l'apprentissage moteur

Plusieurs études ont démontré que des changements dans l'activité neuronale du striatum se produisent lors de l'apprentissage moteur (Ungerleider et al., 2002; Brasted et al., 2004; Barnes et al., 2005). La région dorsomédiale, qui reçoit les efférences du cortex moteur primaire, serait la plus impliquée. Chez le rongeur, la partie dorsomédiale du striatum est très active lors de la phase rapide d'apprentissage alors que la partie dorsolatérale s'active durant la phase lente d'apprentissage (Kreitzer et al., 2008; Yin et al., 2009). Plusieurs études ont démontré que le dysfonctionnement du striatum altère l'apprentissage d'une tâche motrice complexe (Yin et al.,

2005; Bureau et al., 2010; Lemay-Clermont et al., 2011; Bergeron et al., 2014). Au cours de l'apprentissage d'une tâche motrice, des changements au niveau cellulaire et moléculaire s'effectuent dans le striatum. En effet, il a été démontré qu'une réorganisation des circuits corticostriataux se produit durant les premiers moments de l'apprentissage moteur et que plusieurs gènes associés à la plasticité synaptique sont exprimés (Pisani et al., 2005; Wachter et al., 2010; D'Amours et al., 2011). Ainsi, les mouvements produits sont plus fluides, précis et certains mouvements non voulus sont inhibés afin de permettre l'exécution parfaite de la tâche motrice en question. Ainsi, les neurones peuvent se réorganiser suite à des expériences spécifiques. Ce phénomène appelé plasticité synaptique se produit lors de l'apprentissage moteur. Il peut y avoir un changement au niveau de la synapse ou bien au niveau des dendrites (composition, nombre, etc.) du neurone afin de former de nouveaux liens et faciliter la transmission de l'influx nerveux. Subséquemment, les connexions entre les neurones se transforment pour permettre de potentialiser la transmission synaptique. La plasticité synaptique est cruciale dans la mémorisation à long terme, car la phosphorylation de protéines ou l'activation d'un récepteur ne perdure pas dans le temps contrairement à des changements structurels. Cette plasticité dépend donc de la synthèse protéique. Il est intéressant de noter que l'inhibition de cette synthèse protéique dans le striatum altère considérablement l'apprentissage d'une tâche motrice complexe (Wachter et al., 2010). Le striatum est conséquemment très important durant l'apprentissage, mais son rôle ne se limite pas seulement à cette période. En effet, une lésion du striatum même après l'apprentissage complet d'une tâche motrice fera «oublier» la tâche pourtant déjà apprise (Packard et al., 2002). Cela implique donc au striatum aussi un rôle d'entreposage d'information, rôle qui évoque celui de l'hippocampe dans les souvenirs. Étant donné le rôle très important du striatum dans l'apprentissage moteur, les travaux de recherche présentés dans ce mémoire se sont essentiellement concentrés sur les mécanismes moléculaires du striatum qui sont engagés dans l'apprentissage et la mémorisation d'une tâche motrice complexe.

1.1.5 Neurotransmetteurs

Afin de communiquer entre eux, les neurones utilisent des messagers chimiques appelés neurotransmetteurs. Plusieurs neurotransmetteurs différents sont utilisés notamment la dopamine, le glutamate, l'acétylcholine, la sérotonine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

Comme mentionné précédemment, le striatum reçoit plusieurs signaux provenant de différentes parties du cerveau. Certaines de ses afférences sont excitatrices alors que d'autres sont inhibitrices. La majorité des afférences du striatum sont glutamatergiques et donc excitatrices. Plusieurs types de récepteurs sont activés par le glutamate. Les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), acide- α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxasole-propionique (AMPA) et kainate sont ionotropes. Ils agissent comme des canaux en laissant passer des cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) de façon non sélective. Il existe aussi des récepteurs nommés métabotropes. Ils sont divisés en trois classes (I, II, III).

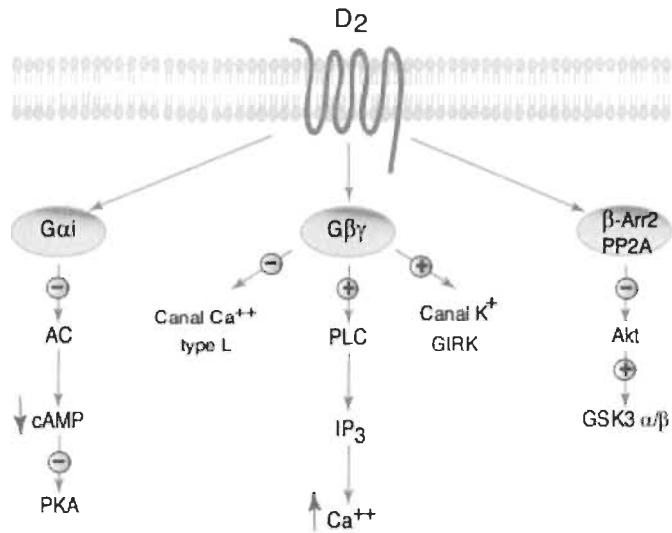


Figure 3. Cascade cellulaire impliquant l'activation du récepteur D2

Tirée de (Landry et al., 2014)

Ils sont reliés à des protéines G et leurs effets physiologiques sont très variés. Le striatum reçoit aussi des signaux dopaminergiques provenant de la substance noire *pars compacta*. Ces afférences vers le striatum dorsal forment ainsi la voie nigrostriée, voie très importante dans le contrôle moteur. Par ailleurs, c'est la perte progressive de ces neurones dopaminergiques qui induit les symptômes caractéristiques de la maladie de Parkinson. La dopamine fait partie de la famille des catécholamines regroupant aussi l'adrénaline et la noradrénaline. La dopamine est produite à partir de la dihydroxyphénylalanine (DOPA) qui est elle-même produite à partir de la tyrosine. Les récepteurs dopaminergiques peuvent être séparés en deux familles : soit la famille « D₁-like » qui contient les récepteurs D₁ et D₅ et les « D₂-like » qui contiennent les récepteurs D₂, D₃ et D₄. Les « D₁-like » sont associées à une protéine G_s alors que les « D₂-like » sont le plus souvent associées à une protéine G_i (Landry et al., 2014). La différence est importante, car l'activation de l'un ou l'autre des deux groupes de récepteurs produira des effets cellulaires très différents. En effet, au niveau du système nerveux central, l'activation des récepteurs « D₁-like » et de la protéine G_s provoque l'activation de l'adénylate cyclase. Cette enzyme permet la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate

(ATP). L'augmentation d'AMPc provoque une cascade moléculaire passant par l'activation de la protéine kinase A (PKA) et aboutissant à l'augmentation de la fréquence de génération d'un potentiel d'action. À l'opposée, l'activation des « D₂-like » et de sa protéine G_i entraîne plutôt une diminution de la susceptibilité du neurone à émettre un potentiel d'action via la diminution de production d'AMPc par l'adénylate cyclase. Outre la protéine G_i, les récepteurs « D₂-like » sont aussi associés à d'autres voies de signalisation (Figure 3). Par exemple, l'activation des récepteurs « D₂-like » peut aussi agir sur la protéine kinase Akt via les protéines β -arrestin2 (β -Arr2) et phosphatase 2A (PP2A) en formant un complexe rendant Akt inactive (Beaulieu et al., 2011; Landry et al., 2014). Ceci aura alors un effet positif (soit une activation) de la protéine GSK-3 α/β , cible naturelle d'Akt. Les deux groupes de récepteurs « D₁/D₂ like » sont fortement exprimés au niveau du striatum et participent à la modulation de la transmission synaptique. Même si la plasticité synaptique implique principalement le neurotransmetteur glutamate, la dopamine et l'activation des récepteurs dopaminergiques jouent un rôle essentiel à l'induction de la plasticité synaptique dans le striatum (Calabresi et al., 2007; Surmeier et al., 2007). En effet, suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques, telle que dans la maladie de Parkinson, la plasticité synaptique est fortement compromise (Shen et al., 2008). La plasticité synaptique est très importante, car elle permet de se rappeler les séquences précises pour effectuer une tâche motrice, même après des années sans l'avoir exécutée. La forme durable d'augmentation de la force synaptique est appelée potentialisation à long terme (PLT) alors que sa diminution est appelée dépression à long terme (DLT). L'activation des récepteurs NMDA par le glutamate permet généralement le déclenchement du processus amenant la PLT (Bliss et al., 1993; Luscher et al., 2012). Quant à la DLT, elle est également déclenchée par l'activation des récepteurs NMDA, mais aussi les récepteurs métabotropiques et muscariniques (Collingridge et al., 2010). Ces deux modes d'adaptation synaptiques sont importants et présents au niveau du striatum. Dans cette région du système nerveux central, la DLT implique aussi le groupe de récepteurs « D₂-like » alors que le blocage de ces récepteurs empêche la formation de DLT (Shen et al., 2008). La PLT impliquerait plutôt le groupe de récepteur « D₁-like » (Calabresi et al., 2007). Ainsi, la plasticité synaptique dans le striatum nécessite le bon fonctionnement des voies glutamatergiques et dopaminergiques.

Chapitre II : Voies de signalisation cellulaire

2.1 Généralités

Une fois les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique, ceux-ci activeront leurs récepteurs respectifs. Ainsi la transduction du signal entraînera une cascade de signalisation cellulaire qui passera par l'activation de plusieurs molécules. Ce mécanisme peut être très complexe et dépend de plusieurs éléments tels que la nature du signal, le type de cellule impliquée, le contexte cellulaire, etc. Une de ces voies de signalisation implique les protéines phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt et GSK-3. L'activation des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) et des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) enclenchent une cascade moléculaire commençant par la PI3K qui phosphorylera ensuite la protéine kinase B (Akt) qui phosphorylera à son tour la protéine Glycogen Syntase Kinase 3 (GSK-3). Le processus est expliqué plus en détail dans les prochaines sections.

2.2 Phosphatidylinositol 3-kinase

La voie de signalisation PI3K/Akt est très importante, car elle exerce de nombreuses fonctions dans plusieurs types cellulaires. En effet, cette voie de signalisation est activée suite à différents stimuli. La voie PI3K/Akt est bien connue pour son rôle dans la prolifération et survie cellulaire ainsi que dans la régulation du métabolisme. Par ailleurs, PI3K est une protéine kinase qui est fréquemment mutée dans différents types de cancers et elle est la cible de plusieurs traitements (Sheppard et al., 2012; Danielsen et al., 2015)}. Une fois activée, la principale fonction de PI3K dans la cellule est de phosphoryler le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) en présence d'une molécule d'ATP. Suite à la transformation du PIP2 en PIP3, le second messager PIP3 peut interagir avec diverses protéines, dont Akt et ainsi activer diverses voies de signalisation (Hemmings et al., 2012). La [Figure 4](#) démontre différentes protéines activées suite à la production de PIP3 par la PI3K. Les PI3K peuvent être divisés en différentes classes (IA, IB, II, III et IV) dépendamment de leur structure, distribution dans l'organisme et mécanisme d'activation. Les PIP3K de classe I sont celles qui génèrent le PIP3 qui activera, entre autres, la protéine Akt via le domaine PH.

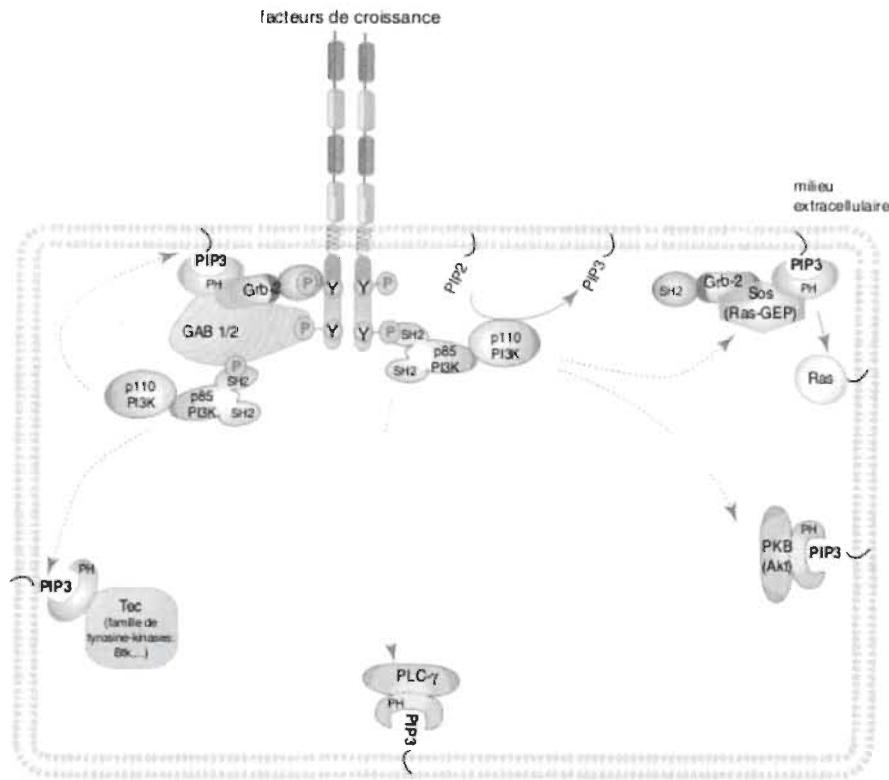


Figure 4. Protéines activées par l'interaction avec le PIP3 produit par la PI3K

Ce schéma démontre que l'activation d'un RTK (ici par un facteur de croissance) permet l'activation de la PI3K, la production de PIP3 et l'activation d'Akt ainsi que de plusieurs autres protéines. Tirée de (Landry et al., 2014)

2.3 Protéine kinase B

Suite à l'activation de la PI3K et à la production de PIP3, plusieurs protéines entrent en jeu afin de poursuivre la transduction du message. Akt fait partie de ces protéines qui sont centrales dans la signalisation cellulaire des cellules eucaryotes. La séro-thréonine kinase Akt est hautement exprimée chez les mammifères et régule plusieurs fonctionnements cellulaires tels que la prolifération, la survie et la plasticité cellulaire (Manning et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2015). Akt possède trois isoformes (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β et Akt3/PKB γ) qui sont encodées par trois gènes distincts. La distribution de ces trois isoformes n'est pas uniforme dans tous les tissus. En effet, Akt3 est significativement plus exprimée dans le cerveau qu'Akt2 alors qu'Akt1 serait ubiquitaire (Nakatani et al., 1999). Akt demeure naturellement dans une conformation inactive. L'interaction de PIP3 avec Akt via son domaine PH permet d'induire un

changement de conformation d'Akt et ainsi activer partiellement son activité enzymatique via la phosphorylation de la thréonine 308 par la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) (Figure 5) (Alessi et al., 1997). Pour maximiser l'activité d'Akt, la phosphorylation de la sérine 473 est importante. Plusieurs protéines peuvent phosphoryler ce site, mais la protéine mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) serait la plus importante (Hers et al., 2011; Wee et al., 2017). Akt est une protéine kinase et par le fait même son rôle est de phosphoryler d'autres protéines. Au cours des années plusieurs

