

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE LA N-CADHÉRINE ET DE LA  $\beta$ 1-INTÉGRINE  
DANS LE PHÉNOMÈNE DE NEUROAGRÉGATION INDUIT PAR LA  
CÉRULOPLASMINE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR

LYVIA FOURCADE

DÉCEMBRE 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à ma directrice de recherche, Dre Joanne Paquin, pour sa patience et son écoute, sa très grande disponibilité et ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion tout au long de cette maîtrise. Un très grand merci Mme Paquin de m'avoir fait confiance et soutenue durant cette période, qui n'a pas été toujours facile.

Je tiens aussi à remercier le professeur Mircea-Alexandru Mateescu pour l'accès à son laboratoire pour la synthèse d'aminoéthyl-agarose. Je remercie également le professeur Steve Bourgault et Mme Josée Crevier pour l'aide des analyses de tamassage moléculaire par FPLC et HPLC, respectivement. Merci au professeur Richard Desrosiers pour l'accès à sa salle de culture quand notre hotte à flux laminaire a fait défaut, et à Denis Filipo pour l'aide apportée lors des études préliminaires en cytométrie de flux. Un grand merci à tous les techniciens et techniciennes pour leur disponibilité et leurs conseils.

Je voudrais remercier également ma collègue de laboratoire Clara Lafortune, qui a été d'une très grande aide et d'un grand soutien pour moi, surtout dans les moments difficiles.

Un très grand merci à ma maman, ma sœur, ma grand-mère, mon oncle Jean-Claude et mon beau-père Jean-Pierre qui m'ont toujours encouragée dans tous mes choix et qui m'ont apporté un énorme soutien moral.

Pour terminer, je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) du Canada pour le subventionnement du projet.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Contexte de la recherche.....	1
1.2 Modèle cellulaire P19 .....	2
1.2.1 Généralités .....	2
1.2.2 Avantages du modèle P19.....	3
1.2.3 Différenciation et maturation des cellules souches P19 en neurones .....	4
1.3 La Céruloplasmine (CP) .....	6
1.3.1 Caractéristiques et structure.....	6
1.3.2 Biosynthèse et expression.....	9
1.3.3 Principaux rôles .....	12
a) Activités catalytiques.....	12
b) Régulateur du métabolisme du fer .....	13
c) Propriétés antioxydantes .....	14
d) Transporteur de cuivre .....	15
e) Actions du métabolisme d'amines biogènes, l'inflammation et la coagulation .....	16
f) Un possible nouveau rôle dans le développement du système nerveux .....	17

1.3.4	Mécanismes des actions de la CP sur les neurones P19 .....	21
1.4	Les molécules d'adhérence cellulaire .....	24
1.4.1	Les cadhérines .....	24
	a) Classification et structures des cadhérines .....	25
	b) Les cadhérines classiques .....	26
	c) La régulation de l'expression de la cadhérine classique .....	30
	d) Expression et rôle des cadhérines dans le SNC et importance de la N-cadhérine .....	32
1.4.2	Les intégrines .....	35
	a) Structures et caractéristiques de liaison .....	35
	b) Association des intégrines avec leurs ligands .....	37
	c) Signalisation et régulation des intégrines .....	39
	d) Rôles des intégrines dans le SNC et importance de la $\beta$ 1-intégrine... ..	42
1.5	Hypothèses de recherche .....	45
<b>CHAPITRE II</b>		
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>		
2.1	Préparation de la CP .....	48
2.1.1	Synthèse d'une résine d'aminoéthyl-agarose .....	48
2.1.2	Purification de la CP .....	49
2.1.3	Déplétion en cuivre de la CP .....	52
2.2	Préparation de petits composés à cuivre .....	53
2.3	Culture cellulaire .....	53
2.3.1	Culture des cellules P19 indifférenciées .....	53
2.3.2	Différenciation neuronale des cellules P19 .....	54
2.3.3	Traitement des neurones P19 .....	55
2.4	Évaluation de l'agrégation neuronale .....	56
2.5	Préparation des échantillons de milieux de culture et d'extraits cellulaires .....	56
2.5.1	Collecte des milieux de culture neuronaux .....	56
2.5.2	Préparation des lysats cellulaires .....	57

2.6	Dosage des protéines .....	57
2.7	Électrophorèse et immunobuvardage .....	58
2.7.1	Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)...	58
2.7.2	Coloration au bleu de Coomassie.....	58
2.7.3	Électrotransfert.....	59
2.7.4	Immunobuvardage .....	59
2.8	Mesure de viabilité cellulaire avec le MTT .....	60
2.9	Statistiques.....	60
CHAPITRE III		
RÉSULTATS .....		
3.1	Synthèse d'AE-agarose et caractérisation de préparations de CP .....	61
3.2	Effet de la CP sur l'expression de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine dans les cultures de neurones P19 .....	69
3.2.1	La CP, la combinaison SBTI/Apro et le rivaroxaban n'influencent pas les niveaux totaux de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine à 48h .....	69
3.2.2	La CP n'affecte pas l'évolution temporelle des niveaux totaux de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine.....	71
3.2.3	Analyses des niveaux de surface pour la N-cadhérine et la $\beta$ 1-intégrine .....	74
	a) La CP n'affecte pas la distribution de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine dans les fractions cellulaires solubles et insolubles dans le triton X-100 .....	74
	b) Essais de marquage de la N-cadhérine de surface cellulaire .....	77
	c) Étude du déstaging de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine dans les milieux de cultures .....	78
	d) Étude des niveaux d'expression de FAK et p-FAK .....	82
	e) Y15 n'est ni pro-neuroagréatif, ni anti-neuroagréatif .....	85
3.3	Étude sur l'importance du cuivre dans l'agrégation des neurones P19. ....	88

3.3.1	Évaluation de l'effet de différents composés à cuivre sur la morphologie et la viabilité de cultures de neurones P19.....	88
3.3.2	La CP déplétée en cuivre et l'agrégation des neurones P19.....	91
CHAPITRE IV		
	DISCUSSION .....	93
4.1	Purification de la CP.....	93
4.2	Molécules d'adhérence N-cadhérine et $\beta$ 1-intégrine.....	96
4.3	Influence du cuivre .....	98
4.4	Conclusion.....	99
	ANNEXES.....	101
	ANNEXE 1. Marquage de protéines avec le système biotine-Neutravidine.....	101
1.1	Biotinylation et analyse des protéines de surface.....	101
1.1.1	Marquage des neurones et analyse de la N-cadhérine biotinylée après enrichissement avec des billes de Neutravidine-agarose.....	101
1.1.2	Analyses de la N-cadhérine biotinylée après enrichissement par immunoprécipitation.....	102
1.2	Biotinylation d'affinité de protéases à sérine (étude exploratoire)..	103
	ANNEXE 2. Test de viabilité neuronale .....	105
2.1	Les composés à cuivre interfèrent dans le dosage de la LDH.....	105
2.2	Courbe de signal du MTT.....	106
	ANNEXE 3. Coloration de la résine AE-agarose à la ninhydrine.....	108
	ANNEXE 4. Analyses des préparations de CP 1a, 1b et 2 par tamassage en CLHP.....	110
	RÉFÉRENCES.....	112

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Le modèle cellulaire P19.....	3
1.2 Micrographies de cellules P19.....	5
1.3 Représentation tridimensionnelle de la CP.....	7
1.4 Relations spatiale et linéaire des domaines de la CP .....	8
1.5 Comparaison des séquences C-term de la CP sécrétée et la CP-GPI .....	11
1.6 Agrégation des neurones P19 induite par la CP à J6 de la différenciation.....	18
1.7 Structure de la reeline et effet de la CP sur le profil protéolytique de la reeline.....	20
1.8 Relation entre la neuroagrégation et la génération du fragment de 300 kDa de la reeline.....	22
1.9 Superfamille des cadhérines liant le calcium .....	26
1.10 Modèle simplifié du complexe cadhérine-caténine .....	29
1.11 Structure générale d'une sous-unité d'intégrine .....	36
1.12 Interactions des protéines impliquées dans la signalisation des intégrines.....	40
3.1 Profils électrophorétiques de trois préparations de CP.....	65
3.2 La neuroagrégation n'est pas induite par le facteur X présent dans la préparation CP et est inhibée par le rivaroxaban.....	68
3.3 La CP, la combinaison de SBTI/Apro et le rivaroxaban n'influencent pas les niveaux totaux de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine à 48h .....	70
3.4 La CP n'affecte pas l'évolution temporelle des niveaux totaux de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine.....	72
3.5 La neuroagrégation est déclenchée en ajoutant la CP entre 0h et 24h.....	73

3.6	La CP n'affecte pas la distribution de la N-cadhérine et la $\beta$ 1-intégrine dans les fractions cellulaires solubles et insolubles dans le Triton X-100....	76
3.7	Étude du délestage extracellulaire de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine par immunobuvardage.....	81
3.8	Effet de la CP et de l'AMPC sur la signalisation de FAK et p-FAK.....	83
3.9	Y15 n'est ni pro-neuroagréatif, ni anti-neuroagréatif .....	87
3.10	Évaluation de l'effet de différents composés à cuivre sur la morphologie et la viabilité de cultures de neurones P19.....	90
3.11	La CP déplétée en cuivre induit la neuroagréation .....	92

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Les intégrines et leurs ligands .....	38
2.1 Anticorps primaires utilisés en immunobuvardage .....	51
2.2 Anticorps secondaires utilisés en immunobuvardage.....	52
3.1 Performance de résines d'AE-agarose .....	63
3.2 Bilan de la préparation de CP 2 sur AE-agarose de forte capacité de rétention .....	67

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide aminé
ADAMs	Protéinase avec motifs désintégrine/ métalloprotéinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AKT	Sérine/thréonine kinase originalement identifiée dans le rétrovirus
	AKT8
AMPA	Acide 2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthyl-isoxazol-4-yl) NMDA propanoïque
AMPC	Adénosine-3',5'-monophosphate cyclique ( <i>cAMP</i> : <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
ApoCP	Apocéruloplasmine
Apro	Aprotinine ( <i>aprotinin</i> )
ARN	Acide ribonucléique
AR	Acide rétinoïque
Arf	<i>ADP-ribosylation factor</i>
ARP2/3	<i>Actin-Related Proteins complex 2/3</i>
ATP7A	Protéine transporteuse de cuivre 7A appartenant à la famille des ATPases
ATP7B	Protéine transporteuse de cuivre 7B appartenant à la famille des ATPases
ATPase	Adénosine triphosphatase
BCA	<i>BiCinchoninic acid Assay</i>
BCS	Bathocuproïne sulfonate
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca <sup>2+</sup>	Ions calcium
CKII	Caséine kinase II
CP	Céruloplasmine
Cu <sup>+</sup>	Ion cuivreux
Cu <sup>2+</sup>	Ion cuivrique
Dab-1	Protéine adaptatrice Disabled-1
cAMP	Adénosine Monophosphate cyclique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC	Domaine extracellulaire de la N-cadhérine
MEC	Matrice extracellulaire
EGF	Facteur de croissance épidermal ( <i>epidermal growth factor</i> )
EPAC	Protéine d'échange directement activée par l'AMPC ( <i>exchange protein directly activated by cAMP</i> )
ERK	Kinases régulées par des signaux extracellulaires ( <i>extracellular signal-regulated kinases</i> )

ERO	Espèces réactives oxygénées
FAK	Kinase d'adhésion focale ( <i>Focal Adhesion Kinase</i> )
p-FAK	Kinase d'adhésion focale phosphorylée
FBS	Sérum foetal bovin ( <i>fetal bovine serum</i> )
FGFR	Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
Fpn	Ferroportine
Fe <sup>2+</sup> , Fe (II)	Ion ferreux
Fe <sup>3+</sup> , Fe (III)	Ion ferrique
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GATA-4	Facteur de transcription-4 reconnaissant le motif GATA
GAP-43	Protéine associée à la croissance-43 ( <i>growth associated protein-43</i> )
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Grb7	<i>Growth-factor-receptor-bound protein 7</i>
GSK3	Glycogène synthase kinase 3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
His <sub>2</sub> Cu	Histidine <sub>2</sub> -cuivre
HNK-1	<i>Human natural killer-1</i>
HoloCP	Holo-céruleoplasmine
HSF1	Facteur-1 de stimulation hépatique
IL-1	Interleukine-1
LDH	Lactate déshydrogénase
LTP	Potentialisation à long terme
MAP-2	<i>Mitogen-activated protein 2</i>
Mg <sup>2+</sup>	Ions magnésium
MMPs	Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
NeuN	Antigène du noyau neuronal
NB-ITA	Neurobasal supplémenté d'insuline, transferrine et BSA
NBS	Neurobasal supplémenté de B27
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superoxyde
OH <sup>•</sup>	Radical hydroxyle
pPD	para-phénylènediamine
PLC-γ	Phospholipase C-gamma
PTP	Phosphatases de tyrosines protéiniques
PS1	Préséniline-1
P120	Protéine 120
SBTI	Inhibiteur de trypsine de la fève de soja ( <i>Soybean Trypsin Inhibitor</i> )
Ser <sub>2</sub> Cu	Sérine <sub>2</sub> -cuivre
SIP1	Protéine-1 interagissant avec Smad ( <i>Smad interaction protein 1</i> )
SOD	Superoxyde dismutase
SNC	Système nerveux central
TCF	Facteur des cellules T
Tf	Transferrine

TNF  
Zn<sup>2+</sup>

Facteur de nécrose tumoral (*tumor necrosis factor*)  
Ions zinc

## RÉSUMÉ

La formation de neurones fonctionnels au cours du développement passe par la prolifération cellulaire, la différenciation en neurones, la migration des neurones jusqu'à leur positionnement final et la synaptogénèse. Un dysfonctionnement dans ces étapes serait à l'origine de maladies neurodéveloppementales. La céruloplasmine (CP), une protéine à cuivre régulatrice du métabolisme du fer, est exprimée à la surface des astrocytes dans le cerveau. Elle pourrait avoir un rôle dans l'organisation tissulaire du système nerveux. En effet, nos études antérieures réalisées avec des neurones dérivés de cellules souches P19 ont montré que la CP peut induire leur agrégation et influencer le profil d'expression de la reeline, une protéine essentielle à la bonne organisation des neurones. Ainsi, afin de poursuivre l'identification des mécanismes des actions neuronales de la CP, nous avons pensé que son action neuroagrégative pouvait (1) être associée à des changements dans l'expression de la N-cadhérine et la  $\beta 1$ -intégrine, deux molécules d'adhérence cellulaire grandement impliquées dans le développement neuronal, et (2) dépendre du cuivre présent dans sa structure. Des lysats totaux de neurones P19 traités ou non avec la CP ont été analysés par immunobuvardage. Dans les neurones non traités, les niveaux de la N-cadhérine et de la  $\beta 1$ -intégrine augmentent au cours du temps durant la culture, mais ceux de la N-cadhérine le font plus tardivement. La proportion soluble de la N-cadhérine est légèrement moins importante que sa fraction insoluble, ce qui diffère de la  $\beta 1$ -intégrine dont la portion soluble prédomine sur la fraction insoluble. Le traitement avec la CP n'a pas eu d'impact sur les niveaux totaux des deux protéines et sur leurs niveaux de solubilité dans le Triton X-100. La CP n'a eu, de plus, que peu ou pas d'impact sur la phosphorylation de FAK, une kinase activée par les intégrines. Enfin, la CP aurait tendance à stimuler le délestage d'un petit fragment extracellulaire de la N-cadhérine mais à un très faible niveau. Nous n'avons pas remarqué de délestage pour la  $\beta 1$ -intégrine. Les atomes de cuivre de la CP sont associés à des résidus d'histidine. Nous avons traité les cultures de neurones P19 avec le composé d'histidine2cuivre ( $\text{His}_2\text{Cu}$ ) en comparaison avec le composé de serine2cuivre ( $\text{Ser}_2\text{Cu}$ ) et des sels de cuivre. La  $\text{Ser}_2\text{Cu}$  mais non l' $\text{His}_2\text{Cu}$  induit une neuroagrégation. Contrairement, aux sels de cuivre, ces deux composés ne sont pas toxiques pour les neurones aux concentrations neuroagrégatives de  $\text{Ser}_2\text{Cu}$ . D'autre part, la CP réduite en cuivre induit l'agrégation des neurones P19. En conclusion, l'action neuroagrégative de la CP ne semble donc pas être associée à des changements d'expression de la N-cadhérine et de la  $\beta 1$ -intégrine. L'action neuroagrégative de la  $\text{Ser}_2\text{Cu}$  laisse penser que le cuivre biocomplexé jouerait un rôle dans l'action

neuroagrégative de la CP et que la réduction en cuivre de la CP pourrait avoir été incomplète.

**Mots clés :** Cellules souches embryonnaires et neurones P19, céruloplasmine, neuroagrégation, molécules d'adhérence cellulaire, N-cadhérine,  $\beta$ 1-intégrine, composés à cuivre,  $\text{His}_2\text{Cu}$ ,  $\text{Ser}_2\text{Cu}$ .

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Contexte de la recherche

La lignée cellulaire P19 est un modèle de cellules souches de type embryonnaire qui permet d'étudier certains aspects du développement embryonnaire *in vitro*, notamment la différenciation cellulaire et la maturation fonctionnelle de cellules nouvellement différenciées. Dans cette étude, c'est la différenciation en neurones qui a été exploitée.

La céruloplasmine (CP) est une protéine à cuivre multifonctionnelle. Elle est sécrétée par le foie dans la circulation sanguine mais elle est aussi retrouvée au niveau des astrocytes dans le cerveau. Son rôle le mieux établi est celui de régulateur du métabolisme du fer. Cependant, le traitement de neurones P19 avec de la CP induit l'agrégation de ces cellules et modifie le profil protéique de la reeline, une protéine indispensable au bon positionnement des neurones dans le cerveau en développement (section 1.3.3(f)). Ces deux actions neuronales de la CP soulèvent la possibilité que la protéine pourrait avoir un rôle dans le développement du cerveau. Les mécanismes de ces deux actions sont peu connus mais certaines considérations nous ont amenés à nous intéresser à des protéines d'adhérence cellulaire, spécifiquement la N-cadhérine et l'intégrine  $\beta 1$ . Nous avons examiné aussi l'effet de petits complexes de cuivre formés sur le modèle de deux molécules d'acide aminé (AA) pour un atome de cuivre ( $\text{His}_2\text{Cu}$ ,  $\text{Ser}_2\text{Cu}$ ).

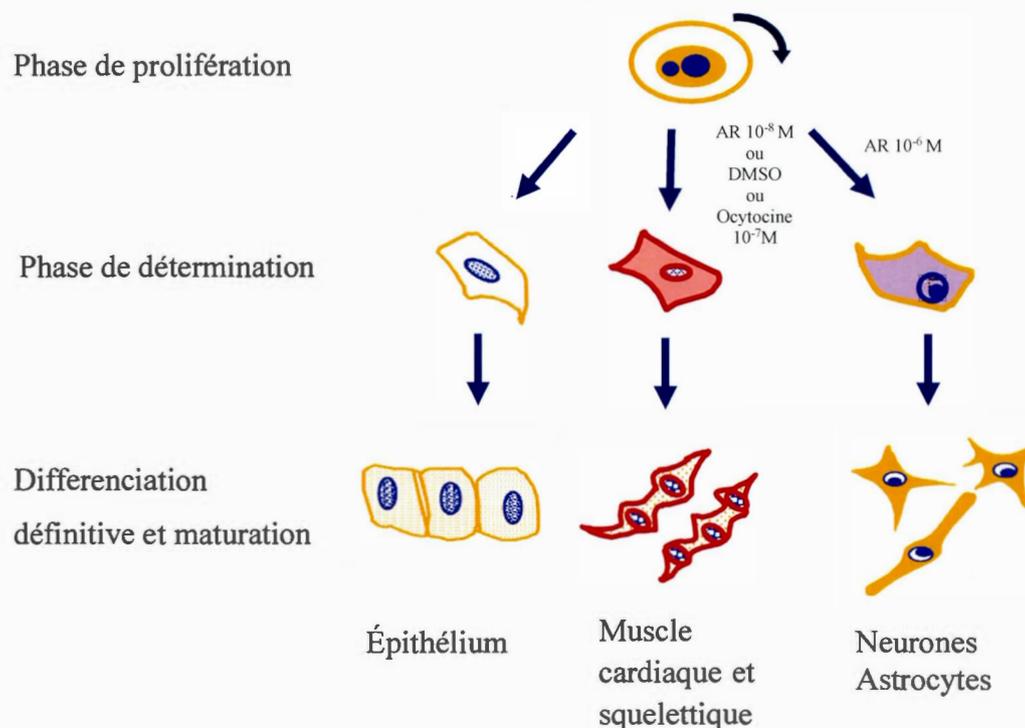
Compte tenu de ces différents aspects, nous présentons, dans l'introduction, un bref aperçu du modèle cellulaire P19, les propriétés et activités générales de la CP ainsi

que ses actions sur les neurones P19, une application thérapeutique de l'histidine de cuivre ( $\text{His}_2\text{Cu}$ ), et différentes informations sur les cadhérines et les intégrines. Cette mise en contexte est suivie des hypothèses et objectifs du projet de recherche.

