

FRANÇOIS MARCOUILLER

**L'IMPACT DU DIABÈTE DE TYPE 2 SUR LA
PHOSPHORYLATION DE TAU *IN VIVO***

Mémoire présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Neurobiologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE PSYCHIATRIE ET DE NEUROSCIENCES
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

© François Marcouiller, 2011

Résumé

L'incidence de maladies neurodégénératives et systémiques liées au vieillissement, tels la maladie d'Alzheimer (MA) et le diabète, augmente rapidement. Plusieurs études rapportent que les patients souffrant de diabète ont entre 50 et 75 % plus de risque de développer la MA que les gens sains du même âge. La protéine tau hyperphosphorylée est une des composantes majeures des enchevêtrements neurofibrillaires, une composante neuropathologique classique de la MA. L'étude présente examine les modifications de tau dans deux modèles de souris transgéniques développant un diabète de type 2. La phosphorylation de tau est augmentée au niveau de l'hippocampe de ces souris. Le diabète de type 2 provoque aussi la dérégulation de quelques kinases et phosphatases de tau. Cette dérégulation serait résultante de la résistance à l'insuline et l'hypothermie. Le diabète de type 2 provoquerait donc l'accélération de la cascade menant à développer la maladie d'Alzheimer.

Abstract

The incidence of age-related neurodegenerative and systemic diseases including Alzheimer's disease (AD) and diabetes is increasing rapidly. Multiple studies report that patients with diabetes have a 50–75% increased risk of developing AD compared with age- and gender-matched patients without diabetes. Abnormally phosphorylated tau is a major building block of neurofibrillary tangles, a classic neuropathological characteristic of AD. The current study examines tau modification in transgenic mice modeling type 2 diabetes mellitus. Tau phosphorylation is increased in hippocampus of db/db and ob/ob mice compared with control mouse brain. This increase of Tau phosphorylation is conversely accompanied of an Type 2 diabetes also induces a deregulation of some kinases and phosphatases of tau. Our results suggest that the increase of tau phosphorylation caused by dysregulation of some kinases and phosphatases induce by insulin resistance and hypothermia.. We hypothesize type 2 diabetes may contribute to exacerbates Alzheimer's like pathological cascade.

Avant-propos

Avant tout, je voudrais en profiter pour remercier bien sûr mon directeur de recherche, le Dr. Emmanuel Planel, pour l'opportunité qu'il m'a donnée ainsi que son dévouement, mes collègues, en remerciant tout spécialement Françoise Morin pour toutes ces journées passées à l'animalerie, et finalement remercier Noura El-Khoury et Alexis Bretteville pour leur aide apportée à ce projet. Je remercie aussi l'Université Laval pour la bourse de maîtrise qui m'a été accordée et les IRSC et le FRSQ pour avoir financé ce projet.

Le corps de ce mémoire débute avec une mise en place des bases théoriques et des concepts de bases de maladie d'Alzheimer et du diabète de type 2 nécessaires afin de mettre la table pour bien comprendre les expérimentations et les résultats présentés sous forme d'article. Cela est fait en présentant la maladie d'Alzheimer en mettant une emphase sur la protéine tau, en présentant le diabète de type 2 et la signalisation de l'insuline et terrine en présentant certaines évidences qui pourraient lier les deux maladies. L'article présenté dans ce mémoire est le résultat des recherches que j'ai entrepris avec d'autres étudiants durant ma maîtrise.

Veillez noter que l'article inclus dans ce mémoire sera soumis pour publication. J'agirai à titre de co-premier auteur étant donné que j'ai participé à la collecte des données expérimentales ainsi qu'à leur traitement et analyse. L'idée originale de l'étude provient du Dr Planel qui a supervisé étroitement l'ensemble du travail.

À ma famille et ma copine
pour leur soutien inébranlable

Table des Matières

| | |
|--|-----|
| Résumé..... | i |
| Abstract..... | ii |
| Avant-propos..... | iii |
| Table des Matières | iii |
| Liste des Figures | iii |
| Liste des Tableaux | iv |
| Introduction..... | 5 |
| 1.1. La maladie d'Alzheimer | 5 |
| 1.1.1. Neurohistopathologie de la maladie d'Alzheimer | 6 |
| 1.1.2. Les Causes de la maladie | 8 |
| 1.1.2.1. Formes héréditaires | 9 |
| 1.1.3. Formes sporadiques et facteurs de risques..... | 9 |
| 1.1.3.1. Prédisposition génétique et ApoE..... | 10 |
| 1.1.4. Autres facteurs | 10 |
| 1.1.4.1. Âge et sexe | 10 |
| 1.1.4.1.1. Diabète | 11 |
| Chapitre 2 : Protéine tau | 12 |
| 2.1. Forme | 14 |
| 2.2. Fonction | 17 |
| 2.2.1. Régulation de la dynamique des microtubules | 17 |
| 2.2.2. Transport axonal | 18 |
| 2.2.3. Autres rôles | 21 |
| 2.2.4. Modification post-traductionnelle..... | 21 |
| 2.2.4.1. Phosphorylation | 21 |
| 2.2.4.1.1. Kinases..... | 22 |
| 2.2.4.1.1.1. GSK-3 β | 22 |
| 2.2.4.1.1.2. JNK | 25 |
| 2.2.4.1.1.3. ERK..... | 26 |
| 2.2.4.1.2. Phosphatases | 26 |
| 2.2.4.1.2.1. PP2A | 28 |
| 2.2.4.1.2.2. PP1 | 28 |
| 2.2.4.1.2.3. PP2B | 29 |
| 2.3. Pathologie tau..... | 29 |
| Chapitre 3 : Diabète | 31 |
| 3.1.1. Diabète type 1 | 31 |
| 3.1.2. Diabète type 2 | 32 |
| 3.1.3. Étiologie du diabète et signalisation à l'insuline | 32 |
| 3.1.3.1. Signalisation extracellulaire et récepteurs cellulaires | 33 |
| 3.1.3.2. Signalisation intracellulaire : kinase et phosphatases | 33 |
| 3.2. Modèles d'études du diabète de type 2 | 36 |
| 3.2.1. Modèle génétique..... | 36 |
| 3.2.1.1. Marqueurs de la maladie d'Alzheimer..... | 38 |
| 3.2.2. Modèle induit et marqueurs de la maladie d'Alzheimer..... | 38 |
| 3.2.2.1. Marqueurs de la maladie d'Alzheimer..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Chapitre 4 : Objectifs et Hypothèse | 41 |
| Chapitre 5 : Results | 43 |
| 5.1. Résumé..... | 43 |
| 5.2. Abstract | 44 |
| 5.3. Introduction..... | 45 |
| 5.4. Materials and Methods..... | 47 |
| 5.4.1. Animals. | 47 |
| 5.4.2. Plasma glucose and insulin measurements. | 47 |
| 5.4.3. Analysis of Tau phosphorylation | 48 |
| 5.4.4. Antibody | 48 |
| 5.4.5. Western blot analysis. | 49 |
| 5.4.6. Statistical analysis..... | 49 |
| 5.5. Results..... | 50 |
| 5.5.1. Physiological parameters of ob/ob and db/db mice. | 50 |
| 5.5.2. Metabolic features of ob/ob and db/db mice..... | 50 |
| 5.5.3. Increased tau phosphorylation in type 2 diabetes mouse model..... | 51 |
| 5.5.4. Tau-related kinases activation in ob/ob and db/db mice..... | 51 |
| 5.5.5. Phosphatases profile during type 2 diabetes | 52 |
| 5.6. Discussion | 53 |
| Conclusion et perspective | 60 |
| Bibliographie..... | 63 |

Liste des Figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Coupe de cerveau humain d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Adapté de (Castellani et al., 2010)..... | 7 |
| Figure 2 : Distribution des diverses formes de la MA et leurs facteurs génétiques associés. Tiré de (Richard and Amouyel, 2001) | 8 |
| Figure 3 : Schéma du gène (A) des ARNm (s) et des différentes isoformes possibles de tau. Tiré de (Sergeant et al., 2005)..... | 13 |
| Figure 4 : Structure et fonction la protéine tau. Tiré de (Buee et al., 2000). | 16 |
| Figure 5 : Implication de la régulation de tau dans le transport axonal. Tiré de (Ballatore et al., 2007). | 20 |
| Figure 6 : Signalisation de l'insuline. Tiré de (Gasparini et al., 2002)..... | 35 |
| Figure 7 : Signalisation de leptine et contrôle de la prise alimentaire. Tiré de (Schwartz and Porte, 2005). | 37 |
| Figure 8 : Physiological parameters of T2DM mouse model. | 55 |
| Figure 9 : Insulin Tolerance Test (ITT) and Glucose Tolerance Test (GTT). | 56 |
| Figure 10 : Western blot analysis of tau protein and phosphorylation in T2DM mouse model. 57 | 57 |
| Figure 11 : Western blot analysis of tau-related kinases in T2DM mouse model. | 58 |
| Figure 12 : Western blot analysis of tau-related phosphatases in T2DM mouse model.... | 59 |

Liste des Tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de tau, identifiées par des études in vivo et in vitro et leurs sites de phosphorylation cibles. | 23 |
| Tableau 2 : Spécificité et efficacité des phosphatases de tau. Tiré de (Liu et al., 2005) ... | 27 |

Introduction

Le diabète de type 2 et la maladie d'Alzheimer sont deux pathologies liées à l'âge et qui montrent une augmentation de leurs incidences. Le diabète de type 2 est une pathologie qui affecte la régulation de la glycémie et qui est causée par l'apparition d'une résistance à l'insuline qui est conséquente de l'âge et de l'obésité. Cette pathologie atteint des individus de plus en plus jeunes en raison de l'augmentation des problèmes d'obésité au niveau mondial. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative menant à une perte des fonctions cognitives, qui se caractérise par la présence de deux lésions histopathologiques spécifiques : les dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes et les agrégats intracellulaires de la protéine tau hyperphosphorylée. Bien que certaines études épidémiologiques aient montré que le diabète de type 2 soit un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer, les dérèglements cellulaires inhérents au diabète de type 2 qui pourraient médier une interrelation entre les deux pathologies sont encore mal connus.

Afin de bien mettre en contexte les travaux que j'ai entrepris durant de ma maîtrise, certains concepts clés de la maladie d'Alzheimer et du diabète de type 2 seront abordés dans un premier temps. Dans un deuxième temps, les résultats expérimentaux et les conclusions seront présentés sous la forme d'article.

1.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) a été nommée en l'honneur du Dr Aloïs Alzheimer à la suite des découvertes qu'il a faites en étudiant le cas d'une patiente : Auguste D. Cette maladie incurable se manifeste par une perte progressive des fonctions cérébrales. Les premières fonctions atteintes sont principalement liées au système limbique telles que la mémoire et les émotions. La maladie d'Alzheimer est la forme de démence la plus

répandue. Aujourd'hui, plus d'un demi-million de Canadiens en sont atteint et plus de 5 millions de nouveaux cas sont rapportés dans le monde chaque année, ce qui entraîne des conséquences socio-économiques très importantes (Bekris et al., 2010). Elle a entraîné des dépenses de plus de 15 milliards de dollars en 2008 et se pose ainsi en problème de santé majeur (Source : Société Alzheimer). Actuellement, nous disposons de traitements symptomatiques qui ralentissent la progression de la pathologie de 5 à 10 ans, mais d'aucun traitement curatif. De plus, nous disposons de peu de marqueurs diagnostiques précoces et la complexité multifactorielle de la maladie d'Alzheimer rend la découverte de facteurs de risques difficiles.

1.1.1. Neurohistopathologie de la maladie d'Alzheimer

La progression irréversible de la maladie d'Alzheimer entraîne une atrophie globale des structures cérébrales. De plus, l'analyse de tissus *post-mortem* révèle la présence de deux changements histopathologiques importants et caractéristiques : les plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires qui s'accompagnent d'une importante atrophie corticale (Figure 1). Les plaques séniles sont le résultat de l'agrégation extracellulaire de peptides β amyloïdes ($A\beta$) provenant du clivage protéolytique de l'« amyloid protein precursor » ou APP. La présence d'enchevêtrement neurofibrillaire correspond, quant qu'à elle, à l'accumulation intracellulaire de la protéine tau hyperphosphorylée regroupée en filaments appariés en hélice ou PHF pour « Paired Helical Filaments ».

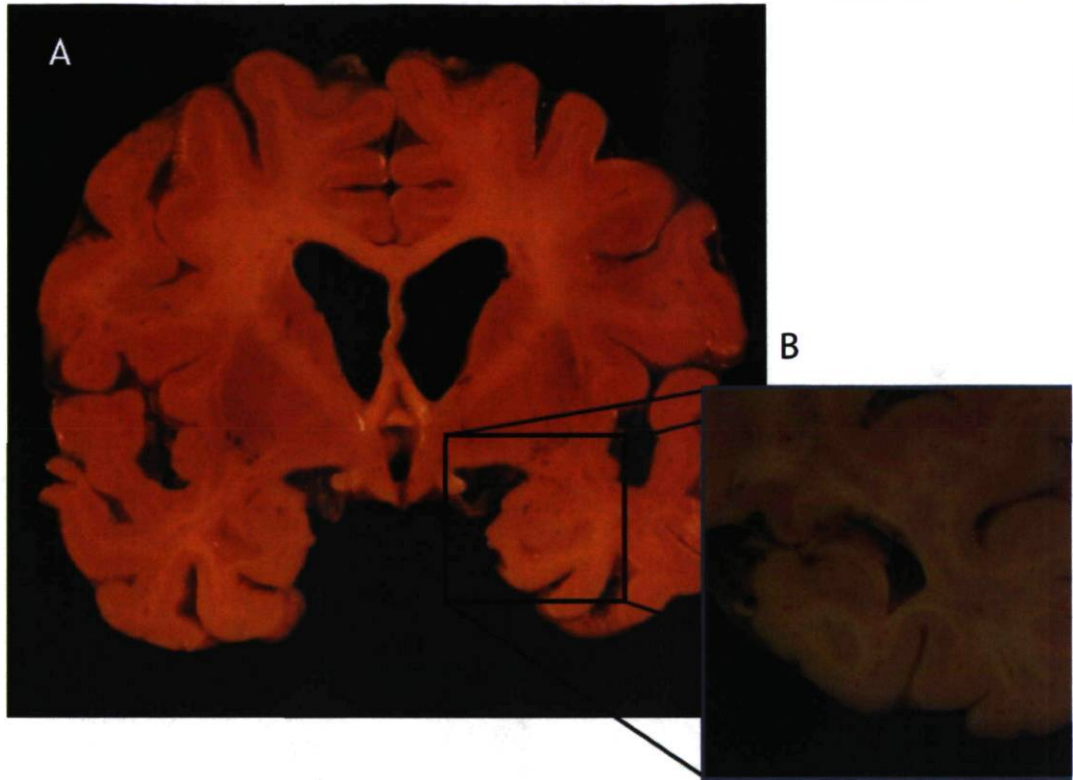


Figure 1 : Coupe de cerveau humain d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Adapté de (Castellani et al., 2010).

(A) Cerveau d'un patient de 73 ans montrant des signes d'atrophie général et d'une dilatation des ventricules cérébraux. (B) Vue rapprochée d'une autre coupe du même cerveau montrant une atrophie de l'hippocampe et une dilatation de la corne temporale.

1.1.2. Les Causes de la maladie

La maladie d'Alzheimer est retrouvée sous deux grandes formes : la forme héréditaire et les formes sporadiques. La forme héréditaire regroupe une famille de mutations autosomales et représente environ 5 % des cas de la MA. Les formes sporadiques regroupent un ensemble de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux et représentent la majorité des cas de la MA (Figure 2).