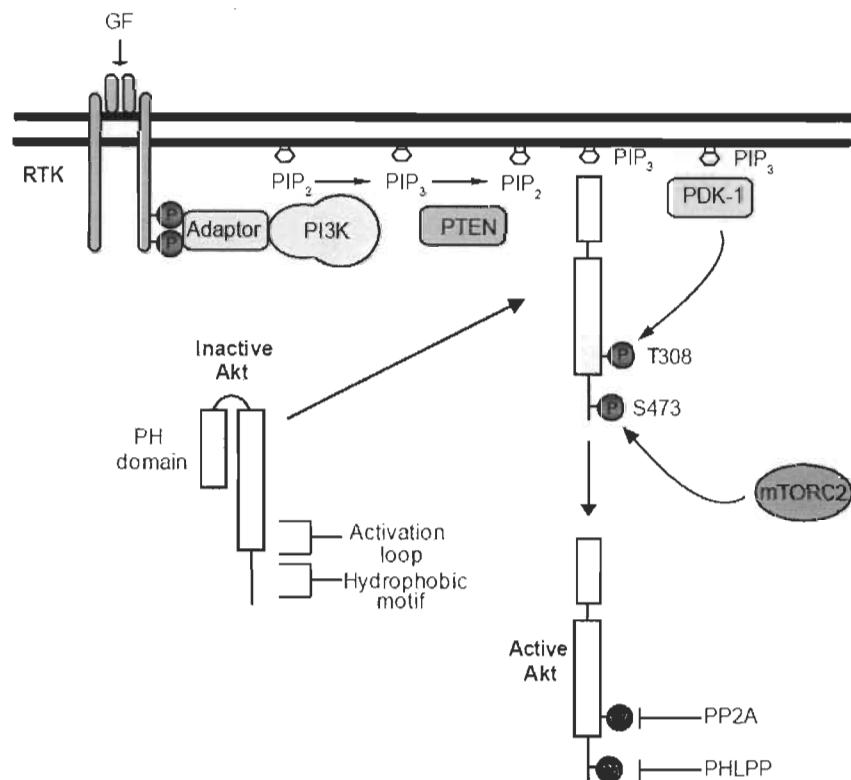


Figure 5. Mécanisme d'activation et d'inactivation d'Akt

La production de PIP3 par la PI3K permet le changement de conformation d'Akt et ainsi permet à PDK-1 de phosphoryler Akt sur la thréonine 308 et à mTORC2 sur la sérine 473 afin de permettre une activité maximale. Tirée de (Hers et al., 2011)

cibles d'Akt ont été identifiées. En effet, depuis l'identification d'Akt, plus d'une centaine de substrats d'Akt ont été identifiés (Manning et al., 2007). Étant donné son rôle très important dans la signalisation cellulaire, le dérèglement d'Akt est aujourd'hui associé avec plusieurs maladies telles que le cancer et le diabète (Mackenzie et al., 2014). Par exemple, il est bien connu que dans certains cas de cancer, il existe une hyperactivation ou

une surexpression des RTKs qui mène à l'activation inadéquate d'Akt (Chandarlapaty et al., 2011; Davis et al., 2014). L'inactivation d'Akt est assurée par la déphosphorylation de la sérine 473 par la *PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase* (PHLPP) et de la T308 par PP2A ([Figure 5](#)) (Andjelkovic et al., 1996; Gao et al., 2005). La protéine Akt est aussi impliquée dans le développement du cerveau ainsi que dans plusieurs maladies neurodégénératives et troubles psychiatriques tels que la schizophrénie (Zheng et al., 2012). Comme mentionné précédemment, les RTKs sont situés au début de la cascade d'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt. Plusieurs facteurs de croissance tels que le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ou insulin-like growth factor 1 (IGF-1) peuvent activer les RTKs et par le fait même promouvoir la survie et la différenciation cellulaire via l'activation de la voie PI3K/Akt. Ainsi, une hypoactivation d'Akt peut induire un problème développemental et même une certaine neurodégénération (Lee et al., 2006). L'isoforme Akt3 est certainement d'un grand intérêt en neurosciences. En effet, il a été démontré que les cerveaux sont anormalement petits chez les rongeurs ayant une délétion génétique d'Akt3 (Easton et al., 2005; Poduri et al., 2012). Contrairement aux souris Akt2 KO, les souris Akt3 KO n'ont pas de dysfonction du métabolisme du glucose (Cho et al., 2001; Easton et al., 2005). De plus, la délétion de l'isoforme Akt3 est aussi fortement impliquée dans le développement de comportements retrouvés dans certains troubles psychiatriques tels dans la schizophrénie, le trouble anxieux et la dépression (Bergeron et al., 2017; Howell et al., 2017). Ainsi, les isoformes d'Akt3 auraient des rôles complémentaires et non redondants.

2.4 Glycogen Synthase Kinase-3

GSK-3 a été initialement identifié comme une protéine importante dans la régulation du métabolisme du glucose en étant l'enzyme limitante à la formation de glycogène, d'où son nom *Glycogen Synthase Kinase*. Au cours des dernières années, plusieurs autres fonctions ont été identifiées dont un rôle important au niveau du système nerveux central. GSK-3 comporte deux isoformes, soit GSK-3 α et GSK-3 β . Chez les mammifères, les deux isoformes de GSK-3 sont exprimées dans tous les tissus, mais il est intéressant de noter que GSK-3 α/β sont fortement exprimée dans le cerveau (Yao et al., 2002). GSK-3 est une protéine kinase possédant des caractéristiques qui la distingue des

autres kinases. En effet, contrairement à Akt, GSK-3 est constitutivement active et c'est sa phosphorylation sur des sites spécifiques qui la rend moins active. La protéine kinase GSK-3 a été l'une des premières cibles d'Akt à être identifiée il y maintenant plus de 20 ans (Cross et al., 1995). En effet, Akt et la protéine kinase GSK-3 sont intimement connectées (Figure 6). La phosphorylation de GSK-3 α sur la sérine 21 et sur la sérine 9 dans le cas de GSK-3 β empêche la kinase de pouvoir phosphoryler ses substrats (Hughes et al., 1993; Freland et al., 2012). Plusieurs kinases comme Akt, PKA ou PKC sont reconnues pour phosphoryler GSK-3 et ainsi diminuer son activité (Cross et al., 1995; Li et al., 2000; Fang et al., 2002). La relation entre Akt et GSK-3 est intéressante, car GSK-3 α peut phosphoryler Akt sur la thréonine 312 et par le fait même inhiber l'activité d'Akt (Gulen et al., 2012). Cette inhibition d'Akt va donc diminuer la phosphorylation GSK-3 α/β sur la sérine 21/9. GSK-3 possède donc un mécanisme pour augmenter sa propre activité. La Figure 6 montre bien la cascade de signalisation impliquant Akt et GSK-3. Ainsi beaucoup de signaux provenant de l'activation des RTK ou des GPCRs peuvent avoir un effet sur GSK-3. De plus, GSK-3 possède aussi une voie de régulation qui passe par la protéine β -arr2. Il a déjà été mentionné que suite à l'activation des récepteurs « D2-like », un complexe β -arrestin2-Akt-PP2PA se forment et subséquemment inactive Akt par sa déphosphorylation par la PP2PA. Par contre, il est important de mentionner que GSK-3 peut aussi se joindre au complexe et de ce fait se faire déphosphoryler par la PP2PA. Ce mécanisme va ainsi activer GSK-3. Fait intéressant, GSK-3 serait une protéine importante dans la formation de ce complexe β -arrestin-PP2A-Akt-GSK-3. Ce mécanisme serait donc une façon de promouvoir sa propre activation (O'Brien et al., 2011). GSK-3 possède aussi des sites de phosphorylation importants pour

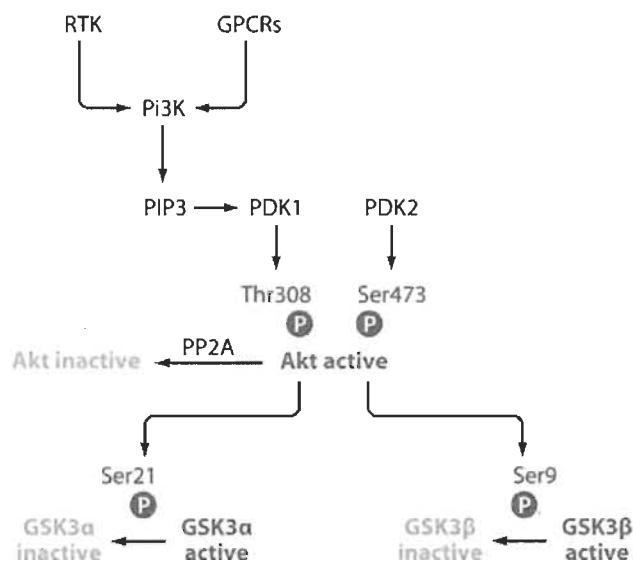


Figure 6. Voie PI3K/Akt/GSK-3

Tirée de (Beaulieu et al., 2009)

promouvoir son activité. En effet, la phosphorylation de GSK-3 sur la Tyrosine216 (GSK-3 β) et sur la Tyrosine279 (GSK-3 α) serait requise pour une activité maximale de la kinase (Frame et al., 2001; Beurel et al., 2015). Cette phosphorylation est particulière, car GSK-3 est une sérine/thréonine kinase, mais lors de sa synthèse, GSK-3 aurait la capacité de s'auto phosphoryler sur ces sites afin d'être pleinement active (Cole et al., 2004).

2.4.1 Rôle de GSK-3 dans le développement de maladies neurodégénératives et psychiatriques

GSK-3 est une protéine centrale dans plusieurs maladies et désordres neurologiques. Au cours de dernières années, beaucoup d'études ont consacré leurs efforts pour découvrir le rôle de cette kinase dans le développement et le traitement de plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Plusieurs études ont pu confirmer le rôle de GSK-3 dans ces maladies et ainsi ouvrir la porte à de futurs traitements. Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, l'activité accrue de GSK-3 contribue à l'hyper phosphorylation de la protéine tau et la formation des neurofilaments (Phiel et al., 2003; Llorens-Martin et al., 2014). Tau est une protéine importante au niveau du cytosquelette et plusieurs études sont en cours afin de déterminer le rôle exact de GSK-3 dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Chez les rongeurs, GSK-3 aurait aussi un rôle à jouer dans le développement de la maladie de Parkinson, car son inhibition aurait un effet neuroprotecteur (King et al., 2001; Duka et al., 2009). Outre les maladies neurodégénératives, GSK-3 a aussi un rôle important à jouer dans les désordres neurologiques. En effet, la perturbation de la voie de signalisation Akt-GSK-3 a été associée à plusieurs pathologies telles que la dépression et les troubles bipolaires (Gould et al., 2005; Kitagishi et al., 2012). De plus, certaines formes de polymorphismes de GSK-3, de même que le dysfonctionnement de la voie Akt-GSK-3, ont été reliées à la dépression (Karege et al., 2007; Inkster et al., 2009). La sérotonine (5-HT) est un neurotransmetteur qui participe au bon fonctionnement de plusieurs fonctions physiologiques comme le sommeil, l'humeur, la douleur, mais elle est aussi impliquée dans les troubles de l'humeur (Kolb et al., 2012). L'activité de GSK-3 α/β est aussi régulée par la sérotonine. En effet, il a été démontré que l'augmentation de 5-HT dans la fente synaptique augmente la phosphorylation de GSK-3 dans plusieurs régions du cerveau dont

l'hippocampe et le striatum (Li et al., 2004; Beaulieu et al., 2008a). Par contre, cette voie régulation de GSK-3 ne passerait pas par la voie Akt/GSK-3, car l'administration de médicaments augmentant la quantité de 5-HT tel que les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) ne modifient pas l'activité d'Akt (Li et al., 2007). La découverte du lithium a été un élément déclencheur dans les recherches sur la protéine kinase GSK-3. Le lithium (LiCl) a été initialement utilisé pour le traitement des manies dans les troubles bipolaires (Cade, 1949). Aujourd'hui

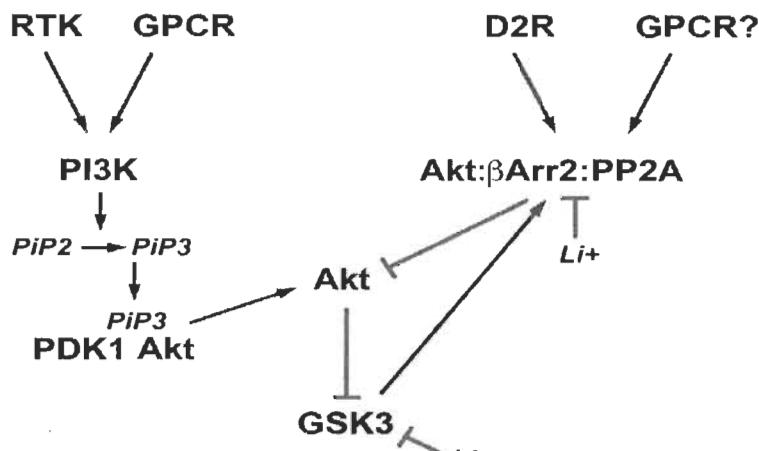


Figure 7. Mécanisme d'inhibition de GSK-3 par le LiCl

Tirée de (Freeland et al., 2012)

plusieurs autres effets thérapeutiques ont été découverts, mais il est encore aujourd'hui utilisé dans de nombreuses thérapies pour soigner les troubles de l'humeur (Freeland et al., 2012). Au cours des années, plusieurs cibles du LiCl ont été décelées. En effet, le LiCl est, en autre, un inhibiteur des inositol monophosphatasées (IMPA) et GSK-3 (Phiel et al., 2001). Le LiCl agit sur GSK-3 via une inhibition directe et indirecte (Figure 7). En effet, le LiCl est un inhibiteur compétitif du magnésium et inhibe directement GSK-3 via ce mécanisme (Ryves et al., 2001; Gould et al., 2005). De plus, il peut agir sur le complexe Akt/βArr2/PP2A (Beaulieu et al., 2008b). Tel que mentionné précédemment, ce complexe provoque l'inactivation d'Akt via sa déphosphorylation par PP2A. Ainsi, l'inhibition de ce complexe par le LiCl empêche PP2A de déphosphoryler Akt. Cette activation d'Akt lui permet donc de phosphoryler GSK-3 α/β et ainsi diminuer son activité. Ce mécanisme est très intéressant pour le domaine des neurosciences, car il implique les récepteurs D2 et la dopamine ce qui fait que cette régulation de GSK-3 n'est pas présente dans toutes les cellules malgré le fait que GSK-3 est exprimée de façon ubiquitaire.