## 1.2 Modèle cellulaire P19

### 1.2.1 Généralités

Les cellules P19 sont des cellules de carcinome embryonnaire qui ressemblent beaucoup aux cellules souches embryonnaires primaires. Elles ont été isolées d'un tératocarcinome, formé à la suite de l'implantation de cellules d'un embryon de 7,5 jours de souris dans un testicule de souris adulte (McBurney, 1993). Les cellules P19 sont non-différenciées, prolifèrent rapidement et indéfiniment, et ont un caryotype euploïde mâle normal qui leur confère une stabilité génétique. De plus, elles sont multipotentes et donc peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires aussi bien *in vivo* que *in vitro* (McBurney, 1993 ; Rudnicki et McBurney, 1987) en présence de différents inducteurs (Fig.1.1). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acide rétinoïque (AR) sont connus comme deux inducteurs de la différenciation cellulaire (Molski et Konarski, 2006). Le DMSO, un solvant non physiologique permet l'activation de plusieurs facteurs de transcription cardiogéniques tels que GATA-4 et Nkx-2.5, et conduit à la différenciation des cellules souches en cellules cardiaques (McBurney, 1993 ; Rudnicki et McBurney, 1987). C'est aussi le cas de l'hormone peptidique ocytocine (Paquin *et al.*, 2002). En revanche, en présence de concentrations élevées d'AR ( $10^{-6}\text{M}$ ) administrées précocement, les cellules P19 se différencient en neurones (Cadet et Paquin, 2000 ; Chiu *et al.*, 1995 ; McBurney, 1993 ; Rudnicki et McBurney, 1987). Les mêmes concentrations d'AR administrées tardivement génèrent des cellules musculaires (Bouchard et Paquin, 2009).



**Figure 1.1 Le modèle cellulaire P19.** Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 sont indifférenciées, prolifératives et pluripotentes. Elles peuvent se différencier en dérivés cellulaires des trois feuilletts germinatifs *in vivo* et *in vitro* (AR, acide rétinoïque; DMSO, diméthylsulfoxyde). (Figure inspirée de Rudnicki et McBurney, 1987).

### 1.2.2 Avantages du modèle P19

Le modèle P19 est très utile pour étudier la différenciation cellulaire *in vitro*. Dans notre cas, il permet l'étude de la différenciation neuronale ainsi que la maturation des nouveaux neurones en neurones fonctionnels. Les cellules P19 se comportent comme des cellules souches embryonnaires normales mais sont plus faciles à cultiver. En effet, elles ne nécessitent pas une co-culture avec des cellules nourricières. Elles sont plus facilement manipulées génétiquement et biochimiquement, et se différencient

peu de façon spontanée. De plus, elles permettent d'obtenir rapidement des neurones immatures et de suivre l'acquisition de caractéristiques moléculaires, morphologiques et physiologiques spécifiques aux neurones normaux du système nerveux (MacPherson et McBurney, 1995). Les cellules embryonnaires sont considérées comme un matériel de greffe en médecine régénérative. Même si les cellules P19 ne peuvent pas être transplantées chez l'homme, elles peuvent donner des informations sur les conditions et les mécanismes de différenciation potentiellement transposables à des cellules embryonnaires humaines.

### **1.2.3 Différenciation et maturation des cellules souches P19 en neurones**

La différenciation neuronale s'effectue en cultivant les cellules P19 durant 4 jours, du jour 0 (J0) au jour 4 (J4) en suspension dans des pétris bactériologiques, en présence d'AR  $0,5\mu\text{M}$ . On a ainsi des corps sphéroïdes flottants souvent appelés corps embryoïdes (Fig. 1.2). Ces corps embryoïdes sont dissociés en cellules individuelles qui sont mises en culture adhérente dans des pétris de grade tissulaire et cultivées en absence d'AR. Les neurones avec leurs prolongements neuritiques sont visibles au bout de deux jours (J6 de la différenciation). Si la culture est poursuivie au-delà de J8-J10, des fibroblastes et des astrocytes apparaissent. L'AR induit la différenciation neuronale en se liant à des récepteurs nucléaires et en activant la transcription de gènes cibles (McBurney, 1993). Les neurones nouvellement obtenus présentent plusieurs phénotypes caractéristiques de ceux que l'on retrouve dans les populations neuronales normales du système nerveux central (SNC), en particulier les neurones du néocortex, de l'hippocampe et du striatum (Cadet et Paquin, 2000 ; MacPherson et McBurney, 1995). Les neurones P19 synthétisent une grande variété de neuropeptides après la dépolarisation de leurs membranes comme la somatostatine (Cadet et Paquin, 2000) et le neuropeptide Y ainsi que des neurotransmetteurs tels que l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), l'acétylcholine (Parnas et Linial, 1997) et le glutamate (Jeannotte *et al.*, 1997

; MacPherson et McBurney, 1995 ; Sharma et Notter, 1988). De plus, ils expriment les enzymes nécessaires à la synthèse, la bioactivation et la dégradation de ces messagers neuronaux.



**Figure 1.2 Micrographies de cellules P19.** **A** Cellules non-différenciées. **B** Cellules regroupés en sphéroïdes flottants en présence d'AR à J4 de la différenciation. **C** Neurones P19 bien étalés, à J6 de la différenciation.

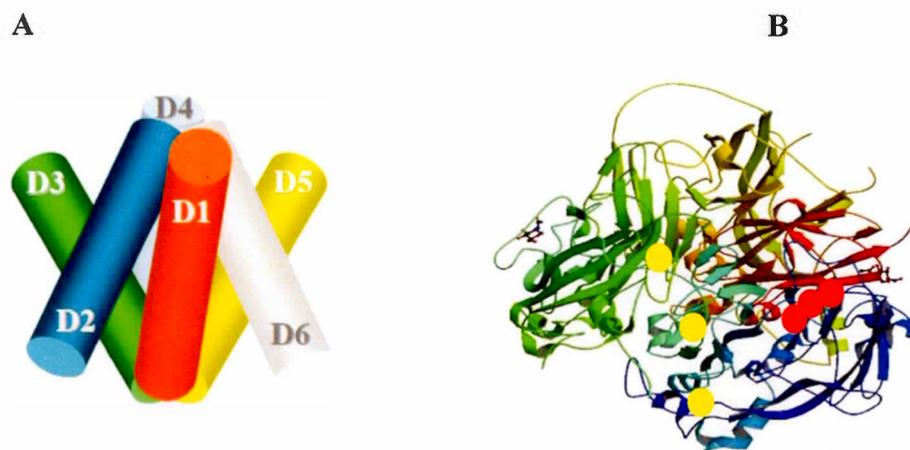
Par ailleurs, ils expriment des marqueurs neuronaux tels que l'énolase, la  $\beta$ III-tubuline, les neurofilaments, la protéine associée aux microtubules-2 (MAP-2), les protéines associée à la croissance (GAP-43), une protéine nucléaire spécifique des neurones (NeuN), le glucide HNK-1 (Human Natural Killer-1), ainsi que plusieurs autres antigènes spécifiques (Jeannotte *et al.*, 1997 ; Laplante *et al.*, 2004 ; McBurney, 1993 ; Poirier *et al.*, 2006).

### 1.3 La Céruloplasmine (CP)

C'est à la fin des années 1940 que Holmberg et Laurell ont décrit et caractérisé la CP. Plus tard, elle a été trouvée dans le plasma de nombreuses espèces de vertébrés (Vassiliev *et al.*, 2005). Cette protéine fait partie de la famille des métalloprotéines à cuivre, laquelle se divise en deux groupes : le groupe des protéines à cuivre bleu, qui comprend la CP mais également l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et l'azurine, et le groupe des protéines à cuivre non bleu avec l'amine-oxydase sérique et les diamines oxydases (Patel *et al.*, 2000).

#### 1.3.1 Caractéristiques et structure

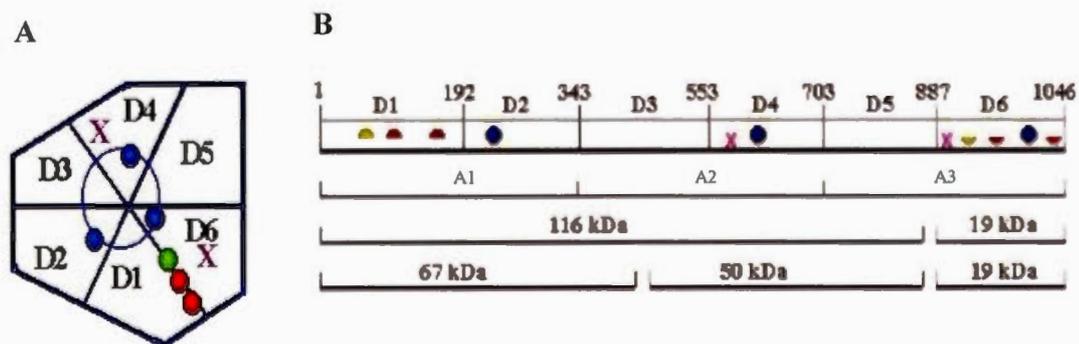
La CP est une glycoprotéine de type  $\alpha_2$ -globuline, de poids moléculaire d'environ 132 kDa, qui est présente dans le plasma (Qian et Ke, 2001 ; Vassiliev *et al.*, 2005). Le gène codant pour la CP est situé sur le chromosome 3q23-q24 et contient 20 exons avec une longueur totale d'environ 65kb (Vassiliev *et al.*, 2005). Chez l'Homme, cette protéine est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 1046 AA (Qian et Ke, 2001) et possède 7-8% de carbohydrates (Zaitsev *et al.*, 1999). Chaque molécule de CP se compose de six domaines, allant de D1 à D6, chacun comportant environ 175 AA (Fig. 1.3 et 1.4) (Vassiliev *et al.*, 2005). Ces domaines sont arrangés en deux triades, pairs et impairs, qui forment deux pyramides triangulaires similaires emboîtées et inversées l'une par rapport à l'autre (Fig. 1.3A) (Vachette *et al.*, 2002 ; Vassiliev *et al.*, 2005). La présence de cinq ponts disulfures à la base des domaines D1 à D5, confère à la protéine sa structure tridimensionnelle (Fig. 1.3B) (Patel *et al.*, 2000).



**Figure 1.3 Représentation tridimensionnelle de la CP.** **A)** Les six domaines de la CP sont représentés par six couleurs différentes, rouge (D1), bleu (D2), vert (D3), bleu pâle (D4), jaune (D5) et vert pâle (D6). Les six domaines de la CP sont arrangés en deux triades, l'une composée des domaines pairs D2, D4, D6 et l'autre des domaines impairs D1, D3, D5. (Zaitseva *et al.*, 1996). **B)** La localisation des six atomes de cuivre permanents est représentée par des cercles, les cercles jaunes correspondant aux ions de cuivre de type 1 et les cercles rouges correspondant aux ions de cuivre de type 2 et 3.

En plus de ces six domaines, la CP contient six atomes de cuivre "permanents" ainsi que deux sites de liaison occupés partiellement à environ 50%, par des atomes de cuivre labiles (Lindley *et al.*, 1997 ; Zaitseva *et al.*, 1996). La présence des ions cuivriques permanents au sein de la structure de la CP est importante puisque, en leur absence, la protéine n'a pas d'activité enzymatique. On parle alors de la forme apoCP, qui est une forme plutôt instable et rapidement dégradée (Gitlin, 1998). Les six atomes de cuivre permanents sont situés dans les domaines pairs (2, 4 et 6) de la protéine ainsi qu'à l'interface des domaines 1 et 6 (Fig. 1.4). Ces atomes de cuivre sont sous forme  $\text{Cu}^{2+}$  et ils sont organisés selon trois types de coordination. Les trois atomes localisés dans les domaines pairs sont de type I et ils sont responsables de la couleur bleue de la

protéine ainsi que de son absorbance à 610 nm (Machonkin *et al.*, 1998). Ils sont coordonnés à deux résidus d’histidine, un résidu de cystéine et un résidu de méthionine (Vachette *et al.*, 2002). Les trois autres atomes forment le noyau trinuécléaire catalytique de la CP, à la jonction des domaines 1 et 6 (Fig. 1.4). Ce noyau est constitué d’un atome de cuivre de type II et deux atomes de type III (Vassiliev *et al.*, 2005). Le cuivre de type II, aussi nommé cuivre « blanc », est associé à deux résidus d’histidine ainsi qu’à un résidu d’AA à caractère polaire. Les deux autres atomes de cuivre de type III sont reliés chacun à trois résidus d’histidine et à un atome électronégatif tel que l’azote ou l’oxygène. Ils sont diamagnétiques et montrent une absorbance maximale à 330 nm (Zaitseva *et al.*, 1996). La CP peut également lier des atomes de cuivre labiles au niveau des domaines 4 et 6 qui ne participeraient pas à l’activité catalytique (Lindley *et al.*, 1997). Quand les domaines D1 et D6 de la CP se rejoignent, les sites de liaison des atomes de cuivre II et III sont complétés.



**Figure 1.4 Relations spatiale et linéaire des domaines de la CP.** A) Les six domaines de la protéine D1 à D6 sont montrés ainsi que la localisation des atomes de cuivre : ●, type I; ●, type 2; ●, type III; X, sites pouvant accueillir les atomes de cuivre labiles. Le noyau trinuécléaire catalytique de la CP est situé à la jonction des domaines 1 et 6. B) Représentation linéaire des six domaines de la CP et leur regroupement en plus grands domaines A1, A2, A3. Les principaux fragments de la CP générés par activité protéolytique *in vivo* sont aussi montrés. Figure inspirée de Takahashi *et al.*, 1984 et Zaitseva *et al.*, 1996.

Une perte des ions de cuivre de type III entraîne la perte irréversible de l'activité catalytique et de la conformation tridimensionnelle. Néanmoins, une perte des ions de type I n'entraînera pas d'effets structuraux importants dans la CP (Vachette *et al.*, 2002).

La CP présente des homologies avec la superoxyde dismutase (SOD) bovine (Richardson *et al.*, 1975), la cytochrome oxydase (Barrell *et al.*, 1979), l'ascorbate oxydase (Zaitseva *et al.*, 1996) et la laccase (Germann et Lerch, 1986). De plus, la CP possède dans sa structure des sites sensibles à l'action protéolytique (Fig. 1.4B) (Takahashi *et al.*, 1984). Dès lors, la protéine plasmatique purifiée peut être obtenue sous forme entière avec un poids moléculaire d'environ 132 kDa et sous forme de deux fragments, respectivement de 110-116 kDa et 16-20 kDa, possiblement dûs à une métalloprotéase présente dans le plasma (Fox *et al.*, 1995). Le groupe de M.A. Mateescu (1994) a décrit une méthode de purification de la CP par chromatographie sur aminoéthyl (AE)-agarose. Cela a permis d'obtenir une protéine présentant un grand degré de pureté, peu ou pas contaminée par des fragments, et très homogène lorsqu'analysée électrophorétiquement. La protéine ainsi purifiée présente un rapport  $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  d'une valeur égale ou supérieure à 0.04, l'absorbance à 610 nm étant due au centre cuivrique bleu et l'absorbance à 280 nm au contenu protéique. Cette valeur correspond à un critère reconnu pour juger de la pureté ainsi que de l'intégrité conformationnelle de la CP (Lovstad, 1981).

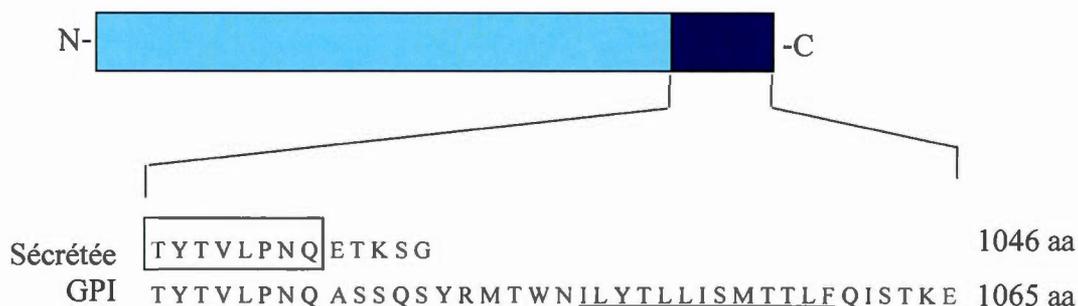
### 1.3.2 Biosynthèse et expression

La CP est majoritairement synthétisée dans le foie, par les hépatocytes, d'abord sous la forme apoCP au niveau du réticulum endoplasmique. Par la suite, elle est chargée en ions cuivriques (holoCP) dans l'appareil de Golgi, pour finalement être libérée dans la circulation sanguine, où elle est responsable du transport de 70 à 95 %

du cuivre plasmatique (Floris *et al.*, 2000). Un défaut d'incorporation des atomes de cuivre dans la CP résulte en la sécrétion d'une forme dépourvue d'activité catalytique (oxydasique et feroxydasique) et rapidement dégradée dans le plasma (Healy et Tipton, 2007).

En plus d'être synthétisée majoritairement par les hépatocytes, elle est aussi retrouvée dans les reins (Linder *et al.*, 1998), mais également dans les poumons où une augmentation de l'ARNm a été observée à la suite d'une hyperoxie (Fleming *et al.*, 1991). De même, en 1986, la présence de la CP a été détectée dans les lymphocytes T, les macrophages et les monocytes humains par hybridation *in situ* (Yang, F. *et al.*, 1986). Plus tard, l'équipe de Kunapuli *et al.*, (1987) note la présence de grandes quantités de CP dans les lignées cellulaires de cancer du côlon et du sein. Les études qui ont suivi ont montré l'expression génique de la CP dans le placenta et les testicules (Aldred *et al.*, 1987), et dans les glandes mammaires (Jaeger *et al.*, 1991).

D'autres études ont montré qu'il existe une forme de CP liée à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) localisée à la surface des cellules leptoméningées dans le cerveau, des cellules gliales de Muller dans la rétine et des cellules de Sertoli dans les testicules (Kono, 2012). Dans le cerveau, la CP-GPI est retrouvée également à la surface des astrocytes, en particulier les astrocytes associés aux vaisseaux sanguins et à celle des cellules de Schwann. La CP capable de se lier à un groupement GPI (Patel et David, 1997 ; Salzer *et al.*, 1998) est produite par l'épissage alternatif des exons 19 et 20 de son gène. Cet épissage alternatif cause la substitution des cinq AA C-terminal de la CP sécrétée par une séquence de 30 AA hydrophobes contenant le site de liaison du groupement GPI (Fig 1.5) (Patel *et al.*, 2000).



**Figure 1.5 Comparaison des séquences C-terminal de la CP sécrétée et la CP-GPI.**

Ici, les deux formes de CP (sécrotée et GPI) proviennent du même gène par épissage alternatif. La différence entre les 2 protéines se tient au niveau des AA C-terminal. La CP sécrétée se termine par les 5 AA ETKSG. Dans le cas de la CP-GPI, la cassette encodant ces 5 AA a été remplacée par une cassette de 30 AA contenant le site d'attachement à l'ancre GPI (souligné). Dans le cerveau, c'est le transcrit de la forme CP-GPI que l'on retrouve de manière prédominante (Patel *et al.*, 2000).

Il est à noter que plusieurs facteurs peuvent influencer la quantité de CP circulante dans l'organisme. Les concentrations de CP augmentent notamment durant la grossesse (Healy et Tipton, 2007), la phase aiguë de la réponse inflammatoire (Trocello *et al.*, 2010), l'infarctus du myocarde, l'hyperthyroïdisme et certains types de cancer (Healy et Tipton, 2007). Certaines hormones, également, agissent sur la biosynthèse et la sécrétion de la CP, comme l'adrénaline qui accroît la quantité d'activité oxydasique ainsi que la concentration d'ions de cuivre dans le sérum (Evans, 1973). L'oestrogène peut aussi augmenter la synthèse de la CP sérique (Ganaraja *et al.*, 2004). De plus, une déficience en fer peut également entraîner une augmentation du taux de CP plasmatique (Mukhopadhyay *et al.*, 1997). Enfin, il a été mis en évidence dans une lignée cellulaire d'hépatome humain que l'interleukine-1 (IL-1), le facteur de nécrose tumoral (TNF) et le facteur-1 de stimulation hépatique (HSF1) induisent chacun la synthèse de CP (Mackiewicz *et al.*, 1987). Cependant, lors d'une

malnutrition ou en cas d'acéruplasminémie (une déficience génétique de la CP fonctionnelle), le niveau de la CP peut être diminué (Trocello *et al.*, 2010).