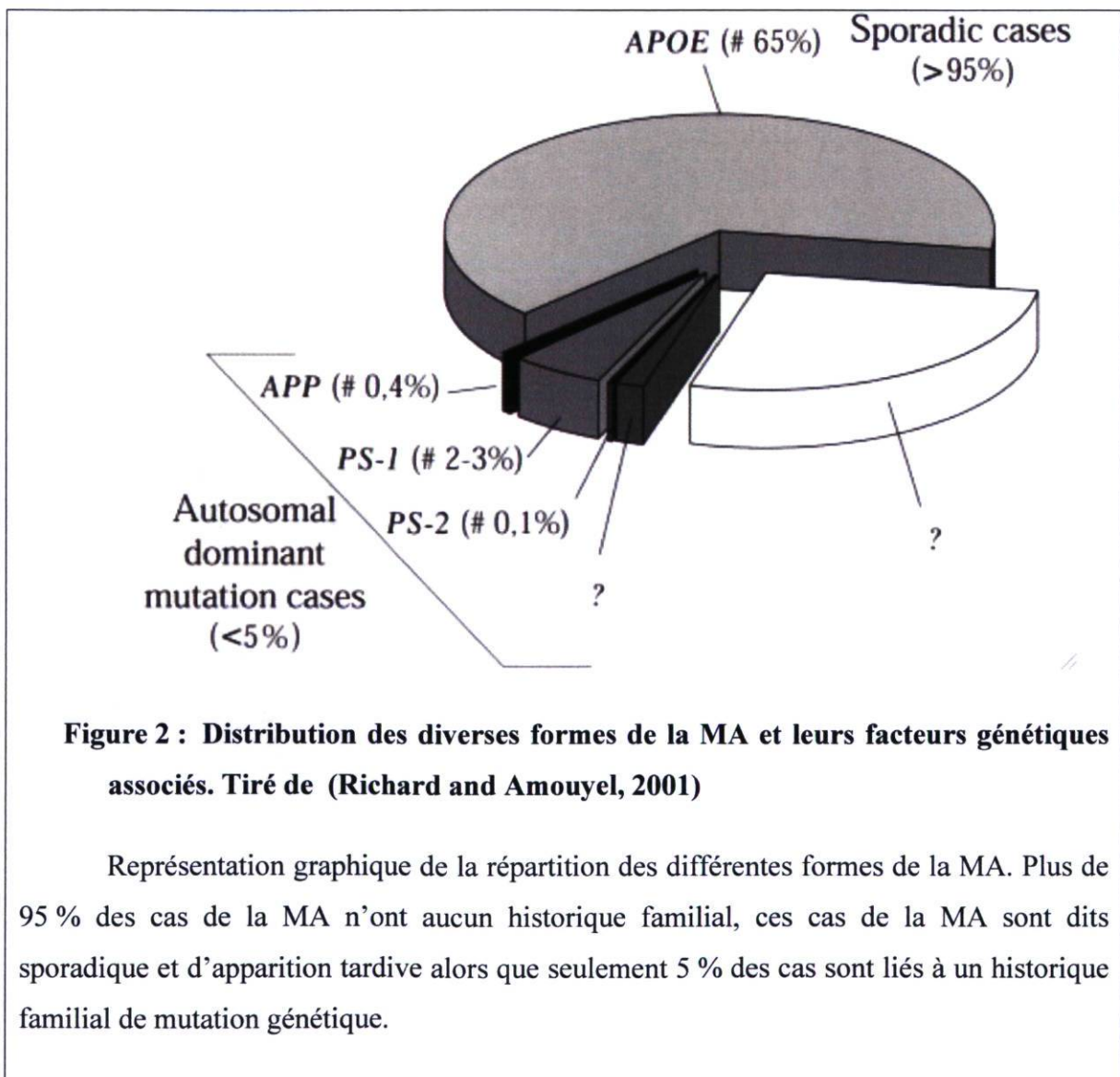


Figure 2 : Distribution des diverses formes de la MA et leurs facteurs génétiques associés. Tiré de (Richard and Amouyel, 2001)

Représentation graphique de la répartition des différentes formes de la MA. Plus de 95 % des cas de la MA n'ont aucun historique familial, ces cas de la MA sont dits sporadiques et d'apparition tardive alors que seulement 5 % des cas sont liés à un historique familial de mutation génétique.

1.1.2.1. Formes héréditaires

Les formes familiales représentent moins de 5 % des cas connus de la maladie d'Alzheimer. Ces cas sont provoqués par la transmission génétique de mutations liées à la voie métabolique de l'APP et sont responsables de l'apparition des formes précoces (Blennow et al., 2006) (Figure 2). Plus de 32 différentes mutations ont été répertoriées sur le gène codant pour l'APP (Guyant-Marechal et al., 2007). La majorité de ces mutations sont retrouvées près des sites de clivages γ ciblés par différents complexes enzymatiques de clivages appelés γ -sécrétases et qui sont responsables de la production du peptide amyloïde à partir de son précurseur (APP). Les autres mutations sont retrouvées dans les gènes codant pour ces sécrétases. Plus de 123 mutations sur le gène la préséniline 1 et plus de 16 sur la préséniline 2 sont rapporté chez les gens atteints de la forme familiale de la MA (Bekris et al., 2010). La préséniline 2 est une protéine membranaire qui forme le centre catalytique du complexe γ -sécrétase (De Strooper et al., 1998; Wolfe et al., 1999). Les mutations sur le gène codant pour la préséniline 1 sont les mutations les plus souvent rencontrées et causent les formes les plus sévères de cette pathologie (Bekris et al., 2010). Autant chez les gens porteurs de mutations dans la préséniline 1 ou 2 que dan l'APP, les symptômes de la maladie d'Alzheimer apparaissent à un âge beaucoup plus jeune et surtout évolue à un rythme beaucoup plus rapide que chez les gens atteints de la forme sporadique.

1.1.3. Formes sporadiques et facteurs de risques

Les formes sporadiques sont les plus répandues et représentent plus de 95 % des cas (Richard and Amouyel, 2001) (Figure 2). Ces formes se manifestent à un âge beaucoup plus avancé et les symptômes évoluent beaucoup moins rapidement que les formes héréditaires. Il semble que la cause de ces cas soit multifactorielle, avec des facteurs environnementaux qui interagissent avec la susceptibilité biologique et génétique intrinsèque à chaque personne pour augmenter la susceptibilité de voir la maladie se développer. Les facteurs multifactoriels impliqués dans les formes sporadiques de la MA

touchent beaucoup de voies de signalisation qui interagissent pour causer les divers symptômes observés chez les gens atteints de la MA.

1.1.3.1. Prédilection génétique et ApoE

Le gène APOE code pour une protéine polymorphe exprimée principalement dans le foie, mais aussi dans le système nerveux central et périphérique qui est impliquée dans le transport des lipoprotéines (Blain et al., 1996). Le gène est présent dans la population sous 3 allèles différents : une forme normale $\epsilon 3$ et deux formes anormales $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$. Des études récentes ont montré que la présence de l'allèle $\epsilon 4$ représente un facteur de risque important dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Strittmatter et al., 1993; Richard and Amouyel, 2001; Gupta et al., 2011). Le mécanisme entraînant la toxicité via la protéine ApoE sous la forme $\epsilon 4$ n'est cependant pas entièrement connu, mais il est proposé que cette dernière pourrait moduler l'hyperphosphorylation de tau et l'agrégation du peptide β -amyloïde (Huang, 2006, 2010). On peut noter également que la concentration plasmatique de la protéine ApoE pourrait servir de marqueur biologique pour évaluer la progression de la MA (Gupta et al., 2011).

1.1.4. Autres facteurs

1.1.4.1. Âge et sexe

L'âge est sans contredit le facteur de risque le plus important (Harman, 2002). En effet, une fois l'âge de 80 ans atteint la prévalence se situe entre 10 et 30 %. Les femmes sont aussi plus touchées par la MA que les hommes, probablement causé par le fait qu'elles ont une espérance de vie plus longue (Alzheimer's Association, 2010).

1.1.4.1.1. Diabète

Le diabète de type 2 est une pathologie qui affecte la régulation de la glycémie et qui est causée par l'apparition d'une résistance à l'insuline qui est consécutive de l'âge et de l'obésité. Le diabète de type 2 est caractérisé par un dysfonctionnement de la signalisation de l'insuline qui provoque une augmentation de la glycémie. Cette pathologie est très répandue et son incidence augmente avec le vieillissement de la population et la détérioration des habitudes alimentaires. Environ 40 % des individus de plus de 65 ans et 50 % des individus de plus de 80 ans souffrent d'intolérance au glucose ou du diabète (Lamberts et al., 1997).

Selon certaines études populationnelles et de cohorte, l'incidence de la maladie d'Alzheimer serait plus grande chez les gens atteints du diabète de type 2 (Leibson et al., 1997; Ott et al., 1999a; Xu et al., 2004). Par exemple, l'étude de Rotterdam rapporte que le risque de démence double chez les gens souffrant de diabète de type 2 (Ott et al., 1999a). Rönnekaa et ces collaborateurs ont aussi montré qu'une déficience de la sécrétion d'insuline, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline sont toutes deux associées avec un risque accru de souffrir de la maladie d'Alzheimer une fois l'âge de 50 ans atteint (Rönnekaa et al., 2008). Aux États-Unis, le suivi sur 5 ans de plus de 600 patients âgés de plus de 65 ans a montré que plus de 40 % du risque de souffrir de la maladie d'Alzheimer était attribuable au diabète ou à l'hyperinsulinémie.

De plus en plus d'évidences sont mises en avant pour supporter le lien qu'il pourrait exister entre la maladie d'Alzheimer et le dysfonctionnement de l'insuline (Gasparini et al., 2002). Par exemple, lors d'étude de groupe de même âge, les cerveaux des patients atteints d'Alzheimer montrent des concentrations d'insuline et une densité des récepteurs à l'insuline plus faible (Frolich et al., 1999; Craft and Watson, 2004). Ces anomalies pourraient jouer un rôle dans la réduction du métabolisme local du glucose, comme cela a

été largement rapporté dans les régions temporales et pariétales du cerveau (Small et al., 2000), tout comme dans l'hippocampe de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (Garrido et al., 2002). Toutes ces évidences ont suggéré l'hypothèse que la maladie d'Alzheimer pourrait être une forme de diabète cérébral (Hoyer, 1998).

Chapitre 2 : Protéine tau

La protéine tau, pour « tubulin associated unit », a été décrite pour la première fois en 1975 (Weingarten et al., 1975) comme étant une protéine essentielle à la stabilisation des microtubules. Depuis, on sait que cette protéine fait partie de la famille des MAPs, pour « microtubule associated protein » et que son principal rôle serait la régulation de la dynamique des microtubules, mais elle pourrait aussi avoir plusieurs autres rôles. Dans le cerveau humain, la protéine tau constitue une famille de 6 isoformes, possédant entre 352 à 441 acides aminés, formés par épissage alternatif d'un seul gène (Goedert et al., 1989) (Figure 3).

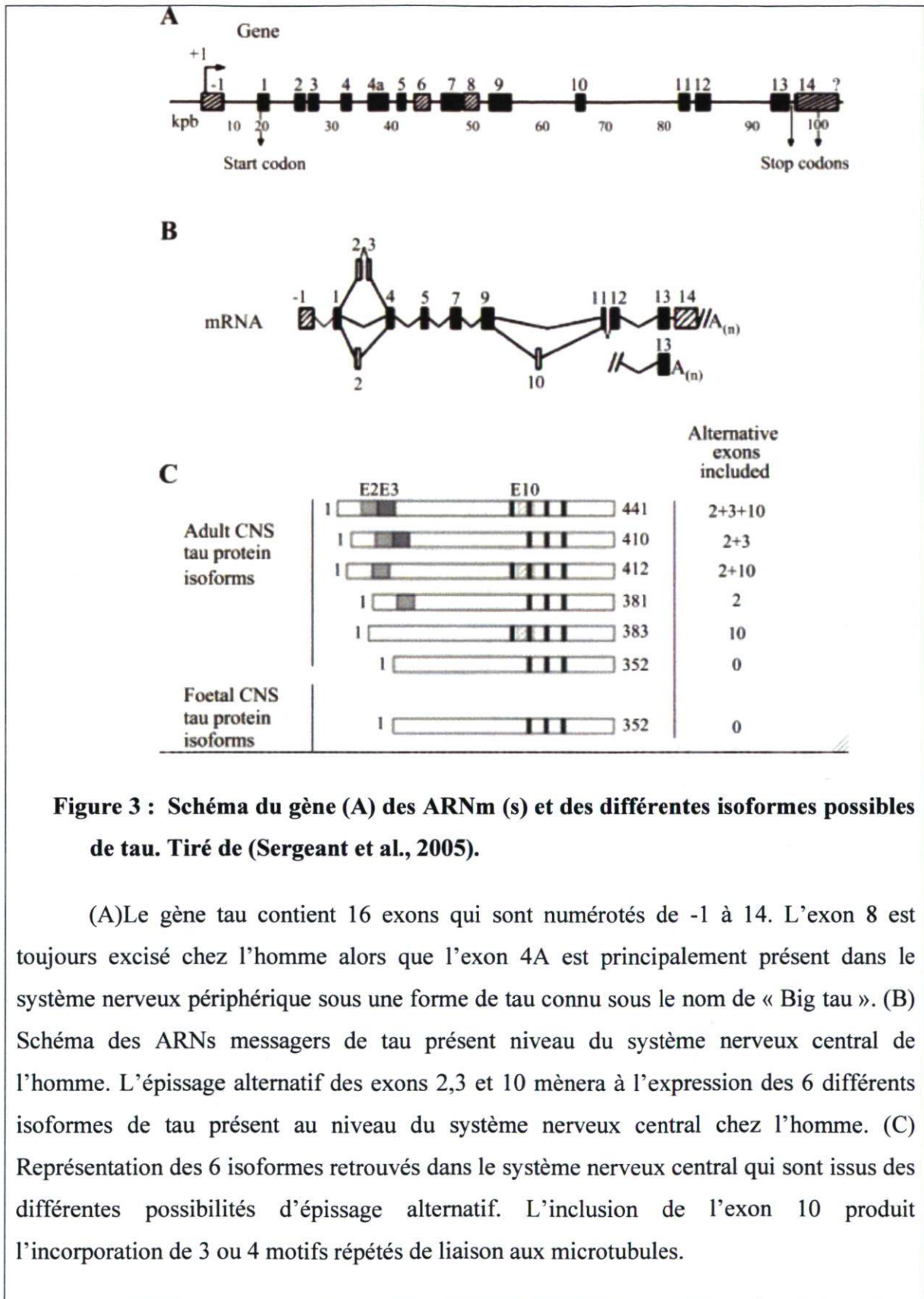


Figure 3 : Schéma du gène (A) des ARNm (s) et des différentes isoformes possibles de tau. Tiré de (Sergeant et al., 2005).

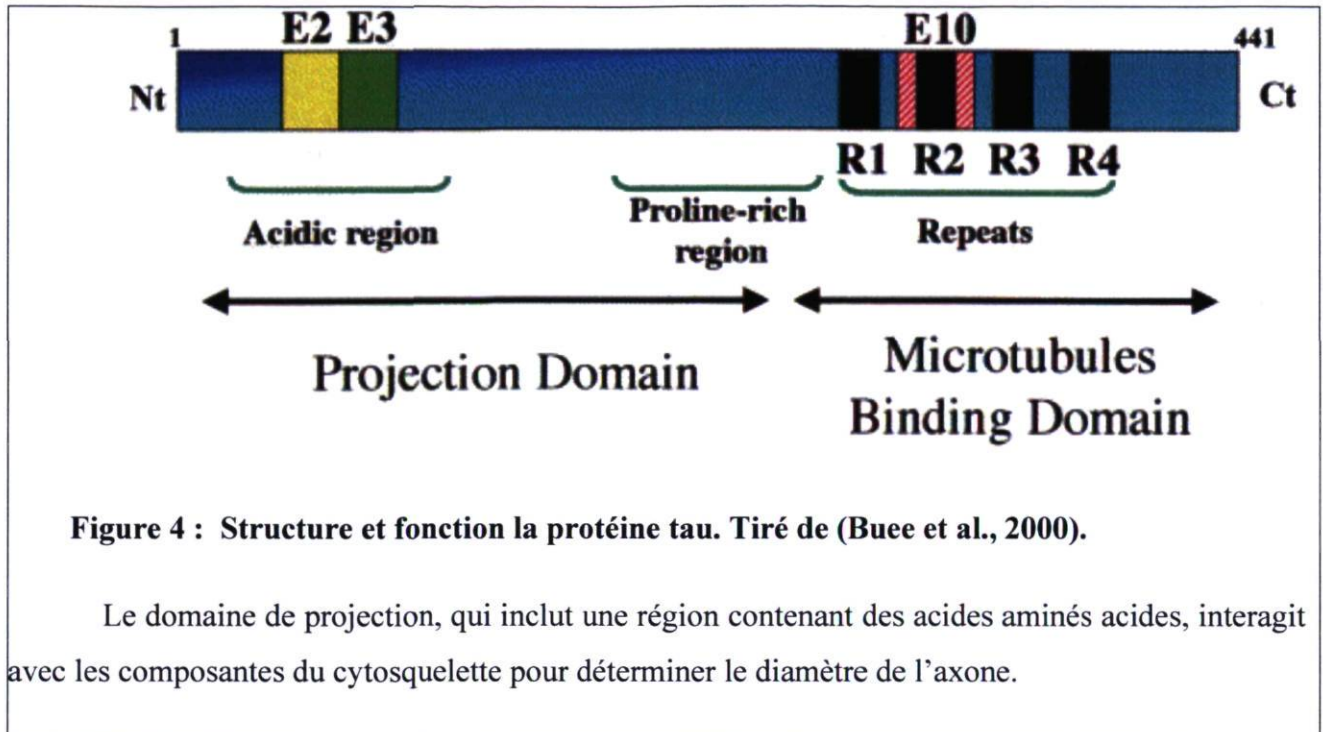
(A) Le gène tau contient 16 exons qui sont numérotés de -1 à 14. L'exon 8 est toujours excisé chez l'homme alors que l'exon 4A est principalement présent dans le système nerveux périphérique sous une forme de tau connu sous le nom de « Big tau ». (B) Schéma des ARNs messagers de tau présent niveau du système nerveux central de l'homme. L'épissage alternatif des exons 2,3 et 10 mènera à l'expression des 6 différents isoformes de tau présent au niveau du système nerveux central chez l'homme. (C) Représentation des 6 isoformes retrouvés dans le système nerveux central qui sont issus des différentes possibilités d'épissage alternatif. L'inclusion de l'exon 10 produit l'incorporation de 3 ou 4 motifs répétés de liaison aux microtubules.

2.1. **Forme**

Le gène codant pour la protéine tau, d'une taille de 140 kb est située sur le chromosome 17 (Neve et al., 1986; Andreadis et al., 1995). Ce gène produit après transcription un pré-ARNm de 16 exons, numéroté de -1 à 14 dont le 8 est systématiquement exclu alors que le 4A est principalement présent au niveau du système nerveux périphérique. L'insertion de l'exon 4A produit une forme de tau nommé « Big tau » qui est moins étudié et est principalement présent au niveau des nerfs périphériques du système nerveux central. Les exons -1 et 14 sont présents au niveau des ARN, mais ne sont jamais traduits. En ce qui touche le système nerveux central humain, les 3 exons 2, 3 et 10 subissent un épissage alternatif qui va conduire à la production de 6 isoformes de la protéine tau. L'inclusion de l'exon 10 dans les isoformes tau 4R de tau permet d'incorporer un quatrième motif de liaison aux microtubules par rapport aux isoformes 3R sans exon 10.