Chapitre III : Hypothèses de recherche et méthodologie

Grâce au progrès de la génétique, la génération de rongeurs génétiquement modifiés a permis de mieux comprendre le rôle de plusieurs protéines. Au laboratoire, nous avons obtenu un modèle de souris possédant une délétion génétique d'Akt3 (Akt3 KO). Ces souris ont été utilisées pour démontrer le rôle d'Akt3 dans diverses fonctions du cerveau telles que la cognition, l'émotion et la motricité. Nous avons observé des comportements anormaux chez la souris Akt3 knockout rappelant certains troubles de l'émotion tels que le trouble anxieux, la dépression et la schizophrénie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, 2014; Bergeron et al., 2017). Chez ces souris, aucune anomalie au niveau de l'orientation spatiale et la mémoire cognitive, ainsi que la capacité d'exécuter des tâches motrices n'ont été dénotée (Bergeron et al., 2017). Or, il n'a pas été établi si ces souris ont un déficit lors de l'apprentissage d'une tâche motrice complexe. La méthodologie est détaillée dans l'article scientifique (Chapitre IV), mais l'approche expérimentale est décrite de façon générale ci-dessous. Mon projet de recherche a voulu répondre aux deux questions suivantes :

1. Est-ce que les souris Akt3 KO ont des troubles d'apprentissage moteur ?

Au niveau cérébral, Akt est impliqué dans la PLT, DLT et dans plusieurs désordres neurologiques. Malgré tout, le rôle d'Akt3 au niveau de l'apprentissage moteur n'est pas bien connu. Étant donné son rôle capital dans la cellule, il serait intéressant de vérifier si la délétion d'Akt3 entraîne un déficit d'apprentissage, surtout que cet isoforme est principalement exprimé au niveau du cerveau. De plus, il a déjà été démontré que l'inhibition de mTORC, activateur d'Akt, au niveau du striatum induit un déficit dans l'apprentissage moteur (Sarbassov et al., 2006; Bergeron et al., 2014). Afin de répondre à cette question, le rotarod, appareil reconnu pour quantifier les différentes phases de l'apprentissage tâche motrice complexe chez les rongeurs (Costa et al., 2004; Bureau et al., 2010), sera utilisé. En comparant deux groupes de souris, WT et Akt3 KO, il sera possible de vérifier l'effet de la délétion d'Akt3 sur l'apprentissage d'une tâche motrice

complexe comme le rotarod. Le rotarod va permettre non seulement de détecter la vitesse d'apprentissage des WT versus les KO, mais aussi de savoir si ces dernières sont capables d'atteindre le même niveau de performances que les WT.

2. Est-ce que la voie Akt-GSK-3 est impliquée?

Akt est connu pour réguler l'activité de GSK-3 α/β via sa phosphorylation sur la S21 et 9 respectivement. La délétion génétique d'Akt3 ne provoque pas une surexpression des deux autres isoformes d'Akt, soit Akt1 et Akt2 (Easton et al., 2005; Tschopp et al., 2005). Cela suggère donc que Akt3 est une protéine fondamentale dans le cerveau et que sa délétion pourrait avoir un impact sur ses protéines cibles comme GSK-3. Ainsi, la délétion d'Akt3 pourrait provoquer une diminution de la phosphorylation de GSK-3 α/β . L'hyperactivation de GSK-3 est connue pour induire divers troubles neurologiques, mais induit aussi une diminution de la PLT et ainsi possiblement déréguler l'apprentissage moteur (Peineau et al., 2007; Zhu et al., 2007). À l'instar d'Akt3, la première étape sera de vérifier l'effet de la délétion de GSK-3 α/β sur l'apprentissage du rotarod. Pour ce faire, des souris GSK-3 α KO et hétérozygotes (HT) seront utilisées en plus des souris GSK-3 β HT, car sa délétion complète est létale (Hoeflich et al., 2000). Afin de déterminer si les deux formes de GSK-3 sont importantes pour l'apprentissage, un inhibiteur de GSK-3 (SB216763) sera injecté directement dans le striatum de souris WT et ainsi vérifier l'impact sur l'apprentissage du rotarod. En deuxième temps, l'activité de GSK-3 dans les striatums des souris WT et Akt3 KO sera comparée afin de détecter toute modification de son activité induite par la délétion d'Akt3. Ceci sera fait en vérifiant les sites d'activation de GSK-3 (phospho-Tyrosine279 pour GSK-3 α et phospho-Tyrosine216 pour GSK-3 β) ainsi que deux sites de la protéine Tau (sérine202 et sérine404), normalement phosphorylés par GSK-3.

Chapitre IV : Article scientifique

Le contenu de ce chapitre présente un article scientifique en processus de préparation qui sera publié prochainement dans une revue telle que *Behavioural Neuroscience* ou *Behavioural Brain Research*.

4.1 Contribution des auteurs

Les travaux présentés ont été réalisés en majeure partie par Bruno Ouimet, sous la supervision de Michel Cyr PhD. Yan Bergeron a établi la colonie de souris AKT3 KO dans le laboratoire de Michel Cyr et Guy Massicotte. Élise Pépin a aidé à caractériser les souris AKT3 KO. Laure Chagniel a réalisé les expériences comportementales sur les souris GSK-3 KO. Bruno Ouimet et Michel Cyr ont écrit le manuscrit. Michel Cyr et Guy Massicotte ont contribué à créer le cadre expérimental et corriger le manuscrit.

4.2 Résumé

La protéine Akt et ses isoformes (Akt1, Akt2 et Akt3) sont des sérine / thréonine kinases. Également connue sous le nom de protéine kinase B, ces enzymes sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques du système nerveux central. Une caractéristique frappante de ces enzymes est leur capacité à interagir avec plusieurs cibles moléculaires telles que la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3). Parmi les isoformes d'Akt, Akt3 est significativement plus exprimé dans le cerveau et la présente étude a été conçue pour déterminer si la voie Akt3 / GSK-3 joue un rôle dans l'apprentissage d'une tâche motrice complexe. En utilisant le rotarod en accélération, épreuve bien connue pour reproduire les différentes phases d'apprentissage moteur, nous avons démontré chez la souris que la délétion génétique de GSK-3 α ou de GSK-3 β n'avait aucun effet sur les performances du rotarod. Cependant, la délétion d'Akt3 a compromis sérieusement l'apprentissage du rotarod lorsque comparé avec les souris de type sauvage. L'analyse biochimique dans le striatum a révélé des modifications des taux phosphorylées de GSK-3 et de Tau chez les souris déficientes en Akt3, qui ont une activité accrue de la protéine kinase GSK-3. Dans cette optique, nous avons observé que les changements biochimiques et au niveau de l'apprentissage moteur étaient prévenus chez les souris déficientes en Akt3 par des traitements chroniques au lithium, un inhibiteur bien connu de GSK-3. Mis ensemble, nos résultats ont soulevé la possibilité intéressante que l'interconnexion entre les kinases Akt3 et GSK-3 soit importante dans l'apprentissage de nouvelles tâches motrices complexes.

Motor learning deficits and striatal GSK-3 hyperactivity in Akt3 knockout mice.

Bruno Ouimet¹, Élise Pépin¹, Yan Bergeron¹, Laure Chagnie¹
Guy Massicotte¹ and Michel Cyr^{1*}

¹Département de biologie médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Canada

***Correspondance:** Michel Cyr, PhD, Département de biologie médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351, boul des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières (QC) G9A 5H7 Canada.

Keywords: Motor learning, basal ganglia, protein kinase B, accelerating rotarod, lithium

ABSTRACT

Akt protein family (Akt1, Akt2 and Akt3) of serine/threonine kinases, also known as protein kinase B, are enzymes implicated in many physiological and pathological processes in the CNS. A striking feature of these enzymes is their ability to interact with several molecular targets such as the glycogen synthase kinase 3 (GSK-3). Among Akt isoforms, the Akt3 is significantly more expressed in the brain and the present investigation was designed to determine whether the Akt3/GSK-3 pathway plays a role in the learning of a complex motor skill. Using the accelerating rotarod task, known to reproduce different motor learning phases, we demonstrated in mouse models that genetic deletion of GSK-3 α or GSK-3 β had no effect on rotarod performances. However, Akt3 deletion robustly compromised rotarod learning when compared to wild type animals. Biochemical analysis in the striatum revealed modifications in the levels of both phosphorylated GSK-3 and Tau in Akt3-deficient mice, which are reminiscent of enhanced GSK-3 activity. In this line, we observed that both biochemical and motor learning impairments were prevented in Akt3-deficient mice by chronic treatments with lithium, a well-known GSK-3 inhibitor. Altogether, our findings raised the interesting possibility that interconnection between Akt3 and GSK-3 kinases is required in the learning of new complex motor tasks.

INTRODUCTION

Many basic and fine motor skills are fundamental for everyday life activities. This type of procedural ability builds through the integration of initially distinct movements into one particular behavioural unit. Consequently, the skill becomes automatic or habitual, instead of goal directed. The integration of several commands coming from diverse regions of the central

nervous system, notably the motor cortex, basal ganglia, hippocampus and the cerebellum, are necessary for the optimization process associated with motor learning (Packard and Knowlton, 2002; Ungerleider et al., 2002). Despite recent progress in the field of motor learning, we are still lacking critical information on the molecular mechanisms orchestrating this process.

The serine/threonine kinase Akt is highly expressed in mammal tissues and regulates many cellular functions such as cell development, growth, and survival (Machado-Vieira et al., 2015; Manning and Cantley, 2007). Furthermore, Akt is a kinase important to normal brain function as compromised expression has been related to human brain disorders (Cole, 2013; Zheng et al., 2012). In mammal cells, Akt has three isoforms with specific distribution and function. Akt1 (PKB α) is ubiquitous, Akt2 (PKB β) is more significantly expressed in liver, skeletal muscle and kidneys (Altomare et al., 1995; Chong et al., 2005), while Akt3 (PKC γ) is predominantly found in brain tissues (Nakatani et al., 1999; Yang et al., 2005). Akt3 isoform is of great interest in neuroscience research as it represents half of the total Akt in the cerebral cortex and hippocampus (Easton et al., 2005), is involved in postnatal brain development and has been identified as a potential contributor to psychiatric symptoms in rodents and humans (Bergeron et al., 2017; Del'Guidice et al., 2015; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, 2014). In the present study, using genetic and pharmacological tools, we have investigated whether Akt3 and the known downstream target of Akt signaling, GSK-3, play a role in the learning processes and motor abilities required for the acquisition of a new complex motor skill.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The generation of Akt3 knockout (Akt3 KO), GSK-3 α knockout (GSK-3 α KO) and GSK-3 β heterozygotes (GSK-3 β HT) mice were described previously (Easton et al., 2005; Hoeflich et al., 2000; MacAulay et al., 2007). Mice were housed with a 12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. 12 to 18 weeks-old KO mice and their wild-type (WT) littermates were used for experiments. WT and KO mouse groups were matched for age and gender in all experiments, and all treatments were assessed in drug-naive animals. All experiments were approved by the UQTR Institutional Animal Care and Use Committee and performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Five sets of experiments were conducted on six independent cohorts of mice. (1) The first one involved motor behavioral testing in drug naive WT and homozygous Akt3 KO mice run in this sequence: accelerating rotarod, wire suspension and pole tests. Other independent sets evaluated the accelerating rotarod performances in (2) WT, heterozygous and homozygous GSK-3 α KO littermates; (3) WT and heterozygous GSK-3 β KO littermates; (4) vehicle and GSK-3 inhibitor (SB216763) treated WT mice; and (5) WT and Akt3 KO mice treated with lithium (LiCl) treatments.

Motor Behaviour Tests

The accelerating rotarod, wire suspension and pole tests were performed as described previously (Bergeron et al., 2014; Chagniel et al., 2012). The accelerating rotarod test consisted of a suspended rod that accelerated at a constant rate from 4 to 40 rpm in 300s. The apparatus were from AccuScan Instruments (Columbus, OH, USA). A trial ends when the mouse falls off

the rod or after reaching 300s. Time was recorded for each trial. A resting time of 180s was allowed between each trial. Ten trials were completed per day for three consecutive days.

The wire suspension test consisted in hanging the mouse by the paws in the middle of a cable (length 80 cm, height 25 cm) fixed between two platforms. The time required to reach one of the platforms was recorded. *The pole test* comprised of a vertical pole (diameter 1.5cm and height 50 cm) fixed on the table and covered by a platform at the top. The mouse was positioned underneath the platform, head upward, and the time to turn down and reach the table was recorded. The maximal time allowed to complete each test was set at 60s. In these two later tests, animals were pre-trained so they fully achieve the task before testing.

Pharmacological Treatments

The GSK-3 inhibitor SB216763 (Tocris, MN, USA) or vehicle (100% DMSO) was administered 15 minutes before rotarod training. They were injected bilaterally (10 μ g/1 μ L/side) directly into the dorsal striatum (stereotaxic coordinates: AP: +0.86mm; ML: \pm 1.50mm; DV: -3.25mm relative to bregma) via a cannula (Plastics One, VA, US) at a constant rate of 0.5 μ L/min using a microinjector pump (Havard Apparatus, MA, USA) for a total of 2min. The cannula was implanted in mice under isoflurane anesthesia 7 days before the beginning of treatments to allow full animal recovery.

In the experiment using LiCl treatment, WT and Akt3 KO mice received 0.2% LiCl diet (Harlan Teklab, WI, USA) for 5 days, followed by 10 additional days of 0.4% LiCl diet as previously described (O'Brien et al., 2004). Mouse drinking water was supplemented with 0.9% NaCl to reduce ion imbalance and potential polyuria caused by the treatment. Motor behaviour tests were initiated on day 11. On day 15, mice were anesthetized under isoflurane, decapitated,

blood was collected through a cardiac puncture and brains were removed. Serum LiCl concentrations were evaluated using a flame photometer (Perkin-Elmer, model Analyst 100). Brains were dissected rapidly, frozen on dried ice and kept at -80 °C until processed for western blots analysis.

Western Blot

Striatal tissues were homogenized in RIPA buffer (65 mM Tris base, 0.15 M NaCl, 0.1% Triton-100x, 0.25% SDS, 1 mM EDTA) containing protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche, IN, USA). Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, CA, USA). 40 µg of protein samples were heated at 95°C for 5 min, loaded on 10% SDS-PAGE gel electrophoresis and then transferred on nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in 5% BSA/TBS-Tween 0.1% for 1 hour at room temperature and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: phospho- GSK-3α/β Y279/Y216 (1:2000, Abcam, MA, USA), GSK-3α/β (1:2000, Millipore, MA, USA), phospho-Tau S202 (1:1000, Abcam), phospho-Tau S404 (1:1000, Abcam) and Tau-5 (1:1000, Abcam). Membranes were washed twice in TBS-Tween 0.1% and incubated with the corresponding horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:5000, Cell Signaling Technology, MA, USA) for 1 hour at room temperature. Mouse monoclonal antibody against GAPDH (1:10000, Abcam) was used as a loading control. Chemiluminescence reactions (SuperSignal West Femto chemiluminescence kit, Pierce Chemical Co., IL, USA) were achieved to visualize protein and performed densitometric analyses using the Visonwork LS software (UVP bioimaging, CA, USA).