### 1.3.3 Principaux rôles

La CP est considérée comme une protéine multifonctionnelle. Elle a des activités catalytiques ferroxidasique et oxydasique, possède des propriétés antioxydantes et pourrait transporter le cuivre en circulation. Grâce à son activité ferroxidasique, la CP est un important régulateur du métabolisme du fer. Cette activité participe aussi à son action antioxydante.

#### a) Activités catalytiques

La CP est une oxydase (EC 1.16.3.1) qui catalyse l'oxydation de différents substrats. Elle génère de l'eau, contrairement aux oxydases classiques qui libèrent du peroxyde d'hydrogène, notamment l'amine oxydase sérique et l'histaminase (Patel *et al.*, 2000). Par contre, la laccase et l'ascorbate oxydase végétales produisent aussi de l'eau. *In vitro*, la CP catalyse l'oxydation de produits phénoliques et d'amines aromatiques tels les catécholamines, des aminophénols, des amines biogènes et des diamines aromatiques, dont le p-phénylènediamine (p-PD) (Vassiliev *et al.*, 2005). Notons que la CP possède une forte affinité pour le pPD. Ce substrat est d'ailleurs utilisé pour mesurer l'activité oxydasique de la CP *in vitro*.

La CP est également reconnue en tant que ferroxidase puisqu'elle oxyde les ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) en ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ). La CP a une affinité élevée pour le  $Fe^{2+}$  (Curzon, 1961). Cette activité ferroxidasique fait de la CP un régulateur essentiel du métabolisme du fer et un antioxydant important.

## b) Régulateur du métabolisme du fer

Les cellules ont besoin de quantités suffisantes de fer pour satisfaire les besoins métaboliques ou accomplir des fonctions spécialisées (Wang et Pantopoulos, 2011). Le fer est un facteur important dans différents mécanismes biologiques puisqu'il est essentiel à l'activité de plusieurs classes d'enzymes, incluant les cytochromes, la ribonucléotide-oxydase, des enzymes impliquées dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes et d'acides biliaires, des enzymes responsables de la détoxification de substances étrangères dans le foie, et des enzymes impliquées dans la synthèse de neurotransmetteurs (Gambling *et al.*, 2011). Par contre, des accumulations de fer dans l'organisme sont associées au vieillissement, à certaines maladies neurodégénératives, à l'athérosclérose, au cancer (Mukhopadhyay *et al.*, 1998 ; Texel *et al.*, 2008). Les cellules ont des mécanismes finement régulés qui leur permettent de contrôler les niveaux de fer. Plusieurs protéines, incluant la CP, interviennent dans la mobilisation, le transport ou la séquestration du fer dans l'organisme (de Silva *et al.*, 1996 ; Kaplan et O'Halloran, 1996).

La CP joue un rôle dans l'afflux de fer au niveau des cellules par l'intermédiaire de son activité ferroxidasique. Elle catalyse l'oxydation de l'ion ferreux  $Fe^{2+}$  en ion ferrique  $Fe^{3+}$ , lequel se lie à des transporteurs tels que la transferrine (Tf) pour ensuite être acheminé dans la cellule (Qian et Ke, 2001). La Tf est synthétisée et sécrétée par les cellules hépatiques, les cellules de Sertoli, ainsi que par les oligodendrocytes dans le cerveau (Texel *et al.*, 2008). Associée à son récepteur membranaire, abondant dans le cerveau, la Tf chargée en fer est endocytosée par la cellule, où elle relâche son contenu en fer pour ensuite être recyclée vers la membrane plasmique avec son récepteur. Ainsi, la CP participe à l'assimilation du fer par la voie de la Tf et de son récepteur (Texel *et al.*, 2008). De plus, la CP peut favoriser l'incorporation de fer dans la ferritine (Juan et Aust, 1998), protéine intracellulaire d'environ 500 kDa responsable

de l'entreposage du fer au niveau intracellulaire, sous une forme non toxique pour la cellule (Texel *et al.*, 2008).

La CP est aussi impliquée dans l'efflux de fer hors des cellules. La CP-GPI exprimée à la surface des astrocytes co-localise avec un transporteur d'ions métalliques, la ferroportine (Fpn). Ce dernier permet ainsi le transport du fer, emmagasiné dans la cellule par la ferritine, vers l'extérieur de la cellule (Vassiliev *et al.*, 2005). En plus d'être exprimée par les astrocytes, la Fpn est retrouvée sur les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, les neurones et les oligodendrocytes (Texel *et al.*, 2008). L'expression de la CP est nécessaire pour maintenir la stabilité de l'expression de la Fpn à la surface cellulaire et ainsi assurer son action d'exportateur de fer. Ainsi, en absence de CP, ce transporteur est rapidement internalisé pour être dégradé, soulignant un nouveau mode d'action de la CP dans le métabolisme du fer (De Domenico *et al.*, 2007).

### c) Propriétés antioxydantes

La CP serait le plus important ou parmi les plus importants antioxydants contenus dans le sérum sanguin (Goldstein *et al.*, 1979 ; Stocks *et al.*, 1974). L'activité ferroxidasique serait impliquée dans l'inhibition de la réaction de Fenton par la conversion d'ions ferreux en ions ferriques (Gutteridge, 1985). La CP aurait également la capacité de piéger certaines espèces réactives oxygénées (ERO) telles que les radicaux superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) les radicaux hydroxyles ( $OH^{\cdot}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). En effet, la CP peut piéger les radicaux  $O_2^{\cdot-}$  en catalysant la dismutation du radical (Goldstein *et al.*, 1979). Elle peut également réagir avec le  $H_2O_2$  de manière stoechiométrique ou le transformer en molécule d'eau en présence de glutathion (Broniowska *et al.*, 2006 ; Brown *et al.*, 2002 ; Paradis *et al.*, 2010). Par ailleurs, en plus de provoquer la terminaison de la chaîne radicalaire, l'activité antioxydante de la

CP serait capable de favoriser l'action d'enzymes antioxydantes Cu-dépendantes telles que notamment la SOD (Atanasiu *et al.*, 1998).

Le rôle protecteur de la CP dans divers tissus sous stress oxydatif a été mis en évidence à travers plusieurs études. La CP protège le cœur isolé contre les radicaux libres produits par électrolyse du tampon de perfusion (Chahine *et al.*, 1991 ; Mateescu *et al.*, 1995), prévient les dommages causés par la reperfusion lors de transplantation rénale (Baron *et al.*, 1991), prévient l'endommagement de protéines et de l'ADN et protège les cellules de la lyse souvent induite par les radicaux libres (Fox *et al.*, 1995). Par contre, dans certaines conditions, la CP pourrait aussi stimuler l'oxydation de lipides membranaires, possiblement par le relâchement de ses ions de cuivre lesquels alimenteraient la réaction de Fenton (Fox *et al.*, 1995).

#### **d) Transporteur du cuivre**

Le cuivre est un élément essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques et dans la synthèse de neurotransmetteurs. Son manque ou son excès a des conséquences sur de nombreux organes, en particulier sur le foie et le cerveau (Trocello *et al.*, 2010). Le cuivre est utilisé dans la synthèse d'enzymes, notamment la SOD (Vassiliev *et al.*, 2005), la cytochrome C-oxydase, la lysyl-oxydase, l'héphaestine et la tyrosinase (Frieden, 1986 ; Trocello *et al.*, 2010).

La CP est le principal transporteur de cuivre sérique puisqu'elle contient jusqu'à 95% du cuivre circulant (Trocello *et al.*, 2010 ; Vassiliev *et al.*, 2005). Selon Vassiliev *et al.* (2005), la CP se lie à la cellule, livre le cuivre (probablement le cuivre non permanent), se dissocie de la cellule puis retourne dans le milieu extracellulaire. La CP pourrait donc assurer l'apport en cuivre aux tissus de tout l'organisme. Cependant, le rôle de la CP en tant que livreur du cuivre n'est pas encore bien établi. De plus, il n'a

pas été observé de changement dans le métabolisme du cuivre chez les souris CP<sup>-/-</sup> (Meyer *et al.*, 2001).

Le cuivre est important dans la biosynthèse de la CP. Ainsi, l'absence de cuivre entraîne la synthèse de l'apoCP, une apoprotéine dépourvue d'activité ferroxidasique (Harris *et al.*, 1998). Cette apoprotéine est rapidement dégradée. Un exemple de la synthèse de CP sans cuivre est la maladie de Wilson, causée par une mutation dans le gène codant pour l'ATPase 7B, ce qui réduit considérablement la livraison du cuivre à l'apoCP. Les ions métalliques s'accumulent dans les hépatocytes et y catalysent la production de radicaux hydroxyles par un cycle redox entre Cu<sup>1+</sup> et Cu<sup>2+</sup>. Ces radicaux endommagent plusieurs molécules biologiques incluant l'ADN, les protéines, les lipides encerclant les cellules et, finalement, provoquent une cirrhose. Simultanément le cuivre s'accumule dans les structures cérébrales provoquant ainsi des symptômes de dégénérescence neurologique. Parmi ces derniers, l'hyperkinésie, la dysarthrie et la démence sont les plus visibles (Trocello *et al.*, 2010).

#### **e) Actions dans le métabolisme d'amines biogènes, l'inflammation et la coagulation**

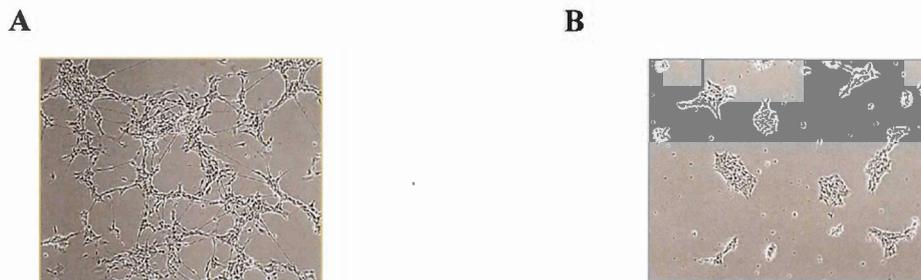
Différentes études ont soulevé d'autres fonctions physiologiques de la CP. Ainsi, grâce à son activité oxydasique, la CP contrôlerait la concentration d'amines biogènes dans le sérum et les tissus telles la sérotonine et les amines de type catécholamine comme la noradrénaline et la dopamine (de Mol, 1985). Comme la CP se retrouve non seulement dans la circulation systémique mais aussi dans le cerveau, riche en amines biogènes, il est possible que la CP influe sur le fonctionnement de certains processus tels que la neurotransmission et le développement neuronal (Vassiliev *et al.*, 2005). D'autre part, la CP est considérée comme une protéine de phase aiguë puisque sa concentration augmente deux à trois fois durant les premiers stades de l'inflammation

ou d'une infection (Cousins, 1985 ; Healy et Tipton, 2007). Ses propriétés antioxydantes et son activité ferroxidasique suggèrent un rôle de protection des tissus lors de la réponse inflammatoire ou infectieuse (Marques *et al.*, 2012). De plus, comme le cuivre possède des propriétés anti-inflammatoires, il est possible que la CP puisse participer à la réponse de phase aiguë en fournissant du cuivre à la région lésée (Berthon, 1993 ; Jackson *et al.*, 2000).

L'implication de la CP dans la coagulation a aussi été investiguée car cette protéine contient des séquences d'homologie avec les facteurs de coagulation V et VIII (Church *et al.*, 1984), chacune de ces protéines ayant les trois domaines A dans leur structure. Sans être eux-mêmes des protéases, les facteurs V et VIII participent à la cascade protéolytique de la coagulation sanguine. Ils sont activés par des protéases de cette cascade et, à leur tour, aident à l'activation de d'autres protéases de cette cascade. La protéine C est une protéase qui inhibe la coagulation sanguine en inactivant les facteurs V et VIII. La CP est capable de se lier à la protéine C et d'inhiber l'inactivation de ces facteurs (Walker et Fay, 1990).

#### **f) Un possible nouveau rôle dans le développement du système nerveux**

En 2003, les laboratoires des Drs Paquin et Mateescu ont montré que la CP peut induire l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules P19 *in vitro*, ce qui pourrait indiquer un rôle dans le développement du système nerveux possiblement en relation avec l'organisation spatiale des neurones (Maltais *et al.*, 2003). En présence de CP, les neurones P19 forment des agrégats *in vitro*, dans un délai de 24 à 48 h, alors que les neurones non traités forment un réseau en monocouche et étendent de longs neurites pour établir des connections entre eux (Fig. 1.6).



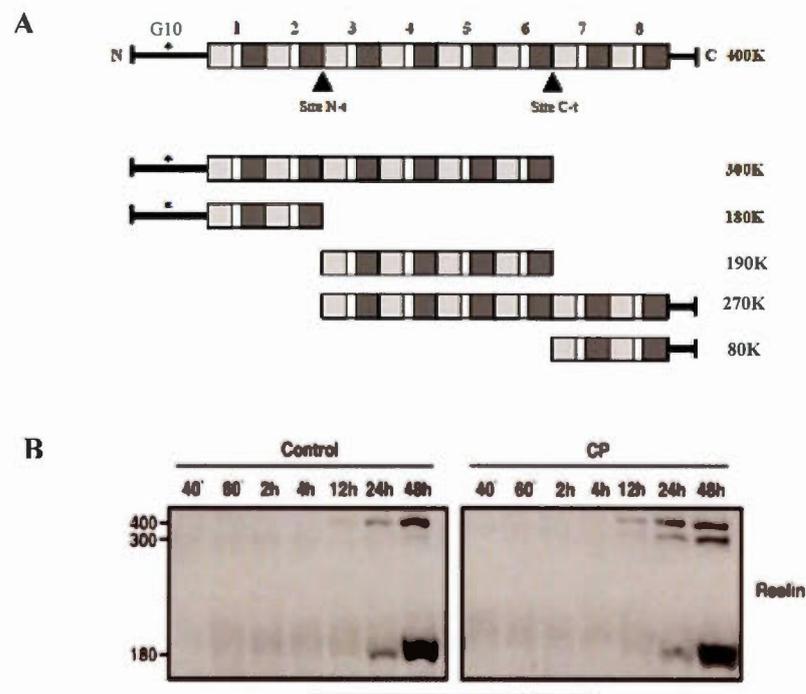
**Figure 1.6 Agrégation des neurones P19 induite par la CP à J6 de la différenciation. A) Neurones P19 en absence de CP. B) Neurones P19 traités avec la CP pendant 48h.**

L'hypothèse d'un rôle développemental a amené à s'intéresser à la reeline. En effet, cette protéine joue un rôle important dans la migration et dans l'organisation neuronales, et elle module la plasticité synaptique chez l'adulte, ce qui est favorable à la mémoire à long terme et à l'apprentissage (Krstic *et al.*, 2012).

La reeline est une grosse protéine extracellulaire dont le poids moléculaire est proche de 400 kDa et est composée d'environ 3500 AA (Lacor *et al.*, 2000). Elle est retrouvée entre autres dans le cortex cérébral de l'embryon et chez l'adulte. Cette glycoprotéine est exprimée et sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius, localisées dans la zone marginale du cortex cérébral en développement (Zhao *et al.*, 2004). Elle est composée d'une séquence N-terminale, suivi d'une région charnière constituée de huit domaines de répétitions de 350 à 390 AA chacun, et se termine par une séquence C-terminale fortement basique (Fig. 1.7.A). Chaque domaine de répétition comprend deux parties A et B, séparées par un motif de facteur de croissance épidermique EGF d'une trentaine d'AA (Folsom et Fatemi, 2013 ; Panteri *et al.*, 2006). *In vivo*, la reeline est clivée par des protéases aux sites N-t et C-t, ce qui permet la formation de cinq fragments distincts. Un épitope N-terminal est reconnu par l'anticorps G10, ce qui permet de détecter la reeline 400K, puis les formes de 300K et 180K qui conservent la

terminaison-N native (Jossin *et al.*, 2003). Peu d'informations sont encore connues sur les protéases qui agissent à ces deux sites. De plus, l'identité des AA reconnus par les protéases aux sites N-t et C-t ainsi que les fonctions biologiques des différents fragments de la reeline ne sont pas connues (Knuesel, 2010 ; Zhao et Frotscher, 2010).

Des études antérieures menées au laboratoire ont montré qu'il existe un lien entre la reeline et la CP dans le modèle P19. Des études d'immunobuvardage faites avec l'anticorps G10, ont montré que la CP stimule la génération de la reeline 300K (Ducharme, 2010) (Fig. 1.7.B). Ces résultats ont été validés *in vivo*. Ainsi, des cerveaux de souris ont été prélevés à différents stades de développement, depuis le jour embryonnaire (E)<sub>10</sub> jusqu'à l'âge adulte et analyses par immunobuvardage avec l'anticorps G10 (Ducharme, 2013). Les résultats obtenus ont montré que la CP apparaît dans le cerveau en développement avant ou en même temps que la reeline sous ses formes 400K, 300K et 180K. Fait intéressant, la forme de 300 kDa est bien moins abondante chez les souris *CP*<sup>-/-</sup> de E<sub>14</sub> à E<sub>17</sub>, une période caractérisée par une migration neuronale très active (Ducharme, 2013). Une observation faite par le groupe de David *et al.* (1997) est en faveur d'un rôle possible de la CP dans la migration neuronale. Ainsi, le traitement de cultures de tranches de cervelet de souris nouveau-nées avec un anticorps anti-CP a inhibé la migration de neurones *in vitro* (Mittal et David, 1994 ; Patel *et al.*, 2000).

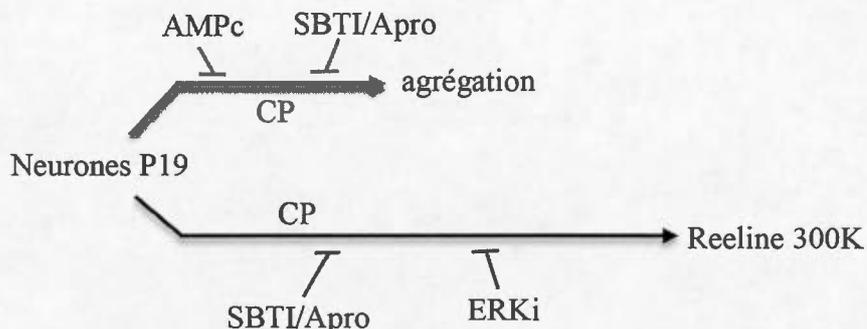


**Figure 1.7 Structure de la reeline et effet de la CP sur le profil protéolytique de la reeline.** **A** La structure de la reeline comporte principalement une région N-terminale, huit domaines répétés et une région C-terminale. Deux sites de clivage nommés sites N-t et C-t sont localisés après les domaines 2 et 6 respectivement. L'anticorps G10 fréquemment utilisé reconnaît un épitope N-terminal (\*). Le clivage protéolytique de la reeline, par des protéases qui ne sont pas encore identifiées à ce jour, permet d'obtenir 5 fragments différents de la reeline. **B** Les neurones P19 de J4 ont été cultivés durant différents temps en absence (contrôle) ou en présence de CP, puis la reeline des milieux de culture a été analysée par immunobuvardage. Notons l'abondance de la reeline 300 kDa dans les cultures traitées avec la CP. Les deux panneaux proviennent d'un même gel (Figure inspirée de Knuesel, 2010 et Ducharme *et al.*, 2010).

#### 1.3.4 Mécanismes des actions de la CP sur les neurones P19

On connaît peu des mécanismes en jeu dans les actions de la CP sur les neurones P19. Cependant, des travaux antérieurs ont permis de commencer à accumuler des informations.

L'action agrégative de la CP sur des neurones P19 *in vitro* est dépendante de la concentration en CP et est saturable au-delà de 3,8  $\mu\text{M}$  (Ducharme, 2013; Maltais *et al.*, 2003). Cette action neuroagrégative de la CP pourrait faire intervenir certaines protéines de liaison à la surface des neurones. En effet, des études de liaison ont montré que la CP marquée à la digoxigénine (CP-DIG) se lie aux neurones et non aux cellules P19 indifférenciées, ce qui laisse penser que l'interaction CP-neurone pourrait être de type ligand-récepteur (Maltais *et al.*, 2003). L'action neuroagrégative de la CP ainsi que son action stimulante sur la génération de la reeline 300 kDa sont toutes les deux inhibées par l'inhibiteur de trypsine de la fève de soja (SBTI) et l'Aprotinine, deux inhibiteurs de protéases à sérine extracellulaires, soulevant la possibilité d'une interrelation entre les deux actions. Cependant, comme l'AMPC inhibe la neuroagrégation mais non la génération de la reeline 300 kDa, alors que les inhibiteurs extracellulaire régulateurs de kinases (ERK) ont l'effet contraire, les deux actions apparaissent indépendantes. À partir de là, un modèle d'action pour la CP sur les neurones P19 et sur la génération de la reeline 300 kDa a été proposé (Ducharme, 2013) (Fig. 1.8).