Les isoformes présents au niveau du système nerveux central ont un poids moléculaire qui varie entre 45 et 65 kDa. La protéine tau peut être séparée en deux parties fonctionnelles : le domaine de projection et le domaine de liaison aux microtubules. Le domaine de projection en N-terminale contient une région acide et une région riche en proline et est de taille variable selon l'inclusion des exons 2 et 3 (Hirokawa et al., 1988; Brandt et al., 1995). Ce domaine lui permet d'interagir avec le cytosquelette et les différents organites intracellulaires et la membrane plasmique afin de déterminer le diamètre axonal (Chen et al., 1992; Brandt et al., 1995) (Figure 4). Le domaine de liaison, situé en C-terminale est caractérisée par la présence d'une séquence d'acides aminés répétés 3 ou 4 fois (Himmler et al., 1989; Butner and Kirschner, 1991; Gustke et al., 1994) qui médie la fonction biologique principale de la protéine tau : la stabilisation des microtubules et augmenter leur polymérisation (Weingarten et al., 1975; Cleveland et al., 1977a, b). La taille du domaine de liaison aux microtubules varie selon l'inclusion par épissage alternatif de l'exon 10 qui code pour une séquence de 31 acides aminés (Figure 4).

Le domaine de liaison aux microtubules possède 3 (R1, R3 et R4) ou 4 (R1, R2, R3 et R4) motifs hautement conservés de 18 acides aminés capables de se lier aux microtubules (Goedert et al., 1989; Himmler et al., 1989).



2.2. Fonction

Initialement décrite par (Cleveland et al., 1977a) comme étant une protéine associée aux microtubules, la principale fonction de tau est de réguler la dynamique des microtubules ce qui a comme conséquence d'avoir un impact important sur le transport axonal.

2.2.1. Régulation de la dynamique des microtubules

Les microtubules sont des structures cylindriques qui sont le résultat de l'assemblage de protofilaments qui sont eux-mêmes constitués de tubuline α et β . Les microtubules sont des structures connues pour être en perpétuelle reconstruction et donc avoir une dynamique d'élongation et de dépolymérisation continue. Cette dynamique instable se fait aux deux extrémités de leur structure. L'ajout de nouveaux éléments se fait à l'extrémité (+) alors que la dépolymérisation se fait à l'extrémité (-). C'est en considérant la dynamique instable que les protéines associées aux microtubules prennent toute leur importance puisque leur liaison permet de les stabiliser.

L'interaction entre tau et les microtubules a grandement été étudiés au cours des dernières années, surtout pour son lien possible avec la MA (Terry, 1996; Pollak et al., 2003). Tau est une protéine qui a la capacité de se lier aux microtubules afin de promouvoir leur polymérisation et les stabiliser (Weingarten et al., 1975; Gustke et al., 1994).

La liaison de tau avec les microtubules se fait par son extrémité C-terminale, au domaine de liaison aux microtubules. La présence d'isoformes 4 domaines de liaison aux microtubules confère aux isoformes 4R une plus grande capacité de promouvoir la

polymérisation et la stabilité des microtubules. Cette plus grande stabilité confère aux réseaux axonaux une plus grande rigidité. Bien que l'impact d'un déséquilibre entre la proportion de 3R et 4R soit toujours sujet à discussions, il semble qu'une modification de la proportion des différents isoformes puisse avoir un impact sur la progression de la pathologie d'Alzheimer (Connell et al., 2005; Glatz et al., 2006; Ingelsson et al., 2006; Espinoza et al., 2008).

2.2.2. Transport axonal

Les neurones sont, par leur fonction, un type de cellules qui peuvent s'étendre sur de très grandes distances. Afin de conserver une signalisation cellulaire fonctionnelle sur toute la longueur de la cellule, le neurone se doit d'avoir un système axonal bidirectionnel très performant et dynamique. Dans ce contexte, les microtubules ont non seulement le rôle de supporter la cellule, mais aussi celui de véritable tapis roulant où circule des organites et des vésicules transportées de façon antérograde ou rétrograde soit respectivement vers la synapse ou le corps cellulaire. La stabilité du système microtubulaire est très importante afin que le transport axonal soit le plus efficace possible. Cependant, le système microtubulaire se doit aussi d'être instable afin de garder une dynamique qui est nécessaire à certains processus biologiques importants comme la croissance axonale. C'est dans cet aspect d'équilibre instable que tau joue un rôle important en régulant la stabilité des microtubules.

Par sa fonction de stabilisation des microtubules, tau intervient dans la régulation du transport axonal. Autant la protéine tau que les autres protéines stabilisatrices associées aux microtubules ont un rôle important à jouer en maintenant cette « autoroute de transport » stable. Il a été démontré qu'un dérèglement de l'expression ou de phosphorylation de la protéine tau entraînait un dysfonctionnement dans le transport axonal, autant *in vitro* qu'*in vivo* (Ebner et al., 1998; Stamer et al., 2002) (Figure 5). La phosphorylation joue un rôle

important dans la liaison de tau aux microtubules et influence donc d'une façon importante le transport axonal. La forme phosphorylée de la protéine tau a une affinité plus faible pour les microtubules, ce qui implique que le réseau microtubulaire est plus instable, mais plus dynamique. La forme déphosphorylée a une plus grande affinité pour le réseau microtubulaire ce qui le stabilise et permet une plus grande efficacité du transport axonal. La proportion des différentes isoformes de tau est aussi importante. Ainsi, dans certains modèles de souris transgéniques qui surexpriment différentes isoformes de tau, le transport axonal a été trouvé comme étant aussi affecté (Spittaels et al., 1999; Zhang et al., 2004; Kambe et al., 2011; Kim et al., 2011).

La liaison aux microtubules est négativement régulée par la phosphorylation de plusieurs sites dans et autour de la région de liaison aux microtubules de la protéine tau (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1995; Buee et al., 2000; Avila et al., 2004). Cette hyperphosphorylation jumelée à une expression plus importante des isoformes 3R, ayant un plus faible pouvoir de liaison, pourraient probablement contribuer à une dynamique des microtubules plus grande plasticité du cytosquelette neuronal, requis lors des périodes de croissance neuronale (Goedert and Jakes, 1990; Lovestone and Reynolds, 1997; Planel et al., 2008).

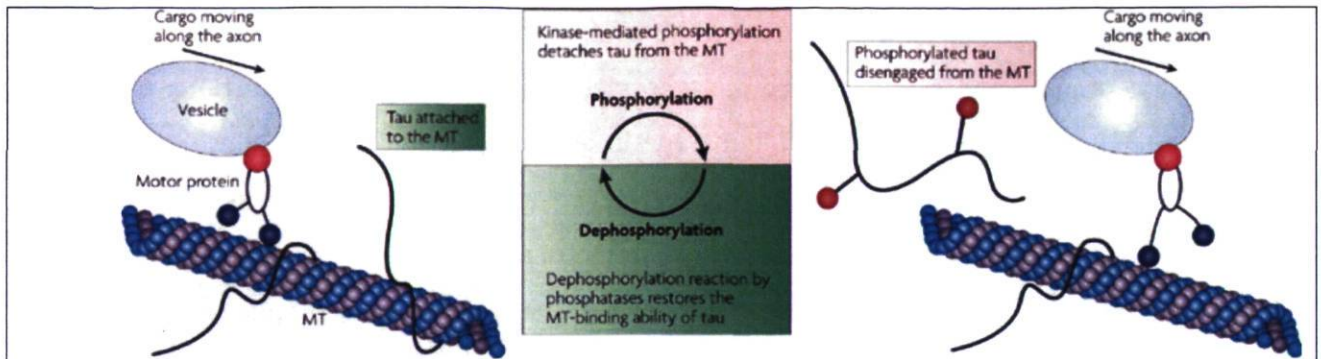


Figure 5 : Implication de la régulation de tau dans le transport axonal. Tiré de (Ballatore et al., 2007).

La principale fonction de tau, connu à ce jour, est de stabiliser la dynamique des microtubules. Cette fonction est un élément clé du transport axonal et est régulée par la capacité de la protéine tau à se lier aux microtubules. Cette liaison est principalement médiée par la phosphorylation de tau qui permet le détachement de la protéine du réseau microtubulaire.

2.2.3. Autres rôles

Initialement décrite par (Binder et al., 1985) comme une protéine axonale, tau a ensuite été montré comme étant présente dans d'autres compartiments cellulaires. Tau a été démontré comme pouvant se lier aux ribosomes (Papasozomenos and Binder, 1987), à la membrane plasmique (Brandt et al., 1995) et aux noyaux des cellules (Loomis et al., 1990; Thurston et al., 1997; Cross et al., 2000). Suite à ces observations, l'hypothèse a été émise que tau pourrait se lier à l'ADN (Hua and He, 2003) et que tau pouvait en induire un changement de conformation qui pourrait être impliqué dans la protection de l'ADN (Hua and He, 2003; Qu et al., 2004; Sultan et al.). Sultan et ces collègues suggèrent que cette protection serait aussi sous l'influence de la phosphorylation de tau (Sultan et al., 2011).

2.2.4. Modification post-traductionnelle

La protéine tau peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles qui peuvent modifier son efficacité à accomplir ses principales fonctions. Parmi celles-ci on peut noter l'ubiquitination, l'acétylation, la glycation, la transglutamination, la formation de ponts disulfure par oxydation, les N- glycosylations et O-glycosylations (Buee et al., 2000). La modification la plus étudiée est cependant la phosphorylation.

2.2.4.1. Phosphorylation

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle de tau la plus étudiée, probablement due à son impact sur la capacité de tau à se lier aux microtubules. Tau peut compter, selon l'isoforme étudié, jusqu'à 85 sites putatifs de phosphorylation. Dans les faits, plus de 30 sites de phosphorylation sérines/thréonines ont été décrits phosphorylés au moyen d'anticorps dirigés contre ces épitopes phosphorylés.

La fonction principale de tau est de réguler la dynamique de polymérisation/dépolarisation des microtubules. Cette fonction est grandement influencée par le degré de phosphorylation de tau. En effet, l'augmentation du degré de phosphorylation de tau inhibe sa capacité à induire la polymérisation des microtubules (Lindwall and Cole, 1984). Le contrôle de la phosphorylation de tau serait donc un moyen de moduler cette fonction de tau. Aussi, il a été montré que l'état de phosphorylation de tau varie selon le stade de développement, comme lors de la différenciation neuronale ou du développement axonal. De plus, la protéine tau est retrouvée sous une forme plus phosphorylée durant le développement embryonnaire que dans les stades de développement postnatal (Lindwall and Cole, 1984; Brion et al., 1993).

Afin de permettre une régulation fine son état de phosphorylation, tau dispose d'un grand nombre de kinases et phosphatases. Parmi elles, GSK-3 β et PP2A sont considérés comme étant respectivement la kinase et la phosphatase majeures régulant la phosphorylation de Tau *in vivo* bien que beaucoup d'autres kinases et phosphatases peuvent être impliquées (Voir tableau 1 et 2) (Planel et al., 2002; Tian and Wang, 2002).

2.2.4.1.1. Kinases

2.2.4.1.1.1. GSK-3 β

Dans un premier temps, la glycogène synthases kinase 3 (GSK-3) a été décrite pour son implication dans le métabolisme du glycogène chez le lapin (Embi et al., 1980). Depuis, l'implication de GSK-3 a été démontrée dans plusieurs fonctions cellulaires telles que le contrôle de la division cellulaire et l'apoptose. Dans un deuxième temps, des études ont montré que GSK-3 était directement impliquée dans diverses voies de signalisation cellulaire telle que celle de l'insuline. GSK-3 est une protéine retrouvée sous deux isoformes (α et β) codés par le même gène (Woodgett, 1990).

GSK-3 β est abondamment exprimée dans tous les tissus, avec des niveaux particulièrement élevés dans le système nerveux central (Woodgett, 1990; Plyte et al., 1992). GSK-3 β est présente dans les dendrites chez l'adulte et dans les axones embryonnaires (Takahashi et al., 1994; Leroy and Brion, 1999). GSK-3 β est également retrouvée dans le noyau cellulaire où elle peut être notamment impliquée dans la régulation de la transcription en étant un partenaire de la voie de signalisation impliquant NF κ B (Hoshi et al., 1995; Diehl et al., 1998; Ougolkov et al., 2005).

La régulation de l'activité de GSK-3 β est modulée par la phosphorylation de deux épitopes. La régulation majeure de GSK-3 β est opérée par sa phosphorylation sur la sérine 9 (Sutherland et al., 1993). La phosphorylation sur site agit comme un compétiteur du domaine catalytique ce qui entraîne une baisse de l'activité de la kinase (Yuan et al., 2004). La phosphorylation sur la tyrosine 216 a aussi été montrée pour augmenter l'activité de GSK-3 β , bien que la phosphorylation de ce site de semble être une voie de régulation mineure (Dajani et al., 2001). *In vitro*, il a été montré que l'inhibition de GSK-3 β peut-être levée sous l'action de la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Sutherland and Cohen, 1994). Cette réactivation de GSK-3 β par PP2A a ensuite été démontrée en culture cellulaire et en culture de coupes de cerveaux (Bennechib et al., 2000; Planel et al., 2001). *In vivo*, la mise à jeun et l'hypothermie en résultant provoquent aussi une inhibition de GSK-3 β via la phosphorylation de sa sérine 9 (Planel et al., 2001; Planel et al., 2007b). GSK-3 β serait aussi capable de s'autoréguler en s'inhibant par autophosphorylation sur sa sérine 9 (Wang et al., 1994).

GSK a la capacité de phosphoryler une grande variété de substrats comme certains facteurs de transcriptions ou protéines de structures (Grimes and Jope, 2001). GSK-3 β a été montré comme étant capable de se lier à la portion N-terminales de tau (Sun et al., 2002). Au préalable, GSK-3 β avait été montré capable de phosphoryler tau à plusieurs épitopes dont à la sérine 199, la thréonine 231, la sérine 396 et la sérine 413 (Tableau 1) (Ishiguro et

al., 1992). Ensuite, plus de 15 sites ont été montrés comme étant des sites de phosphorylation ciblés par GSK-3 β . De son côté, GSK-3 α a la capacité de phosphoryler tau sur 2 sites (Tableau 1). La régulation de la phosphorylation de tau par la GSK-3 β est complexe. Afin d'être efficace sur certains épitopes, GSK-3 β a besoin que tau subisse une pré-phosphorylation par certaines kinases comme CDK5 (Ishiguro et al., 1995) ou MAPK (Thomas et al., 1999). GSK-3 β peut donc être régulé par son état de phosphorylation sur la sérine 9 et par l'état de phosphorylation de son substrat. En effet, la pré-phosphorylation de certains épitopes rend possible l'action GSK-3 β alors que la déphosphorylation de certains autres épitopes rend son action impossible (Hur and Zhou, 2010).

2.2.4.1.1.2. JNK

Les JNKs (c-Jun N-terminal kinase) sont des kinases qui sont actives en réponse à des facteurs de stress (Schaeffer and Weber, 1999). Les JNKs sont codés par 3 gènes qui subiront un épissage alternatif qui résultera en la production de 6 isoformes. Seuls jnk1, jnk2 et jnk3 sont exprimés au niveau du cerveau et la fonction des différents isoformes n'est pas bien comprise, mais ils ont des affinités pour des substrats différents *in vivo* (Gupta et al., 1996). JNK est activé par sa double phosphorylation (Derijard et al., 1994; Kyriakis et al., 1994; Gupta et al., 1996) et est capable de phosphoryler tau *in vitro* et *in vivo* (Mielke and Herdegen, 2000). Lorsque JNK est activé, il colocalise avec les agrégats de tau hyperphosphorylés dans la maladie d'Alzheimer (Atzori et al., 2001; Zhu et al., 2001), JNK pourrait donc jouer un rôle important de la phosphorylation de tau chez les gens atteints de la MA (Okazawa and Estus, 2002; Ferrer et al., 2005). En cellule, JNK a été montré être capable de phosphoryler tau sur divers épitopes, dont AT8 et AT270 (Tableau 1) (Buée-Scherrer and Goedert, 2002; Sato et al., 2002)(Buée-Scherrer and Goedert, 2002; Sato et al., 2002)(Buée-Scherrer and Goedert, 2002; Sato et al., 2002).

2.2.4.1.1.3. ERK

Tous comme les JNKs, les ERKs (Extracellular signal-regulated kinases) répondent à divers stimuli et sont capables de phosphoryler une grande variété de substrat (Schaeffer and Weber, 1999)(Schaeffer and Weber, 1999)(Schaeffer and Weber, 1999). Parmi la famille des ERKS, seuls ERK1 et ERK2 font l'objet de recherche importante. Elles sont connues comme étant fortement exprimées dans le cerveau (Boulton et al., 1991; Schaeffer and Weber, 1999). Bien que connu depuis longtemps pour phosphoryler tau sur plusieurs épitopes *in vitro* (Tableau 1) (Reynolds et al., 2000; Abe et al., 2002), la phosphorylation de tau par ERK *in vivo* demeure à démontrer. En effet, des études en cellules ont montré une faible hyperphosphorylation de tau suite à une co-transfection de ERK (Baum et al., 1995; Illenberger et al., 1998). Il a cependant été rapporté, dans un modèle cellulaire de neurotoxicité induite par le manganèse, que lorsque la phosphorylation de ERK mène à la phosphorylation de tau(Lovestone et al., 1994).