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (version 5.0, Graph Pad Software, CA, USA). Data were subjected, as appropriate, to a two-way repeated measures ANOVA followed by the *post hoc* Bonferroni test. Data were reported as the mean \pm S.E.M. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Deletion of Akt3 compromised rotarod performances but not general motor abilities. The accelerating rotarod task is commonly used to evaluate motor skill learning (Bureau et al., 2010; Luft and Buitrago, 2005). As we previously reported (Bureau et al., 2010), rotarod performances in WT mice rapidly improved at the first and second day of training and reached a plateau on day 3 (Figure 1A). On the other hand, rotarod performances in Akt3 KO mice improved at a much slower rate at day 1 and 2 when compared to WT littermates. In addition, the plateau of performances is significantly lower than WT mice at day 3 (Figure 1A). Two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test was performed on the average of the first two trials and revealed a significant effect of genotype ($F_{(1,20)} = 50.55, P < 0.001$), an effect of training days ($F_{(2,20)} = 48.59, P < 0.001$) but no interaction between genotype and training days ($F_{(2,20)} = 2.557, P > 0.05$) (Figure 1B). Analysis of the last two trials indicated a significant effect of genotype ($F_{(1,20)} = 13.44, P < 0.01$), an effect of training days ($F_{(2,20)} = 4.958, P < 0.05$), but no interaction between genotype and training days ($F_{(2,20)} = 0.05394, P > 0.05$) (Figure 1B). We next assessed gross motor skills in order to verify whether the impaired rotarod performances were due to learning deficits or compromised motor abilities such as coordination,

motion speed and muscular strength. We observed that both Akt3 KO mice and their WT littermates exhibited similar performances at the pole (Figure 1C, unpaired *t*-test, $P > 0.05$) and wire suspension tests (Figure 1D, unpaired *t*-test, $P > 0.05$).

Genetic deletion or pharmacological inhibition of GSK-3 has no effect on rotarod learning. Homozygous deletion of GSK-3 β or deletion of both α and β GSK-3 isoforms were known to be lethal (Hoeflich et al., 2000). We therefore assessed the accelerating rotarod test in the GSK-3 α heterozygous and homozygous, as well as the GSK-3 β heterozygous KO mice. Neither genetic deletion of GSK-3 α nor GSK-3 β was associated with alteration in rotarod performances (Figures 2A, 2B). In order to assess the effect of inhibiting both GSK-3 α and GSK-3 β isoforms at the same time, we injected the selective GSK-3 α/β inhibitor SB216763 directly into the dorsal striatum, a region well known to be implicated in motor skill learning (Bergeron et al., 2014; Bureau et al., 2010; D'Amours et al., 2011; Lemay-Clermont et al., 2011; Yin et al., 2009). Intra-striatal infusion of SB216763 prior each day of training did not impair rotarod learning (Figure 2C).

Evidence of augmented GSK-3 activity in the striatum of Akt3 KO mice. Our previous study on Akt3 KO mice has revealed that an increase in the levels of phospho-Ser21-GSK-3 α and phospho-Ser9-GSK-3 β occurred in the striatum structure, which are known to enhance GSK-3 α/β activity (Bergeron et al., 2017). It has been shown that increased phospho-Tyr279-GSK-3 α and phospho-Tyr216-GSK-3 β is also related to an increase in these kinases activity (Jope, 2003; Kirshenboim et al., 2004). Western blot analysis revealed that the levels of phospho-Tyr279-GSK-3 α and phospho-Tyr216-GSK-3 β were both increased in the striatum of AKT KO

mice (Figures 3A and 3B). Chronic LiCl treatment was able to reduce to control values the levels of phospho-GSK-3 α / β (Figures 3A and 3B). To further accumulate evidence of an increased GSK-3 activity in the striatum of Akt3 KO mice, we assessed the levels of phospho-Ser202 and phospho-Ser404 of Tau, two well-known molecular targets of activated GSK-3 (Sutherland, 2011). Western blot quantification revealed that LiCl treatments decreased the striatal levels of phospho-Ser202-Tau in WT mice; whereas the levels of phospho-Ser404-tau were unaffected (Figures 3C and 3D). In Akt3 KO mice, both levels of phospho-Ser-Tau were increased compared to their WT littermates. The LiCl treatment reduced to control values the striatal levels of phospho-Ser202/404 (Figures 3C and 3D).

LiCl administration rescued rotarod performances in Akt3 KO mice. We investigated the effect of a chronic LiCl treatment on the accelerating rotarod performances of Akt3 KO mice. It is noteworthy that serum LiCl concentrations were measured at the end of treatments and a mean of 0.09 ± 0.08 mM were detected in mice fed with LiCl chow; levels in mice fed with normal chow were undetectable. Our rotarod analyses confirmed the reduced performances in Akt3 KO mice as previously displayed in Figure 1 and revealed that the LiCl treatment was without effect on WT mice (Figure 4A). Notably, Akt3 KO mice fed with LiCl significantly improved their performances on the rotarod when compared to Akt3 KO mice fed with normal chow. Statistical analysis using two-way repeated measures ANOVA followed by the *post hoc* Bonferroni test of the first two trials displayed a significant difference between the treatments ($F_{(3,32)} = 10.40, P < 0.001$), an effect of training days ($F_{(2,32)} = 140.2, P < 0.001$) and no interaction between treatments and days of training ($F_{(6,32)} = 1.519, P > 0.05$). Analysis of last two trials indicated a significant effect of treatments ($F_{(3,34)} = 4.028, P < 0.05$), an effect of training days

($F_{(2,34)} = 13.94, P < 0.001$), but no interaction between treatments and days of training ($F_{(6,34)} = 0.0707, P > 0.05$) (Figure 4B).

DISCUSSION

Our findings using a mouse model with genetic deletion of Akt3 are demonstrating that the specific isoform Akt3 throughout the Akt3/GSK-3 pathway is involved during motor learning. Akt3 differs from other isoforms (Akt1 and Akt2) as its distribution is more restricted, being most highly expressed in the brain than Akt1 and Akt2 (Nakatani et al., 1999; Yang et al., 2005). It is noteworthy that deletion of Akt3 does not interfere with Akt1 or Akt2 protein expression and has no overall impact on body size or general health in two independent models of Akt3 genetic deletion (Bergeron et al., 2017; Howell et al., 2017). We propose that motor learning impairments observed in the Akt3 KO mice are caused by a GSK-3 hyperactivity in the brain of these mice.

The present study validates our previous observation that genetic deletion of Akt3 in mice is not associated with impaired general motor aptitudes (Bergeron et al., 2017). Normal performances of Akt3 KO mice are indeed described in two independent tests of motor abilities, the slow constant speed rotarod and stepping tests (Bergeron et al., 2017). The present study reaches the same conclusion by using two additional motor ability assessments, the pole and wire suspension tests. The pole test is known to evaluate mice bradykinesia and motor coordination whereas the wire suspension test assesses coordination and muscles strength. Interestingly, however, regardless of this normal general motor abilities phenotype, the Akt3 KO mice exhibit marked impaired learning performances at the accelerating rotarod test. This later test is designed to arbitrary divide the learning progression into several stages in parallel

to the general pattern of memory encoding, which include acquisition (intrasession; day 1) and consolidation (intersession; days 2-3) (Buitrago et al., 2004; Bureau et al., 2010; Karni et al., 1998; Luft and Buitrago, 2005). Note that the test allows the investigation of motor skill learning in the absence of associative and working memory components (Buitrago et al., 2004). Our data revealed that Akt3 KO improved their performances at a much slower rate than their WT littermates. A closer analysis using the average first two trials revealed that the performances of Akt3 KO animals are significantly lower than WT, corresponding to the intersession phase. Analysis of the average last two trials revealed that at the third training day, the difference between both groups did not reach statistical significance. These data revealed that Akt3 KO mice have the capacity to reach maximal rotarod performances, but require a much longer period than WT animals. We believe the memory stabilization that undergoes at the end of each training days, transferring the memory from an unsteady state to a more stable state, is impaired in Akt3 KO mice. As far as we know, this is the first demonstration that Akt3 deletion selectively altered motor skill learning without affecting general motor abilities in mice.

The GSK-3 protein is a direct molecular target of Akt and the Akt/GSK-3 pathway represents an important signaling corridor for the integration of the synaptic neurotransmission, neuronal cell proliferation, migration, and plasticity (Beaulieu et al., 2011; Beaulieu et al., 2009). Our study demonstrates that although deletion of Akt3 impaired motor learning, the genetic deletion or pharmacological inhibition of GSK-3 is without effect at the accelerating rotarod test. This is in accordance with the fact that we observe an increased activation of GSK-3 α/β in parallel with the impaired motor learning of Akt3 KO mice. Our study reveals the activation of GSK-3 through phosphorylation of Tyr279 in GSK-3 α and Tyr216 in GSK-3 β . This unrestrictive tyrosine-phosphorylation is widely used as an indicator of changes in GSK-3

activity because, when phosphorylated, it has been shown to act as a pseudosubstrate that folds into the primed substrate binding pocket of GSK-3 to increase access of substrates and thereby allow their phosphorylation by GSK-3 (Beurel et al., 2015; Li and Jope, 2010; Sutherland, 2011). In accordance, we have previously reported that levels of phosphorylated GSK-3 α/β at serine 21/9 are significantly decreased in the Akt3 KO animals, which also indirectly propose an increased activity of GSK-3 proteins in the brain of these mice (Bergeron et al., 2017).

Another evidence suggesting an increased GSK-3 activity is that levels of Tau phosphorylated at Ser202 and Ser404 sites are increased. The Ser202 and Ser404 sites of Tau have been recognized as substrates directly phosphorylated by activated GSK-3 (Liu et al., 2004; Qu et al., 2014). It is therefore reasonable to propose that the augmented GSK-3 α/β activity we reported in the brain of Akt3 KO mice is accountable, at least in part, for the impaired rotarod learning observed in these mice. Recent studies are also suggesting that GSK-3 may be involved in different phases of memory processes. For instance, activation of GSK-3 in the hippocampus is required for contextual memory reconsolidation of fear-conditioning (Kimura et al., 2008) and memory retrieval in a passive avoidance task (Hong et al., 2012). GSK-3 inhibition has been shown to interfere with spatial learning in the Morris water maze (Hu et al., 2009). In fact, it is demonstrated that enhanced GSK-3 activation impairs long-term potentiation and constrain synaptic plasticity (Hooper et al., 2007; Peineau et al., 2007; Zhu et al., 2007).

Administration of LiCl has been shown to increase serine-phosphorylation of GSK-3 in mouse brain, which is considered as lithium's inhibition of GSK-3 (Freeland and Beaulieu, 2012; Jope, 2003; O'Brien et al., 2004). LiCl inhibits GSK-3 by a direct action (Klein and Melton, 1996; Stambolic et al., 1996), and this inhibitory effect is amplified by a subsequent increase in the inhibitory serine-phosphorylation of GSK-3 (De Sarno et al., 2002). In the brain of Akt3 KO

mice, chronic LiCl treatment increases phosphorylated GSK-3 α/β at serine 21/9 (Bergeron et al., 2017). In this context, we were interested to test whether the increased tyrosine-phosphorylation of GSK-3 reported in our study is also modulated by LiCl, using a therapeutically relevant regimen, a query that has never been investigated before *in vivo*. Our finding demonstrate that these indicators of hyperactive GSK-3 in Akt3 KO mice brain can be entirely reversed by LiCl. Another remarkable finding is our demonstration that chronic LiCl administration reverse the impaired rotarod learning in Akt3 KO mice. We therefore establish a link between direct GSK-3 inhibition and the rescue of motor learning deficit in the Akt3 KO animals. These findings are highlighting a central role for Akt3 and GSK-3 activity in memory stabilization during the consolidation periods of rotarod learning in mice.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BO has designed and conducted the whole study. YB established and maintained the AKT3 KO mice in the laboratory of MC and GM. E. Pepin has helped in the behavioral characterization of AKT3 KO mice. LC in the laboratory of JMB performed behavioral experiments on the GSK-3 KO mice. JMB has provided and maintained mouse GSK-3 KO colonies. BO and MC wrote the manuscript. MC and GM contributed to the conceptual frame of the study and edited the manuscript.

FUNDING AND DISCLOSURE

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant #311763 to MC). B Ouimet and E Pepin were the holder of MSc research merit scholarship from the Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS) and Y Bergeron was the

holder of a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada PhD studentship.

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M.J. Birnbaum for providing Akt3 KO mice and J.R. Woodgett for providing GSK-3 KO mice. We are also grateful to Geneviève Bureau for useful comments and suggestions.

REFERENCE

- Altomare, D.A., K. Guo, J.Q. Cheng, G. Sonoda, K. Walsh, and J.R. Testa. 1995. Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene. *Oncogene*. 11:1055-1060.
- Beaulieu, J.M., T. Del'guidice, T.D. Sotnikova, M. Lemasson, and R.R. Gainetdinov. 2011. Beyond cAMP: The Regulation of Akt and GSK-3 by Dopamine Receptors. *Front Mol Neurosci*. 4:38.
- Beaulieu, J.M., R.R. Gainetdinov, and M.G. Caron. 2009. Akt/GSK-3 Signaling in the Action of Psychotropic Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 49:327-347.
- Bergeron, Y., G. Bureau, M.E. Laurier-Laurin, E. Asselin, G. Massicotte, and M. Cyr. 2017. Genetic Deletion of Akt3 Induces an Endophenotype Reminiscent of Psychiatric Manifestations in Mice. *Front Mol Neurosci*. 10:102.
- Bergeron, Y., L. Chagniel, G. Bureau, G. Massicotte, and M. Cyr. 2014. mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 7:26.
- Beurel, E., S.F. Grieco, and R.S. Jope. 2015. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 148:114-131.
- Buitrago, M.M., J.B. Schulz, J. Dichgans, and A.R. Luft. 2004. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem*. 81:211-216.
- Bureau, G., M. Carrier, M. Lebel, and M. Cyr. 2010. Intrastriatal inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem*. 94:107-115.
- Chagniel, L., C. Robitaille, C. Lacharité-Mueller, G. Bureau, and M. Cyr. 2012. Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control. *Behavioural Brain Research*. 228:9-15.
- Chong, Z.Z., F. Li, and K. Maiese. 2005. Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol Histopathol*. 20:299-315.
- Cole, A.R. 2013. Glycogen synthase kinase 3 substrates in mood disorders and schizophrenia. *FEBS J*. 280:5213-5227.