**Figure 1.8 Relation entre la neuroagrégation et la génération du fragment de 300 kDa de la reeline.** L'AMPc inhibe l'agrégation des neurones P19 mais pas la génération du fragment de 300 kDa de la reeline. Au contraire, des inhibiteurs de la signalisation d'ERK (ERKi) bloquent la génération du fragment 300 kDa de la reeline mais pas l'agrégation. Toutefois, les 2 actions dépendent de protéases à sérine. En effet, les deux phénomènes sont sensibles au SBTI et à l'Aprotinine qui sont 2 inhibiteurs de protéases à sérine extracellulaires. La flèche plus longue pour la production de la reeline 300 kDa indique que ce phénomène est observé plus tard que celui de la neuroagrégation. Figure inspirée de Ducharme, 2013.

D'autre part, le SBTI et l'Aprotinine inhibent l'action neuroagrégative dans une fenêtre de temps étroite (dans les deux premières heures d'addition de la CP) alors que la fenêtre de temps est plus large pour l'inhibition de la formation de la reeline 300 kDa (Salmi, 2015). Le SBTI et l'Aprotinine sont des inhibiteurs à large spectre de protéases cibles.

Comme la CP a des homologues de structure avec les facteurs V et VIII de la coagulation, et que ces facteurs influencent l'activité du facteur X, le rivaroxaban, inhibiteur du facteur X a été testé. Le rivaroxaban inhibe l'agrégation des neurones induite par la CP ainsi que la génération de la reeline 300 kDa. Ces résultats soulèvent la possibilité de la présence du facteur X dans les préparations de CP (Salmi, 2015).

De premiers essais ont été faits pour tenter de déterminer l'importance du cuivre dans l'action de la CP. Différents sels de cuivre ou la CP dénaturée par la chaleur n'ont pas causé de neuroagrégation (Maltais *et al.*, 2003). Cependant, dans le cas de la dénaturation par la chaleur nous ne savons pas si c'est la perte des ions de cuivre ou la perte de la conformation qui est responsable de l'absence de neuroagrégation. L'utilisation d'une CP dépourvue de son cuivre ou encore celle de petits complexes de cuivre pourraient apporter des informations complémentaires. Un exemple de petits complexes de cuivre est le complexe  $\text{His}_2\text{Cu}$  développé par le Dr Bibudhendra Sarkar (The Hospital for Sick Children, Toronto, ON) pour traiter la maladie de Menkes (Sarkar, 1999). Cette maladie est causée par des défauts génétiques du transporteur de cuivre intestinal ATP7A qui provoquent une accumulation de cuivre dans les cellules intestinales et un manque de cuivre dans l'organisme (Trocello *et al.*, 2010). Cette maladie présente plusieurs symptômes dont des problèmes de neurodégénérescence et conduit à une mort précoce de l'enfant. L' $\text{His}_2\text{Cu}$ , administrée par injection sous-cutanée de façon régulière très tôt après la naissance prévient cette neurodégénérescence (donc, ce complexe se rend au cerveau) et la mort précoce (Sarkar *et al.*, 1993). Le complexe  $\text{His}_2\text{Cu}$  généré en solution selon le protocole de Sarkar n'induit ni l'agrégation de neurones P19, ni la génération de reeline 300K (Maltais *et al.*, 2003; Salmi, 2015). Par contre, un complexe  $\text{Ser}_2\text{Cu}$  généré sous forme solide et gracieusement donné par Dr Mircea-Alexandru Mateescu (Université du Québec à Montréal) et ses collaborateurs a induit une neuroagrégation mais est resté sans effet sur la reeline (Salmi, 2015). Il n'est pas clair dans quelle mesure l'AA choisi ou le protocole de formation du complexe a son importance dans l'action sur les neurones.

## 1.4 Les molécules d'adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire est une fonction essentielle afin de permettre la formation de tissus, organes et organismes, et elle est permise grâce à l'activité de molécules d'adhérence au sein des membranes plasmiques, telles que les cadhérines et les intégrines (Retta *et al.*, 2006).

Dans le cadre de notre étude, nous avons pensé que les molécules d'adhérence cellulaire pourraient être impliquées dans le phénomène de neuroagrégation. Par exemple, l'agrégation des neurones pourrait être due à un déséquilibre des interactions cellule-cellule par rapport aux interactions cellule-matrice extracellulaire (MEC). Les cadhérines, des protéines responsables des interactions entre les cellules, et les intégrines, des protéines responsables des interactions entre les cellules et la MEC, nous sont apparues comme des molécules d'adhérence pertinentes à étudier. Ces protéines sont présentées dans les sections suivantes.

### 1.4.1 Les cadhérines

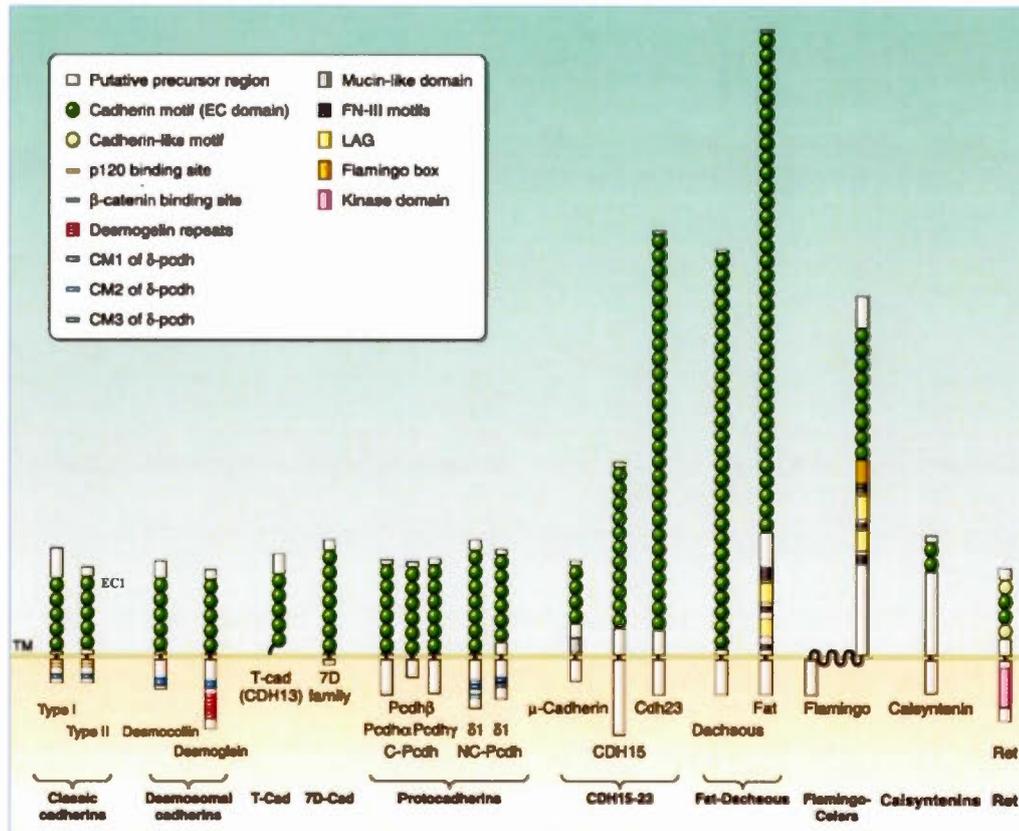
Il y a près d'un quart de siècle, des cadhérines ont été identifiées comme des molécules d'adhérence formant des complexes surtout homophiles mais aussi hétérophiles (Gallin *et al.*, 1983 ; Yoshida et Takeichi, 1982). Depuis lors, les progrès de la biologie moléculaire ont permis la découverte de l'existence d'un grand nombre de cadhérines chez les vertébrés.

### a) Classification et structure des cadhérines

Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires (Hulpiau et van Roy, 2011). Leur domaine extracellulaire leur permet d'établir une liaison avec d'autres cadhérines. Ce sont généralement des liaisons de type homotypique et dépendantes des ions de calcium  $Ca^{2+}$  (Brigidi et Bamji, 2011 ; Halbleib et Nelson, 2006 ; Redies, 2000). Ce domaine est caractérisé par la présence de deux ou plusieurs motifs répétés d'environ 110 AA et est appelé domaine de répétition de la cadhérine extracellulaire (EC). Les études de structure initiales ont montré que le domaine se replie de manière autonome dans une unité de construction comprenant sept brins  $\beta$  formant deux feuillets  $\beta$ , une topologie similaire à celle du domaine de type immunoglobuline (Hulpiau et van Roy, 2009).

Il existe plus de 100 membres de la superfamille des cadhérines et ils sont regroupés en sous-familles selon l'agencement des domaines EC ainsi que de l'agencement des motifs structuraux cytoplasmiques responsables de l'interaction avec des molécules de signalisation (Hirano et Takeichi, 2012 ; Hulpiau et van Roy, 2011 ; Nollet *et al.*, 2000) (Fig. 1.9). Il est probable que la duplication, la transcription et la translocation de gènes ont contribué à la diversité de la superfamille des cadhérines (Hirano et Takeichi, 2012 ; Hulpiau et van Roy, 2009). Chez l'homme, plus de 100 gènes de cadhérine existent et beaucoup d'entre eux sont organisés par les chromosomes 5p14-15, 5q13-15, 5q31-32, 13q14.3-21.1, 16q22.1, 16q24.1 et 18q12.1 (Hirano et Takeichi, 2012).

Les cadhérines classiques et les cadhérines desmosomales fonctionnent comme des molécules d'adhérence cellules-cellules, tandis que beaucoup d'autres cadhérines ont des fonctions plus diverses. L'adhérence cellulaire comme les autres fonctions sont dues à des interactions homophiles et hétérophiles (Hirano et Takeichi, 2012).



**Figure 1.9 Superfamille des cadhérines liant le calcium.** Les structures globales varient parmi les familles sauf que toutes les cadhérines possèdent le motif cadhérine extracellulaire (domaine EC) quoiqu'en nombre variable. Ce sont des protéines transmembranaires simples, à l'exception de Flamingo, qui est une protéine à sept passages transmembranaires. Des cadhérines non classiques ont également des motifs extracellulaires supplémentaires. Les cadhérines se distinguent aussi par les motifs structuraux retrouvés dans leur queue cytoplasmique. D'après Hirano et Takeichi, 2012.

### b) Les cadhérines classiques

Les cadhérines classiques forment le premier sous-type de la superfamille à avoir été identifié. Elles sont exprimées dans presque tous les tissus des vertébrés, principalement impliquées dans des interactions homophiles et souvent concentrées

dans les jonctions adhérentes. Elles modulent l'adhérence cellulaire avec l'assistance de d'autres protéines par des interactions dynamiques avec le cytosquelette d'actine (Halbleib et Nelson, 2006).

### Le domaine extracellulaire

Les cadhérines classiques sont subdivisées en deux groupes de par l'organisation de leurs domaines extracellulaires. Les cadhérines de type I/II ont cinq domaines « EC ». Les cadhérines de type III ne sont pas retrouvées chez les mammifères (Suzuki et Takeichi, 2008), aussi nous nous concentrerons sur les cadhérines I et II.

Les cadhérines de type I et II se distinguent par certaines séquences d'AA (Nollet *et al.*, 2000). Les cadhérines E, N, P, et R (Cdh1, 2, 3 et 4, respectivement) ont une séquence tripeptidique HAV conservée dans leur domaine (EC1). Elles sont le plus souvent impliquées dans des interactions homophiles. En revanche, les cadhérines classiques de type II, telle que la cadhérine retrouvée dans l'épithélium vasculaire (cadhérine VE), n'ont pas ce motif et leurs interactions sont plus compliquées du fait des interactions hétérophiles fréquemment observées (Nakagawa et Takeichi, 1995). Il est à noter tout de même que la force des interactions hétérophiles est plus faible que celle des interactions homophiles (Inuzuka *et al.*, 1991).

Le domaine EC1 est important pour l'adhérence homophile avec une cadhérine du même type. Il contient des résidus de tryptophane conservés qui sont responsables de la *trans*-interaction entre les molécules (Patel *et al.*, 2006). Des interactions hétérophiles entre cadhérines classiques ont également été rapportées notamment pour la N-cadhérine et la R-cadhérine (Niessen et Gumbiner, 2002 ; Shimoyama *et al.*, 2000). Néanmoins, d'autres domaines EC peuvent interagir avec d'autres partenaires

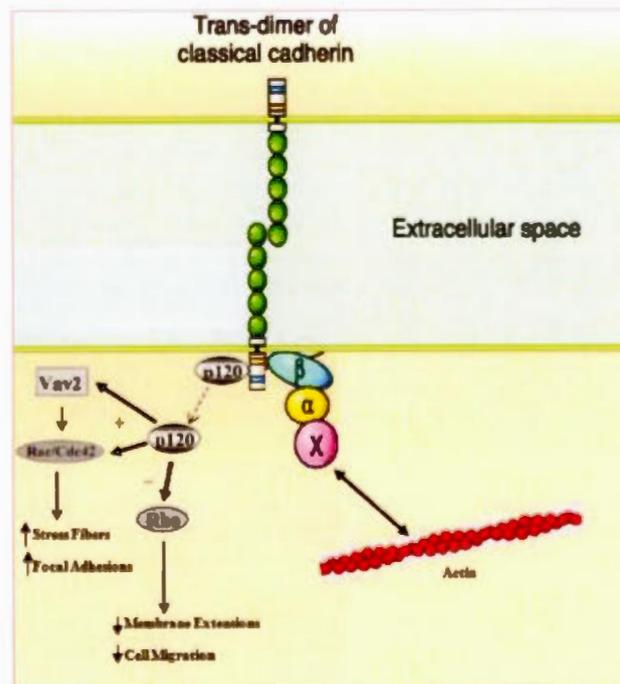
de liaison qui ne sont pas des cadhérines. Par exemple, le domaine EC4 de la N-cadhérine se lie au récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) et active la signalisation en aval de FGFR (Williams *et al.*, 2001).

### Le domaine cytosolique

Le domaine cytoplasmique est hautement conservé entre les différents sous-types de cadhérines classiques et se lie directement à des protéines cytoplasmiques, notamment à la  $\beta$ -caténine et la p120 (Fig. 1.10). La partie juxtamembranaire contient la séquence GGGEED, par laquelle des protéines membres de la famille p120 et la  $\beta$ -caténine interagissent avec les cadhérines (Halbleib et Nelson, 2006). La p120 peut réguler la liaison du cytosquelette d'actine avec la cadhérine. Quand la p120 n'est pas liée à la cadhérine, elle inhibe RhoA de façon directe (Anastasiadis et Reynolds, 2001) et active Rac1 et Cdc42 via Vav2 de manière indirecte (Noren *et al.*, 2000). RhoA, Cdc42 et Rac1 sont des GTPases régulatrices de l'arrangement du cytosquelette d'actine. La  $\beta$ -caténine lie directement l' $\alpha$ -caténine. Ce complexe cadhérine-caténines s'ancre ensuite au cytosquelette d'actine. Cet ancrage est essentiel pour l'adhérence cellulaire médiée par la cadhérine (Halbleib et Nelson, 2006).

En utilisant une combinaison d'études de liaison directe avec des protéines purifiées et la mesure de la dynamique du mouvement des protéines dans des cellules vivantes, les auteurs Drees *et al.* (2005) ont montré que l' $\alpha$ -caténine n'interagissait pas avec la E-cadhérine/ $\beta$ -caténine et l'actine filamenteuse simultanément. En effet, l' $\alpha$ -caténine se comporte de manière allostérique, en fonction de la formation d'un monomère  $\alpha$ -caténine qui se lie fortement à la  $\beta$ -caténine ou d'un homodimère qui se lie fortement à l'actine. En plus de la liaison à l'actine, l'homodimère  $\alpha$ -caténine inhibe la liaison du complexe actine-Arp2/3 avec les filaments d'actine et supprime ainsi la

polymérisation de l'actine (Drees *et al.*, 2005). Notons que ARP 2/3 est un complexe de sept sous-unités protéiques, dont deux protéines ARP2 et ARP3 se lient à l'actine. Ce complexe va pouvoir catalyser l'extension d'un nouveau filament d'actine et conduire à la formation du réseau d'actine (Mullins *et al.*; 1998).



**Figure 1.10** Modèle simplifié du complexe cadhérine-caténine. Dans la région cytoplasmique, une cadhérine lie la p120 et la  $\beta$ -caténine. Quand la p120 se délie de la cadhérine, elle diminue l'activité de RhoA et augmente celle de Cdc42 et Rac1. Une autre façon par laquelle p120 peut activer Cdc42 et Rac1, est l'association avec le facteur d'échange Vav2. La  $\beta$ -caténine, quant à elle, s'associe à l' $\alpha$ -caténine, pour se lier à d'autres molécules ("X"). Ce complexe interagit avec le cytosquelette d'actine via divers mécanismes pour fonctionner comme un centre de signalisation afin de permettre la communication entre les cellules. Figure inspirée de Halbleib et Neilson, 2006 et Noren *et al.*, 2000.

L' $\alpha$ -caténine recrute aussi la formine-1, qui agit de manière à nucléer les câbles d'actine non ramifiés aux jonctions adhérentes (Kobielak et Fuchs, 2004). Cela peut être important dans la régulation de la dynamique de l'actine dans les contacts cellule-cellule. Les cellules forment des contacts transitoires induits par les cadhérines présentes sur les extensions de lamellipodes hautement dynamiques (Adams *et al.*, 1998). Lors de la maturation d'un contact, les cadhérines se concentrent au site du futur contact sur chaque cellule et un contact stable est établi (Ehrlich *et al.*, 2002 ; Vaezi *et al.*, 2002). Les filaments d'actine adjacents s'organisent ensuite en groupes non ramifiés, face à la membrane. Ainsi, la suppression de Arp2/3 médiée par l'activité des lamellipodes, la localisation de formine-1 et la formation des faisceaux d'actine non ramifiés peuvent être coordonnées par des  $\alpha$ -caténines (Halbleib et Nelson, 2006).

### **c) La régulation de l'expression des cadhérines classiques**

L'expression des cadhérines classiques est régulée à de nombreux niveaux, y compris au niveau génique et à celui du transport intracellulaire pour le renouvellement des protéines à la surface cellulaire. Cette régulation est décrite ici pour la cadhérine-E qui a été particulièrement bien étudiée.

La transcription de la cadhérine-E est directement régulée par la méthylation et la répression de l'activité du promoteur. Par exemple, au cours de la carcinogenèse, la méthylation du promoteur de la E-cadhérine a été associée à une diminution de l'expression de la E-cadhérine, ainsi qu'avec la progression de la maladie et l'apparition des métastases (Strathdee, 2002). Le deuxième intron de plusieurs gènes de cadhérines classiques contient des éléments régulateurs importants qui modulent d'une part les niveaux globaux de cadhérine et d'autre part l'expression spécifique à certains tissu au cours du développement embryonnaire (Stemmler *et al.*, 2005).

Les protéines à doigts de zinc, appartenant à la famille Slug/Snail et Smad-interacting protein (SIP1), sont des répresseurs de la transcription des gènes de la E-

cadhérine (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003). La diminution de la transcription du gène de la E-cadhérine est le résultat de la perte de l'adhérence cellulaire (Perret *et al.*, 2002), ainsi que de l'accumulation cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine, qui peut fonctionner indépendamment ou en synergie avec la signalisation Wnt (Ciruna et Rossant, 2001). En effet, Slug peut être un gène cible du complexe TCF/ $\beta$ -caténine (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003) qui se lie et réprime le promoteur de la E-cadhérine (Jamora *et al.*, 2003). Ainsi, la répression de l'expression de la cadhérine par Slug/Snail/SIP1 ou encore par le complexe TCF/ $\beta$ -caténine peut réduire l'adhérence cellule-cellule, mais l'augmentation cytoplasmique concomitante de la  $\beta$ -caténine peut abaisser le seuil d'activation de la voie Wnt. Par ailleurs, la perturbation de l'interaction homophilique de la E-cadhérine va entraîner une augmentation de la p120 libre dans le cytoplasme, provoquant ainsi l'augmentation de l'activité de Cdc42 et Rac1 et la diminution de RhoA, ce qui entraînera la diminution de la migration cellulaire (Fig. 1.10) (Noren *et al.*, 2000).