2.2.4.1.2. *Phosphatases*

Il existe 4 protéines phosphosérine et phosphothréonine qui sont fortement exprimées dans le cerveau et qui ont la capacité de phosphoryler tau *in vitro* et probablement *in vivo* (Cai et al., 2010). Chacune des phosphatases a une efficacité et une régulation qui leur sont propres.

| Phosphatase | Phosphorylation sites of tau |
|--------------------|---|
| PP1 | Thr205 \approx Thr212 \approx Ser214 \approx Ser409 > Ser396 > Ser262 > Ser404 > Ser199 > Ser202 |
| PP2A | Thr205 \approx Thr212 \approx Ser262 \approx Ser409 > Ser214 \approx Ser396 > Ser202 > Ser199 > Ser404 |
| PP2B | Ser262 \approx Ser396 \approx Ser409 > Ser212 \approx Ser404 > Thr205 \approx Ser214 > Ser202 > Ser199 |
| PP5 | Thr205 \approx Thr212 \approx Ser409 > Ser202 \approx Ser214 > Ser199 > Ser396 \approx Ser404 > Ser262 |

Tableau 2 : Spécificité et efficacité des phosphatases de tau. Tiré de (Liu et al., 2005)

2.2.4.1.2.1. PP2A

La protéine phosphatase 2A (PP2A) est un apoenzyme trimérique connu pour jouer un rôle dans diverses voies cellulaires, dont la dynamique du cytosquelette, la prolifération et la mobilité cellulaire (Liu et al., 2005). PP2A est retrouvée de façon ubiquitaire dans tout le cerveau et est la phosphatase la plus importante. PP2A est composée de 3 sous-unités : une sous-unité catalytique (C), une sous-unité régulatrice (B) et une sous-unité de liaison (A). La sous-unité régulatrice est retrouvée sous 4 familles qui comptent chacune entre 2 et 5 isoformes (Janssens and Goris, 2001; Shi, 2009).

La méthylation de la leucine 309 empêche la liaison de la sous-unité catalytique avec la sous-unité régulatrice ce qui empêche l'activité de PP2A (Eichhorn et al., 2009). La protéine phosphatase 2A (PP2A) est connue pour être la phosphatase la plus importante de tau *in vivo* (Bennecib et al., 2000; Gong et al., 2000; Virshup and Shenolikar, 2009). Elle peut agir directement sur la phosphorylation de tau sur plusieurs épitopes (voir (Tableau 2) et aussi indirectement via la régulation d'autres effecteurs. Elle agit directement sur la phosphorylation de tau et est connue pour être responsable de plus 70 % de l'activité de déphosphorylation de tau dans le cerveau (Planel et al., 2001). De plus, son activité est connue pour être réduite chez les gens atteints de la MA (Gong et al., 1995; Liu et al., 2005). PP2A peut aussi agir de façon indirecte sur la phosphorylation de tau. En effet, l'acide okadaïque, un inhibiteur spécifique de PP2A en culture cellulaire, a permis de démontrer que l'inhibition de PP2A augmente aussi l'action de certaines kinases, dont CAMK, ERK et GSK-3 qui sont des effecteurs de la phosphorylation de tau (Gong et al., 1993; Bennecib et al., 2000; Bennecib et al., 2001).

2.2.4.1.2.2. PP1

La protéine phosphatase 1 (PP1) est une phosphatase qui est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes et qui est impliquée dans diverses voies cellulaires, dont la synthèse de protéine, la division cellulaire et la réorganisation du cytosquelette (Pei et al., 2003; Ceulemans and Bollen, 2004). PP1 est constituée de deux sous-unités : la sous-unité catalytique et la sous-unité régulatrice (Cohen, 2002). PP1 est capable de déphosphoryler tau *in vitro* et son activité a été montré comme étant diminué chez les gens atteints de la

MA (Gong et al., 1993; Shi, 2009). PP1 a notamment été montrée pour être capable de déphosphoryler tau *in vitro* sur plusieurs épitopes (Tableau 2).

2.2.4.1.2.3. PP2B

La protéine phosphatase B (PP2B ou calcineurin) joue un rôle important dans plusieurs voies cellulaires importantes où le calcium est impliqué comme dans les réactions immunitaires, le développement neurologique et la mémoire (Gong et al., 1994). PP2B consiste en deux sous-unités : une régulatrice et une catalytique (Rusnak and Mertz, 2000). PP2B a été montrée pour avoir la capacité de déphosphoryler tau *in vitro* sur plusieurs épitopes (Tableau 2). Bien que PP2B soit hautement exprimé dans le cerveau des mammifères, il semble son efficacité à déphosphoryler tau *in vitro* (Shi, 2009) et chez les gens atteints de la MA soit toutefois assez négligeable (Liu et al., 2005).

2.3. Pathologie tau

Les tauopathies correspondent aux maladies neurodégénératives qui se caractérisent par l'accumulation intracellulaire de la protéine tau anormalement phosphorylée et hyperphosphorylée, dont la maladie d'Alzheimer est sans doute la plus connue. La protéine tau anormalement et hyperphosphorylée est retrouvée sous forme de PHF (Paired Helical Filaments) et peut être colorée au rouge congo pour être visible en microscopie électronique (Qian et al., 2011). Tout au long de la progression de la pathologie, l'accumulation de PHF est accentuée et peut être caractérisée en cytologie selon le stade d'évolution. L'hyperphosphorylation de tau est le résultat de l'augmentation de l'état de phosphorylation de la protéine tau sur plusieurs épitopes, provoquée par la dérégulation de l'activité des kinases et/ou phosphatases de tau (Kidd, 1963).

Chez les gens atteints de la MA, certaines kinases et phosphatases ont été montrées comme étant dérégulées. Par exemple, l'activité de PP1 et PP2A a été montrée comme étant diminuées chez les patients atteints de la MA (Gong et al., 1994; Gong et al., 2005). Certaines kinases sont aussi relocalisées chez les gens atteints de la MA, ce qui laisse croire qu'elles pourraient être impliquées dans le développement de la pathologie. Par exemple, JNK activé colocalise avec les agrégats de tau hyperphosphorylés dans la maladie d'Alzheimer (Gong et al., 1993; Atzori et al., 2001). Une autre kinase de tau GSK-3 β a aussi été montrée pour colocaliser sous sa forme active avec les formes précoces de la dégénérescence neurofibrillaire et non avec les formes plus tardives (Zhu et al., 2001; Leroy et al., 2007). Ce qui laisse croire que cette kinase pourrait être impliquée dans la mise en place de la dégénérescence neurofibrillaire. En raison du grand nombre de phosphatases et de kinases qui pourraient être impliquées dans la phosphorylation de tau chez les gens atteints de la MA, il n'est pas exclu que ce soit une synergie entre plusieurs acteurs qui soient responsables de la mise en place de la pathologie.

La cause de la dérégulation de l'activité des kinases et phosphatase chez les gens atteints de la MA peut être la résultante de plusieurs facteurs. Depuis longtemps la relation entre les lésions liées aux plaques amyloïdes et à la dégénérescence neurofibrillaire est fortement discutée et débattue. Dans la théorie de la cascade amyloïde, c'est le peptide amyloïde- β qui est le pivot central. De façon intéressante, il a été montré que la GSK-3 pouvait être le lien entre la pathologie amyloïde et de la pathologie Tau. En effet, l'exposition de cultures de neurones hippocampiques de rat au peptide amyloïde- β entraîne une augmentation de la phosphorylation de tau via l'activation de la GSK-3 (Takashima et al., 1998; Pei et al., 1999). De la même façon, l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt semble être un des liens entre les mutations présénilines 1 et l'augmentation de la phosphorylation de tau (Takashima et al., 1996). L'accumulation du peptide amyloïde- β semble donc être un facteur qui influence l'équilibre entre l'activité des kinases et phosphatases. Cependant, l'observation de modèle murin montrant une accumulation importante de peptides amyloïdes montre que ceux-ci ne présentent pas de dégénérescence neurofibrillaire (Duff et al., 1996; Baki et al., 2004). En contrepartie, les modèles murins de

dégénérescence neurofibrillaire montrent l'apparition de mort neuronale, mais pas l'accumulation de peptide- β (Games et al., 1995). Il semble cependant que la cohabitation des deux lésions provoque un effet synergique qui provoque une augmentation et l'apparition de la pathologie Tau (Gotz et al., 2001; Lewis et al., 2001; Perez et al., 2005; McGowan et al., 2006). L'observation de la protéine tau hyperphosphorylée chez des modèles animaux présentant une dérégulation de la voie signalisation de l'insuline semble indiquer que cette voie pourrait influencer l'équilibre entre l'activation des kinases et phosphatases (Duvillie et al., 1997; Ribe et al., 2005; Schechter et al., 2005). C'est dans l'optique de permettre de mettre en évidence la relation moléculaire entre le diabète et la pathologie tau que les modèles murins de diabète sont maintenant utilisés.

Chapitre 3 : Diabète

Le diabète est une maladie chronique qui est marquée par un niveau élevé de glucose sanguin. Le diabète est connu principalement sous deux formes : diabète de type 1 et type 2. Chacune des formes représente respectivement 5-10 % et 90-95 % de la population vivant avec le diabète. D'autres formes de diabète sont connues, comme le diabète gestationnel, mais elles sont beaucoup moins étudiées et moins répandues.

3.1.1. Diabète type 1

Le diabète de type 1 ou diabète indépendant est généralement diagnostiqué chez les enfants ou les adultes en bas âge. Ce type de diabète est dû à une réaction auto-immune qui détruit les cellules β des îlots de Langerhans qui produisent (Schubert et al., 2004). Actuellement, la thérapie à l'insuline est la seule voie pour corriger l'absence ou la très faible production d'insuline (Castano and Eisenbarth, 1990). Cependant, des effets secondaires aux traitements tels que l'hypoglycémie iatrogénique sont fréquents et entraînent, chez les patients, des tremblements, des changements de l'humeur (anxiété,

énervements, ataxie) et peut occasionner le coma dans les cas extrêmes (Cryer, 2001; Cryer et al., 2003; Cryer, 2004; McCrimmon and Sherwin, 2010).

3.1.2. Diabète type 2

Le diabète de types 2 ou indépendant de l'insuline est habituellement associé avec le vieillissement, mais il touche des populations de plus en plus jeunes en raison de l'incidence élevée de l'obésité, qui est un facteur de risque majeur de développer le diabète de type 2 dans les populations développées. Chez les patients atteints du diabète de type 2, le pancréas produit dans un premier temps des taux normaux d'insuline, mais en raison d'une résistance à l'insuline, les cellules réceptrices ne répondent correctement au stimulus hormonal. La phase précoce du diabète de type 2 se caractérise donc par une hyperglycémie et une hyperinsulinémie induite par l'absence d'une boucle de rétrocontrôle négatif (Briscoe and Davis, 2006). Avec le temps, le pancréas, qui est surtaxé, devient incapable de produire suffisamment d'insuline pour pallier la résistance à l'insuline et maintenir la glycémie à un niveau normal. Les cellules β du pancréas vont donc s'essouffler et la production d'insuline va diminuer de façon importante, ce qui va causer une hyperglycémie et une déficience en insuline qui accompagne le diabète de type 2 dans les cas les plus avancés de la pathologie (Festa et al., 2006).

3.1.3. Étiologie du diabète et signalisation à l'insuline

Le rôle de l'insuline est bien connu dans les muscles et tissus adipeux, cependant son rôle est beaucoup moins bien documenté au niveau du système nerveux central. Toutefois, de récentes découvertes suggèrent que l'insuline pourrait jouer un rôle important au niveau cérébral dans son métabolisme, au niveau neurotrophique, de la neuromodulation et des fonctions neuroendocriniennes (DeFronzo, 2004).

3.1.3.1. Signalisation extracellulaire et récepteurs cellulaires

L'insuline présente au niveau du système nerveux central provient à la fois de la circulation sanguine puisque l'insuline est transportée de façon active à travers la barrière hémato-encéphalique et est aussi produite localement au niveau du cerveau (Torres-Aleman, 2000). Les récepteurs à l'insuline sont aussi abondants au niveau cérébral et hautement exprimé dans le bulbe olfactif, l'hypothalamus, l'hypophyse, le cortex et l'hippocampe (Havrankova et al., 1978; Schulingkamp et al., 2000). Le récepteur à l'insuline est un récepteur hétéro-tetramérique qui est composé de deux types de sous-unité : α et β . La sous unité β a une activité tyrosine kinase (Unger et al., 1991) qui est activée suite à la liaison de la sous-unité α .

3.1.3.2. Signalisation intracellulaire : kinase et phosphatases

Une fois activé, le récepteur de l'insuline va phosphoryler sa protéine cible (Youngren, 2007), qui va à son tour activer la phosphatidyl-inositol-3 phosphate kinase (PI3K) (Shpakov and Pertseva, 2000) (Figure 6). La PI3K est à l'embranchement de deux voies métaboliques importantes : la voie des « mitogen-activated proteine kinase » (MAPK) et la voie de Akt (Sun et al., 1993). La voie des MAPKs est notamment impliquée dans la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire (Carnero et al., 2008). La voie de signalisation qui passe par Akt est pour sa part impliquée dans la prolifération et la croissance cellulaire ainsi que dans la synthèse protéique (Brazil and Hemmings, 2001; Pearson et al., 2001). Akt peut aussi phosphoryler la GSK-3 β sur la sérine 9, ce qui la rend inactive (Tremblay and Giguere, 2008). De cette façon, un mauvais fonctionnement de la voie de signalisation Akt mène à une déphosphorylation de GSK-3 β et donc à une activation (de la Monte and Wands, 2005; Deng et al., 2009).

La résistance à l'insuline qui est présente dans les cas de diabète de type 2 conduit à une diminution de la capacité d'induire la cascade de phosphorylation (Balaraman et al., 2006). Bien que la cause initiale de la perturbation de la cascade de signalisation ne soit pas connue, la biopsie de muscle de sujet résistant à l'insuline a montré une réduction de l'activité enzymatique et de l'état de phosphorylation de kinases et substrats impliqués dans la voie de signalisation de l'insuline.

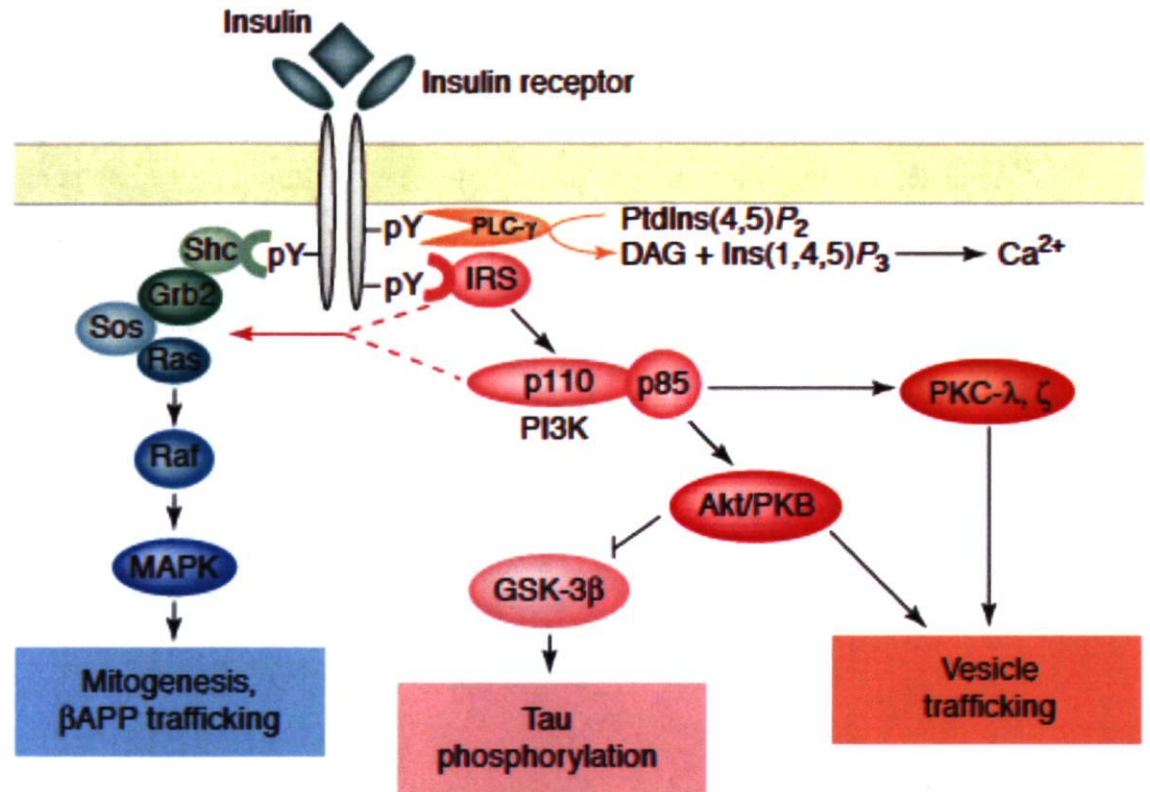


Figure 6 : Signalisation de l'insuline. Tiré de (Pirola et al., 2004).

La voie de signalisation de l'insuline est une voie métabolique importante qui comporte plusieurs ramifications qui touchent beaucoup de processus biologiques. Suite à l'activation de son récepteur, une cascade de signalisation est activée qui touche beaucoup de fonctions métaboliques, dont la phosphorylation de la protéine tau.