- D'Amours, G., G. Bureau, M.J. Boily, and M. Cyr. 2011. Differential gene expression profiling in the mouse brain during motor skill learning: focus on the striatum structure. *Behav Brain Res.* 221:108-117.
- De Sarno, P., X. Li, and R.S. Jope. 2002. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology.* 43:1158-1164.
- Del'Guidice, T., C. Latapy, A. Rampino, J. Khlgatyan, M. Lemasson, B. Gelao, T. Quarto, G. Rizzo, A. Barbeau, C. Lamarre, A. Bertolino, G. Blasi, and J.M. Beaulieu. 2015. FXR1P is a GSK-3beta substrate regulating mood and emotion processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 112:E4610-4619.
- Easton, R.M., H. Cho, K. Roovers, D.W. Shineman, M. Mizrahi, M.S. Forman, V.M. Lee, M. Szabolcs, R. de Jong, T. Oltersdorf, T. Ludwig, A. Efstratiadis, and M.J. Birnbaum. 2005. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol.* 25:1869-1878.
- Freland, L., and J.M. Beaulieu. 2012. Inhibition of GSK-3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Front Mol Neurosci.* 5:14.
- Hoeflich, K.P., J. Luo, E.A. Rubie, M.S. Tsao, O. Jin, and J.R. Woodgett. 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature.* 406:86-90.
- Hong, J.G., D.H. Kim, C.H. Lee, S.J. Park, J.M. Kim, M. Cai, D.S. Jang, and J.H. Ryu. 2012. GSK-3beta activity in the hippocampus is required for memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem.* 98:122-129.
- Hooper, C., V. Markevich, F. Plattner, R. Killick, E. Schofield, T. Engel, F. Hernandez, B. Anderton, K. Rosenblum, T. Bliss, S.F. Cooke, J. Avila, J.J. Lucas, K.P. Giese, J. Stephenson, and S. Lovestone. 2007. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience.* 25:81-86.
- Howell, K.R., K. Floyd, and A.J. Law. 2017. PKB γ /AKT3 loss-of-function causes learning and memory deficits and deregulation of AKT/mTORC2 signaling: Relevance for schizophrenia. *PLoS one.* 12:e0175993.
- Hu, S., A.N. Begum, M.R. Jones, M.S. Oh, W.K. Beech, B.H. Beech, F. Yang, P. Chen, O.J. Ubeda, P.C. Kim, P. Davies, Q. Ma, G.M. Cole, and S.A. Frautschy. 2009. GSK-3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. *Neurobiol Dis.* 33:193-206.
- Jope, R.S. 2003. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends in Pharmacological Sciences.* 24:441-443.
- Karni, A., G. Meyer, C. Rey-Hipolito, P. Jezzard, M.M. Adams, R. Turner, and L.G. Ungerleider. 1998. The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95:861-868.
- Kimura, T., S. Yamashita, S. Nakao, J.-M. Park, M. Murayama, T. Mizoroki, Y. Yoshiike, N. Sahara, and A. Takashima. 2008. GSK-3 β Is Required for Memory Reconsolidation in Adult Brain. *PLoS one.* 3:e3540.
- Kirshenboim, N., B. Plotkin, S.B. Shlomo, O. Kaidanovich-Beilin, and H. Eldar-Finkelman. 2004. Lithium-mediated phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta involves PI3 kinase-dependent activation of protein kinase C-alpha. *J Mol Neurosci.* 24:237-245.

- Klein, P.S., and D.A. Melton. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:8455-8459.
- Lemay-Clermont, J., C. Robitaille, Y.P. Auberson, G. Bureau, and M. Cyr. 2011. Blockade of NMDA receptors 2A subunit in the dorsal striatum impairs the learning of a complex motor skill. *Behavioral neuroscience*. 125:714-723.
- Li, X., and R.S. Jope. 2010. Is Glycogen Synthase Kinase-3 a Central Modulator in Mood Regulation? *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 35:2143-2154.
- Liu, S.J., J.Y. Zhang, H.L. Li, Z.Y. Fang, Q. Wang, H.M. Deng, C.X. Gong, I. Grundke-Iqbali, K. Iqbali, and J.Z. Wang. 2004. Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *The Journal of biological chemistry*. 279:50078-50088.
- Luft, A.R., and M.M. Buitrago. 2005. Stages of motor skill learning. *Mol Neurobiol*. 32:205-216.
- MacAulay, K., B.W. Doble, S. Patel, T. Hansotia, E.M. Sinclair, D.J. Drucker, A. Nagy, and J.R. Woodgett. 2007. Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell metabolism*. 6:329-337.
- Machado-Vieira, R., M.V. Zanetti, A.L. Teixeira, M. Uno, L.L. Valiengo, M.G. Soeiro-de-Souza, S.M. Oba-Shinjo, R.T. de Sousa, C.A. Zarate Jr, W.F. Gattaz, and S.K.N. Marie. 2015. Decreased AKT1/mTOR pathway mRNA expression in short-term bipolar disorder. *European Neuropsychopharmacology*. 25:468-473.
- Manning, B.D., and L.C. Cantley. 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129:1261-1274.
- Nakatani, K., H. Sakaue, D.A. Thompson, R.J. Weigel, and R.A. Roth. 1999. Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun*. 257:906-910.
- O'Brien, W.T., A.D. Harper, F. Jove, J.R. Woodgett, S. Maretto, S. Piccolo, and P.S. Klein. 2004. Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci*. 24:6791-6798.
- Packard, M.G., and B.J. Knowlton. 2002. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual review of neuroscience*. 25:563-593.
- Peineau, S., C. Taghibiglou, C. Bradley, T.P. Wong, L. Liu, J. Lu, E. Lo, D. Wu, E. Saule, T. Bouschet, P. Matthews, J.T.R. Isaac, Zuner A. Bortolotto, Y.T. Wang, and G.L. Collingridge. 2007. PLT Inhibits DLT in the Hippocampus via Regulation of GSK-3 β . *Neuron*. 53:703-717.
- Qu, Z.-S., L. Li, X.-J. Sun, Y.-W. Zhao, J. Zhang, Z. Geng, J.-L. Fu, and Q.-G. Ren. 2014. Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Production of Amyloid- β Peptides and Tau Phosphorylation in Diabetic Rat Brain. *The Scientific World Journal*. 2014:878123.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 511:421-427.
- Stambolic, V., L. Ruel, and J.R. Woodgett. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Current biology : CB*. 6:1664-1668.
- Sutherland, C. 2011. What Are the bona fide GSK-3 Substrates? *Int J Alzheimers Dis*. 2011:505607.

- Ungerleider, L.G., J. Doyon, and A. Karni. 2002. Imaging brain plasticity during motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem.* 78:553-564.
- Yang, Z.-Z., O. Tschopp, N. Di-Poï, E. Bruder, A. Baudry, B. Dümmler, W. Wahli, and B.A. Hemmings. 2005. Dosage-Dependent Effects of Akt1/Protein Kinase B α (PKB α) and Akt3/PKB γ on Thymus, Skin, and Cardiovascular and Nervous System Development in Mice. *Molecular and Cellular Biology.* 25:10407-10418.
- Yin, H.H., S.P. Mulcare, M.R. Hilario, E. Clouse, T. Holloway, M.I. Davis, A.C. Hansson, D.M. Lovinger, and R.M. Costa. 2009. Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature neuroscience.* 12:333-341.
- Zheng, W., H. Wang, Z. Zeng, J. Lin, P.J. Little, L.K. Srivastava, and R. Quirion. 2012. The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia. *Brain Research.* 1470:145-158.
- Zhu, L.Q., S.H. Wang, D. Liu, Y.Y. Yin, Q. Tian, X.C. Wang, Q. Wang, J.G. Chen, and J.Z. Wang. 2007. Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci.* 27:12211-12220.

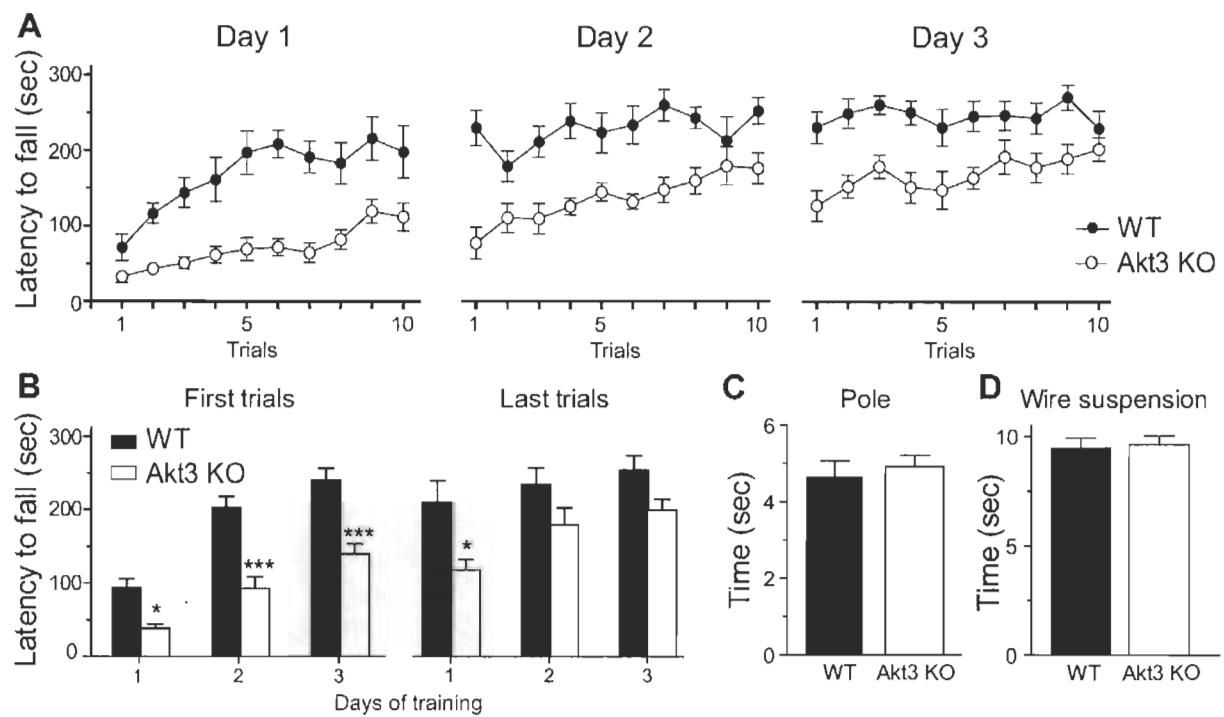


Figure 1. Impaired motor skill learning in Akt3 KO mice. (A) Time spent on the rod of the accelerating rotarod for each trial at days 1, 2 and 3 were shown for Akt3 KO and WT mice. Data represent the mean of latency to fall per trial expressed in seconds \pm S.E.M. **(B)** Average of the first two and last two trials of each training day. Values represent the average mean latency to fall expressed in seconds \pm S.E.M. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. WT group. General motor capacity of WT and Akt3 KO mice was assessed by the pole test **(C)** and the wire suspension test **(D)**. Data represent the time in seconds required to perform the task \pm S.E.M.. $n = 6$ mice per group.

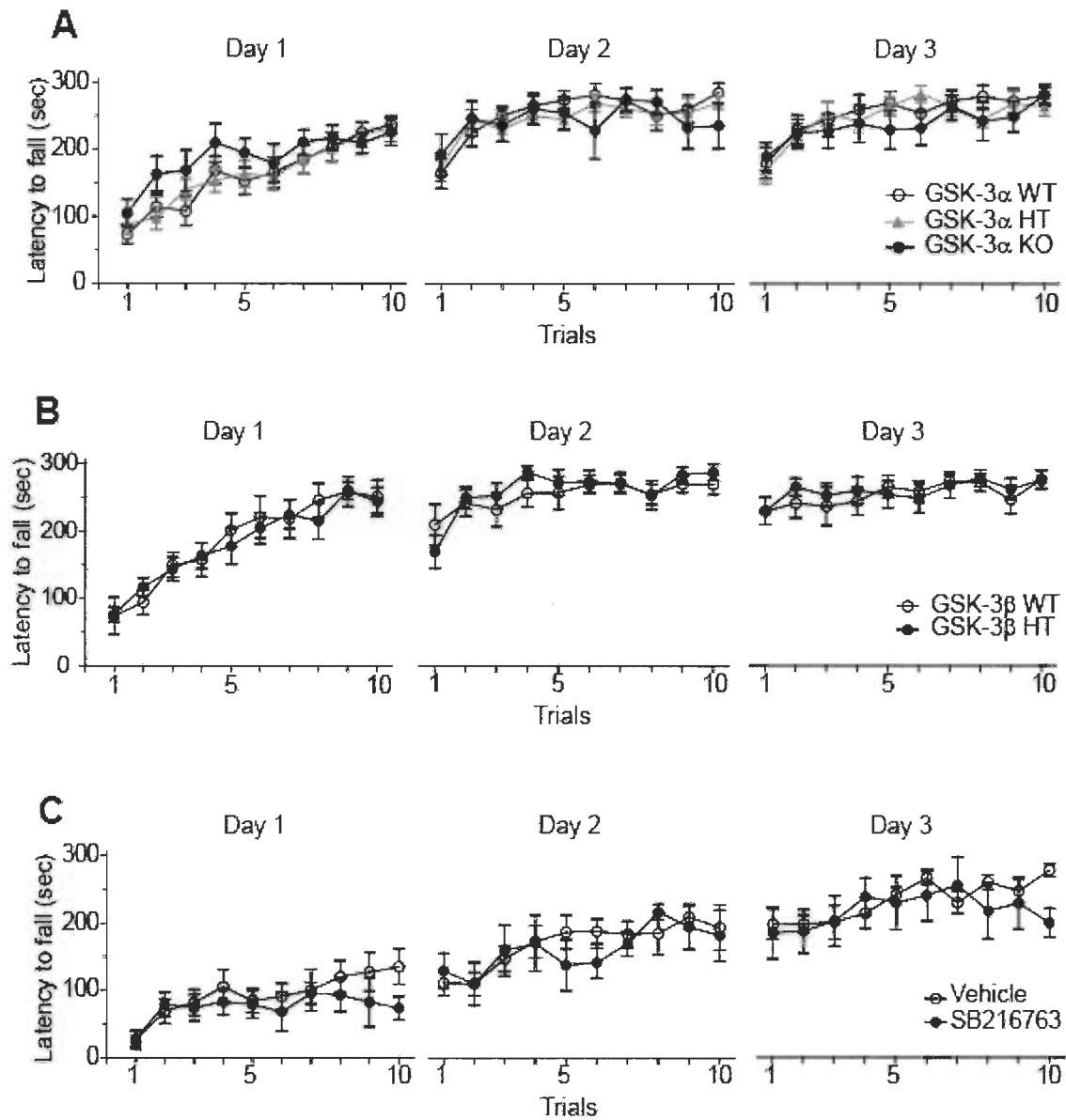


Figure 2. Genetic deletion or pharmacological inhibition of GSK-3 α and GSK-3 β did not affect motor learning. Time spent on the rod of the accelerating rotarod for each trial at days 1, 2 and 3 for mice with a genetic deletion of (A) GSK-3 α ($n = 10$ WT, 12 GSK-3 α HT and 6 GSK-3 α KO), (B) GSK-3 β ($n = 6$ WT and 13 GSK-3 β HT) or (C) mice treated with the GSK-3 inhibitor SB216763 ($n = 7$ mice per group). Data represent the mean of latency to fall per trial expressed in seconds \pm S.E.M..