Le transport de la E-cadhérine nouvellement synthétisée à la membrane plasmique nécessite la liaison de la  $\beta$ -caténine (Halbleib et Nelson, 2006), et une fois rendue à la surface cellulaire, l'activité de la E-cadhérine est régulée par phosphorylation, ubiquitination et protéolyse. L'intégrité structurale du complexe cadhérine/caténine est positivement et négativement régulée par phosphorylation. Au niveau du domaine cytoplasmique, trois résidus de sérine de la E-cadhérine (S684, S686, S692) sont phosphorylés par la caséine kinase II (CKII) et la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3), ce qui génère des interactions supplémentaires avec la  $\beta$ -caténine résultant en une forte augmentation de l'affinité entre les deux protéines (Huber et Weis, 2001). En revanche, la phosphorylation de la tyrosine aux positions 489 ou 654 perturbe la liaison de la E-cadhérine avec la  $\beta$ -caténine, mais la phosphorylation de Y142 permet la liaison avec l' $\alpha$ -caténine. La phosphorylation de la tyrosine de la  $\beta$ -

caténine est équilibrée par des tyrosines protéiques-phosphatases (PTP) qui stabilisent l'interaction caténine/E-cadhérine (Lilien et Balsamo, 2005).

L'adhérence cellulaire est modulée par les variations du niveau de cadhérine à la surface cellulaire. La stabilité de la cadhérine à la surface cellulaire est régulée par la p120. La perte de la liaison cadhérine-p120 est associée à une endocytose rapide de la E-cadhérine (Davis *et al.*, 2003). Le domaine cytoplasmique des cadhérines classiques est également la cible d'un clivage protéolytique par l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase/préséniline-1 (PS1), ce qui entraîne une perte d'adhérence cellule-cellule (Marambaud *et al.*, 2002). Le clivage par PS1 est précédé d'un clivage du domaine extracellulaire de la cadhérine par la protéase ADAM10 (Halbleib et Nelson, 2006 ; Uemura *et al.*, 2006). L'internalisation de la E-cadhérine via des vésicules de clathrine (Bryant et Stow, 2004), suivie de son ubiquitination par une ligase E3 (Fujita *et al.*, 2002) entraîne une perte rapide de l'adhérence cellule-cellule perturbant ainsi le complexe cadhérine-caténine (Avizienyte *et al.*, 2002).

La régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des cadhérines influence leur niveau d'expression à la surface cellulaire, leur liaison à diverses molécules intracellulaires, leur activité de cadhérine (Foty et Steinberg, 2005).

#### **d) Expression et rôle des cadhérines classiques dans le système nerveux central et importance de la N-cadhérine**

Le système nerveux central des vertébrés dérive du tube neural, une structure creuse qui se dégage à la ligne médiane dorsale de l'embryon par une invagination de l'ectoderme de surface (neurulation). La paroi du tube neural donne naissance à un neuro-épithélium homogène, dans lequel les précurseurs neuronaux prolifèrent. Peu de temps après sa formation, le tube neural est soumis à la structuration embryonnaire.

Les cadhérines jouent un rôle essentiel dans la régionalisation du tube neural, la migration neuronale, la morphologie de la colonne vertébrale, la formation du circuit neuronal ainsi que la formation des synapses et de leur régénération (Hirano et Takeichi, 2012 ; Redies, 2000 ; Takeichi, 2007). Chaque sous-type de cadhérine classique a des préférences de tissus dans l'organisme en développement et adulte. La E-cadhérine par exemple, est présente dans l'embryon au stade de morula. Par la suite, elle est exprimée dans tous les épithéliums et est importante pour l'établissement et le maintien de la polarité apico-basale de l'épithélium. La N-cadhérine, quant à elle, est retrouvée dans les tissus nerveux et musculaires, la R-cadhérine dans le cerveau antérieur et les os, la P-cadhérine dans la couche basale de l'épiderme, la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales, la cadhérine-6 dans le rein et la cadhérine-11 préférentiellement dans le mésoderme (Halbleib et Nelson, 2006). Toutefois, il y a un chevauchement dans les distributions tissulaires de cadhérines classiques, comme la E-cadhérine qui est également exprimée dans le système nerveux (Halbleib et Nelson, 2006).

Les déficits de la cadhérine sont généralement associés à une malformation d'organes. Dans l'organisme adulte, la perte de la fonction de cadhérine peut causer la tumorigenèse, en partie, parce que les cellules perdent leurs propriétés adhésives, se détachent des cellules environnantes et deviennent envahissantes (Heuberger et Birchmeier, 2010). L'expression est aussi altérée dans divers dysfonctionnements cérébraux, tels que les troubles neuropsychiatriques comme l'épilepsie et le retard mental, l'autisme ou encore la schizophrénie et les troubles bipolaires (Redies *et al.*, 2012).

Parmi les cadhérines classiques, la N-cadhérine, encore appelée CDH2, apparaît comme la forme prédominante de cadhérine exprimée de manière ubiquitaire dans le tube neural précoce (Takeichi *et al.*, 1997) et elle s'accumule dans les jonctions adhérentes de la partie apicale des cellules neuro-épithéliales (Hatta *et al.*, 1987 ; Hatta et Takeichi, 1986). Elle maintient l'intégrité de ces cellules au cours du développement du cerveau et son inhibition entraînerait la perturbation des jonctions apicales du neuro-

épithélium (Kadowaki *et al.*, 2007). De plus, dans le neuro-épithélium, elle est importante pour le réarrangement des cellules neuro-épithéliales. D'autre part, la N-cadhérine participe à l'élaboration et à l'organisation fonctionnelle du tissu neural (Redies *et al.*, 2003). Elle est nécessaire pour la polarisation des feuilletts neuro-épithéliaux, l'organisation des fibres radiales pour le développement de la plaque corticale et probablement la migration des précurseurs neuronaux (Gartner *et al.*, 2015 ; Kadowaki *et al.*, 2007 ; Paulson *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2010). Elle est également impliquée dans la croissance des neurites, l'arborisation dendritique, le guidage axonal, et dans les premiers stades de la synaptogenèse (Aiga *et al.*, 2011 ; Paulson *et al.*, 2014 ; Takeichi, 2006). Plus tard, dans le développement, la N-cadhérine se localise au niveau des synapses (Paulson *et al.*, 2014 ; Uchida *et al.*, 1996), où elle joue non seulement un rôle d'adhérence, mais aussi participe à la régulation de la fonction et la plasticité synaptiques (Aiga *et al.*, 2011 ; Benson *et al.*, 2000).

Dans le modèle cellulaire P19, la N-cadhérine joue un rôle important dans la différenciation neuronale. En effet, l'expression de la N-cadhérine est associée à la différenciation neuronale des cellules du carcinome embryonnaire P19 après exposition à l'AR (Gao *et al.*, 1999). D'ailleurs, la surexpression de N-cadhérine dans les cellules est suffisante pour déclencher la différenciation en neurones, et ce même en l'absence d'AR (Gao *et al.*, 2001 ; Laplante *et al.*, 2004). La N-cadhérine peut aussi être impliquée dans la formation d'agrégats de neurones. Ainsi, dans le modèle de neurones PC12, la N-cadhérine est impliquée dans la neuroagrégation induite par l'optimédine, une protéine considérée comme ayant un rôle dans le développement du tissu neural (Lee et Tomarev, 2007).

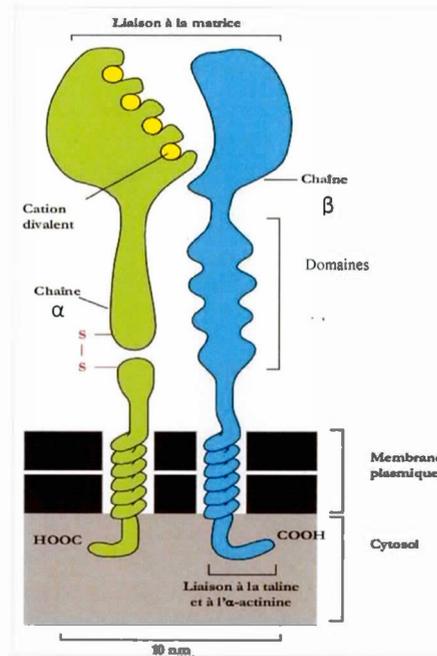
### 1.4.2 Les intégrines

Les intégrines sont la principale famille de protéines de surface cellulaire qui interagissent avec les composantes de la MEC. Ces interactions contrôlent l'adhérence et la migration des cellules, ainsi que la transduction de signaux et l'expression de gènes qui régulent la croissance et la différenciation cellulaires (Emsley *et al.*, 2000).

#### a) Structure et caractéristiques de liaison

Les intégrines sont une classe de récepteurs hétérodimères  $\alpha\beta$  qui adhèrent à la MEC et régulent diverses voies de signalisation (Dansie et Ethell, 2011 ; DeMali *et al.*, 2003). Elles possèdent un grand domaine extracellulaire responsable de la liaison du ligand présent dans la MEC, un domaine transmembranaire unique et un court domaine C-terminal cytoplasmique qui se lie au cytosquelette (Fig. 1.11).

La cryo-microscopie électronique montre que les intégrines ont une tête extracellulaire globulaire d'environ 70 Å de diamètre, comprenant les régions N-terminales des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , reliées à une paire d'hélices, par l'intermédiaire d'une longue tige rigide d'environ 100 Å (Emsley *et al.*, 2000). Neuf sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha1$ ,  $\alpha2$ ,  $\alpha10$ ,  $\alpha11$ ,  $\alphaD$ ,  $\alphaF$ ,  $\alphaL$ ,  $\alphaM$  et  $\alphaX$ ) contiennent un domaine supplémentaire ("A" ou "I"). Ce domaine est inséré dans la région de la tête, où il joue un rôle central dans la liaison du ligand (Emsley *et al.*, 2000)



**Figure 1.11 Structure générale d'une sous-unité d'intégrine.** Chaque récepteur d'intégrine est composé d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  qui ne sont pas liées de façon covalente. La chaîne  $\alpha$  contient plusieurs sites de liaison de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). La chaîne  $\beta$  contient une série de répétitions riches en cystéine dans le domaine extracellulaire. La région qui lie le ligand dans la MEC est composée à la fois des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . D'après Alberts B *et al.*, 2002.

Le domaine cytoplasmique des intégrines est beaucoup plus petit que le domaine extracellulaire puisqu'il compte généralement moins de 50 AA. Il joue un rôle vital dans les fonctions de l'intégrine. Le domaine cytoplasmique peut réguler l'état d'activation des intégrines c'est-à-dire qu'il a une incidence sur la structure et la fonction des domaines extracellulaires. Il permet aussi l'interaction et la liaison avec le cytosquelette et les partenaires de signalisation des intégrines (Hynes, 2002).

## **b) Association des intégrines avec leurs ligands**

On retrouve une abondante littérature sur les nombreuses protéines reconnues pour interagir avec le domaine cytoplasmique des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , notamment des protéines d'échafaudage ou des protéines de signalisation spécifique telles que la spectrine, la filamine, la vaculine, la xylene (Calderwood *et al.*, 2000 ; Kawauchi, 2012 ; Liu *et al.*, 2000), des kinases d'adhésion focale (FAK) ou des récepteurs couplés aux protéines G (Hynes, 2002). D'ailleurs, un ensemble considérable de données indiquent que les domaines cytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent interagir pour contrôler les états d'activation des intégrines (Hynes, 2002).

Il existe une multitude de combinaisons entre les différentes isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ , déterminant ainsi la spécificité de liaison de l'intégrine pour les différents composants de la MEC (Kawauchi, 2012) (Tableau 1.1).

**Tableau 1.1 Les intégrines et leurs ligands (Kawauchi, 2012)**

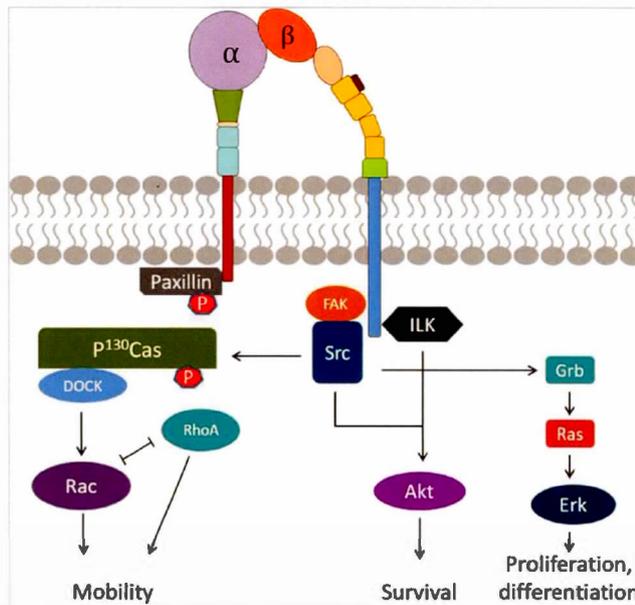
<b>Intégrines</b>	<b>Ligands</b>
$\alpha 1 \beta 1$	Collagène, Laminine
$\alpha 2 \beta 1$	Collagène, Laminine, Tenascine
$\alpha 3 \beta 1$	Laminine, Collagène
$\alpha 4 \beta 1$	Fibronectine, VCAM-1
$\alpha 4 \beta 7$	MAdCAM-1, Fibronectine
$\alpha 5 \beta 1$	Fibronectine
$\alpha 6 \beta 1$	Laminine
$\alpha 6 \beta 4$	Laminine
$\alpha 7 \beta 1$	Laminine
$\alpha 8 \beta 1$	Fibronectine, Tenascine
$\alpha 9 \beta 1$	Tenascine
$\alpha 10 \beta 1$	Collagène
$\alpha 11 \beta 1$	Collagène
$\alpha \text{IIb} \beta 3$	Fibronectine, Vitronectine, Fibrinogène
$\alpha \text{v} \beta 1$	Vitronectine, Fibronectine
$\alpha \text{v} \beta 3$	Vitronectine, Fibronectine, Fibrinogène
$\alpha \text{v} \beta 5$	Vitronectine
$\alpha \text{v} \beta 6$	Fibronectine, Tenascine
$\alpha \text{v} \beta 8$	Vitronectin
$\alpha \text{L} \beta 2$	ICAM-1, -2, -3
$\alpha \text{M} \beta 2$	Fibrinogène, iC3b
$\alpha \text{X} \beta 2$	Fibrinogène, iC3b
$\alpha \text{D} \beta 2$	ICAM-3, VCAM-1
$\alpha \text{E} \beta 7$	E-cadherine

Abréviations : Molécule d'adhérence intracellulaire (ICAM), Molécule d'adhérence vasculaire (VCAM), molécule d'adhérence cellulaire adressée aux muqueuses-1 (MAdCAM-1), complément inactif 3b (iC3b).

### c) Signalisation et régulation des intégrines

Les intégrines sont des médiateurs de transduction cellulaire bidirectionnels au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, dans la signalisation extérieur-vers-intérieur (*outside-in*), la liaison de l'intégrine à son substrat spécifique dans la MEC active des signaux dans la cellule et induit une réorganisation du cytosquelette ou modifie l'expression génique. Dans le sens contraire (intérieur-vers-extérieur, *inside-out*), des signaux intracellulaires (par exemple, des signaux causés par la liaison d'une hormone à son récepteur) peuvent se propager jusqu'aux intégrines et augmenter leur affinité ou avidité pour la MEC et ainsi améliorer l'adhérence cellulaire (Liu, 2000). Cette activation des intégrines peut aussi être déclenchée par un contact initial à faible affinité avec leur substrat approprié (Goult *et al.*, 2009). L'activation implique un trafic endosomal, un ensemblage coordonné d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  à la membrane, l'exposition de leurs domaines de liaison extracellulaires, et l'association intracellulaire de facteurs et d'agents de liaison de signalisation au niveau du cytosquelette d'actine (Rehberg *et al.*, 2014). De nombreuses intégrines sont activées par leur interaction avec le motif Arg-Gly-Asp (RGD), que l'on trouve dans de nombreuses composantes de la MEC, notamment la laminine, la fibronectine, la té nascine, et la thrombospondine (Dansie et Ethell, 2011).

L'une des premières molécules de signalisation jouant un rôle important dans la signalisation des intégrines (Fig. 1.12) est la tyrosine kinase d'adhérence focale (FAK). En effet beaucoup de signaux résultant de l'interaction intégrine-MEC sont centrés autour de FAK, et de ses interactions avec les protéines de la famille des tyrosines kinases Src (Zeng *et al.*, 2003). Le profil de phosphorylation de FAK, en réponse à l'engagement de l'intégrine avec la MEC, conduit à la formation de phosphotyrosine comme sites d'ancrage pour plusieurs classes de molécules de signalisation (Parsons, 2003).



**Figure 1.12 Interactions des protéines impliquées dans la signalisation des intégrines.** Les intégrines signalent à travers FAK pour la signalisation des voies de régulation des petites GTPases de la famille Rac/RhoA et Arf dans la modulation de l'adhérence et de la migration cellulaire. Ainsi, la chaîne β recrute et active FAK, Src et ILK. Ceci va permettre à la chaîne α d'activer et de phosphoryler Paxilline, qui à son tour phosphoryle P<sup>130</sup>Cas. P<sup>130</sup>Cas phosphorylée recrute le facteur d'échange de guanine DOCK, conduisant à l'activation de Rac. Rac et RhoA fonctionnent à l'opposé lors de la migration cellulaire. ILK favorise l'activité Akt impliquée dans la survie cellulaire. Src active également Akt et peut aussi favoriser la prolifération cellulaire par voie Ras-Erk (Hu et Luo, 2013).

L'autophosphorylation sur Tyr397 crée un site de liaison de haute affinité pour le domaine SH2 de kinases de la famille Src et entraîne le recrutement et l'activation de Src à travers la formation d'un complexe de kinases (Parsons, 2003). Cette phosphorylation sur Tyr397 et le recrutement de Src ont été impliqués dans la phosphorylation de sites supplémentaires de FAK (Owen *et al.*, 1999). La phosphorylation de Tyr397 semble également être importante pour le recrutement

d'autres protéines contenant un motif SH2, y compris la sous-unité de la phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase), la phospholipase C (PLC)- $\gamma$  et la protéine adaptatrice Grb7 (Akagi *et al.*, 2002). La phosphorylation aux Tyr 576 et 577 est importante pour une activation et une activité signalisatrice maximale de FAK (Parsons, 2003).

En plus de tyrosines kinases, des tyrosines protéiques-phosphatases (PTP) intracellulaires interviennent en tant que régulateurs de la signalisation médiée par les intégrines (DeMali *et al.*, 2003). Deux récepteurs PTP ont été associés à la signalisation des intégrines : LAR et PTP $\alpha$ . L'antigène lié aux leucocytes communs, LAR, est localisé dans les adhésions focales et intervient dans les voies de migration des cellules et dans la régulation de différentes populations neuronales en fonction de la molécule à laquelle il est associé (Yang *et al.*, 2006). PTP $\alpha$  est trouvé dans les adhésions focales (Lammers *et al.*, 2000). Cependant les cellules qui la surexpriment montrent une amélioration de l'association substrat-cellule alors que celles dépourvues de PTP $\alpha$ , montrent une réduction de la phosphorylation de la tyrosine de FAK et p<sup>130</sup>Cas (DeMali *et al.*, 2003).

Une autre catégorie de protéines intervenant dans la signalisation des intégrines sont les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Ces enzymes protéolytiques caractérisées par la présence d'un ion Zn<sup>2+</sup>, jouent un rôle dans la modification de la MEC et catalysent le délestage ("shedding") du domaine extracellulaire des intégrines (Parr-Sturgess *et al.*, 2012). Ces "sheddases" sont associées à l'invasion de métastases d'une gamme de cancers. La coopération des intégrines et des MMPs est requise pour la motilité et l'invasion de cellules cancéreuses à l'intérieur de la MEC (Kryczka *et al.*, 2012). Les interactions entre les intégrines et les MMPs à la surface cellulaire peuvent être détectées de façon directe par des études de liaison ou de façon indirecte en montrant que la protéolyse d'une composante de la MEC dépend de la présence d'une MMP donnée (Giannelli *et al.*, 1997).