3.2. Modèles d'études du diabète de type 2

3.2.1. Modèle génétique

La prise alimentaire est finement régulée par plusieurs systèmes et peut donc être influencée de plusieurs façons. Dès les années 50, il a été suggéré que les dépôts adipeux jouaient un rôle dans la régulation de la prise alimentaire (Gasparini et al., 2002). Ce n'est que quelques années plus tard que la leptine a été clonée chez la souris ainsi que sa séquence homologue chez l'homme (Kennedy, 1953). La leptine est une hormone qui est principalement sécrétée par les tissus adipocytes (Zhang et al., 1994). Le principal lieu d'action de la leptine est l'hypothalamus pour la régulation de la satiété et la dépense énergétique. Elle régule de façon négative la balance énergétique en inhibant la prise de nourriture et en stimulant la dépense énergétique (Maffei et al., 1995) (Figure 7).

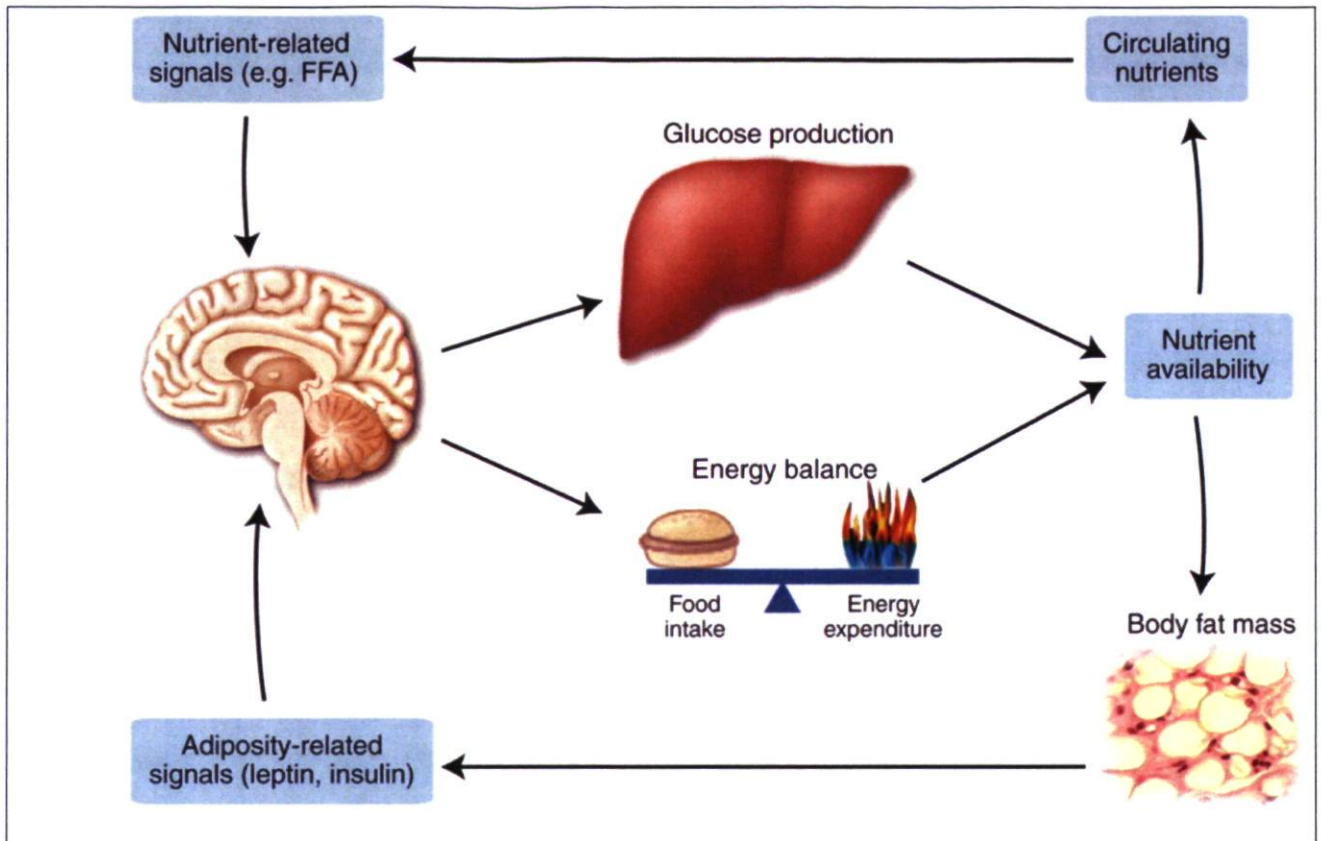


Figure 7 : Signalisation de leptine et contrôle de la prise alimentaire. Tiré de (Cottrell et al., 2010).

La leptine produite par les adipocytes joue un rôle central dans le contrôle de la satiété. Sa présence au niveau du système nerveux central diminue la prise alimentaire en modulant la réponse face de satiété. Chez les animaux *ob/ob* ou *db/db* porteurs de mutation dans cette voie de signalisation, la prise alimentaire est donc augmentée.

Depuis la découverte de la leptine, deux principales lignées animales ont été utilisées pour étudier les effets de la prise alimentaire excessive. Chez les souris adultes porteuses de la mutation ob/ob, il n'y a pas de leptine détectable en dans la circulation sanguine puisque la mutation produit une protéine qui est tronquée et non sécrétée (Schwartz and Porte, 2005). Les animaux db/db ayant une mutation sur le gène codant pour le récepteur de la leptine (Zhang et al., 1994) auront pour leur part un niveau de leptine circulante normal, mais la signalisation en aval du récepteur ne sera pas activé puisque le récepteur est non fonctionnel. Autant chez les animaux db/db que les animaux ob/ob, les signaux de la satiété transmis par le système de la leptine sont absents. Le même phénotype est donc observé chez les deux lignées d'animaux, c'est-à-dire que ces animaux auront une augmentation de la prise alimentaire qui causerait une obésité accompagnée d'hyperinsulinémie et une sévère résistance à l'insuline (Chen et al., 1996). Ils auront donc une augmentation de la masse corporelle rapide et la mise en place d'un diabète insulino-résistant (diabète de type 2). Ces modèles murins (ob/ob et db/db) meurent généralement avant l'âge de 10 mois.

3.2.1.1. Marqueurs de la maladie d'Alzheimer

Plusieurs études ont rapporté une hyperphosphorylation de la protéine tau dans des modèles de rats (Hummel et al., 1966; Jung et al., 2011) et de souris (Li et al., 2007) développant le diabète de type 2. Les deux groupes ont rapporté une augmentation de la phosphorylation de tau dans les neurones corticaux, mais chacun sur deux épitopes différents (Kim et al., 2009; Jung et al., 2011). De la même façon, plusieurs études ont montré des niveaux d'expression d'APP et de β -amyloïde augmentée dans des modèles de rats (Li et al., 2007) et de souris (Li et al., 2007) développant le diabète.

3.2.2. Modèle induit et marqueurs de la maladie d'Alzheimer

Les diètes riches en gras sont la méthode la plus couramment utilisée pour induire l'apparition du diabète de type 2. Il a été démontré que les diètes riches causent le diabète de type 2 (Jolivald et al., 2008), l'augmentation de la masse corporelle des animaux (Julien et al., 2008; Moroz et al., 2008) et une diminution de la masse cérébrale (Moroz et al., 2008). Ces modèles animaux reproduisent mieux que les modèles génétiques les aspects retrouvés chez les sujets humains souffrant du diabète de type 2 soit : l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline.

3.2.2.1. Marqueurs de la maladie d'Alzheimer

Il a été démontré que les diètes riches causent le diabète de type 2 (Moroz et al., 2008), l'augmentation de la masse corporelle des animaux (Julien et al., 2008; Moroz et al., 2008) et une diminution de la masse cérébrale (Moroz et al., 2008). Il a été montré que l'utilisation de telles diètes augmentait la production de peptide A β 1-40 et A β 1-42 et augmentait les niveaux totaux de protéine tau, mais n'augmente pas les niveaux de la protéine tau phosphorylée chez un modèle transgénique de souris Alzheimer (Moroz et al., 2008).

Les résultats cumulés des études épidémiologiques faites chez l'homme et les modèles murins semblent montrer qu'il y a une corrélation entre le diabète de type 2 et la phosphorylation de tau. Cependant, les études faites avec les modèles animaux ne sont pas complètes. Le modèle db/db utilisé par Kim et ces collègues (Julien et al., 2008) est caractérisé par une obésité associée à de l'hyperphagie, de l'hyperinsulinémie et une sévère résistance à l'insuline (Kim et al., 2009). L'hyperphosphorylation de tau observée pourrait donc être conséquente de plusieurs facteurs. Il serait donc intéressant de dissocier ces anomalies métaboliques afin de pouvoir mieux discerner les causes possibles de la phosphorylation de tau chez ces modèles animaux. De plus, plusieurs de ces études ont utilisé des agents anesthésiants, ce qui est connu pour provoquer une hyperthermie rapide et

induire une forte hyperphosphorylation de tau (Hummel et al., 1966), les voies métaboliques causant l'augmentation de la phosphorylation de la protéine devront aussi être élucidées.

Chapitre 4 : Objectifs et Hypothèse

Notre laboratoire s'intéresse à la protéine tau et aux facteurs influençant ces modifications post-traductionnelles, dont sa phosphorylation. En effet, la phosphorylation, comme nous l'avons précédemment vu au cours de l'introduction, semble jouer un rôle important dans la capacité de tau à assurer sa fonction de stabilisation des microtubules. D'un point de vue pathologique, de nombreuses évidences semblent suggérer que la phosphorylation de tau semble impliquée dans la cascade moléculaire menant à l'agrégation de tau et à la mort neuronale. Enfin, de nombreuses évidences cliniques et l'étude de modèles expérimentaux modélisant le diabète indiquent un possible lien entre diabète et maladie d'Alzheimer.

Mon projet de maîtrise s'inscrit donc dans cette voie et vise à évaluer l'impact du diabète de type 2 sur la phosphorylation de la protéine tau *in vivo*. Pour démontrer que le diabète de type 2 augmente la phosphorylation de la protéine tau, nous avons utilisé deux modèles de souris transgéniques obèses, déficientes pour la régulation de la prise alimentaire médiée par la leptine : les souris ob/ob et db/db. Chacun des modèles de souris diabétiques est comparé par rapport à un groupe contrôle qui a un fond génétique commun. Après avoir analysé les différents paramètres physiologiques relevant du diabète, nous avons étudié la phosphorylation de tau chez ces souris au cours de la mise en place des différentes phases du diabète de type 2. Chacun des modèles de souris diabétique ont paramètres physiologiques différents et ne développeront pas un diabète de la même intensité puisqu'ils ont des fonds génétiques différents. L'utilisation de deux modèles, sur deux fons génétiques différents, ayant des paramètres physiologique différents pourrait nous aider à mieux cerner les désordres métaboliques impliquer dans le diabète de type 2 qui ont un impact sur la phosphorylation de la protéine tau.

Dans un deuxième temps, afin de comprendre les mécanismes moléculaires pouvant relier le diabète de type 2 et la phosphorylation de tau *in vivo*, nous avons étudié les

niveaux d'expression et d'activation des kinases et phosphatases majeures de tau. Notre objectif étant de montrer que le diabète de type 2 entraîne une dérégulation de certaines kinases ou phosphatases de tau.

Les résultats seront présentés sous la forme d'un article scientifique à comité de revue qui comprendra respectivement une section : résumé, introduction, matériel et méthode, résultats et discussion.

Chapitre 5 : Results

Tau Hyperphosphorylation In Type 2 Diabetes Mouse Model: Implications For Alzheimer's Disease

Noura EL Khoury*, François Marcouiller*, Françoise Morin, Carl Julien, Alexis Bretteville, Emmanuel Planel**

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author

5.1. Résumé

L'incidence des maladies neurodégénératives et systémiques liées au vieillissement, tels la maladie d'Alzheimer (MA) et le diabète, augmente rapidement. Plusieurs études rapportent que les patients souffrant de diabète ont entre 50 et 75 % plus de risque de développer la MA que les gens sains du même âge. La protéine tau hyperphosphorylée est une des composantes majeures des enchevêtrements neurofibrillaires, une composante neuropathologique classique de la MA. L'étude présente examine les modifications de tau dans deux modèles de souris transgéniques développant un diabète de type 2. La phosphorylation de tau est augmentée au niveau de l'hippocampe de ces souris. Le diabète de type 2 provoque aussi la dérégulation de quelques kinases et phosphatases de tau. Cette dérégulation serait résultante de la résistance à l'insuline et l'hypothermie. Le diabète de type 2 participerait donc l'accélération de la cascade menant à développer la maladie d'Alzheimer.

5.2. Abstract

The incidence of age-related neurodegenerative and systemic diseases including Alzheimer's disease (AD) and diabetes is increasing rapidly. Multiple studies report that patients with diabetes have a 50–75% increased risk of developing AD compared with age- and gender-matched patients without diabetes. Abnormally phosphorylated tau is a major building block of neurofibrillary tangles, a classic neuropathological characteristic of AD. The current study examines tau modification in transgenic mice modeling type 2 diabetes mellitus. Tau phosphorylation is increased in hippocampus of db/db and ob/ob mice compared with control mouse brain. This increase of Tau phosphorylation is conversely accompanied of an Type 2 diabetes also induces a deregulation of some kinases and phosphatases of tau. Our results suggest that the increase of tau phosphorylation caused by dysregulation of some kinases and phosphatases induce by insulin resistance and hypothermia.. We hypothesize type 2 diabetes may contribute to exacerbates Alzheimer's like pathological cascade.

5.3. Introduction

Alzheimer's Disease is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of memory, a decline of cognitive functions leading to behavioral disturbances. With aging population as a main risk factor (Harman, 2002 #1986), this pathology becomes one of the most frequent neurodegenerative diseases and one of the top public health economic concerns since estimated 26.6 million people worldwide are affected (Planel et al., 2007b). The neuropathological hallmarks of AD include amyloid plaques, composed of extracellular aggregates of the beta-amyloid peptide (A β) (Brookmeyer et al., 2007) and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFT), composed of abnormally hyperphosphorylated tau protein (Glennner and Wong, 1984). Tau is a microtubule-associated protein that is abundant in the CNS and expressed mainly in axons. Its main function is to bind and stabilize which is crucial to neuronal functions such as axonal transport (Grundke-Iqbal et al., 1986; Avila et al., 2004). Only rare cases of early onset Familial Alzheimer's Disease (FAD) are caused by mutations in the amyloid precursor protein or presenilin genes. By contrast, the etiology of the vast majority are sporadic late onset AD (LOAD) cases, is still misunderstood due to its multifactorial components involving both genetic and environmental factors. Diabetes mellitus (DM) might be such factor, as there is extensive data from epidemiological studies suggesting that DM is associated with an increased relative risk for AD (Leibson et al., 1997; Ott et al., 1999b; Buee et al., 2000). Moreover, over the last decade, there has been considerable interest on the impact of insulin dysfunction and diabetes on tau pathology. It has been shown that insulin could regulate tau phosphorylation in neuronal cells (Stolk et al., 1997), (Hong and Lee, 1997) which was confirmed by observations of hyperphosphorylated tau in mice showing abnormal insulin levels (Lesort et al., 1999), (Freude et al., 2005), (Planel et al., 2004), (Schechter et al., 2005), (Schubert et al., 2003). We (Schubert et al., 2004) have found tau hyperphosphorylation in models of streptozotocin-induced type 1 diabetes (Planel et al., 2007a), (Clodfelder-Miller et al., 2006), (Jolivald et al., 2008).

Furthermore, starvation, which results in a decrease in the amount of circulating glucose and insulin (Zhao et al., 2003) (Newsholme, 1976) has already been reported to induce AD-like tau hyperphosphorylation in mice (Cherel et al., 1988). In this study, we investigated the impact of T2DM on tau pathogenesis in two genetic model of spontaneous T2DM: the diabetic ob/ob and db/db mice. These are well-established transgenic mice which are respectively deficient for the leptin itself or its receptor (Planel et al., 2001). Leptin is a 16 kDa hormone that regulates adipose-tissue mass through hypothalamic effects on satiety and energy expenditure (Coleman, 1978). Due to a mutation in the leptin receptor, db/db mice are a model of T2DM with in mild obesity and extreme hyperglycemia (Hummel et al., 1966). Due to a nonsense mutation, leptin is missing from homozygous mutant mice ob/ob mice on the C57BL/6J background are a model of T2DM with mild hyperglycemia and extreme obesity (Coleman, 1978), (Lindstrom, 2007), (Ingalls et al., 1950).

5.4. Materials and Methods

5.4.1. Animals.

All adult male C57BL/6J (JAX mice stock no. 000664), ob/ob (B6.V-*Lep^{ob}*/J, JAX mice stock no. 000632), db+ and db/db (BKS.Cg-*Dock7^m* +/+ *Lepr^{db}*/J, JAX mice, stock no. 000642) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were maintained in a temperature-controlled room (~23°C) with a light/dark cycle of 12/12h, and experiments were performed during the light period. Animals were handled according to procedures approved by the Laval University Animal Ethics Committee in accordance with the standards of the Canadian Council on Animal Care. The body temperature of the animals was monitored using a rectal probe (Thermalert TH-5, Physitemp, Clifton, NJ). Mice were sacrificed at 4, 16, or 26 weeks of age, and analyzed as described below. Five animals were used for each group.