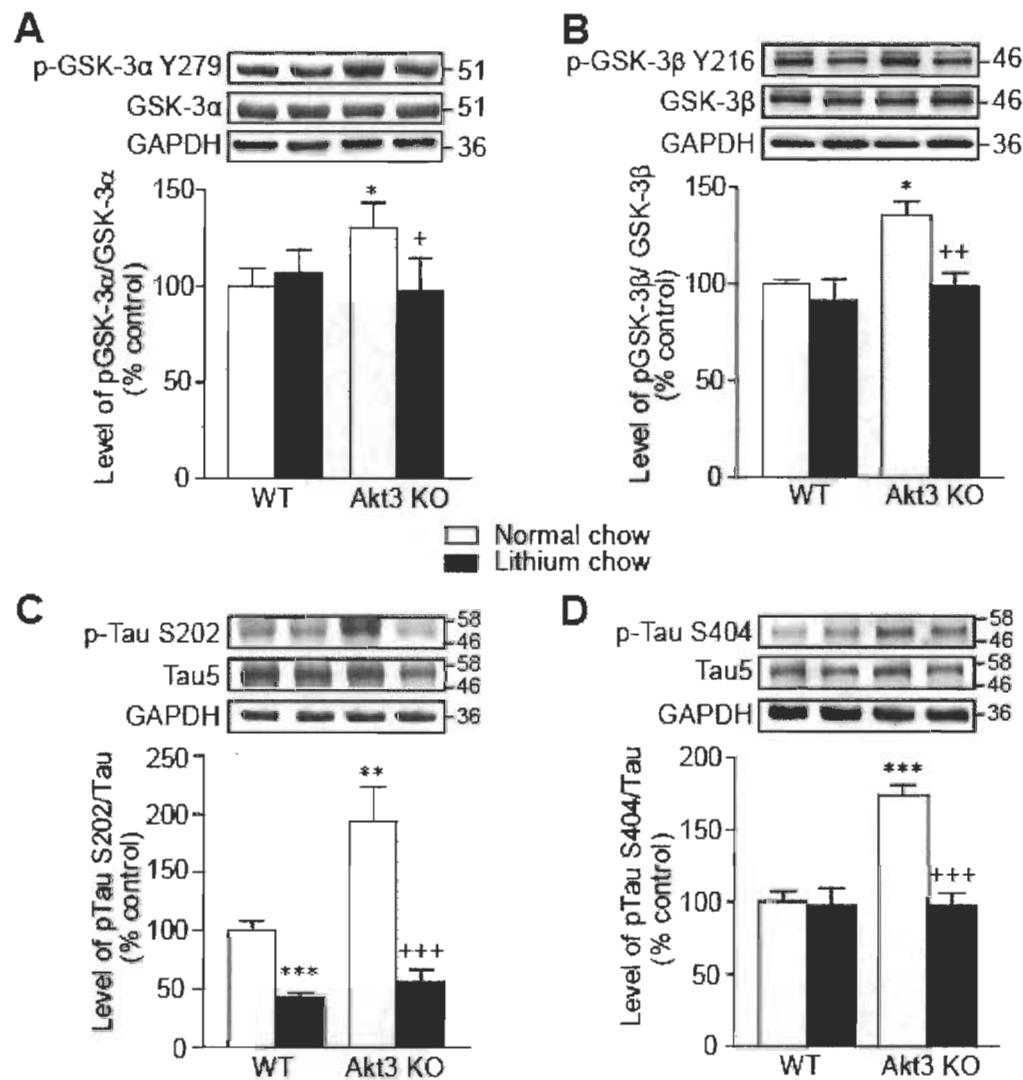


Figure 3. GSK-3 activity is enhanced in the striatum of Akt3 KO mice. Western blot analysis was performed in striatal samples of WT and Akt3 KO mice fed with normal or LiCl chow. Levels of phospho-Tyr279-GSK-3 α (A), phospho-Tyr216-GSK-3 β (B), phospho-Ser202-Tau (C) and phospho-Ser404-Tau (D) are expressed as mean relative to respective GSK-3 or tau total protein (expressed as a percentage of control) \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT mice fed with normal chow. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, + + + $p < 0.001$ vs. Akt3 KO mice fed with normal chow. $n = 5$ mice per group.

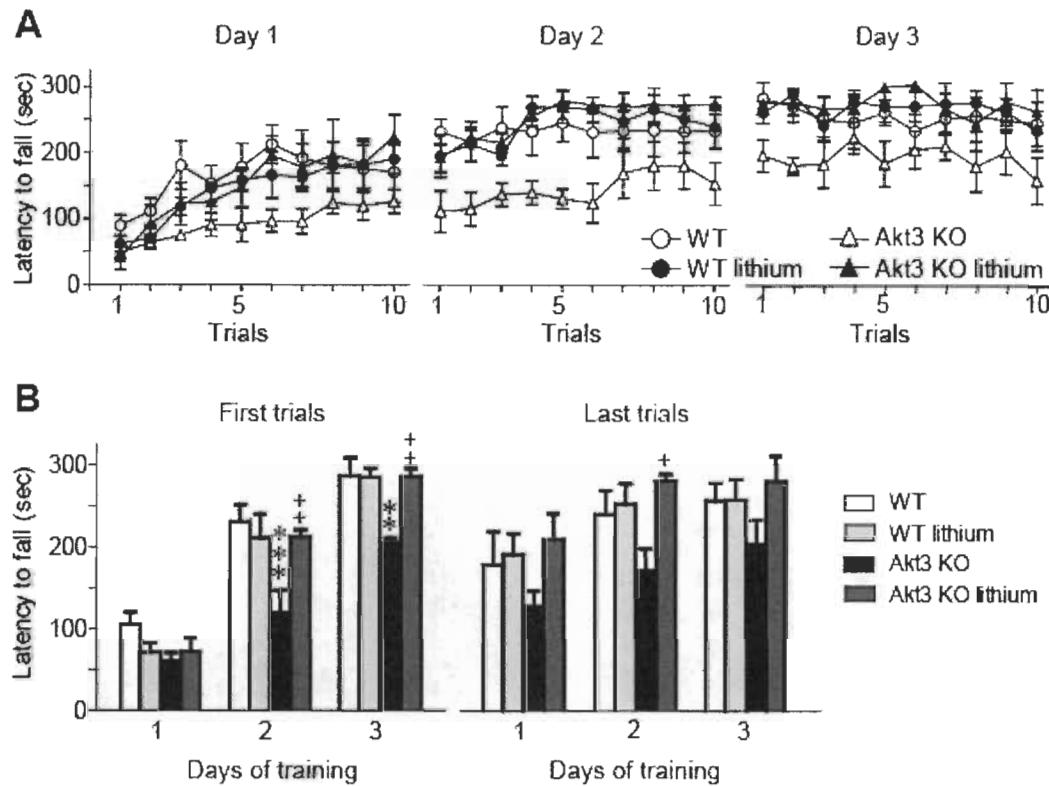


Figure 4. LiCl treatment restored rotarod impairment of Akt3 KO mice. (A) Time spent on the rod of the accelerating rotarod for each trial at days 1, 2 and 3. WT and Akt3 KO mice were fed with normal or LiCl chow. Data represent the mean of latency to fall per trial expressed in seconds \pm S.E.M.. **(B)** Average of the first two and last two trials of each training day. Values represent the average mean latency to fall expressed in seconds \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. WT group fed with normal chow, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ vs. Akt3 KO mice fed with normal chow. $n = 5$ mice per group.

Chapitre V : Discussion générale

GSK-3 est une protéine largement étudiée pour ses multiples effets sur le corps humain tels que le diabète, le cancer et les troubles de l'humeur (Jope et al., 2007; MacAulay et al., 2007). Par contre, son implication dans l'apprentissage moteur est moins comprise. Mes premiers résultats ont démontré que la délétion d'Akt3 induit un retard de l'apprentissage du rotarod sans pour autant affecter la capacité des rongeurs affectés à accomplir la tâche. Effectivement, les résultats sur le *pole test* et le *wire test* n'ont démontré aucun déficit moteur important chez les souris Akt3 KO. De plus, il a été possible d'établir que GSK-3 α/β serait impliquée dans l'apprentissage moteur et qu'Akt3 serait un important modulateur de l'activité de GSK-3 dans le striatum. En effet, une augmentation de l'activité de GSK-3 α/β dans le striatum a été aperçu chez les souris Akt3 KO. De plus, les résultats obtenus avec un groupe de souris génétiquement modifiées ont pu établir que la présence de GSK-3 ne serait pas indispensable à l'apprentissage moteur. En effet, sa délétion et son inhibition pharmacologique dans le striatum n'entraînent pas de déficit d'apprentissage du rotarod. Les résultats complets sont présentés sous forme d'article scientifique (Chapitre IV). Les principaux résultats qui ont permis de répondre à mes hypothèses de recherche seront développés dans ce chapitre.

5.1 La délétion génétique d'Akt3 KO induit des troubles d'apprentissage moteur

Grâce au rotarod et à la génération de souris Akt3 KO, il a été possible d'établir qu'Akt3 a un rôle important dans l'apprentissage d'une tâche motrice complexe. Le rotarod est un instrument de recherche bien décrit qui permet de reproduire les différentes phases de l'apprentissage moteur (Buitrago et al., 2004). Au premier jour d'entraînement, le temps passé sur le rotarod avant la chute de l'animal a augmenté de façon importante entre les premiers et derniers essais. En effet, les souris ont été capables de rester sur le rotarod en accélération beaucoup plus longtemps, en moyenne, lors du dixième essai qu'au premier essai. Cette importante amélioration correspond à la phase rapide de l'apprentissage moteur. Ce qu'il est important de noter, c'est la différence importante entre les deux groupes de souris. En effet, malgré le fait que chaque groupe se soit amélioré entre les premiers et derniers essais, il y a une

différence significative entre les groupes Akt3 KO et WT. Effectivement, les souris Akt3 KO restent, en moyenne, moins longtemps sur le rotarod lors de leurs premiers et derniers essais (Figure 1B, Chapitre IV). Cette différence significative au premier jour peut être expliquée par un problème au niveau de l'apprentissage rapide, c'est-à-dire l'apprentissage durant la première session d'une nouvelle tâche motrice complexe. Cette hypothèse est supportée par les résultats sur le *pole test* et le *wire suspension test* qui démontrent que le retard d'apprentissage n'est pas causé par une incapacité motrice chez les souris Akt3 KO (Figure 1 C/D, Chapitre IV). Ainsi, la délétion d'Akt3 n'induit pas de déficit moteur ou de coordination qui pourrait nuire à l'exécution du rotarod. Mes résultats sont par ailleurs en accord avec les études récentes qui n'ont pas détecté de trouble d'habiletés motrices chez les souris Akt3 KO (Bergeron et al., 2017; Howell et al., 2017). Mis ensemble, mes résultats suggèrent fortement que Akt3 est une protéine kinase essentielle à la phase rapide de l'apprentissage moteur. Au jour 2, le temps moyen aux premiers essais est toujours significativement plus bas chez les souris Akt3 KO. Par contre, ce temps moyen aux premiers essais du jour 2 est très similaire au temps moyen des derniers essais du jour 1 autant chez le groupe contrôle que le groupe Akt3 KO (Figure 1B, Chapitre IV). Ceci est un signe que l'animal a consolidé son apprentissage durant le temps de repos entre la première et la deuxième session d'entraînement (Luft et al., 2005). Ce résultat est intéressant, car il signifie que malgré le fait que les souris Akt3 KO performent moins bien sur le rotarod que le groupe contrôle, elles sont quand même capables d'apprendre la tâche et même de s'améliorer. Aussi, contrairement au jour 1, il n'y a pas eu d'amélioration fulgurante durant cette session d'apprentissage. La différence moyenne entre les premiers et derniers essais n'est pas aussi importante. Cependant, il est quand même possible d'observer une légère amélioration entre les premiers et derniers essais, car les souris n'ont pas encore atteint la limite maximale de la tâche, fixée à 300 secondes. Ces légers progrès correspondent à la phase lente d'apprentissage. C'est à ce moment qu'il y a remodelage des neurones et consolidation de la mémoire à long terme. Durant la troisième journée d'entraînement, les souris des deux groupes commencent la session avec un niveau d'habileté au rotarod qui est similaire au temps moyen du dernier essai du jour précédent. Encore une fois, les souris ont consolidé les informations qu'elles ont apprises durant la session du jour 2 pendant la période de repos entre le jour 2 et 3. À l'instar du jour 2, il n'y a pas eu d'amélioration très importante entre les premiers et derniers essais lors de la troisième journée d'apprentissage. Il est même possible d'observer un début de plateau des

performances chez les souris contrôles. En effet, les souris WT ont presque atteint le maximum du test, soit de tenir 300s sans tomber du rotarod. Continuer l'apprentissage n'apportera pas de gain significatif à ce groupe de souris, car la mémorisation de la tâche est déjà bien consolidée. Par contre, le groupe Akt3 KO semble encore continuer à s'améliorer et il n'y a pas encore de plateau visible (Figure 1A, Chapitre IV). Ceci suggère aussi que les souris Akt3 KO connaissent un retard important dans l'apprentissage dans du rotarod, car en temps normal 3 jours suffisent aux souris WT pour apprendre et maîtriser le rotarod (Bureau et al., 2010; Chagniel et al., 2012; Bergeron et al., 2014). Il aurait été intéressant de continuer l'apprentissage du rotarod afin de déterminer si les souris Akt3 KO sont capables de performer aussi bien que les WT avec quelques jours d'entraînement en plus.