#### **d) Rôles des intégrines dans le SNC et importance de la $\beta$ 1-intégrine**

Les intégrines sont retrouvées dans de nombreux types cellulaires et dans la médiation de divers processus cellulaires, y compris la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaires (Dansie et Ethell, 2011). On en distingue au moins 22 récepteurs différents (Tableau 1.1). Les dimères de la  $\beta$ 1-intégrine semblent être pertinents pour le développement neuronal, car ils fournissent des fonctions adhésives et une plate-forme de signalisation polyvalente (Rehberg *et al.*, 2014).

Dans le cerveau, plusieurs sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ont été retrouvées dans différentes régions, notamment l'hippocampe, le cervelet, le thalamus et le cortex (Shi et Ethell, 2006) et un sous-ensemble de celles-ci a été localisé au niveau des épines dendritiques (Bourgin *et al.*, 2007). Les intégrines sont impliquées dans le développement du cerveau et la synaptogenèse (Milner et Campbell, 2002), ainsi que dans le remodelage des épines dendritiques (Bourgin *et al.*, 2007). En plus d'être essentielles dans la formation corticale de la lame basale (Graus-Porta, D. *et al.*, 2001), elles sont retrouvées dans les neurones puisqu'elles régulent la migration neuronale (Gupton et Gertler, 2010), la maturation synaptique (Webb *et al.*, 2007), la plasticité et la stabilité neuronales (Shi et Ethell, 2006). Dans le modèle de cellules souches P19, la  $\beta$ 1-intégrine est associée avec la différenciation neuronale. Ainsi l'expression de la  $\beta$ 1-intégrine est induite par la différenciation en neurones alors qu'elle n'est pas induite dans une lignée mutante de ces cellules qui ne répond pas à l'AR et ne se différencie pas en neurones (Dedhar *et al.*, 1991).

La  $\beta$ 1 intégrine est impliquée dans le contrôle de la différenciation des cellules gliales radiales (Belvindrah *et al.*, 2007). Les souris qui n'ont pas l'intégrine  $\beta$ 1 dans ces cellules montrent des perturbations lors de la formation des couches de neurones corticales qui sont associées à des défauts dans l'ancrage de fibres gliales radiales au niveau de la membrane basale (Graus-Porta, Diana *et al.*, 2001). La reeline, connue

pour être l'un des régulateurs clés du développement du cortex cérébral chez les mammifères (Sekine *et al.*, 2014), pourrait activer l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  par la voie intracellulaire Dab1-Crk/Crkl-C3G-Rap1. Ceci favoriserait l'adhérence neuronale à la fibronectine, qui médie les alignements neuronaux dans le cortex mature (Sekine *et al.*, 2014).

Chez la souris, le "knockout" (KO) de l'intégrine  $\beta 1$  cause des perturbations sévères du système nerveux périphérique, incluant un échec de l'arborisation normale des nerfs, un délai dans la migration des cellules de Schwann et une différenciation défectueuse des jonctions neuromusculaires. La perte de l'intégrine  $\beta 1$  cause la rupture de la lame basale qui sépare le cerveau du mésenchyme qui le recouvre. Le résultat de cela est une perturbation de la migration des neurones qui amène une lamination anormale du cortex et du cervelet. Au niveau de l'hippocampe, l'intégrine  $\beta 1$  est requise pour une Potentialisation à Long Terme (LTP) normale. L'intégrine  $\beta 1$  est aussi impliquée au niveau des synapses en régulant la fonction des récepteurs des neurotransmetteurs NMDA et AMPA (Marciano *et al.*, 2007).

Lors des blessures du système nerveux, une réorganisation des cellules et des tissus est nécessaire afin de pouvoir faciliter la réparation des lésions cellulaires et tissulaires. Les neurones du système nerveux périphérique sont capables de régénérer leurs axones mais non ceux du système nerveux central. Les intégrines sont censées jouer un rôle dans ces processus (Clegg *et al.*, 2003). D'autre part, certaines études ont également montré que les intégrines seraient impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment dans les réponses immunitaires rencontrées dans ces maladies. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer où les intégrines seraient localisées dans les tissus de la microglie (Akiyama et McGeer, 1990), et impliquées dans une réponse inflammatoire du tissu cérébral. Par ailleurs, les  $\beta 1$  intégrines ont été les premières molécules/protéines à avoir été identifiées comme médiateurs de croissance de la MEC (Clegg, 2000). Elles peuvent se dimériser avec au moins 10 sous-unités

différentes, dont  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  et  $\alpha V$  et sont exprimées dans toutes les régions du cortex cérébral en développement et adulte (Schmid et Anton, 2003).

Ces médiateurs de croissance de la MEC sont majeurs dans le SNC. En effet, ils sont importants dans la transmission et la plasticité synaptique ainsi que dans la mémoire à long terme (Chan *et al.*, 2006). Ils jouent un rôle central dans le processus de formation de couches de neurones corticales, sont indispensables pour l'organisation cellulaire ainsi que pour la différenciation synaptique des neurones pyramidaux dans l'hippocampe et jouent des rôles distincts dans le développement et la fonction des synapses excitatrices centrales (Huang *et al.*, 2006). Leur expression est fortement induite par axotomie et associées à l'apparition de la régénération des axones. Du point de vue du développement, la  $\beta 1$  intégrine est essentielle pour l'adhérence neuronale et la croissance des neurites sur la laminine *in vitro* (Clegg, 2000 ; Weaver *et al.*, 1995), ce qui lui suggère un rôle dans la repousse axonale et adhésive lors des événements de réparation et de régénération (Kloss *et al.*, 2001).

### 1.5 Hypothèses de recherche

Des résultats antérieurs obtenus dans notre laboratoire suggèrent que la CP aurait la capacité d'agir sur l'organisation et le développement des jeunes neurones. En effet, la CP induit l'agrégation de neurones P19 nouvellement différenciés et a une influence sur le profil protéique de la reeline, une protéine essentielle au bon positionnement des neurones dans le cerveau (section 1.3.3(f)). Ces deux actions neuronales de la CP seraient indépendantes. Ainsi, l'agrégation n'est pas nécessaire pour le clivage de la reeline en son fragment de 300 kDa et la génération de ce fragment n'est pas requise pour l'agrégation (voir section 1.3.4). L'AMPC inhibe l'agrégation des neurones et l'inhibition de ERK bloque la génération de la reeline 300 kDa. Cependant, les deux actions de la CP dépendent de protéases à sérine extracellulaires puisqu'elles sont sensibles au SBTI et à l'Aprotinine. Elles sont aussi sensibles au rivaroxaban, un inhibiteur apparemment spécifique du facteur X de la coagulation sanguine. Les substrats de ces protéases sont inconnus.

D'autre part, un petit composé à cuivre fabriqué par Dr. M.A Mateescu et ses collaborateurs, la Ser<sub>2</sub>Cu, a aussi montré une activité neuroagrégative (Salmi, 2015) alors que le composé His<sub>2</sub>Cu préparé selon la méthode du Dr. B. Sarkar n'a pas eu cet effet (Maltais *et al.*, 2003; Salmi, 2015). Comme ces deux composés ont été préparés de façon différente, nous ne savons pas dans quelle mesure l'AA choisi comme base du composé ou la méthode de fabrication est responsable des actions différentes. Les résultats avec la Ser<sub>2</sub>Cu soulèvent la possibilité que le cuivre soit un élément important de l'action neuroagrégative de la CP.

Le présent travail avait pour but de continuer les travaux d'élucidation des mécanismes des actions neuronales de la CP. Nous avons émis deux hypothèses :

- 1) les protéines d'adhérence cellulaire sont importantes dans l'action neuroagrégative de la CP et pourraient même être une cible de la protéase à serine impliquée dans cette action;
- 2) le cuivre présent dans la CP pourrait être important dans l'action neuroagrégative de la protéine et la différence de comportement entre l'His<sub>2</sub>Cu et la Ser<sub>2</sub>Cu pourrait être expliquée par la différence dans la méthode de fabrication ou l'AA choisi.

Par la suite, les objectifs suivants ont été énoncés :

1. Pour les raisons présentées dans les sections 1.4.1 (d) et 1.4.2 (d), nous avons retenu la N-cadhérine et la  $\beta$ 1-intégrine comme des molécules d'adhérence cellulaire pouvant être impliquées dans le phénomène de neuroagrégation déclenchée par traitement avec de la CP. Une partie de mon travail de recherche a donc porté sur **l'étude de l'expression de ces protéines, avec et sans traitement avec la CP, par différentes approches qui impliquent l'immunobuvardage.**
2. Nous avons aussi comme objectif de **comparer l'action neuroagrégative de la Ser<sub>2</sub>Cu et de l'His<sub>2</sub>Cu** préparées selon la même méthode de fabrication. Nous avons de plus vérifié que l'effet neuroagrégatif de la Ser<sub>2</sub>Cu n'était pas associé à une perte de la viabilité neuronale. Dans ce volet de l'importance du cuivre, nous avons testé l'action neuroagrégative de la CP appauvrie en cuivre.
3. En parallèle des deux premiers objectifs, mon travail a porté sur une **caractérisation de préparations de CP.** Nous avons deux raisons pour faire cela. D'abord, nous devons synthétiser une nouvelle résine d'AE-agarose pour remplacer celle qui s'est détériorée abruptement après une utilisation sur plusieurs années, et nous avons modifié le protocole de synthèse de l'AE-agarose. Ensuite,

nous avons porté attention à la possibilité d'une contamination des préparations de CP par le facteur X de coagulation sanguine. Cela a été soulevé par l'effet inhibiteur du rivaroxaban sur le phénomène de neuroagrégation induit par la CP. Notons tout de même que la Ser<sub>2</sub>Cu avait montré une activité neuroagrégative inhibable par le rivaroxaban (Salmi, 2015). Comme ce petit composé n'est pas contaminé par le facteur X, ceci suggère que le rivaroxaban pourrait avoir d'autres cibles que le facteur X.

Les travaux sur les protéines d'adhérence cellulaire, la neuroagrégation et la viabilité neuronale ont été réalisés sur des cultures de neurones nouvellement différenciés de cellules P19.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 Préparation de la CP

##### 2.1.1 Synthèse d'une résine d' aminoéthyl-agarose

L'AE-agarose qui sert de matériel chromatographique pour la purification de la CP a été synthétisé selon une procédure adaptée du groupe de Musci et Calabrese (Musci *et al.*, 1993) et du groupe de Mateescu (Wang *et al.*, 1994). Un volume de 150 mL de gel de Sépharose CL-6B (Amersham/GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) a été lavé extensivement avec de l'eau distillée, par filtration sous vide, sur un entonnoir Büchner. La pâte de gel a été mise en suspension dans 75 mL de NaOH (10N), et le tout agité avec une pale agitatrice jusqu'à obtenir un mélange lisse. Puis, 65 g de chloroéthylamine (Sigma-Aldrich, Mississauga, ON, Canada) préalablement dissout dans 60 mL d'eau distillée ont été ajoutés au mélange, et le tout a été chauffé à 70-75°C pendant 2 h tout en maintenant le pH à environ 10 à l'aide de NaOH (10N). Le gel (AE-agarose) a finalement été extensivement lavé avec de l'eau distillée, par filtration sous vide, jusqu'à l'atteinte d'un pH neutre, puis entreposé à 4°C, dans 5 mM phosphate de potassium (KPi), pH 7,2, 20% éthanol jusqu'à utilisation. Cette procédure a généré un gel d'AE-agarose possédant une faible capacité de rétention de la CP. Pour augmenter cette capacité, nous avons introduit une deuxième addition de 65 g de chloroéthylamine environ 1 h après la première addition en s'inspirant du protocole de Musci *et al.* (1993). Le greffage de groupements amino sur les billes a été vérifié par coloration à la ninhydrine en chauffant environ 1 mL de billes avec 1 mL de ninhydrine (20 mM) dans de l'eau distillée. Dans un tube témoin,

1 mL de 2% d'albumine sérique bovine (BSA) a été chauffé avec 1 mL de ninhydrine (20 mM).

### 2.1.2 Purification de la CP

La purification de la CP, à partir de 10 L du sang de bœuf, a été effectuée d'après le protocole développé par l'équipe du Dr Mateescu (Wang *et al.*, 1994; Mateescu *et al.*, 1999 ; Ducharme *et al.*, 2010). Lors de la récolte du sang (Boucherie-abattoir Tarte Enr., Marieville, Québec, Canada), un litre de citrate de sodium (2.5%) a été ajouté afin de prévenir la formation de caillots sanguins. Deux centrifugations consécutives, à 8 000 g durant 20 min à 4°C, ont permis de séparer les érythrocytes pour ne conserver que le plasma. Ce dernier a été soumis à une première précipitation avec du sulfate d'ammonium à 35% de saturation puis, après une incubation de 2 h sous agitation à 4°C, le mélange a été centrifugé à 10 000 g durant 20 min à 4°C. Le surnageant résultant a été soumis à une autre précipitation au sulfate d'ammonium (55% de saturation) pendant 1 h à 4°C. Le mélange a été à nouveau centrifugé et le culot a été resuspendu dans 800 mL de tampon KPi (10 mM), pH 7,2. La solution a été dialysée par la suite pendant environ 30 h dans du tampon KPi (10mM), pH 7,2 (trois bains de 15 à 18L chaque fois), puis centrifugée à 10 000 g pendant 20 min à 4°C.

Le surnageant (échantillon) a été déposé sur gel d'AE-agarose préalablement équilibré avec 10 mM KPi, pH 7,2. Pour un gel à faible capacité de rétention de la CP, nous avons divisé l'échantillon en environ 6 portions égales et utilisé 2 colonnes d'AE-agarose de 50 mL chacune qui ont été manipulées en parallèle. Chaque colonne a donc servi à chromatographier à tour de rôle 3 portions de l'échantillon avec une étape de rééquilibration entre chaque portion. Une chromatographie unique aurait ainsi nécessité 300 mL de gel. Après dépôt de l'échantillon, le gel a été lavé avec 10 volumes de 20 mM KPi, pH 7,2 ainsi qu'avec au moins 5 volumes de KPi (30 mM), pH 7,2, et élué avec 200 mM KPi, pH 7,2, le tout à un débit de 2 mL/min. Les fractions

(2 mL) absorbant à 610 nm ( $Abs > 0.1$ ) ont été recueillies pour générer l'éluat final. Cet éluat, de couleur bleue, a été dilué deux fois avec de l'eau nanopure, puis concentré par centrifugation, jusqu'à atteindre une concentration en protéine de 25-30 mg par mL, en utilisant des filtres Spin-X<sup>®</sup> UF Concentrator, ayant une limite de porosité de 100 kDa (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada). Pour un gel à forte capacité de rétention de la CP, tout l'échantillon a été déposé en une seule fois sur environ 75 mL d'AE-agarose (répartis sur deux colonnes en série). Après chaque préparation de CP, la résine d'AE-agarose a été régénérée. Elle a été successivement incubée dans 10 volumes de NaCl (1 M), 2 volumes d'urée (6 M), 2 volumes de NaOH (0.1 M) et 2 volumes de HCL (0.1 M); chacune de ces incubations a été faite durant 30 min à 4°C et suivie d'un lavage avec 20 volumes d'eau distillée. La résine a été conservé 4°C dans du tampon KPI (20 mM) et 20% d'éthanol.

La préparation de CP a été analysée pour son contenu en protéines, son rapport  $DO_{610nm}/DO_{280nm}$  et son homogénéité par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE), associée à une coloration au bleu de coomassie, à une coloration au nitrate d'argent ainsi qu'à un immunobuvardage, en utilisant un anticorps anti-CP (Dako, Mississauga, Ontario Canada) 1/1000 (tableaux 2.1 et 2.2). L'activité oxydasique de la CP a été déterminée par un dosage effectué sur une microplaque de 96 puits (Sarstedt). Le milieu réactionnel contenait 0.2 mg/mL de CP, 10 mM de *p*PD et 50 mM de tampon KPi à pH 7,0 dans un volume final de 200  $\mu$ L. L'oxydation du *p*PD a été suivie par spectrophotométrie à 560 nm par des lectures à intervalle de 5 min durant 1 h à l'aide d'un lecteur de microplaque (SpectraMax M2, Molecular Devices, Californie, USA). Un contrôle a été fait en remplaçant la solution de CP par un même volume de son tampon.

**Tableau 2.1 Anticorps primaires utilisés en immunobuvardage**

Anticorps	Dilution	Incubation	Animal hôte	Fournisseur (N° catalogue)
CP	1 :1000 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Lapin (IgG)	Dako, (A0031)
N-cadhérine (épitope intracellulaire)	1 :1000 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Souris (monoclonal IgG1)	BD Transduction Laboratories (610920)
N-cadhérine (épitope extracellulaire)	1 :1000 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Lapin (monoclonal IgG)	Abcam (AB76011)
β1- Intégrine (épitope intracellulaire)	1 :500 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Lapin (polyclonal IgG)	Millipore (AB1952)
β1- Intégrine (épitope extracellulaire)	1 :500 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Rat (monoclonal IgG)	R&D Systems (MAB2405)
FAK	1 :200 TBS-Tw 0.05%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Lapin (polyclonal IgG)	Millipore (06-543)
p-FAK	1 : 500 TBS-Tw 0.05%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Souris (monoclonal IgG1)	Millipore (05-1140)
β- Actine	1 : 10 000 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN <sub>3</sub> 0.1%	1h à température pièce ou toute la nuit à 4 °C	Souris (monoclonal IgG)	Sigma-Aldrich (A5441)

Abcam (Toronto, ON, Canada), BD Transduction Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada), Dako (Mississauga, Ontario, Canada), Millipore (Billerica, MA, USA), R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) et Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, Canada).

**Tableau 2.2 Anticorps secondaires utilisés en immunobuvardage**

<b>Anticorps</b>	<b>Dilution</b>	<b>Incubation</b>	<b>Animal hôte</b>	<b>Fournisseur (N° catalogue)</b>
POD anti IgG de souris	1 :2500 TBS-Tw 0.01%, 3% BSA	1h à température pièce ou toute la nuit à 4° C	Chèvre (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories (115-035-062)
POD anti IgG de lapin	1 :2500 TBS-Tw 0.01%, 3% BSA	1h à température pièce ou toute la nuit à 4° C	Chèvre (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories (711-035-152)
POD anti IgG de rat	1 :2500 TBS-Tw 0.01%, 3% BSA	1h à température pièce ou toute la nuit à 4° C	Singe (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories (712-546-150)

Les produits de Jackson Immuno Research Laboratories sont distribués par Cedarlane Laboratories (Burlington, ON, Canada).

La teneur en facteur X a été évaluée, par mesure de son activité, au département Banque de sang de l'Hôpital Ste-Justine (Montréal, QC, Canada). Cette mesure consiste en un test de coagulation chronométrique fait à l'aide d'un système STAR-Evolution (Diagnostica Stago Ltd, Toronto, ON, Canada).

### 2.1.3 Déplétion en cuivre de la CP

La méthode de déplétion en cuivre de la CP a été faite selon la méthode de Hirano *et al.* (2005) avec des modifications. Notre préparation de CP a été mise dans une cassette à dialyse (Slide-A-Lyzer G2, ThermoScientific, Massachusetts, USA) à raison 25 mg/mL, puis dialysée dans 2 L de tampon KP<sub>i</sub> 50 mM à pH 7,3 contenant 50 mM de cyanure de sodium (NaCN) pendant 2 h à 4°C. Par la suite, une autre dialyse a été

faite durant 4 h puis toute la nuit à 4°C dans 2 L de tampon KPi 50 mM à pH 7,3 pour s'assurer de la disparition totale du NaCN. L'apoCP a été analysée pour son contenu en protéine et son activité oxydasique comme précédemment.

## 2.2 Préparation de petits composés à cuivre

Les solutions d'His<sub>2</sub>Cu et de Ser<sub>2</sub>Cu ont été préparées le jour de l'utilisation selon la méthode du Dr Sarkar (Sarkar, 1999) en dissolvant 2 M de L-histidine ou de L-sérine et 1 M de CuCl<sub>2</sub> dans de l'eau contenant 0.9% (p/v) de NaCl. Après avoir ajusté le pH à 7,4, la solution a été stérilisée sur un filtre de 0.2 µm puis gardée à 4°C à l'abri de la lumière.