5.4.2. Plasma glucose and insulin measurements.

The Glucose Tolerance Test (GTT) was performed by fasting the mice for 6h (0'), and then injecting them intraperitoneally with 1 g of glucose for 1kg of mouse. Blood was analyzed after 15, 30, 60 and 90 min. Plasma glucose was determined using a blood glucose monitor (Accu-Check®Aviva Nano, Roche). Plasma insulin was determined using a ELISA sandwich enzyme immunoassay according to the manufacturer instructions (Insulin, Mouse ELISA, Mercodia).

5.4.3. Analysis of Tau phosphorylation

Mice were killed by cervical dislocation, brains were immediately removed and tissues dissected on ice. Hemispheres (hippocampus and neocortex) were quickly frozen on dry ice and kept at -80°C . Tau phosphorylation was analyzed by a modification of the protocol of Greenberg and Davies (Greenberg and Davies, 1990; Hamann and Matthaei, 1996). Briefly, frozen hemispheres were homogenized without thawing in 5 times volume/weight of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.25% Na-deoxycholate; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM NaF; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aprotinin, leupeptin, and pepstatin) supplemented with proteases and phosphatases inhibitor cocktail, mechanically dissociated with amicrohomogenizer (Microgen Fisherscience), and centrifuged at 20,000 g for 20 min at 4°C . An aliquot of the supernatant representing the total Tau fraction was kept for analysis. Supernatant was diluted sample buffer (NP0008, Invitrogen,) supplemented with 5% 2-mercaptoethanol; protease inhibitor cocktail (P8340, Sigma-Aldrich) and phosphatases inhibitor boiled for 10 min and kept at -20°C .

5.4.4. Antibody

The anti-Tau PHF-1 (phospho-Ser-396/404) monoclonal antibody was a generous gift from Dr. Peter Davies (Albert Einstein University, New York, NY). Total Tau was detected with TauC A0024 (polyclonal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA). AT8 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) reacts with Tau phosphorylated at Ser-202 and Thr-205 (Planel et al., 2004). Changes in the expression and phosphorylation of tau kinases were investigated with the following antibodies: CaMKII, phospho-CaMKII (Santa-Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA); GSK-3 β (BD Transduction Laboratories); phospho-GSK-3 β (Ser9), SAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK (T183/Y185) G9, p44/42 MAP kinase, phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Levels of protein phosphatases were analyzed with the following antibodies: PP1 (E-9) and PP2A-

A (H-300) from Cell signaling, PP2B (Calcineurin A) from R & D Systems; PP2A-C (Santa-Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA);

5.4.5. Western blot analysis.

Membrane blocking and antibody incubations were performed as described (Goedert et al., 1995), with appropriate primary and secondary antibody dilutions. Anti-mouse and anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Cerdarlane. Immunoreactive bands were visualized and analyzed by enhanced chemiluminescence reagent (ECL, Milipore) using a Fujifilm LAS4000 imaging system and the Image Gauge Mac OS X software.

5.4.6. Statistical analysis.

Statistical analysis was performed by t-tests. Except otherwise indicated, data are means \pm standard deviations (S.D.). *, **, and *** symbols indicate significant differences versus control with $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively. Note that for all experiments, ob/ob mice were compared to wild-type (WT) animals, and db/db mice were compared to their heterozygous (db/+) littermates.

5.5. Results

5.5.1. Physiological parameters of ob/ob and db/db mice.

We first investigated physiological parameters of db/db and ob/ob mice at 4, 16 and 26 weeks old. At 4 weeks old, both ob/ob and db/db mice were heavier than control; however, there was no significant weight difference between ob/ob and db/db mice. In addition, ob/ob mice were significantly heavier than db/db mice at 16 weeks and 26 weeks old (Fig.8A.). While rectal temperature was not different among groups at 4 weeks, we could detect a mild hypothermia first in ob/ob mice at 16 weeks old, then in both ob/ob and db/db mice at 26 weeks old (Fig.8B.).

Blood glucose levels showed severe hyperglycemia in both ob/ob and db/db mice at all ages. Moreover, db/db were significantly hyperglycemic than ob/ob mice at 16 and 26 weeks old (Fig.8.C). Blood insulin levels revealed hyperinsulinemia in ob/ob and db/db mice at 4 weeks in comparison to their control. Moreover, ob/ob mice showed severe hyperinsulinemia at 16 weeks old in comparison to db/db mice (Fig.8.D).

5.5.2. Metabolic features of ob/ob and db/db mice.

We next examined insulin resistance and glucose tolerance in both obese and diabetic mice. Interestingly, ob/ob and db/db mice were insulin resistant at 4, 16 and 26 weeks old, as shown by the Insulin Tolerance Test (ITT) (Fig.9.A-C). Similarly, blood glucose analysis during Glucose Tolerance Test (GTT) revealed glucose intolerance in young ob/ob mice at 4 and 16 weeks old and db/db mice at 4 weeks old (Fig.9 D-F).

5.5.3. Increased tau phosphorylation in type 2 diabetes mouse model

. Thus, we next investigated whether T2DM was able to influence tau phosphorylation in the hippocampi of db/db and ob/ob mice compared to their controls (db+ and WT respectively) at 4, 16, 26 weeks of age. At 4 weeks, we observed a massive increase of phosphorylation at AT8 (pS201/pT205) and PHF1 (pS396/pS404) epitopes both in db/db and ob/ob mice (Fig. 10. A.1, A.2). db/db mice showed a mild tau hyperphosphorylation at the PHF1 (120%) epitope at 16 and 26 weeks, and a massive one at the AT8 (300%) epitope at 26 weeks. We could also detect a tau hyperphosphorylation at the AT8 (300%) and PHF1 (150%) epitopes in ob/ob mice at 16 weeks, and at the AT8 (250%) epitope at 26 weeks old (Fig.10. B, C.) Overall, tau phosphorylation was increased in both in ob/ob and db/db mice, but to different extent according to mouse strain. We observe a increase of total tau protein level (150%) in db/db mice at 4 weeks old, there was no change in total tau protein levels in other time points (Fig. 10.).

5.5.4. Tau-related kinases activation in ob/ob and db/db mice.

We have presented evidence showing that T2DM can induce tau hyperphosphorylation. To examine the sequence of events implicated in this mechanism, we next investigated the molecular mechanisms underlying this event. Thus, we first analysed the activation profile of neuronal kinases by immunoblots in ob/ob and db/db hippocampi. We could detect an increase of phosphorylation of CaMKII (200%) in the hippocampi of 4 weeks old ob/ob mice. However, db/db mice did not show a similar activation of CaMKII kinase. ERK phosphorylation was significantly increased in both ob/ob (160%) and db/db (140%) mice at 4 weeks, and this activation was more marked in ob/ob mice. (Fig.11.A.). GSK-3 β serine 9 phosphorylation was increased in db/db brains at 16 weeks (450%) and 26 weeks (200%), and in ob/ob brains at 26 weeks (400%) (Fig.11.). We did not observe any changes in pJNK activation. In addition, we did not

observe any significant changes in total protein level of CamKII, MAPK, GSK-3 β and JNK (Data not shown).

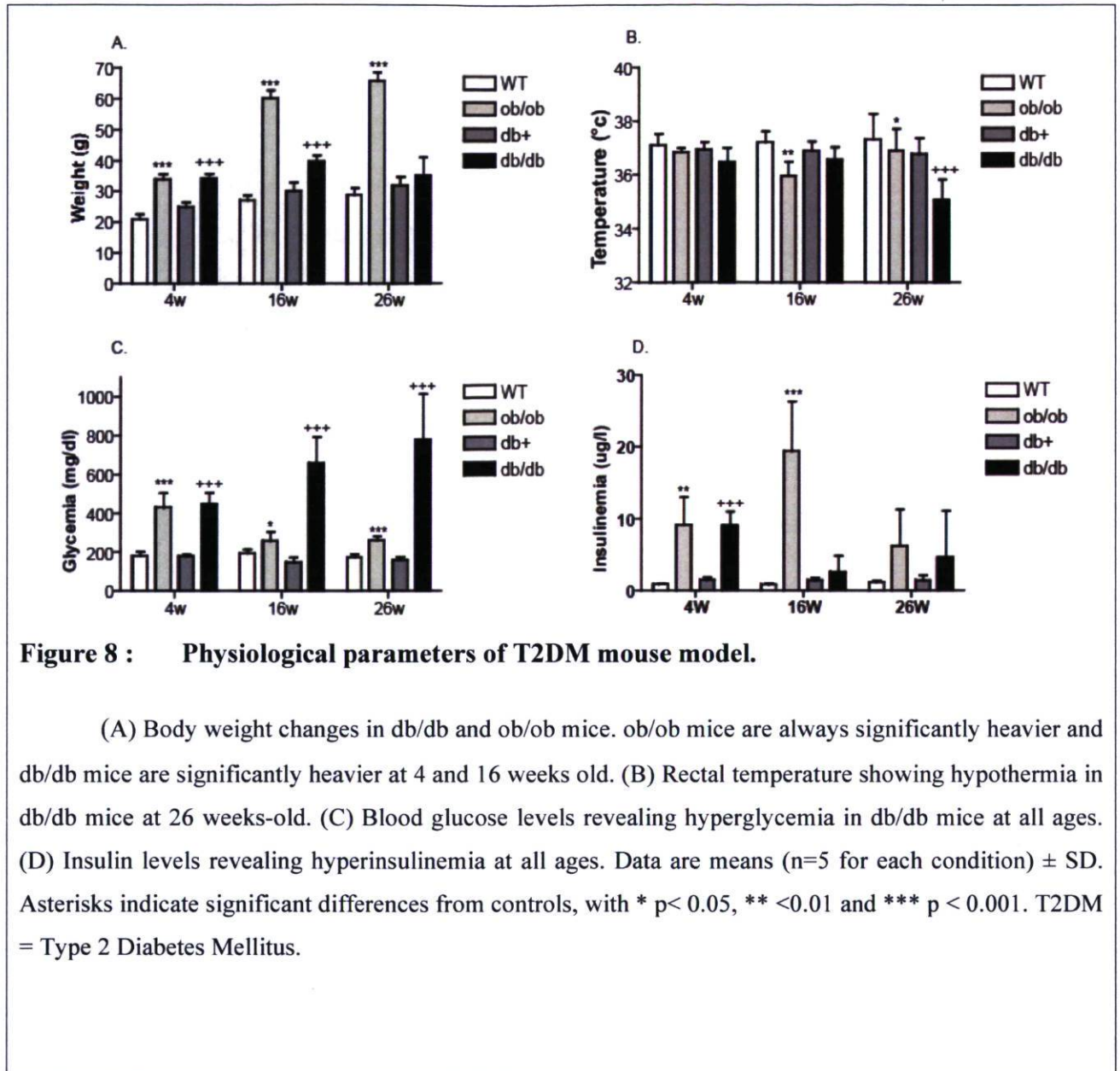
5.5.5. Phosphatases profile during type 2 diabetes

Our results suggested that tau hyperphosphorylation could be attributable to a deregulation of the tau related kinases/phosphatases balance. Therefore, we next assessed the expression levels and activation of tau ser/thr phosphatases (PP). PP are classified into four types, PP1, PP2A, PP2B, and PP2C, on the basis of their substrate specificities and sensitivity to specific activators and inhibitors (Planel et al., 2001). To investigate the pattern of PPs during T2DM, we looked at levels of PP1, PP2A, and PP2B (calcineurin), as biochemical studies have demonstrated that they can dephosphorylate Tau (Cohen, 1989).. At 4 weeks old, we observe a significant increase in the A scaffolding subunit of PP2A and PP2B levels in both ob/ob and db/db mice (Fig. 12.A.). An increase in the level in the PP1 in ob/ob was the only change detected at 16 weeks old (Fig.12.B.). However, at 26 weeks, immunoblots quantification revealed increased levels of PP1 catalytic subunits and PP2A-a and PP2A-c in ob/ob and db/db mice. In addition, PP2B levels were increased in db/db brains (Fig.12.C.). Moreover, we did not observe any change in PP2A-c methylation (Fig.12) which is a positive modulator of PP2A activity (Liu et al., 2005; Eichhorn et al., 2009).

5.6. Discussion

Multiple studies report that patients with diabetes have an increased risk of developing AD compared with age- and gender-matched patients without diabetes (Ott et al., 1999a; Brands et al., 2005; Virshup and Shenolikar, 2009). Two of the most prominent pathological characteristics of AD are extracellular A β plaques and intracellular NFT composed of hyperphosphorylated tau. In this report, we present results strongly suggesting that tau phosphorylation may be a key factor leading to the increased incidence of AD in type 2 diabetic patients. Diabetes and AD share many common characteristics including impaired insulin signalling, increased cholesterol levels, and increased incidence of metabolic disorders (Strachan et al., 1997). In addition, type 2 diabetes involves hyperinsulinemia and insulin resistance in the context of metabolic syndrome, which refers to a cluster of metabolic and vascular risk factors including obesity, dyslipidemia, hypertension, and inflammation (Biessels and Kappelle, 2005; Li and Holscher, 2007). We investigated the *in vivo* relationship between type 2 diabetes and tau phosphorylation in two transgenic mouse models of type 2 diabetes mellitus. In our models, we detected an increase of tau phosphorylation in 4 and 16 weeks old db/db mice. These results are in agreement with a previous study published recently (Milionis et al., 2008). This increase of phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes is accompanied by a deregulation of the kinase/phosphatase equilibrium. Indeed we observed that pCamKII was activated in 4 weeks old ob/ob mice, while activation was increased in both ob/ob and db/db mice. This deregulation of kinase/phosphatase balance could be attributed to an upstream deregulation of insulin signalling pathway as both models show insulin resistance at this age. At 26 weeks of age, db/db and ob/ob mice show an increase of phosphorylation concomitantly with an elevation of GSK-3 β S9 inhibitory phosphorylation in ob/ob and db/db mice. At this age, both ob/ob and db/db mice showed insulin resistance but only the db/db mice are hypothermic. Our lab has previously shown that hypothermia could lead to an increase of tau phosphorylation (Kim et al., 2009) and anesthesia-induced hypothermia (Planel et al., 2007a). Moreover hypothermia is a common outcome in experimental diabetes (Shalaby et

al., 1989; Kilgour and Williams, 1998; Planel et al., 2007b) as a consequence of the inhibition of leptin signalisation pathway (Kilgour and Williams, 1996). It is therefore possible that hypothermia in old db/db mice could be one of the factors responsible of tau phosphorylation increase. In fact, we have previously shown that GSK-3 β S9 phosphorylation was increased during hypothermia (Hukshorn and Saris, 2004; Planel et al., 2004). Moreover, we observe an increase in the levels of the A scaffolding and C catalytic subunit of PP2A in both ob/ob and db/db mice at 4 and 26 weeks which has been shown I hypothermic conditions to compensate the decrease of PP2A activity (Planel et al., 2007b) (Baharians and Schonthal, 1998). However, it is worth to note that whether hypothermia is involved in tau phosphorylation in our diabetes experimental model, it does not act synergistically with insulin signalling induced kinase/phosphatase deregulation as tau phosphorylation levels in hypothermic db/db mice are comparable with tau phosphorylation levels in non hypothermic ob/ob mice. Therefore, investigating tau phosphorylation in normothermic controlled db/db mice could be a way to assess the relative contribution of each mechanism in tau phosphorylation increase. To summarize, our data indicate that insulin resistance and hypothermia could be two distinct mechanisms in type 2 diabetes leading to an imbalance of kinases and/or phosphatases activity which in turn triggers tau phosphorylation increase. More importantly, our work suggest that type 2 diabetes may act as an AD risk factor by exacerbating Alzheimer's like pathological cascade.



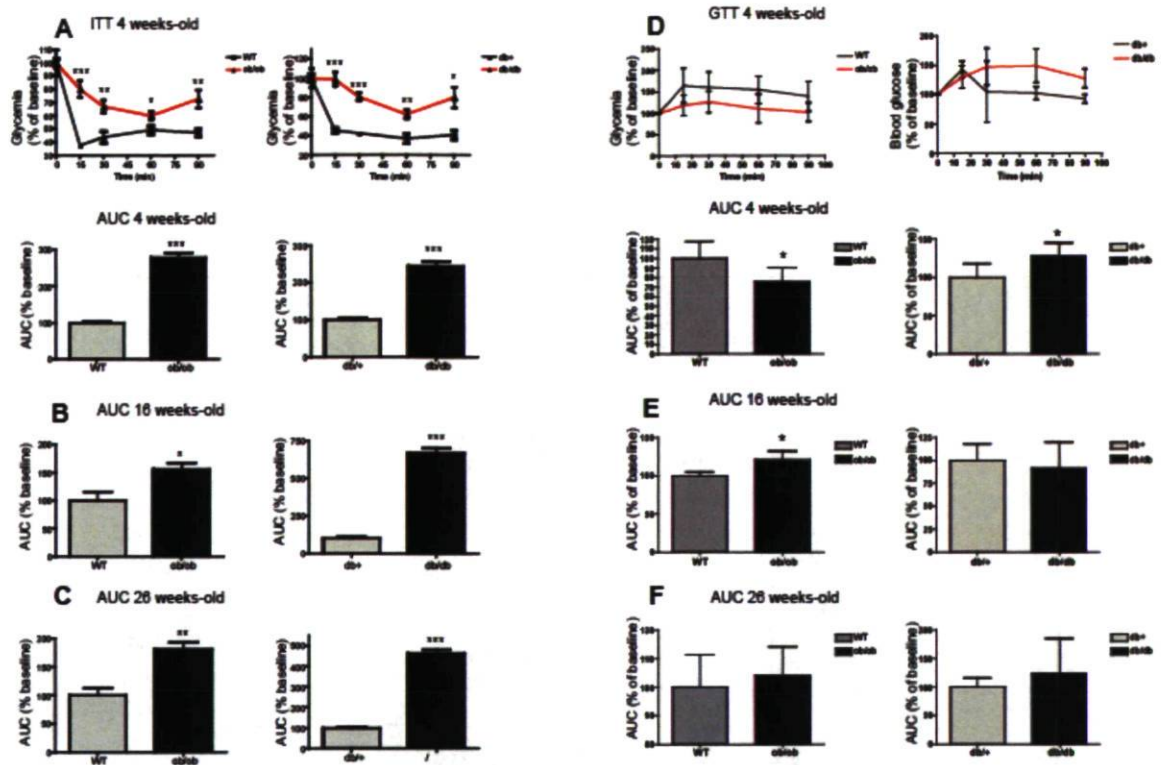


Figure 9 : Insulin Tolerance Test (ITT) and Glucose Tolerance Test (GTT).