5.2 Implication de la voie Akt-GSK-3 dans l'apprentissage moteur

Afin de comprendre l'implication de GSK-3 α/β dans l'apprentissage moteur, nous avons étudié les effets de sa délétion génétique sur l'apprentissage du rotarod. Comme mentionné précédemment, la délétion complète de GSK-3 β n'est pas viable chez la souris. Plusieurs combinaisons (GSK-3 α HT, GSK-3 α KO, GSK-3 β HT, inhibition pharmacologique) ont alors été utilisées pour permettre de bien comprendre le rôle de GSK-3. Ainsi, la délétion totale de GSK-3 α , d'un allèle de GSK-3 β ou bien l'inhibition pharmacologique de GSK-3 α/β dans le striatum n'induit aucun retard d'apprentissage sur le rotarod (Figure 2, Chapitre IV). Ceci suggère donc que l'activité de GSK-3 n'est pas indispensable à l'apprentissage du rotarod. Par ailleurs, quelques études précédentes avaient déjà expérimenté l'apprentissage du rotarod chez les souris GSK-3 α KO et GSK-3 β HT et n'avaient pas détecté de différence significative entre le groupe KO et WT (Kimura et al., 2008; Kaidanovich-Beilin et al., 2009). Par contre, ces études n'ont effectué que 3 essais par session ou moins durant 3 jours consécutifs. Mes résultats indiquent que ceci est nettement insuffisant pour détecter un trouble d'apprentissage dans la phase d'apprentissage rapide. Ainsi, à ma connaissance, cette présente étude est la première qui a porté attention à l'implication de GSK-3 α/β dans l'apprentissage moteur. Fait intéressant, plusieurs études ont démontré que l'inhibition de GSK-3 n'entraîne pas de problèmes neurologiques négatifs, mais plutôt positifs tels qu'un effet neuroprotecteur, antidépresseur et anti-inflammatoire (Eldar-Finkelman et al., 2011; Beurel et al., 2015). Ceci

pourrait expliquer pourquoi les souris traitées avec l'inhibiteur SB2116763, les GSK-3 α KO et les GSK-3 β HT n'ont pas de problème d'apprentissage du rotarod. Inversement, une étude antérieure a démontré que chez les souris Akt3 KO, l'activité de GSK-3 est plutôt augmentée dans plusieurs régions du cerveau, dont le striatum, région importante de l'apprentissage moteur (Bergeron et al., 2017). En effet, chez les souris Akt3 KO, il a été possible de détecter une diminution de la phosphorylation de GSK-3 α/β sur les séries 21/9. Ainsi, il est important de se rappeler que la phosphorylation de GSK-3 α/β par Akt sur les séries 21/9 respectivement permet de réduire l'activité de GSK-3 (Hughes et al., 1993; Freland et al., 2012). Afin d'attester cette hyperactivation de GSK-3, deux autres sites de phosphorylation de GSK-3 ont été étudiés. La phosphorylation de la tyrosine 279 de GSK-3 α et de la tyrosine 216 de GSK-3 β sont requis pour une activité maximale de GSK-3 (Sutherland, 2011; Beurel et al., 2015). Mes résultats indiquent une augmentation significative de la phosphorylation sur ces deux sites chez les souris Akt3 KO (Figure 3 A/B, Chapitre IV). Ainsi, l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines 279/216 et la diminution de la phosphorylation des séries 21/9 signalent une activité accrue de GSK-3. Puis, pour s'assurer que cette augmentation de l'activité est bien concrète, l'activité fonctionnelle de GSK-3 a été évaluée en examinant la phosphorylation des séries 202 et 204 de la protéine Tau, sites bien connus pour être phosphorylés par GSK-3 (Liu et al., 2004; Qu et al., 2014). En accord avec les résultats précédents, les niveaux de phosphorylation des séries 202 et 204 sont plus élevés chez les souris Akt3 KO (Figure 3 C/D, Chapitre IV). L'hyperactivation de GSK-3 a été reliée à plusieurs troubles neurologiques, tels que le trouble bipolaire la dépression et la schizophrénie (Eldar-Finkelman, 2002; Li et al., 2002; Karege et al., 2007; Li et al., 2010; Polter et al., 2010; Avrahami et al., 2013; Cole, 2013). Par contre, son rôle dans l'apprentissage moteur est nouveau. En supprimant la protéine Akt3, aucune augmentation de l'expression des isoformes Akt1 et Akt2 n'a été détectée, suggérant ainsi un rôle unique et non redondant à Akt3 (Bergeron et al., 2017). Akt est impliquée dans la régulation de GSK-3 α/β par sa phosphorylation sur les séries 21/9. Une étude *in vivo* a démontré que l'inhibition de la régulation de GSK-3 sur les séries 21/9 est importante pour la neurogenèse et qu'un dysfonctionnement de cette régulation cause d'importantes perturbations dans la neuroplasticité (Eom et al., 2009). Le striatum est bien connu pour son implication dans l'apprentissage moteur (Costa et al., 2004; Wachter et al., 2010). La perturbation de la plasticité

synaptique dans cette région spécifique du cerveau par l'hyperactivation de GSK-3 pourrait expliquer le retard d'apprentissage moteur chez les souris Akt3 KO. Ici, il est probable que la diminution de la phosphorylation de GSK-3 sur les séries 21/9 par Akt3 a permis à GSK-3 d'augmenter son activité. Par contre, il ne faut pas oublier qu'Akt a de multiples cibles et qu'il est impossible de déterminer avec certitude que les effets observés ne découlent pas aussi de l'altération d'une autre voie de signalisation impliquant Akt. L'implication de la voie Akt3/GSK-3 est d'autant plus plausible que l'administration d'un inhibiteur de GSK-3 permet le renversement du déficit d'apprentissage moteur du rotarod (Figure 4 A/B, Chapitre IV). Malgré les multiples effets répertoriés du LiCl, il est généralement bien accepté que le LiCl agit comme inhibiteur compétitif du magnésium et inhibe directement GSK-3 comme principale fonction (Phiel et al., 2001; Ryves et al., 2001; Gould et al., 2005; Jope, 2011). Effectivement, à dose thérapeutique, le traitement chronique au LiCl des souris Akt3 KO a rétabli les niveaux de phosphorylation des séries 21/9 (Bergeron et al., 2017) et tyrosines 279/216 de GSK-3 α/β au niveau du groupe contrôle (Figure 3 A/B, Chapitre IV). De plus, la diminution de la phosphorylation des séries 202/204 du Tau suite à l'administration chronique de LiCl témoignent une baisse de l'activité fonctionnelle de GSK-3. Malheureusement, le mécanisme moléculaire par lequel l'administration chronique de LiCl rétablit les niveaux de phosphorylation de GSK-3 et Tau chez les souris Akt3 KO n'a pas été établi pendant mes recherches. Par contre, mis ensemble, mes résultats suggèrent fortement que la voie Akt3-GSK-3 est impliquée dans l'apprentissage d'une tâche motrice complexe et que l'hyperactivation de GSK-3 aurait un impact négatif sur l'apprentissage du rotarod.

5.3 Perspectives et objectifs à long terme

Pour aller plus loin, il est intéressant de noter que les souris Akt3 KO ont été récemment caractérisées et expriment des symptômes suggérant des troubles psychiques. Effectivement, les souris Akt3 KO seraient plus susceptibles à développer des symptômes reliés à la dépression et à l'anxiété (Bergeron et al., 2017). La dépression est une maladie caractérisée par plusieurs symptômes cognitifs tels que l'état dépressif, une perte d'intérêt et de plaisir dans la majeure partie des activités courantes, de l'insomnie et de la difficulté à réfléchir et à se concentrer (American Psychiatric et al., 2013). Plusieurs études de neuroimagerie ont révélé que de

nombreuses structures cérébrales sont affectées durant la dépression (Lorenzetti et al., 2009; Zou et al., 2010). Ces structures incluent le lobe temporal, les ganglions de la base, l'amygdale et l'hippocampe. De plus, des études récentes ont démontré que la plasticité synaptique et les activités psychomotrices sont diminuées chez les patients dépressifs (Pittenger et al., 2008; Player et al., 2013). Il est donc légitime de se questionner et d'émettre l'hypothèse que le retard d'apprentissage moteur chez les souris Akt3 KO pourrait être en fait causé par une démotivation des souris à effectuer la tâche. Cette hypothèse est intéressante, car elle peut être corrélée avec mes résultats suite au traitement chronique avec le LiCl, molécule aussi reconnue pour être un

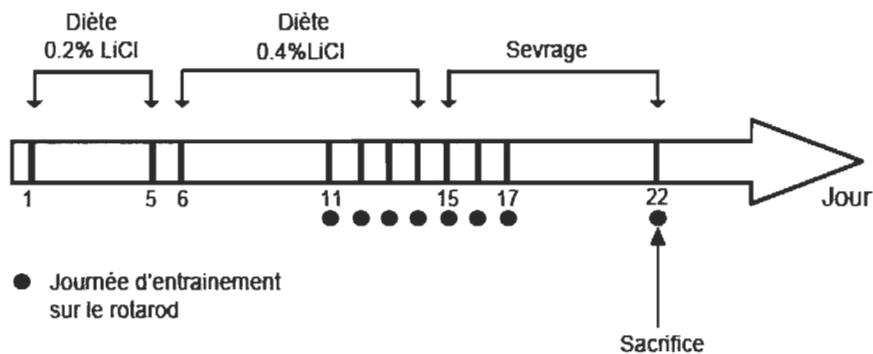


Figure 8. Conception expérimentale

régulateur de l'humeur et pour avoir un effet antidépresseur (Li et al., 2002; Bauer et al., 2014). Ainsi, il serait intéressant de scinder l'effet réel du lithium sur l'apprentissage moteur de son effet antidépresseur. Pour ce faire, des souris WT et Akt3 KO ont été traité au LiCl puis entraînées au rotarod selon un protocole précis (Figure 8). Tel que prévu, les deux groupes de souris ont bien appris la tâche en 3 jours et aucune différence significative n'a été détectée entre

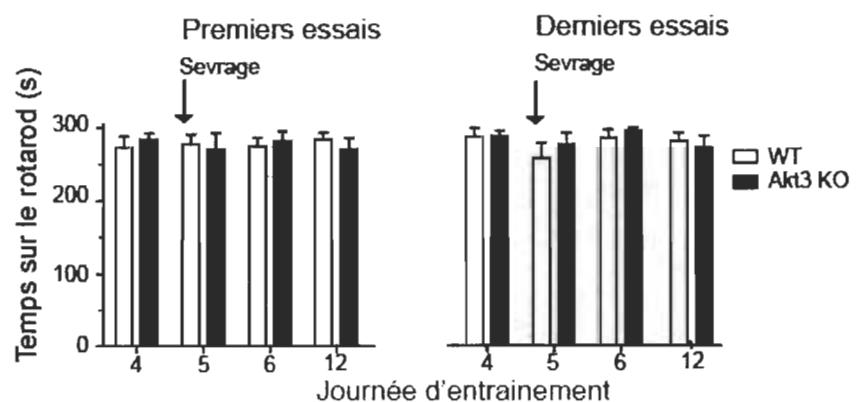


Figure 9. Moyenne des deux premiers et deux derniers essais pour chaque journée d'entraînement.

les premiers et derniers essais (Figure 9, Figure 10). Par la suite, un sevrage du LiCl a été effectué et les deux groupes ont subis plusieurs jours supplémentaires d'entraînement du rotarod. Il est important de noter qu'une aucune trace de LiCl n'est détectée dans le sérum des rongeurs après 48h de sevrage (O'Brien et al., 2004). Mes résultats sont intéressants, car autant les souris WT qu'Akt3 KO ont continué à bien performer sur le rotarod (Figure 10). Cette expérience m'a permis de constater qu'une fois la tâche motrice apprise, les souris Akt3 KO n'ont plus besoin de LiCl pour performer. Ceci suggère donc que le LiCl, et par conséquent l'inhibition de GSK-3, est très important pour apprendre la tâche, mais pas pour l'exécuter. Si le retard d'apprentissage du rotarod avait été causé par une démotivation des souris Akt3 KO à effectuer le rotarod, alors je me serais attendu à un retour en arrière des performances suite à l'arrêt du traitement au LiCl. D'autres expériences telles que l'analyse de la phosphorylation de GSK-3 avant et après le sevrage du LiCl, ainsi que la mesure du niveau d'activité fonctionnelle de GSK-3 via l'étude de la protéine Tau permettront de confirmer mes résultats.

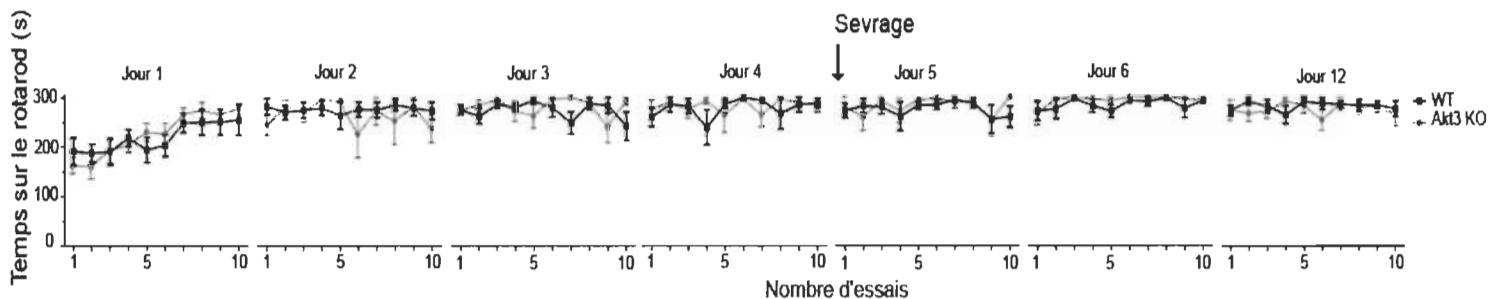


Figure 10. Courbe d'apprentissage sur le rotarod par les souris Akt3 KO et WT

Temps passé sur le rotarod par les souris Akt3 KO et WT pour chacun des 10 essais au jour 1, 2, 3 et 4. Les souris WT et Akt3 KO ont été nourris avec de la nourriture normale ou enrichie de lithium. Les données représentent la moyenne de temps sur le rotarod par essai pour chaque jour d'entraînement, exprimées en secondes n=7 WT et n=6 Akt3 KO

Chapitre VI : Conclusion

Ce projet a permis de mettre en évidence l’implication de la voie Akt-GSK-3 dans l’apprentissage d’une tâche motrice complexe telle que le rotarod. Tout d’abord, mon étude a démontré que la délétion génétique d’Akt3 induit un retard de l’apprentissage moteur du rotarod (Figure 1A/B, Chapitre IV). De plus, l’absence de trouble de moteur et de coordination objectivés par le *pole test* et *wire test* (Figure 1 C/D, Chapitre IV) renforcit la théorie qu’Akt3 est impliquée dans l’apprentissage moteur d’une tâche motrice complexe et non dans son exécution. Inversement, GSK-3 α/β ne serait pas indispensable à l’apprentissage du rotarod car mes travaux sur des souris GSK-3 α KO et GSK-3 β HT n’ont pas décelé de différence significative durant l’apprentissage du rotarod (Figure 2 A/B, Chapitre IV). De plus, l’inhibition de GSK-3 α et GSK-3 β dans le striatum par l’inhibiteur SB216763 n’a pas induit de retard d’apprentissage moteur (Figure 2C, Chapitre IV). Par contre, ceci ne veut pas dire pour autant que GSK-3 n’est pas impliquée dans l’apprentissage moteur. En effet, mes travaux de recherche ont démontré que plusieurs marqueurs d’activité de GSK-3 sont significativement plus élevés chez les souris Akt3 KO. Étant donné que GSK-3 est une cible d’Akt3, la délétion d’Akt3 pourrait être la cause de l’hyperactivation de GSK-3. Cette hypothèse est pour autant corrélée avec mes résultats suite au traitement chronique au LiCl. En inhibant GSK-3, les souris Akt3 KO ont retrouvé leur capacité d’apprentissage moteur. Ainsi, ce projet a permis de mieux comprendre le rôle de la voie de signalisation Akt/GSK-3 et son implication dans l’apprentissage moteur. Il reste encore beaucoup de travail pour bien comprendre le rôle exact de GSK-3 dans l’apprentissage moteur, mais la poursuite des recherches permettra de cerner les mécanismes moléculaires précis qui sont responsables de la mémorisation à long terme et ainsi mieux comprendre le fonctionnement de la mémorisation de tâches motrices complexes.

Bibliographie

Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Current biology* : CB 7:776-789.

American Psychiatric A, American Psychiatric A, Force DSMT (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-5.

Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:5699-5704.

Avrahami L, Licht-Murava A, Eisenstein M, Eldar-Finkelman H (2013) GSK-3 inhibition: Achieving moderate efficacy with high selectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834:1410-1414.

Barnes TD, Kubota Y, Hu D, Jin DZ, Graybiel AM (2005) Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 437:1158-1161.

Bauer M, Adli M, Ricken R, Severus E, Pilhatsch M (2014) Role of lithium augmentation in the management of major depressive disorder. *CNS Drugs* 28:331-342.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews* 63:182-217.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG (2009) Akt/GSK3 Signaling in the Action of Psychotropic Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49:327-347.

Beaulieu JM, Zhang X, Rodriguez RM, Sotnikova TD, Cools MJ, Wetsel WC, Gainetdinov RR, Caron MG (2008a) Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:1333-1338.

Beaulieu JM, Marion S, Rodriguez RM, Medvedev IO, Sotnikova TD, Ghisi V, Wetsel WC, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2008b) A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell* 132:125-136.

Bergeron Y, Chagniel L, Bureau G, Massicotte G, Cyr M (2014) mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7:26.

Bergeron Y, Bureau G, Laurier-Laurin ME, Asselin E, Massicotte G, Cyr M (2017) Genetic Deletion of Akt3 Induces an Endophenotype Reminiscent of Psychiatric Manifestations in Mice. *Front Mol Neurosci* 10:102.

Beurel E, Grieco SF, Jope RS (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 148:114-131.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Blumenfeld H (2010) *Neuroanatomy Through Clinical Cases*: Sinauer.

Brasted PJ, Wise SP (2004) Comparison of learning-related neuronal activity in the dorsal premotor cortex and striatum. *The European journal of neuroscience* 19:721-740.

Buitrago MM, Schulz JB, Dichgans J, Luft AR (2004) Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem* 81:211-216.

Bureau G, Carrier M, Lebel M, Cyr M (2010) Intrastriatal inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem* 94:107-115.

Cade JF (1949) Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med J Aust* 2:349-352.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 30:211-219.

Chagniel L, Robitaille C, Lacharité-Mueller C, Bureau G, Cyr M (2012) Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control. *Behavioural Brain Research* 228:9-15.

Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N (2011) AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer cell* 19:58-71.

Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ (2001) Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science (New York, NY)* 292:1728-1731.

- Cole A, Frame S, Cohen P (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* 377:249-255.
- Cole AR (2013) Glycogen synthase kinase 3 substrates in mood disorders and schizophrenia. *FEBS J* 280:5213-5227.
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG, Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11:459-473.
- Costa RM, Cohen D, Nicolelis MA (2004) Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Current biology : CB* 14:1124-1134.
- Cowan CM, Raymond LA (2006) Selective neuronal degeneration in Huntington's disease. *Current topics in developmental biology* 75:25-71.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.
- D'Amours G, Bureau G, Boily MJ, Cyr M (2011) Differential gene expression profiling in the mouse brain during motor skill learning: focus on the striatum structure. *Behav Brain Res* 221:108-117.
- Danielsen SA, Eide PW, Nesbakken A, Guren T, Leithe E, Lothe RA (2015) Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1855:104-121.
- Davis NM et al. (2014) Deregulation of the EGFR/PI3K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention. *Oncotarget* 5:4603-4650.
- Doyon J, Penhune V, Ungerleider LG (2003) Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia* 41:252-262.
- Doyon J, Bellec P, Amsel R, Penhune V, Monchi O, Carrier J, Lehericy S, Benali H (2009) Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. *Behav Brain Res* 199:61-75.
- Duka T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A (2009) α -Synuclein contributes to GSK-3 β -catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. *The FASEB Journal* 23:2820-2830.
- Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A, Birnbaum MJ (2005) Role for

Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. Mol Cell Biol 25:1869-1878.

Eldar-Finkelman H (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. Trends in Molecular Medicine 8:126-132.

Eldar-Finkelman H, Martinez A (2011) GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS. Frontiers in Molecular Neuroscience 4:32.

Eom T-Y, Jope RS (2009) Blocked inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 α / β impairs in vivo neural precursor cell proliferation. Biological psychiatry 66:494-502.

Fang X, Yu S, Tanyi JL, Lu Y, Woodgett JR, Mills GB (2002) Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. Mol Cell Biol 22:2099-2110.

Frame S, Cohen P, Biondi RM (2001) A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. Mol Cell 7:1321-1327.

Freeland L, Beaulieu JM (2012) Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. Front Mol Neurosci 5:14.

Gao T, Furnari F, Newton AC (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. Mol Cell 18:13-24.

Gould TD, Manji HK (2005) Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. Neuropsychopharmacology 30:1223-1237.

Gulen MF, Bulek K, Xiao H, Yu M, Gao J, Sun L, Beurel E, Kaidanovich-Beilin O, Fox PL, DiCorleto PE, Wang JA, Qin J, Wald DN, Woodgett JR, Jope RS, Carman J, Dongre A, Li X (2012) Inactivation of the enzyme GSK3alpha by the kinase IKK α promotes AKT-mTOR signaling pathway that mediates interleukin-1-induced Th17 cell maintenance. Immunity 37:800-812.

Hemmings BA, Restuccia DF (2012) PI3K-PKB/Akt pathway. Cold Spring Harbor perspectives in biology 4:a011189.

Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) Akt signalling in health and disease. Cellular Signalling 23:1515-1527.

Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86-90.

Howell KR, Floyd K, Law AJ (2017) PKB γ /AKT3 loss-of-function causes learning and memory deficits and deregulation of AKT/mTORC2 signaling: Relevance for schizophrenia. *PLoS one* 12:e0175993.

Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 12:803-808.

Inkster B, Nichols TE, Saemann PG, Auer DP, Holsboer F, Muglia P, Matthews PM (2009) Association of GSK3beta polymorphisms with brain structural changes in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 66:721-728.

Jope RS (2011) Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Front Mol Neurosci* 4:16.

Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E (2007) Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochemical research* 32:577-595.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina TV, Takao K, van Eede M, Hattori S, Laliberté C, Khan M, Okamoto K, Chambers JW, Fletcher PJ, MacAulay K, Doble BW, Henkelman M, Miyakawa T, Roder J, Woodgett JR (2009) Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3alpha mutant mice. *Molecular Brain* 2:35.

Karege F, Perroud N, Burkhardt S, Schwald M, Ballmann E, La Harpe R, Malafosse A (2007) Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry* 61:240-245.

Karni A, Meyer G, Rey-Hipolito C, Jezzard P, Adams MM, Turner R, Ungerleider LG (1998) The acquisition of skilled motor performance: fast and slow experience-driven changes in primary motor cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:861-868.

Kim SD, Fung VSC (2014) An update on Huntington's disease: from the gene to the clinic. *Current Opinion in Neurology* 27:477-483.

Kimura T, Yamashita S, Nakao S, Park J-M, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A (2008) GSK-3 β Is Required for Memory Reconsolidation in Adult Brain. *PLoS one* 3:e3540.

King TD, Bijur GN, Jope RS (2001) Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3 β and attenuated by lithium. *Brain Research* 919:106-114.

Kitagishi Y, Kobayashi M, Kikuta K, Matsuda S (2012) Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. *Depression Research and Treatment* 2012:752563.

Kolb B, Whishaw IQ (2012) *Introduction to Brain and Behavior*: Worth Publishers, Incorporated.

Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60:543-554.

Landry Y, Gies JP (2014) *Pharmacologie - 3e édition: Des cibles à la thérapeutique*: Dunod.

Lee KJ, Rhyu IJ, Pak DT (2014) Synapses need coordination to learn motor skills. *Reviews in the neurosciences* 25:223-230.

Lee SH, Chun W, Kong PJ, Han JA, Cho BP, Kwon OY, Lee HJ, Kim SS (2006) Sustained activation of Akt by melatonin contributes to the protection against kainic acid-induced neuronal death in hippocampus. *Journal of pineal research* 40:79-85.

Lemay-Clermont J, Robitaille C, Auberson YP, Bureau G, Cyr M (2011) Blockade of NMDA receptors 2A subunit in the dorsal striatum impairs the learning of a complex motor skill. *Behavioral neuroscience* 125:714-723.

Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA (2000) Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol* 20:9356-9363.

Li X, Jope RS (2010) Is Glycogen Synthase Kinase-3 a Central Modulator in Mood Regulation? *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 35:2143-2154.

Li X, Bijur GN, Jope RS (2002) Glycogen synthase kinase-3 β , mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar disorders* 4:137-144.

Li X, Rosborough KM, Friedman AB, Zhu W, Roth KA (2007) Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:7-19.

- Li X, Zhu W, Roh MS, Friedman AB, Rosborough K, Jope RS (2004) In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 29:1426-1431.
- Liu SJ, Zhang JY, Li HL, Fang ZY, Wang Q, Deng HM, Gong CX, Grundke-Iqbali I, Iqbali K, Wang JZ (2004) Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *The Journal of biological chemistry* 279:50078-50088.
- Llorens-Martin M, Jurado J, Hernandez F, Avila J (2014) GSK-3beta, a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci* 7:46.
- Lloyd KG (1977) CNS compensation to dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Advances in experimental medicine and biology* 90:255-266.
- Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, Yücel M (2009) Structural brain abnormalities in major depressive disorder: A selective review of recent MRI studies. *Journal of Affective Disorders* 117:1-17.
- Luft AR, Buitrago MM (2005) Stages of motor skill learning. *Mol Neurobiol* 32:205-216.
- Luscher C, Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiological reviews* 84:87-136.
- MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, Nagy A, Woodgett JR (2007) Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell metabolism* 6:329-337.
- Machado-Vieira R, Zanetti MV, Teixeira AL, Uno M, Valiengo LL, Soeiro-de-Souza MG, Obajinjo SM, de Sousa RT, Zarate Jr CA, Gattaz WF, Marie SKN (2015) Decreased AKT1/mTOR pathway mRNA expression in short-term bipolar disorder. *European Neuropsychopharmacology* 25:468-473.
- Mackenzie RWA, Elliott BT (2014) Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 7:55-64.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129:1261-1274.

Morales P (2008) Long lasting structural changes in primary motor cortex after motor skill learning: a behavioural and stereological study. *Biological research* 41:397-404.

Muellbacher W, Ziemann U, Wissel J, Dang N, Kofler M, Facchini S, Boroojerdi B, Poewe W, Hallett M (2002) Early consolidation in human primary motor cortex. *Nature* 415:640-644.

Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, Roth RA (1999) Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* 257:906-910.

O'Brien WT, Harper AD, Jove F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S, Klein PS (2004) Glycogen synthase kinase-3beta haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* 24:6791-6798.

O'Brien WT, Huang J, Buccafusca R, Garskof J, Valvezan AJ, Berry GT, Klein PS (2011) Glycogen synthase kinase-3 is essential for beta-arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice. *J Clin Invest* 121:3756-3762.

Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual review of neuroscience* 25:563-593.

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JTR, Bortolotto Zuner A, Wang YT, Collingridge GL (2007) LTP Inhibits LTD in the Hippocampus via Regulation of GSK3 β . *Neuron* 53:703-717.

Phiel CJ, Klein PS (2001) Molecular targets of lithium action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:789-813.

Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS (2003) GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 423:435-439.

Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2005) Striatal synaptic plasticity: implications for motor learning and Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 20:395-402.

Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88-109.

Player MJ, Taylor JL, Weickert CS, Alonso A, Sachdev P, Martin D, Mitchell PB, Loo CK (2013) Neuroplasticity in depressed individuals compared with healthy controls. *Neuropsychopharmacology* 38:2101-2108.

Poduri A, Evrony GD, Cai X, Elhosary PC, Beroukhim R, Lehtinen MK, Hills LB, Heinzen EL, Hill A, Hill RS, Barry BJ, Bourgeois BF, Riviello JJ, Barkovich AJ, Black PM, Ligon KL, Walsh CA (2012) Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron* 74:41-48.

Polter A, Beurel E, Yang S, Garner R, Song L, Miller CA, Sweatt JD, McMahon L, Bartolucci AA, Li X, Jope RS (2010) Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology* 35:1761-1774.

Purves D (2011) Neurosciences, 4e éd. Edition. Bruxelles: De Boeck.

Qu Z-S, Li L, Sun X-J, Zhao Y-W, Zhang J, Geng Z, Fu J-L, Ren Q-G (2014) Glycogen Synthase Kinase-3 Regulates Production of Amyloid- β Peptides and Tau Phosphorylation in Diabetic Rat Brain. *The Scientific World Journal* 2014:878123.

Ryves WJ, Harwood AJ (2001) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 280:720-725.

Sanes JN (2000) Motor cortex rules for learning and memory. *Current biology* : CB 10:R495-497.

Sanes JN (2000) Skill learning: Motor cortex rules for learning and memory. *Current Biology* 10:R495-R497.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-168.

Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics C (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421-427.

Shen W, Flajolet M, Greengard P, Surmeier DJ (2008) Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science* (New York, NY) 321:848-851.

Sheppard K, Kinross KM, Solomon B, Pearson RB, Phillips WA (2012) Targeting PI3 kinase/AKT/mTOR signaling in cancer. *Critical reviews in oncogenesis* 17:69-95.

Sulzer D (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* 30:244-250.

Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in neurosciences* 30:228-235.

Sutherland C (2011) What Are the bona fide GSK3 Substrates? *Int J Alzheimers Dis* 2011:505607.

Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Miesczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA (2005) Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132:2943-2954.

Ungerleider LG, Doyon J, Karni A (2002) Imaging brain plasticity during motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem* 78:553-564.

Wachter T, Rohrich S, Frank A, Molina-Luna K, Pekanovic A, Hertler B, Schubring-Giese M, Luft AR (2010) Motor skill learning depends on protein synthesis in the dorsal striatum after training. *Experimental brain research* 200:319-323.

Walker MP, Brakefield T, Hobson JA, Stickgold R (2003) Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. *Nature* 425:616-620.

Wee P, Wang Z (2017) Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* 9:52.

Yao HB, Shaw PC, Wong CC, Wan DC (2002) Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. *J Chem Neuroanat* 23:291-297.

Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) Blockade of NMDA receptors in the dorsomedial striatum prevents action-outcome learning in instrumental conditioning. *The European journal of neuroscience* 22:505-512.

Yin HH, Mulcare SP, Hilario MR, Clouse E, Holloway T, Davis MI, Hansson AC, Lovinger DM, Costa RM (2009) Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nature neuroscience* 12:333-341.

Zheng W, Wang H, Zeng Z, Lin J, Little PJ, Srivastava LK, Quirion R (2012) The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia. *Brain Research* 1470:145-158.

Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, Wang Q, Chen JG, Wang JZ (2007)
Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-
associated impairments. *J Neurosci* 27:12211-12220.

Zou K, Deng W, Li T, Zhang B, Jiang L, Huang C, Sun X, Sun X (2010) Changes of Brain
Morphometry in First-Episode, Drug-Naïve, Non-Late-Life Adult Patients with Major
Depression: An Optimized Voxel-Based Morphometry Study. *Biological Psychiatry*
67:186-188.