## 2.3 Culture cellulaire

### 2.3.1 Culture des cellules P19 indifférenciées

Les cellules P19 ont été obtenues originalement du Dr M. W. McBurney (Université d'Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada), et cultivées en monocouches selon le protocole décrit par Maltais *et al.*, 2003 et Ducharme *et al.*, 2010. Toutes les solutions servant à la culture cellulaire ont été stérilisées et utilisées à 37°C. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C et dans un milieu complet  $\alpha$ -Modified Eagle's Essential Minimum ( $\alpha$ -MEM; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplémenté de 10% (v/v) de sérum foetal bovin (FBS; Wisent Inc, St-Bruno, Qc, Canada), de 50 U/mL de pénicilline et de 50 µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Les passages cellulaires ont été effectués tous les deux jours, soit quand les cultures atteignaient 70-80% de confluence. Le milieu de culture a été aspiré et les cellules rincées deux fois avec du tampon phosphate salin [PBS : NaCl 0.8% (p/v), KCl 0.02% (p/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02% (p/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.115% (p/v), pH 7,3]. Les cellules ont été par la suite décollées par incubation dans une

solution de trypsine 0.025% (p/v) (Sigma-Aldrich) contenant 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich). L'action de la trypsine a été arrêtée par l'addition d'un volume de milieu complet. Les cellules ont été transférées dans un tube à centrifuger de 15 mL (Sarstedt/Cedarlane, Burlington, ON, Canada) et individualisées par pipettages. Les cellules ont été comptées sous microscope inversé TE (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada) à l'aide d'un hémacytomètre (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada), et réensemencées à raison d'un million de cellules dans un pétri tissulaire Sarstedt de 100 mm de diamètre contenant 10 mL de milieu complet.

### **2.3.2 Différenciation neuronale des cellules P19**

Le protocole de différenciation neuronale des cellules P19 s'effectue sur 4 à 6 jours. Au jour zéro (J0) de la différenciation, 1.5 millions de cellules ont été ensemencés dans un pétri bactériologique de 100 mm de diamètre (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada) contenant 10 mL de milieu de différenciation :  $\alpha$ -MEM supplémenté de 5% (v/v) FBS et de 5% (v/v) de sérum de boeuf adulte (PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada), d'antibiotiques (50 U/mL de pénicilline et 50 U/mL de streptomycine) et de 0.5  $\mu$ M d'AR (Sigma Aldrich). Le milieu de différenciation a été remplacé à J2 par une nouvelle solution du même milieu et les cellules réincubées jusqu'à J4. Durant ces quatre jours d'exposition à l'AR, les cellules forment des sphéroïdes flottants dans lesquels les cellules se différencient en neurones. À J4, les agrégats ont été transférés dans un tube de 15 mL (Sarstedt/Cedarlane). Le milieu de différenciation a été retiré puis les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS et dissociées par pipetages dans une solution de PBS contenant 0.025% (p/v) de trypsine et 1 mM d'EDTA. La réaction a été arrêtée par un même volume de milieu complet. Les cellules individualisées ont été lavées avec du PBS, resuspendues dans du milieu NBS [milieu Neurobasal supplémenté de 2% (v/v) de B27 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), 0.5 mM de L-glutamine, 50 U/mL de pénicilline et 50

U/mL de streptomycine], puis comptées. Ce milieu dépourvu de sérum permet la croissance des neurones et décourage celles des fibroblastes. Les cellules ont ensuite étéensemencées à une densité de 800 cellules/mm<sup>2</sup> dans des pétris de grade tissulaire de 60 mm de diamètre (Sarstedt/Cedarlane), préalablement gélatinisés et cultivées jusqu'à J6. La gélatinisation des surfaces de culture a été faite avec une solution de 0.1% (p/v) de gélatine (Sigma-Aldrich) dans l'eau nanopure stérile durant 20 min, suivie d'un rinçage avec du PBS stérile, d'une incubation avec du milieu  $\alpha$ -MEM complet et d'un autre rinçage avec du PBS. La gélatinisation favorise l'adhérence des cellules au pétri en absence de sérum dans le milieu de culture.

### 2.3.3 Traitement des neurones P19

À moins d'indication contraire, le traitement des neurones P19 avec différents composés a débuté à J4 de la différenciation neuronale, au moment de l'ensemencement des neurones dans les pétris tissulaire de 60 mm de diamètre (Sarstedt/Cedarlane) dans du milieu (NBS) ( $t = 0$  h). La CP (0,5 mg/mL), la Ser<sub>2</sub>Cu (50-250  $\mu$ M), l'His<sub>2</sub>Cu (250  $\mu$ M), le CuCl<sub>2</sub> (50-250  $\mu$ M), le CuSO<sub>4</sub> (250  $\mu$ M), l'AMPc (1  $\mu$ M), la combinaison SBTI (100  $\mu$ g/mL) et Aprotinine (30  $\mu$ g/mL) (SBTI/Apro), l'inhibiteur Y15 (1  $\mu$ M) ont été ajoutés seul ou en combinaison dans le milieu de culture lors de l'ensemencement. L'AMPc, l'Y15, le SBTI et l'Aprotinine proviennent de Sigma-Aldrich. Les cultures témoins ne contiennent que les cellules dans le milieu NBS. Après un temps d'incubation défini (30 min à 48 h), les jeunes neurones ont été analysés morphologiquement pour évaluer l'agrégation neuronale puis récoltés pour la préparation des lysats cellulaires. Les milieux de culture ont aussi été récoltés.

Dans certains cas, les neurones P19 ont étéensemencés dans les pétris tissulaires de 100 mm de diamètre (Sarstedt/Cedarlane) dans du milieu NB-ITA (milieu Neurobasal contenant 1 $\mu$ g/mL d'insuline, 5 $\mu$ g/mL de transferrine et 10 $\mu$ g/mL de BSA)

à  $t=0$  h. Après un temps d'incubation de 8 h à 24 h, les milieux de cultures ont été récoltés afin d'être concentrés puis analysés.

## **2.4 Évaluation de l'agrégation neuronale**

L'agrégation neuronale a été estimée par la surface occupée par des cellules. Les cultures de jeunes neurones P19 ont été prises en photos à l'aide d'un microscope inversé Nikon muni d'un objectif Ph1 DL (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), équipé d'une caméra Nikon Digital Sight U2 et contrôlé par le logiciel NIS-Elements Advanced Research 3.0. Les photos ont été placées sous une grille de 638 carrés de 56 mm<sup>2</sup> chacun. Les carrés occupés par les neurones à plus de 50% ont été comptés. L'agrégation fait diminuer le nombre de carrés occupés

## **2.5 Préparation des échantillons de milieux de culture et d'extraits cellulaires**

### **2.5.1 Collecte des milieux de culture neuronaux**

À 24 h post-traitement, les milieux de cultureensemencés dans du milieu NB-ITA ont été récoltés puis des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés aux concentrations finales suivantes: 5 mM d'EDTA, 100  $\mu$ M de 1,10-phénanthroline et 1/300 du Cocktail d'inhibiteurs de protéases de Sigma-Aldrich. Les milieux contenant de la CP, ont été dilués 2 fois avec de l'eau distillée, puis incubés avec 3 mL de billes d'AE-agarose, durant 1 h à 4°C, suivi d'une autre incubation de 50 min à 4°C. Les milieux ont été clarifiés par centrifugation, puis concentrés 30 à 50 fois par centrifugation dans des tubes équipés de filtres ayant une porosité de 5K (Spin-X<sup>®</sup> UF Concentrator, Corning<sup>®</sup>), et entreposés à -20°C jusqu'à l'analyse par immunobuvardage de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine..

### 2.5.2 Préparation des lysats cellulaires

À J6 de la différenciation neuronale, les inhibiteurs de protéases (1/300 Cocktail 1 Sigma-Aldrich) et des inhibiteurs de phosphatases (1 mM d'orthovanadate de sodium et 1 mM de NaF) ont été ajoutés au milieu de culture, puis les neurones adhérents à la surface du pétri ont été grattés. Les suspensions ont été transférées dans des tubes Sarstedt de 15 mL et centrifugées à 1000 g pendant 1 min à température pièce. Le culot cellulaire a été suspendu dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,6, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (v/v) désoxycholate, 0.1% (v/v) sodium dodécyl sulfate (SDS) (tous de Sigma-Aldrich)), supplémenté avec 1 mM orthovanadate de sodium, 1 mM de NaF et 1/300 de cocktail-1 d'inhibiteurs de protéases de Sigma-Aldrich. Le tout a été incubé à 4°C pendant 30 min puis centrifugé à 14 000 g pendant 10 min à l'aide d'une microcentrifugeuse Eppendorf 5415C. Les surnageants (extraits de protéines totales) ont été dosés pour leur contenu en protéines (voir section 2.6).

### 2.6 Dosage des protéines

Le dosage a été réalisé selon une micro-méthode à base d'acide bicinchoninique (BCA) (Pierce Chemical, Rockford, Illinois, USA) car cette technique n'est pratiquement pas affectée par les détergents. Le réactif a été préparé selon les recommandations du fabricant. Dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits, 150 µl d'échantillon, préalablement dilué, a été ajouté à 150 µl de réactif BCA. La microplaque a été incubée pendant 2 h à 37°C puis lue à 562 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (SpectraMax M2, Molecular Devices, Californie, USA). Des solutions de 0 à 40 µg/mL de BSA ont été préparées dans l'eau distillée et utilisées pour faire la courbe d'étalonnage.

## **2.7 Électrophorèse et immunobuvardage**

### **2.7.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)**

Les échantillons ont été préparés dans du tampon d'échantillon (62.5 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% (v/v) glycérol, 2% (p/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoéthanol et 6.2% (p/v) bleu de bromophénol). Puis ils ont été bouillis pendant 3 min à 100°C, clarifiés par centrifugation et chargés sur gel de 10% polyacrylamide en présence de SDS. Les échantillons ont migré durant 15 min à 100 volts puis 1 h 15 min à 150 volts dans du tampon de migration (1% (p/v) SDS, 3% (p/v) Tris et 14% (p/v) glycérine). L'appareil utilisé a été le Mini-Protean TetraCell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie, USA). Un mélange de marqueurs de poids moléculaire (Bio Basic Inc., Ontario, Canada) a aussi été déposé sur gel. La  $\beta$ 1-intégrine (dans toutes les occasions) et quelques fois la CP ont été analysées en conditions non-réductrices pour ne pas défaire les pont disulfures interchaines. Dans ces cas, le tampon d'échantillon ne contenait pas de 2-mercaptoéthanol. Après l'électrophorèse, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie ou transférés sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) puis analysés par immunobuvardage.

### **2.7.2 Coloration au bleu de Coomassie**

Les gels ont été incubés dans une solution de bleu de Coomassie (40% (v/v) de méthanol, 10% (v/v) d'acide acétique et 0.1% (p/v) de bleu de Coomassie) pendant 1 h puis lavés au minimum trois fois durant 15 min avec la solution de décoloration (40% de méthanol, 10% d'acide acétique). Par la suite, les gels ont été transférés sur papier cellophane pour séchage durant 48 h.

### 2.7.3 Électrotransfert

Après l'électrophorèse, les gels ont été équilibrés durant 5 min dans un tampon de transfert (10 mM Tris, 96 mM glycine, 0.01% SDS et 20% (v/v) méthanol). Ensuite les gels ont été déposés sur des membranes de PVDF (Boehringer-Mannheim, Montréal, Québec, Canada) préalablement activées pendant 1 min dans du méthanol, lavées dans l'eau nanopure et équilibrées pendant 15 min au minimum dans le tampon de transfert. L'assemblage gel/membrane PVDF a été placé dans un système demi-sec Trans-blot SD (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA). La durée du transfert a été de 35 min, à un voltage de 15 volts pour 1-2 gels et 20 volts pour 3-4 gels (selon le cas). À la fin du transfert, les membranes ont été mises dans un tampon de blocage constitué de tampon Tris salin-Tween 0.1% (TBS-Tw: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0.1% (v/v) Tween (Sigma-Aldrich)), supplémenté avec 3% (p/v) lait écrémé en poudre ou 3% (p/v) de BSA, pendant 1 h minimum, sous agitation douce.

### 2.7.4 Immunobuvardage

Après le transfert des protéines, les membranes ont été lavées avec du TBS-Tw (quatre fois 15 min), puis incubées avec l'anticorps primaire pendant 1 h minimum sous agitation douce. Après avoir subi une série de lavages dans du TBS-Tw, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort (POD) puis rincées avec du TBS-Tw. La détection a été faite par chimioluminescence en incubant la membrane dans 2 mL du réactif Immobilon Western Chemiluminescence HRP Substrate (Millipore, Nepean, ON, Canada) pendant 1 min et en l'exposant à un film HyBlot CL (Denville Scientific Inc., Toronto, ON, Canada). Les anticorps dirigés contre un épitope intracellulaire ont été utilisés partout sauf dans les expériences de délestages. Les anticorps primaires et secondaires sont listés dans les tableaux 2.1 et 2.2 respectivement.

## 2.8 Mesure de la viabilité cellulaire avec le MTT

Les neurones de J4 ont étéensemencés dans des plaques tissulaires (Sarstedt) de 12 puits à raison de  $0,75 \cdot 10^6$  cellules, et cela en absence (contrôle) ou en présence de composés à cuivre. À J6, les neurones ont été lavés avec du tampon HEPES salin [HBS-G/ $\text{Ca}^{2+}$ /Mg : HEPES (20 Mm), D-glucose (20 mM), NaCl (140 mM), KCl (4 mM),  $\text{CaCl}_2$  (1.8 mM) et  $\text{MgCl}_2$  (0.8 mM), pH=7,4] puis ont été incubés pendant 3 h à  $37^\circ\text{C}$  dans 500  $\mu\text{L}$  du même tampon contenant 0.5 mg/mL de MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (Sigma-Aldrich). Par la suite, les cristaux formés ont été dissouts dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), puis l'absorbance a été lue à 550 nm et 664 nm. La viabilité a été déterminée en soustrayant l'absorbance de 664 nm à celle de 550 nm et rapportée à la valeur des neurones de contrôle (Nikkhah *et al.*, 1992).

## 2.9 Statistiques

Chaque expérience a été réalisée au minimum trois fois. Les données de toutes les expériences ont été analysées avec la version 2013 d'Excel. L'analyse statistique a été faite en utilisant le test *t* de Student. Une valeur de  $P < 0.05$  a été utilisée pour identifier des différences significatives.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 Synthèse d'AE-agarose et caractérisation de préparations de CP

Une méthode de purification de la CP, à partir de plasma bovin, et comportant une seule étape chromatographique sur AE-agarose, a été publiée en 1988 par le groupe de Musci et Calabrese (Calabrese *et al.*, 1988). Le matériel chromatographique était synthétisé selon une procédure en deux temps : 1) la réticulation de billes d'agarose Sépharose 4B avec de l'épichlorhydrine pour augmenter la résistance chimique et physique du gel, puis 2) le greffage de groupements amino avec le chloroéthylamine. Ce greffage était réalisé à raison de 43,3 g de chloroéthylamine pour 100 mL de gel. La CP obtenue par cette méthode était jugée pure sur la base d'un rapport  $Abs_{610nm}/Abs_{280nm} \geq 0,04$  et d'une homogénéité électrophorétique par SDS-PAGE (Calabrese *et al.*, 1988). Une modification de la méthode a été publiée par le groupe de Mateescu. Cette modification consistait à utiliser de l'agarose déjà réticulé du marché, le Superose 6B (Wang *et al.*, 1994) ou le Sepharose CL-4B (Buisson, 1993). Le groupe de Musci et Calabrese a aussi apporté une modification à son protocole initial : il a un peu plus que doublé la proportion de chloroéthylamine en utilisant 100 g de ce réactif par 100 mL de billes (Musci *et al.*, 1993). La capacité de rétention de la CP est passée à 9 mg/mL de billes comparativement à la valeur de 0,82 rapportée par Wang *et al.* (1994).

Dans le présent travail, nous avons finalement combiné les deux modifications. Nous avons premièrement, fabriqué une résine d'AE-agarose à partir d'agarose déjà réticulé (Sépharose CL-6B) et en utilisant 43,3 g de chloroéthylamine par 100 mL de billes. Cette résine retenait faiblement la CP : elle se colorait en bleu pâle lors de

l'application de l'échantillon de CP et un volume équivalent à environ 300 mL de résine était nécessaire pour lier environ 220 mg de CP à partir de 10 L de plasma. La capacité de rétention de cette résine était ainsi d'environ 0,72 mg de CP/mL de résine, similaire à la valeur de 0,82 rapportée par Wang *et al.* (1994) (Tableau 3.1). Deuxièmement nous avons doublé la quantité de chloroéthylamine. Cela a permis de quintupler la capacité de retenir la CP (3,6 mg de CP/mL de billes); cette résine se colorait en bleu foncé lors du dépôt de l'échantillon de CP. Cependant, cette capacité accrue s'est révélée tout de même moindre que celle de 9 mg de protéine/ml de billes rapportée par Musci *et al.* (1993). D'un côté, la proportion un peu plus élevée en chloroéthylamine utilisée par ces chercheurs pourrait expliquer la rétention supérieure. D'un autre côté, la réticulation-maison faite avec l'épichlorhydrine par Musci *et al.* (1993) pourrait avoir laissé plus de sites libres pour le greffage sur l'agarose que la réticulation industrielle faite avec du 2,3-dibromopropanol (brochure « Filtration sur gel - théorie et pratique », Pharmacia Fine Chemicals). Notons que, dans notre cas, l'augmentation de la capacité de rétention de la CP en utilisant plus de chloroéthylamine a légèrement amélioré le rapport  $A_{610nm}/A_{280nm}$  (Tableau 3.1), l'amenant à la valeur seuil utilisée dans la littérature pour indiquer une préparation pure ( $\geq 0,040$ ; (Lovstad, 1981)).

Tableau 3.1 Performance de résines d'AE-agarose.

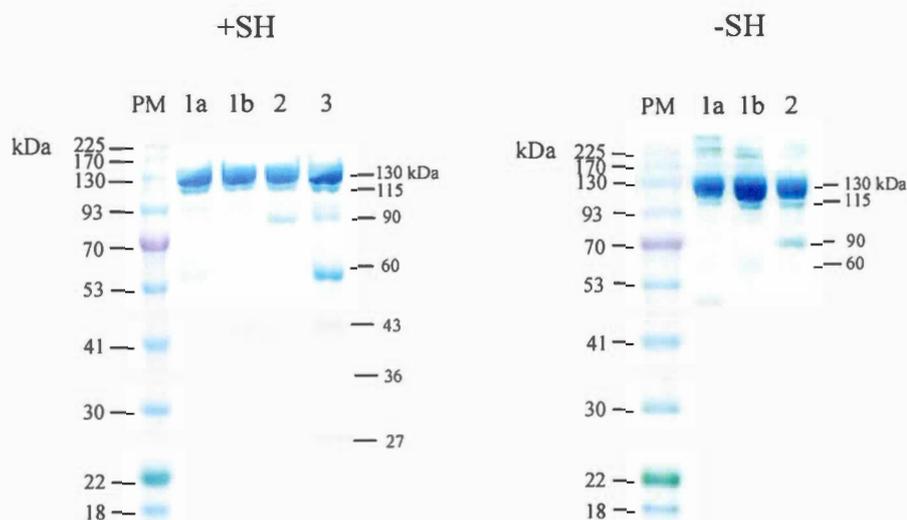
Capacité de rétention de la résine	mg de CP retenue par mL de résine (moyenne)	mg de CP récupérée par L de plasma (moyenne)	$\frac{A_{610nm}}{A_{280nm}}$
Faible (n=2)	0,72/mL <sup>a</sup>	36,3	0,035
Forte (n=2)	3,6/mL <sup>b</sup>	28,3	0,041

<sup>a</sup> En utilisant une résine d'AE-agarose générée à partir de 43,3 g de chloroéthylamine par 100 mL de billes, Wang et al (1994) rapportent une capacité de rétention de 0,82 mg de CP/mL d'AE-agarose et un rapport  $A_{610nm}/A_{280nm}$  au-delà de 0,040.

<sup>b</sup> En utilisant une résine d'AE-agarose générée à partir de 100 g de chloroéthylamine par 100 mL de billes, Musci et al (1993) rapportent une capacité de rétention de 9 mg de CP/mL d'AE-agarose.