Insulin Tolerance Test (ITT) and Glucose Tolerance Test (GTT) glucose intolerance and insulin resistance in both *ob/ob* mice and *db/db* mice. (A-C) Blood glucose levels during ITT (up) and AUCs of blood glucose (down) of WT- *ob/ob* mice (left) and *db+* - *db/db* mice (right) at 4 weeks (A), 16 weeks (B) or 26 weeks (C) of age. (D-F) Blood glucose levels during Glucose Tolerance Test (GTT) (up) and AUCs of blood glucose (down) of WT-*ob/ob* mice (left) and *db+* - *db/db* mice (right) at 4 (D), 16 (E) and (F) 26 weeks-old of age. Data are means ($n=5$ for each condition) \pm SD. Asterisks indicate significant differences from controls, with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

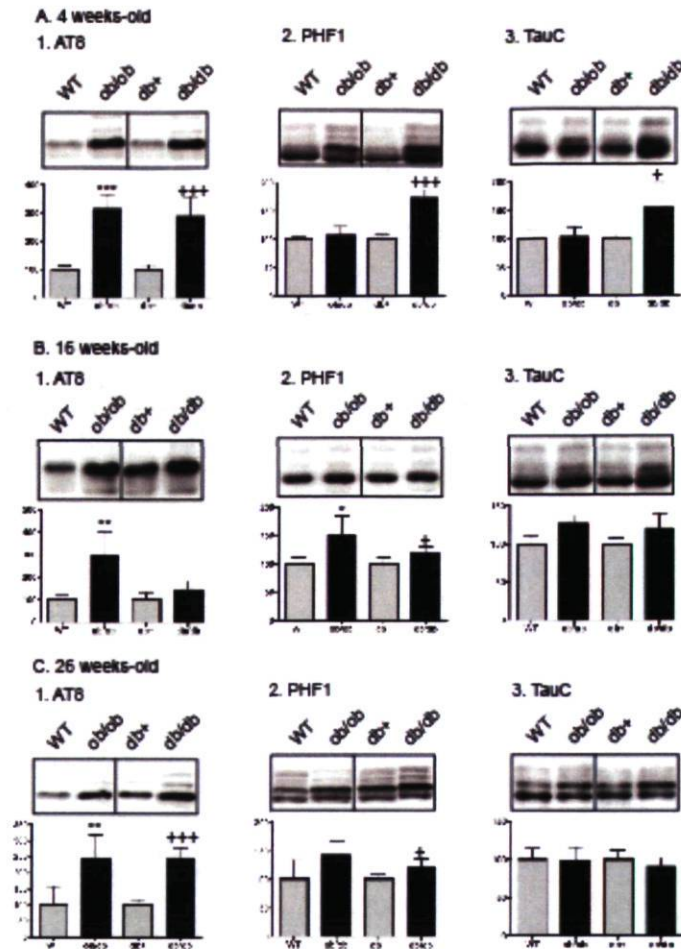


Figure 10 :Western blot analysis of tau protein and phosphorylation in T2DM mouse model.

Western blot analysis of tau protein and phosphorylation in T2DM mouse model. Proteins from 4 weeks-old (A), 16 weeks-old (B) or 26 weeks-old (C) were extracted from mice hippocampi, separated by SDS-PAGE, and identified with the following antibodies: 1. AT8, 2. PHF1 and 3. TauC. Each lane shows an immunoblot extract from one representative mouse of five analyzed. Lanes are identified as follows: lane 1, WT control mice; lane 2, ob/ob, obesity control mice; lane 3, db+ heterozygous control mice, and lane 4, db/db T2DM mice model. Data are means (n=5 for each condition) \pm SD. Asterisks (ob/ob versus WT) or crosses (db/db versus db+) indicate significant differences from controls, with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

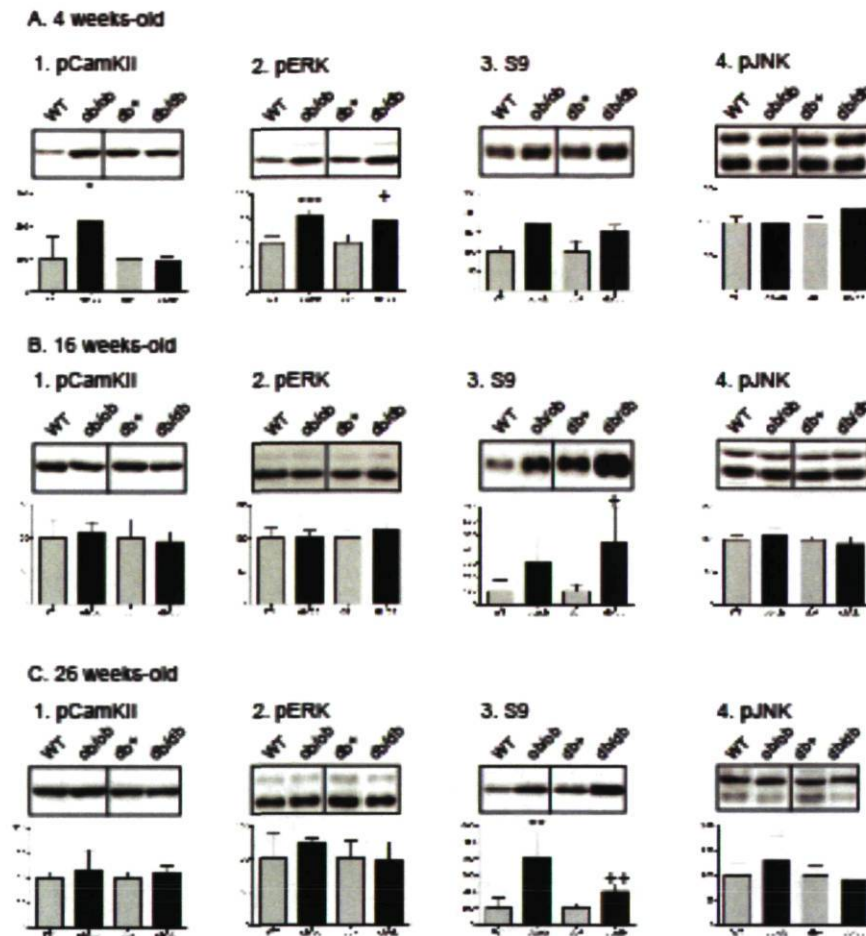


Figure 11 : Western blot analysis of tau-related kinases in T2DM mouse model.

Western blot analysis of tau-related kinases in T2DM mouse model. Proteins from 4 weeks-old (A), 16 weeks-old (B) or 26 weeks-old (C) were extracted from mice hippocampi, separated by SDS-PAGE, and identified with the following antibodies: 1. pCamKII, 2. pERK, 3. S9 and 4. pJNK. Each lane shows an immunoblot extract from one representative mouse of five analyzed. Lanes are identified as follows: lane 1, WT control mice; lane 2, ob/ob obesity control mice; lane 3, db+ heterozygous control mice and lane 4, db/db T2DM mice model. Data are means ($n=5$ for each condition) \pm SD. Asterisks (ob/ob versus WT) or crosses (db/db versus db+) indicate significant differences from controls, with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

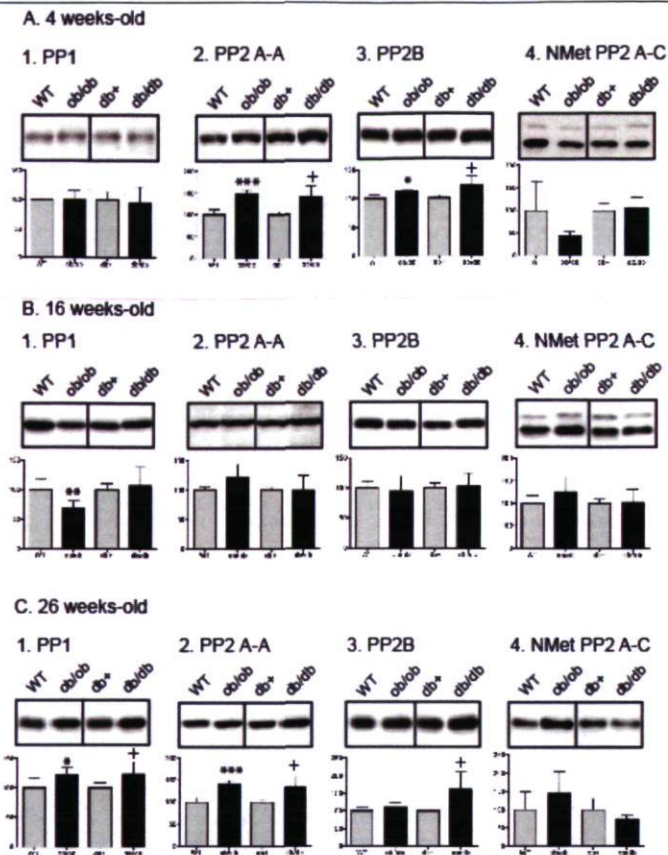


Figure 12 : Western blot analysis of tau-related phosphatases in T2DM mouse model

Western blot analysis of tau-related phosphatases in T2DM mouse model. Proteins from 4 weeks-old (A), 16 weeks-old (B) or 26 weeks-old (C) were extracted from mice hippocampi, separated by SDS-PAGE, and identified with the following antibodies: 1. PP1, 2. PP2A-A, 3. PP2B and 4. Non-methylated PP2A-C (NMet PP2A-C). Each lane shows an immunoblot extract from one representative mouse of five analyzed. Lanes are identified as follows: lane 1, WT control mice; lane 2, ob/ob obesity control mice; lane 3, db+ heterozygous control mice, and lane 4, db/db T2DM mice model. Data are means (n=5 for each condition) \pm SD. Asterisks (ob/ob versus WT) or crosses (db/db versus db+) indicate significant differences from controls, with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Conclusion et perspective

D'un point de vue général, les résultats cumulés de ce mémoire résultant des travaux faits durant ma maîtrise ont permis de montrer que le diabète de type 2 est impliqué dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau dans un modèle murin. Cette hyperphosphorylation est provoquée dans un premier temps par un déséquilibre dans l'activation des principales kinases et phosphatases de tau et dans un deuxième temps par l'hypothermie consécutive du déséquilibre dans les dépenses énergétiques provoquées par le diabète de type 2.

L'impact de l'augmentation de la phosphorylation de tau observée dans ces modèles de souris souffrant du diabète de type 2 reste cependant à être étudié. Compte tenu des rôles présumés de tau, plusieurs aspects se doivent d'être considérés. Compte tenu du rôle important que joue tau dans la régulation de la dynamique des microtubules. Il est possible de penser que l'augmentation de la phosphorylation de tau observé va influencer sa capacité à se lier aux microtubules ce qui pourrait influencer leur capacité à se polymériser et pourrait les rendre plus instables. Cette instabilité causée par l'hyperphosphorylation de tau pourrait être le point de départ de l'effondrement du réseau microtubulaire et de la mort neuronale (Trojanowski and Lee, 1994; Planel et al., 2001). Le transport axonal, qui est vital pour un neurone, pourrait s'en retrouver lui aussi affecté puisque son efficacité est intimement liée à la dynamique du réseau microtubulaire (Feinstein and Wilson, 2005).

Toutefois, ces expérimentations ont été effectuées chez un modèle murin présentant un diabète de type 2 provoqué de façon génétique. C'est principalement là que se situent la force et la faiblesse de cette étude. En effet, le fait d'utiliser un modèle génétique de diabète de type 2 constitue une force puisque la sévérité du diabète augmente avec le vieillissement comme c'est le cas chez les humains, et ce, sans les effets secondaires que pourrait provoquer une drogue. Le fait d'utiliser un modèle de diabète génétique de type 2 constitue aussi une faiblesse. Les modèles murins utilisés dans ce mémoire n'expriment pas, à l'âge

adulte, les mêmes isoformes tau que ceux présents chez l'humain. L'utilisation de souris transgénique exprimant les mêmes isoformes de la protéine tau que l'humain pourrait permettre de mieux étudier l'impact que pourrait avoir le diabète de type 2 sur le développement de la pathologie tau. Afin de mieux se rapprocher de l'influence que pourrait avoir le diabète de type 2 sur la phosphorylation de la protéine tau chez l'humain, il serait intéressant d'utiliser des modèles induits de diabètes de type 2 en utilisant, par exemple, des diètes riches en gras ou en sucre simple chez des modèles murins exprimant les mêmes isoformes de la protéine tau que ceux retrouvés chez l'homme adulte. L'utilisation de tels modèles d'études pourrait permettre de mieux étudier l'impact sur la pathologie tau, qui est absente chez les modèles murins exprimant la protéine tau murine. La proportion des différents isoformes pourraient aussi être modifiée comme cela a été observé chez un modèle de rats diabétique (Mandelkowitz et al., 2003) que comme c'est observé chez les gens atteints de la maladie d'Alzheimer (Connell et al., 2005; Glatz et al., 2006; Espinoza et al., 2008; Jung et al., 2011). En combinant une diète permettant de simuler le diabète de type 2 humain et l'utilisation de souris transgéniques exprimant les isoformes humaines de la protéine tau permettrait de bien évaluer l'impact que pourrait avoir le diabète de type 2 sur l'humain.

Depuis quelques années, certaines études ont montré que notre rythme et nos habitudes de vie à tout âge ont un impact sur notre qualité de vie globale ainsi que l'apparition de diverses maladies ou cancers lors du vieillissement. La maladie d'Alzheimer est une maladie incurable qui touche des millions de personnes à travers le monde et qui a des impacts sociaux économiques importants. Les facteurs qui augmentent la prédisposition de cette maladie, dont la majorité des cas sont sporadiques et d'apparitions tardives, ne sont pas bien connus, mais il semble que les habitudes de vie pourraient avoir un impact important. C'est dans ce contexte que les résultats obtenus lors de ces travaux prennent tout leur sens et leurs importances puisqu'ils mettent en évidence que le diabète de type 2 peut avoir un impact sur la phosphorylation de tau et pourrait augmenter les probabilités d'être atteint de la maladie d'Alzheimer à un âge plus avancé. D'un point de vue général, ces

résultats montrent que les choix que nous faisons aujourd'hui, à propos de notre hygiène de vie, peuvent avoir des conséquences que nous devons assumer dans plusieurs années.

Bibliographie

- Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, 3rd, Kahle KT, Hershenon MB, Le Beau MM, Rosner MR (2002) ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 277:16733-16743.
- Alzheimer's Association (2010) 2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 6:158-194.
- Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23:3585-3593.
- Atzori C, Ghetti B, Piva R, Srinivasan AN, Zolo P, Delisle MB, Mirra SS, Migheli A (2001) Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 60:1190-1197.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84:361-384.
- Baharians Z, Schonthal AH (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression. *J Biol Chem* 273:19019-19024.
- Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK (2004) PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J* 23:2586-2596.
- Balaraman Y, Limaye AR, Levey AI, Srinivasan S (2006) Glycogen synthase kinase 3beta and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell Mol Life Sci* 63:1226-1235.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:663-672.
- Baum L, Seger R, Woodgett JR, Kawabata S, Maruyama K, Koyama M, Silver J, Saitoh T (1995) Overexpressed tau protein in cultured cells is phosphorylated without formation of PHF: implication of phosphoprotein phosphatase involvement. *Brain Res Mol Brain Res* 34:1-17.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:213-227.
- Bennecib M, Gong C, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett* 485:87-93.
- Bennecib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett* 490:15-22.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-163.

- Biessels GJ, Kappelle LJ (2005) Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochem Soc Trans* 33:1041-1044.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Blain H, Merched A, Visvikis S, O'Kane M, Pillot T, Siest G, Jeandel C (1996) [Alzheimer disease: hypotheses implicating apolipoproteins E]. *Presse Med* 25:763-768.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65:663-675.
- Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP (2005) The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care* 28:726-735.
- Brandt R, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.
- Brazil DP, Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26:657-664.
- Brion JP, Smith C, Couck AM, Gallo JM, Anderton BH (1993) Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 61:2071-2080.
- Briscoe VN, Davis SN (2006) Hypoglycemia in Type 1 and Type 2 Diabetes: Physiology, Pathophysiology, and Management. *clinical diabetes* 24:115-121.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3:186-191.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.
- Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115:717-730.
- Cai T, Che H, Yao T, Chen Y, Huang C, Zhang W, Du K, Zhang J, Cao Y, Chen J, Luo W (2010) Manganese induces tau hyperphosphorylation through the activation of ERK MAPK pathway in PC12 cells. *Toxicol Sci* 119:169-177.
- Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8:187-198.
- Castano L, Eisenbarth GS (1990) Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 8:647-679.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon* 56:484-546.
- Ceulemans H, Bollen M (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84:1-39.
- Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996) Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84:491-495.

- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360:674-677.
- Cherel Y, Burnol AF, Leturque A, Le Maho Y (1988) In vivo glucose utilization in rat tissues during the three phases of starvation. *Metabolism* 37:1033-1039.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207-225.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116:227-247.
- Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GV, Jope RS (2006) Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. *Diabetes* 55:3320-3325.
- Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58:453-508.
- Cohen PT (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115:241-256.
- Coleman DL (1978) Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14:141-148.
- Connell JW, Rodriguez-Martin T, Gibb GM, Kahn NM, Grierson AJ, Hanger DP, Revesz T, Lantos PL, Anderton BH, Gallo JM (2005) Quantitative analysis of tau isoform transcripts in sporadic tauopathies. *Brain Res Mol Brain Res* 137:104-109.
- Cottrell EC, Mercer JG, Ozanne SE (2010) Postnatal development of hypothalamic leptin receptors. *Vitam Horm* 82:201-217.
- Craft S, Watson GS (2004) Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol* 3:169-178.
- Cross DC, Munoz JP, Hernandez P, Maccioni RB (2000) Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem* 78:305-317.
- Cryer PE (2001) Hypoglycemia risk reduction in type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2:S412-423.
- Cryer PE (2004) Diverse causes of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. *N Engl J Med* 350:2272-2279.
- Cryer PE, Davis SN, Shamoan H (2003) Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 26:1902-1912.
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105:721-732.
- de la Monte SM, Wands JR (2005) Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: Relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 7:45-61.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390.
- DeFronzo RA (2004) Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88:787-835, ix.

- Deng Y, Li B, Liu Y, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX (2009) Dysregulation of insulin signaling, glucose transporters, O-GlcNAcylation, and phosphorylation of tau and neurofilaments in the brain: Implication for Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 175:2089-2098.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025-1037.
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499-3511.
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 270:7679-7688.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710-713.
- Duvillie B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier JM, Monthieux E, Jami J, Joshi RL, Bucchini D (1997) Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5137-5140.
- Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777-794.
- Eichhorn PJ, Creighton MP, Bernards R (2009) Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1795:1-15.
- Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107:519-527.
- Espinoza M, de Silva R, Dickson DW, Davies P (2008) Differential incorporation of tau isoforms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14:1-16.
- Feinstein SC, Wilson L (2005) Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta* 1739:268-279.
- Ferrer I, Gomez-Isla T, Puig B, Freixes M, Ribe E, Dalfo E, Avila J (2005) Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2:3-18.
- Festa A, Williams K, D'Agostino R, Jr., Wagenknecht LE, Haffner SM (2006) The natural course of beta-cell function in nondiabetic and diabetic individuals: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 55:1114-1120.
- Freude S, Plum L, Schnitker J, Leeser U, Udelhoven M, Krone W, Bruning JC, Schubert M (2005) Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes* 54:3343-3348.

- Frolich L, Blum-Degen D, Riederer P, Hoyer S (1999) A disturbance in the neuronal insulin receptor signal transduction in sporadic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 893:290-293.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Garrido GE, Furuie SS, Buchpiguel CA, Bottino CM, Almeida OP, Cid CG, Camargo CH, Castro CC, Glabus MF, Busatto GF (2002) Relation between medial temporal atrophy and functional brain activity during memory processing in Alzheimer's disease: a combined MRI and SPECT study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73:508-516.
- Gasparini L, Netzer WJ, Greengard P, Xu H (2002) Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci* 23:288-293.
- Glatz DC, Rujescu D, Tang Y, Berendt FJ, Hartmann AM, Faltraco F, Rosenberg C, Hulette C, Jellinger K, Hampel H, Riederer P, Moller HJ, Andreadis A, Henkel K, Stamm S (2006) The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96:635-644.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* 9:4225-4230.
- Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 189:167-169.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 8:393-399.
- Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1993) Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61:921-927.
- Gong CX, Grundke-Iqbal I, Damuni Z, Iqbal K (1994) Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase-1 and -2C and its implication in Alzheimer disease. *FEBS Lett* 341:94-98.
- Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2005) Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 112:813-838.
- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 65:732-738.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275:5535-5544.

- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293:1491-1495.
- Greenberg SG, Davies P (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5827-5831.
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 beta in cellular signaling. *Progress in Neurobiology* 65:391-426.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4913-4917.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, Davis RJ (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* 15:2760-2770.
- Gupta VB, Laws SM, Villemagne VL, Ames D, Bush AI, Ellis KA, Lui JK, Masters C, Rowe CC, Szoeki C, Taddei K, Martins RN (2011) Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk: The AIBL study of aging. *Neurology* 76:1091-1098.
- Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33:9511-9522.
- Guyant-Marechal L, Rovelet-Lecrux A, Goumidi L, Cousin E, Hannequin D, Raux G, Penet C, Ricard S, Mace S, Amouyel P, Deleuze JF, Frebourg T, Brice A, Lambert JC, Campion D (2007) Variations in the APP gene promoter region and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 68:684-687.
- Hamann A, Matthaei S (1996) Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104:293-300.
- Harman D (2002) Alzheimer's disease: role of aging in pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 959:384-395; discussion 463-385.
- Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272:827-829.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9:1381-1388.
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107:1449-1459.
- Hong M, Lee VM (1997) Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem* 272:19547-19553.
- Hoshi M, Sato M, Kondo S, Takashima A, Noguchi K, Takahashi M, Ishiguro K, Imahori K (1995) Different localization of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta from glycogen synthase kinase-3 alpha in cerebellum mitochondria. *J Biochem* 118:683-685.
- Hoyer S (1998) Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose/energy metabolism. *J Neural Transm Suppl* 54:187-194.
- Hua Q, He RQ (2003) Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta* 1645:205-211.
- Huang Y (2006) Molecular and cellular mechanisms of apolipoprotein E4 neurotoxicity and potential therapeutic strategies. *Curr Opin Drug Discov Devel* 9:627-641.
- Huang Y (2010) Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 16:287-294.

- Hukshorn CJ, Saris WH (2004) Leptin and energy expenditure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:629-633.
- Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL (1966) Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153:1127-1128.
- Hur EM, Zhou FQ (2010) GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11:539-551.
- Illenberger S, Zheng-Fischhofer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* 9:1495-1512.
- Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD (1950) Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41:317-318.
- Ingelsson M, Ramasamy K, Cantuti-Castelvetri I, Skoglund L, Matsui T, Orne J, Kowa H, Raju S, Vanderburg CR, Augustinack JC, de Silva R, Lees AJ, Lannfelt L, Growdon JH, Frosch MP, Standaert DG, Irizarry MC, Hyman BT (2006) No alteration in tau exon 10 alternative splicing in tangle-bearing neurons of the Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 112:439-449.
- Ishiguro K, Sato K, Takamatsu M, Park J, Uchida T, Imahori K (1995) Analysis of phosphorylation of tau with antibodies specific for phosphorylation sites. *Neurosci Lett* 202:81-84.
- Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Sato K, Arioka M, Uchida T, Imahori K (1992) Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett* 148:202-206.
- Janssens V, Goris J (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353:417-439.
- Jolivald CG, Lee CA, Beiswenger KK, Smith JL, Orlov M, Torrance MA, Masliah E (2008) Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res* 86:3265-3274.
- Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, Calon F (2008) High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging*.
- Jung HJ, Park SS, Mok JO, Lee TK, Park CS, Park SA (2011) Increased expression of three-repeat isoforms of tau contribute to tau pathology in a rat model of chronic type 2 diabetes. *Exp Neurol*.
- Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N (2011) Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the nucleus accumbens in tauopathy model mice. *Neurobiol Dis*.
- Kennedy GC (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140:578-596.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature* 197:192-193.
- Kilgour RD, Williams PA (1996) Effects of diabetes and food deprivation on shivering activity during progressive hypothermia in the rat. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 114:159-165.

- Kilgour RD, Williams PA (1998) Diabetes affects blood pressure and heart rate responses during acute hypothermia. *Acta Physiol Scand* 162:27-32.
- Kim B, Backus C, Oh S, Hayes JM, Feldman EL (2009) Increased tau phosphorylation and cleavage in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinology* 150:5294-5301.
- Kim J, Choi IY, Michaelis ML, Lee P (2011) Quantitative in vivo measurement of early axonal transport deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.
- Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ (1997) The endocrinology of aging. *Science* 278:419-424.
- Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ (1997) Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol* 145:301-308.
- Leroy K, Brion JP (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat* 16:279-293.
- Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP (2007) Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:43-55.
- Lesort M, Jope RS, Johnson GV (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* 72:576-584.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293:1487-1491.
- Li L, Holscher C (2007) Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev* 56:384-402.
- Li ZG, Zhang W, Sima AA (2007) Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes* 56:1817-1824.
- Lindstrom P (2007) The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal* 7:666-685.
- Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259:5301-5305.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22:1942-1950.
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8422-8426.
- Lovestone S, Reynolds CH (1997) The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 78:309-324.
- Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S, et al. (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 4:1077-1086.

- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161.
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E (2003) Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiology of aging* 24:1079-1085.
- McCrimmon RJ, Sherwin RS (2010) Hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes* 59:2333-2339.
- McGowan E, Eriksen J, Hutton M (2006) A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* 22:281-289.
- Mielke K, Herdegen T (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61:45-60.
- Milionis HJ, Florentin M, Giannopoulos S (2008) Metabolic syndrome and Alzheimer's disease: a link to a vascular hypothesis? *CNS Spectr* 13:606-613.
- Moroz N, Tong M, Longato L, Xu H, de la Monte SM (2008) Limited Alzheimer-type neurodegeneration in experimental obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Alzheimers Dis* 15:29-44.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387:271-280.
- Newsholme EA (1976) Carbohydrate metabolism in vivo: regulation of the blood glucose level. *Clin Endocrinol Metab* 5:543-578.
- Okazawa H, Estus S (2002) The JNK/c-Jun cascade and Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 17:79-88.
- Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM (1999a) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53:1937-1942.
- Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM (1999b) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study [see comments]. *Neurology* 53:1937-1942.
- Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD (2005) Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 65:2076-2081.
- Papasozomenos SC, Binder LI (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton* 8:210-226.
- Pearson LL, Castle BE, Kehry MR (2001) CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13:273-283.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58:1010-1019.
- Pei JJ, Gong CX, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2003) Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of

- mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 163:845-858.
- Perez M, Ribe E, Rubio A, Lim F, Moran MA, Ramos PG, Ferrer I, Isla MT, Avila J (2005) Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience* 130:339-347.
- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E (2004) Modulation of insulin action. *Diabetologia* 47:170-184.
- Planel E, Sun X, Takashima A (2002) Role of GSK-3 beta in Alzheimer's disease pathology. *Drug Development Research* 56:491-510.
- Planel E, Yasutake K, Fujita SC, Ishiguro K (2001) Inhibition of protein phosphatase 2A overrides Tau protein kinase I / glycogen synthase kinase 3beta and Cyclin-dependant kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J Biol Chem* 276:34298-34306.
- Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2401-2411.
- Planel E, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Liu L, Wang L, Herman M, Yu WH, Luchsinger JA, Wadzinski B, Duff KE, Takashima A (2007a) Insulin dysfunction induces in vivo tau hyperphosphorylation through distinct mechanisms. *J Neurosci* 27:13635-13648.
- Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau LF, Duff KE (2007b) Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27:3090-3097.
- Planel E, Krishnamurthy P, Miyasaka T, Liu L, Herman M, Kumar A, Bretteville A, Figueroa HY, Yu WH, Whittington RA, Davies P, Takashima A, Nixon RA, Duff KE (2008) Anesthesia-induced hyperphosphorylation detaches 3-repeat tau from microtubules without affecting their stability in vivo. *J Neurosci* 28:12798-12807.
- Plyte SE, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer BJ, Woodgett JR (1992) Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta* 1114:147-162.
- Pollak D, Cairns N, Lubec G (2003) Cytoskeleton derangement in brain of patients with Down syndrome, Alzheimer's disease and Pick's disease. *J Neural Transm Suppl*:149-158.
- Qian W, Yin X, Hu W, Shi J, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX, Liu F (2011) Activation of Protein Phosphatase 2B and Hyperphosphorylation of Tau in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*.
- Qu MH, Li H, Tian R, Nie CL, Liu Y, Han BS, He RQ (2004) Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* 15:2723-2727.
- Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Anderton BH (2000) Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 74:1587-1595.

- Ribe EM, Perez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sanchez B, Nieto M, Gomez-Ramos P, Moran MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Perez A, Ferrer I, Avila J, Gomez-Isla T (2005) Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 20:814-822.
- Richard F, Amouyel P (2001) Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 412:1-12.
- Ronnemaa E, Zethelius B, Sundelof J, Sundstrom J, Degerman-Gunnarsson M, Berne C, Lannfelt L, Kilander L (2008) Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology* 71:1065-1071.
- Rusnak F, Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521.
- Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19:2435-2444.
- Schechter R, Beju D, Miller KE (2005) The effect of insulin deficiency on tau and neurofilament in the insulin knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 334:979-986.
- Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF (2003) Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci* 23:7084-7092.
- Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldikis N, Kustermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Bruning JC (2004) Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3100-3105.
- Schulinkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB (2000) Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 24:855-872.
- Schwartz MW, Porte D, Jr. (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307:375-379.
- Sergeant N, Delacourte A, Buee L (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:179-197.
- Shalaby TH, Yousef MK, Dupre RK (1989) Thermoregulatory responses of diabetic rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 94:153-157.
- Shi Y (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139:468-484.
- Shpakov AO, Pertseva MN (2000) Structural and functional characterization of insulin receptor substrate proteins and the molecular mechanisms of their interaction with insulin superfamily tyrosine kinase receptors and effector proteins. *Membr Cell Biol* 13:455-484.
- Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Barrio JR, Phelps ME (2000) Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6037-6042.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155:2153-2165.

- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-1063.
- Stolk RP, Breteler MM, Ott A, Pols HA, Lamberts SW, Grobbee DE, Hofman A (1997) Insulin and cognitive function in an elderly population. The Rotterdam Study. *Diabetes Care* 20:792-795.
- Strachan MW, Frier BM, Deary IJ (1997) Cognitive assessment in diabetes: the need for consensus. *Diabet Med* 14:421-422.
- Strittmatter WJ, Huang DY, Bhasin R, Roses AD, Goldgaber D (1993) Avid binding of beta A amyloid peptide to its own precursor. *Exp Neurol* 122:327-334.
- Sultan A, Nessler F, Violet M, Begard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buee L, Galas MC (2011) Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 286:4566-4575.
- Sun W, Qureshi HY, Cafferty PW, Sobue K, Agarwal-Mawal A, Neufeld KD, Paudel HK (2002) Glycogen synthase kinase-3beta is complexed with Tau protein in brain microtubules. *J Biol Chem* 277:11933-11940.
- Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG, Jr., Miralpeix M, White MF (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13:7418-7428.
- Sutherland C, Cohen P (1994) The alpha-isoform of glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle is inactivated by p70 S6 kinase or MAP kinase-activated protein kinase-1 in vitro. *FEBS Lett* 338:37-42.
- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 296 (Pt 1):15-19.
- Takahashi M, Tomizawa K, Kato R, Sato K, Uchida T, Fujita SC, Imahori K (1994) Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. *J Neurochem* 63:245-255.
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 203:33-36.
- Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, Ishiguro K, Yamaguchi H (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 31:317-323.
- Terry RD (1996) The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55:1023-1025.
- Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P, Cohen P (1999) A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett* 458:247-251.
- Thurston VC, Pena P, Pestell R, Binder LI (1997) Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil Cytoskeleton* 38:100-110.
- Tian Q, Wang J (2002) Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11:262-269.

- Torres-Aleman I (2000) Serum growth factors and neuroprotective surveillance: focus on IGF-1. *Mol Neurobiol* 21:153-160.
- Tremblay ML, Giguere V (2008) Phosphatases at the heart of FoxO metabolic control. *Cell Metab* 7:101-103.
- Trojanowski JQ, Lee VM (1994) Paired helical filament tau in Alzheimer's disease. The kinase connection. *Am J Pathol* 144:449-453.
- Unger JW, Livingston JN, Moss AM (1991) Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol* 36:343-362.
- Virshup DM, Shenolikar S (2009) From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol Cell* 33:537-545.
- Wang QM, Fiol CJ, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1994) Glycogen synthase kinase-3 beta is a dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 269:14566-14574.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862.
- Wolfe MS, De Los Angeles J, Miller DD, Xia W, Selkoe DJ (1999) Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38:11223-11230.
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9:2431-2438.
- Xu WL, Qiu CX, Wahlin A, Winblad B, Fratiglioni L (2004) Diabetes mellitus and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study. *Neurology* 63:1181-1186.
- Youngren JF (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64:873-891.
- Yuan Z, Agarwal-Mawal A, Paudel HK (2004) 14-3-3 binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser⁹-phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta in the brain. *J Biol Chem* 279:26105-26114.
- Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Ishihara T, Forman MS, Martinez D, Joyce S, Trojanowski JQ, Lee VM (2004) Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci* 24:4657-4667.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhao YM, Pei JJ, Ji ZJ, Zhao ZW, Qian YY, Sheng SL (2003) Effect of amyloid precursor protein 17mer peptide on microtubule structure and tau protein hyperphosphorylation in hippocampal neurons of experimental diabetic mice. *Neuroreport* 14:61-66.
- Zhu X, Raina AK, Rottkamp CA, Aliev G, Perry G, Boux H, Smith MA (2001) Activation and redistribution of c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 76:435-441.