Les préparations de CP ont été analysées par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. Trois des préparations sont montrées sur la Fig. 3.1. En présence de 2-mercaptoéthanol (+ SH), on observe une bande fortement majeure à 132 kDa accompagnée d'une bande plus faible aux environs de 115 kDa et cela, aussi bien pour la résine de faible capacité (pistes 1a et 1b) que pour celle de forte capacité (pistes 2 et 3) (Fig. 3.1 +SH). Ces deux bandes sont caractéristiques des préparations de CP (Aouffen *et al.*, 2001), sauf pour la piste 3 que nous discutons après, la combinaison de l'intensité de coloration de ces deux bandes compte en moyenne pour 90% ou plus de la coloration totale. Nous voyons une faible bande à environ 50 kDa dans la piste 1a et une faible bande à environ 90 kDa dans la piste 2, dont l'identité n'est pas connue, mais qui pourraient être des fragments de la CP (Dwulet et Putnam, 1981). Le profil électrophorétique de la préparation de CP 3 montre que le lavage de la résine avec 30 mM KPi, pH 7,2, avant l'élution est important pour la pureté finale de la préparation. Le nombre accru de bandes pour cette 3<sup>e</sup> préparation, s'accorde avec un rapport

$A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  plus faible et avec le fait que les bandes de 130 et 115 kDa contribuent ensemble à 65% de la coloration totale. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature une analyse SDS-PAGE en conditions non-réductrices. Dans de telles conditions (Fig. 3.1 -SH), nous voyons le doublet de 130 et 115 kDa de la CP, en accord avec l'existence d'une seule chaîne polypeptidique pour cette protéine. Les bandes de faible intensité dans les préparations 1a et 2 sont de même nombre en absence qu'en présence de 2-mercaptoéthanol, indiquant qu'il n'y aurait pas de ponts disulfures interchaînes dans ces protéines. En effet, pour la piste 1a, nous avons une bande d'environ 50 kDa pour -SH et +SH, et pour la piste 2, nous avons une bande d'environ 90 kDa pour -SH et +SH.



**Figure 3.1 Profils électrophorétiques de trois préparations de CP.** Gels de 10% de polyacrylamide obtenus par SDS-PAGE en présence (+SH) ou en absence (-SH) de 2-mercaptoéthanol, suivi d'une coloration au bleu de Coomassie. Les poids moléculaires des protéines étalons (PM) sont indiqués à gauche des gels, ceux des bandes observées dans les autres puits (5  $\mu$ g de protéines/puits) sont indiqués à droite. La préparation de CP 1 a été faite avec de l'AE-agarose de faible capacité; l'échantillon 1a ( $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0,036$ ) correspond aux fractions chromatographiques les plus concentrées en CP (milieu du pic de CP); l'échantillon 1b ( $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0,035$ ) correspond à une repurification, sur la même résine, du pool de fractions retrouvées au début et à la fin du pic de CP. La préparation de CP 2 ( $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0,040$ ) a été faite avec de l'AE-agarose de forte capacité. La préparation de CP 3 ( $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0,032$ ) a aussi été faite avec une résine de forte capacité mais il n'y a pas eu de lavage avec 30 mM KPi, pH 7,2 avant l'élution. Les résultats montrent que ce lavage est important pour la pureté de la CP.

Le bilan de purification pour la préparation 2 de CP est présenté dans le tableau 3.2. Nous avons obtenu un enrichissement en CP d'environ 2000, ce qui est plus élevé que la valeur de 860 déjà rapportée (Wang *et al.*, 1994). Nous nous retrouvons donc avec une préparation 2000 fois enrichie et présentant une  $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  de 0,040 alors

que la préparation de Wang *et al.*, enrichie de près de 900 fois, présente un rapport d'absorbance de 0,056. Possiblement, il pourrait y avoir une hétérogénéité des molécules de CP concernant la teneur dans les trois types de cuivre entre les préparations.

Des travaux préliminaires que j'ai réalisés avec Houda Salmi ont montré que le rivaroxaban inhibe l'action neuroagréative de la CP (Salmi, 2015). Comme le rivaroxaban est reconnu être un inhibiteur spécifique du facteur X de coagulation (Flierl *et al.*, 2013 ; Somjen *et al.*, 2013 ; Thomas *et al.*, 2013), ces résultats soulevaient la possibilité qu'une contamination de nos préparations de CP par le facteur X puisse être la véritable source de l'action de la CP. Aussi, nous avons analysé la teneur en facteur X dans nos préparations de CP. Le tableau 3.2 montre une très faible contamination de la préparation de CP par le facteur X (environ 1%). Le facteur X activé est inhibable par le SBTI et l'Aprotinine et peut se lier au SBTI-agarose. L'analyse d'une préparation de CP avant et après chromatographie sur une colonne de SBTI-agarose n'a pas fait varier la teneur en facteur X (non montré), indiquant que ce facteur est probablement sous sa forme zymogène. Il pourrait toutefois être activé au contact des neurones. En connaissant le degré d'activité du facteur X dans nos préparations, nous avons traité les neurones P19 avec du facteur X commercial dans les quantités retrouvées dans nos préparations de CP. Les effets du rivaroxaban et du facteur X sur l'agrégation des neurones ont été comparés à ceux d'une préparation de CP (Fig. 3.2). Les panneaux A et B confirment que l'agrégation neuronale due à la préparation de CP est inhibée en présence du rivaroxaban. Par contre, le facteur X lui-même, dans la concentration utilisée, n'a pas induit de neuroagréation (Fig. 3.2 C-D). Ce qui nous laisse penser que c'est la CP, et non les traces de facteur X, qui est la cause de la neuroagréation.

Dans les études qui suivent, nous avons utilisé des préparations de CP ayant une activité spécifique  $\geq 860$  U/mg de protéines. Ces préparations avaient un rapport  $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  de 0.040-0.043, sauf une avec un rapport de 0.036.

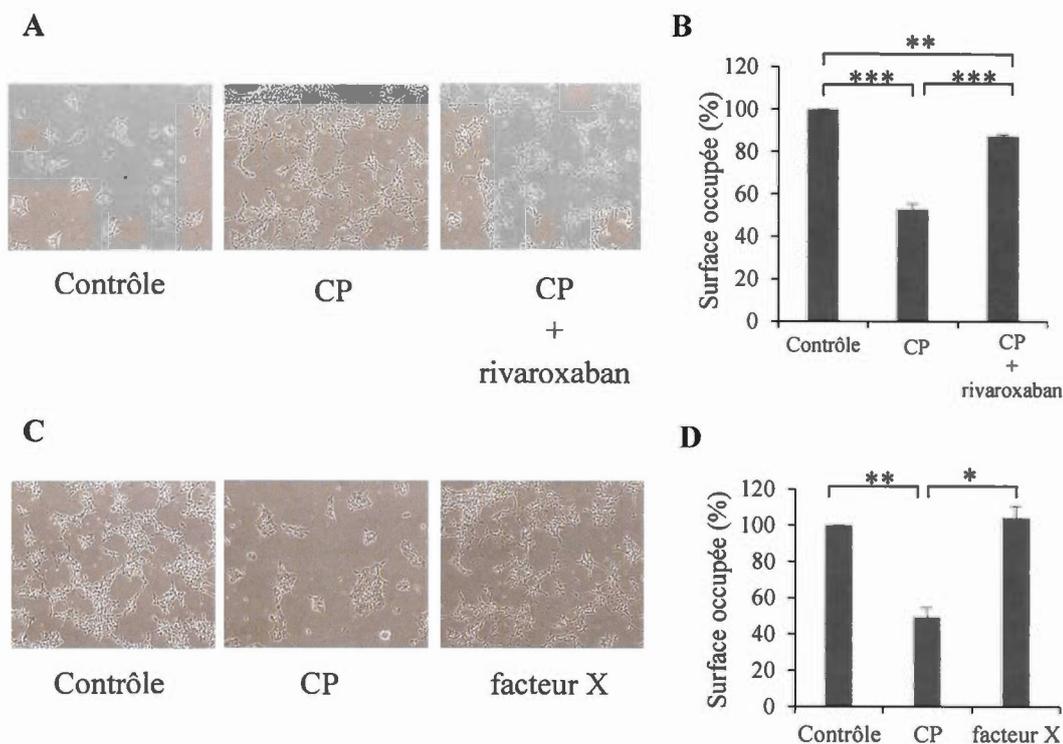
Pour chaque étude, au moins deux préparations différentes ont été utilisées et les résultats ont été les mêmes d'une préparation à l'autre.

**Tableau 3.2 Bilan de la préparation de CP 2 sur AE-agarose de forte capacité de rétention.**

Paramètre	Plasma	Échantillon avant chromatographie	Échantillon final
<b>Volume total (mL)</b>	8250	1150	10
<b>Protéines totales (mg)</b>	3 951 503	174 260	254
<b>Activité CP totale (U)</b>	1 636 594	388 944	230 188
<b>Activité CP spécifique (U/mg de protéines)</b>	0,414	2,23	906
<b>Rendement en CP (%)</b>	100	24	14
<b>Enrichissement en CP</b>	1	5,4	2 188 <sup>a</sup>
<b>Activité fX totale (U)</b>	8 498	2 105	16
<b>Activité fX spécifique (U/mg de protéines)</b>	0,0022	0,012	0,061
<b>Rendement en fX (%)</b>	100	25	0,18
<b>Enrichissement en fX</b>	1	5,6	29
<b>Contamination de la CP par le fX (%)</b>	100	104	1,3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> L'enrichissement est le rapport de l'activité spécifique dans l'échantillon sur l'activité spécifique dans le plasma. L'enrichissement rapporté dans le tableau est basé sur l'activité oxydasique mesurée dans le tampon KPi, pH 7,0 (1 Unité = 0.9 mDO/min/µg de protéine). L'enrichissement basé sur la même activité mais mesurée dans le tampon NaAc, pH 5,2, (Musci *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1994) donne une valeur similaire (2506).

<sup>b</sup> La contamination par le facteur X est obtenue en comparant l'enrichissement en fX par rapport à l'enrichissement en CP. Nous avons aussi évalué cette contamination d'une autre façon en mesurant l'activité de coagulation du fX acheté chez Sigma-Aldrich (# F9320-50UG). Nous avons retrouvé une activité spécifique de 179 U/mg de fX pur, la quantité totale de fX dans l'échantillon final correspondrait à 0,087 mg, soit 0,034% de la quantité de protéines.



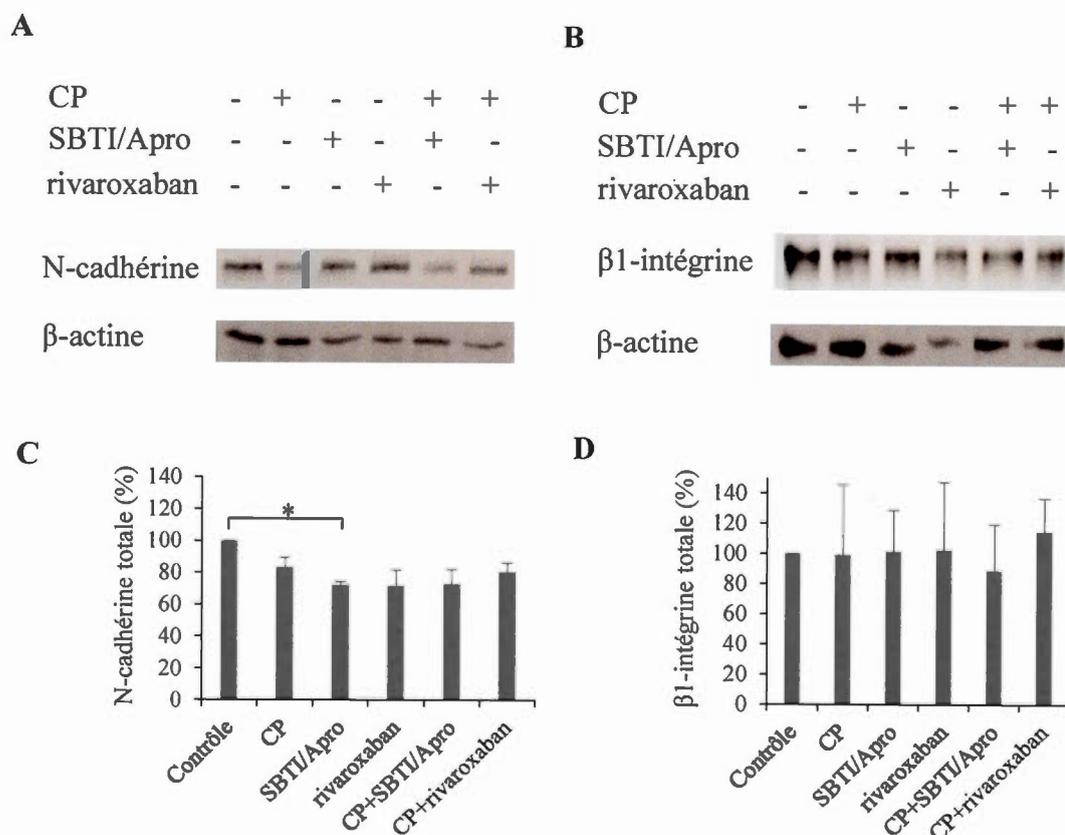
**Figure 3.2 La neuroagrégation n'est pas induite par le facteur X présent dans la préparation CP et est inhibée par le rivaroxaban.** Les neurones de J4 ont été incubés, jusqu'à J6, en absence (contrôle) ou en présence de CP (0,5 mg/mL), du facteur X (1,56 U/mL) et de rivaroxaban (10µM). (A, C) Photographies (100x) de cultures cellulaires au J6. (B, D) Évaluation de la surface occupée par les cellules sur les photographies pour quatre études indépendantes, i.e quatre séries de cellules à des temps différents (moyenne et écart sur la moyenne). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. Le symbole \* indique une différence significative (\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.005$ ).

### **3.2 Effet de la CP sur l'expression de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine dans les cultures de neurones P19**

L'action neuroagrégate de la CP pourrait être due à une action directe ou indirecte sur les interactions cellule-cellule (neurone-neurone) et/ou sur les interactions cellules-MEC. Pour les différentes raisons présentées aux sections 1.4.1 (d) et 1.4.2 (d) nous nous sommes intéressés en particulier aux molécules d'adhérence N-cadhérine et  $\beta$ 1-intégrine.

#### **3.2.1 La CP, la combinaison SBTI/Apro et le rivaroxaban n'influencent pas les niveaux totaux de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine à 48h.**

Nous avons d'abord déterminé si les niveaux totaux de N-cadhérine et de  $\beta$ 1-intégrine dans les neurones P19 ont été affectés par le traitement de 48h (J4 à J6) avec 0.5 mg/ml de CP. Ce n'est pas le cas (Fig 3.3). Considérant que la combinaison SBTI/Apro et le rivaroxaban inhibent l'action neuroagrégate de la CP (Salmi 2015), nous avons aussi testé l'influence de ces inhibiteurs de protéases sur la N-cadhérine et la  $\beta$ 1-intégrine. Sauf dans le cas du SBTI/Apro pour la N-cadhérine, ces inhibiteurs seuls ou utilisés avec la CP n'ont pas affecté les niveaux des deux protéines d'adhérence cellulaire (Fig 3.3 C-D). Le fait que la combinaison SBTI/Apro diminue le niveau de N-cadhérine va peut-être avec le fait qu'en présence de cette combinaison, les neurones P19 apparaissent plus étalés que les neurones contrôle.



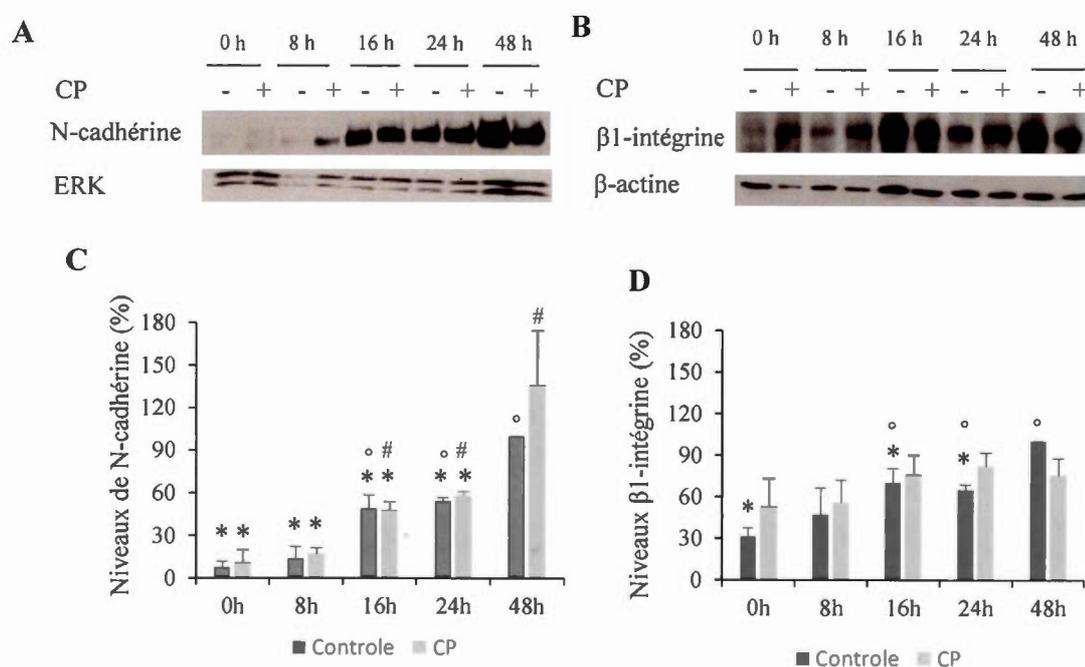
**Figure 3.3 La CP, la combinaison de SBTI/Apro et le rivaroxaban n'influencent pas les niveaux totaux de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine à 48h.** Les neurones de J4 ont été incubés en absence (contrôle), ou en présence de CP (0,5 mg/mL), de SBTI (100  $\mu$ M), d'Apro (30  $\mu$ M), de rivaroxaban (10  $\mu$ M). (A, B) Immunobuvardage représentatif des niveaux intracellulaire de la N-cadhérine (132 kDa en conditions réductrices) et de la  $\beta$ 1-intégrine (135 kDa en condition non-réductrices), respectivement. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme un témoin endogène du chargement en protéines. (C, D) Analyse densitométrique de différents immunobuvardages de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine, respectivement. L'intensité de signal de chacune de ces protéines a d'abord été normalisée par l'intensité de signal de la  $\beta$ -actine correspondante, puis exprimée en pourcentage par rapport au contrôle. Les résultats sont rapportés avec une moyenne et un écart-moyen d'au moins trois études indépendantes. Le symbole \* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.2 La CP n'affecte pas l'évolution temporelle des niveaux totaux de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine.

Nous avons raffiné l'analyse en étudiant le profil d'expression dans les lysats cellulaires totaux à différentes heures entre 0 h et 48 h (Fig. 3.4). À chaque temps étudié, on constate qu'il n'y a pas de différence significative en présence ou absence de CP dans les neurones P19, ce qui montre que le niveau d'expression de ces molécules d'adhérence cellulaire n'est pas influencé par la CP. Cependant, dans les cultures contrôle comme celles traitées avec de la CP, on observe de faibles niveaux de N-cadhérine à 0 h et 8 h, et une nette augmentation à partir de 16h et ce, jusqu'à 48 h (Fig. 3.4 A et C). Pour la  $\beta$ 1-intégrine, il y a aussi une augmentation de l'expression totale de 0h à 16h (environ 2.5 fois) mais elle est moins prononcée que celle de N-cadhérine (environ 6 à 7 fois) (Fig. 3.4 B et D). De plus, les niveaux cellulaires totaux se stabilisent plus tôt (dès 16h) que ceux de la N-cadhérine.

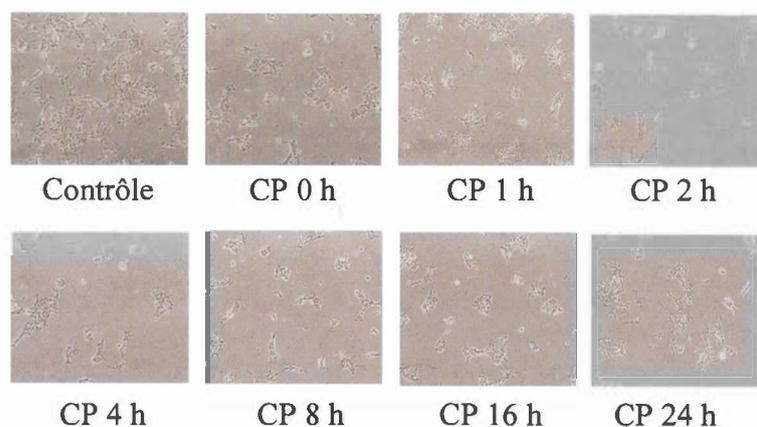
Les faibles niveaux d'expression de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine de 0 h à 8 h pourraient créer un contexte cellulaire favorable à l'action neuroagrégate de la CP. Aussi, on a voulu savoir si l'agrégation des neurones est particulièrement déclenchée en ajoutant la CP entre 0 h et 8 h. En ajoutant la CP dans cet intervalle de temps, on observe une neuroagrégate (Fig. 3.5 A) qui fait diminuer de plus de la moitié la surface occupée par les neurones (Fig. 3.5 B). Par contre l'agrégation des neurones se produit aussi en ajoutant la CP à 16 h ou à 24 h.

L'action neuroagrégate de la CP semble donc insensible aux niveaux totaux de N-cadhérine et  $\beta$ 1-intégrine.

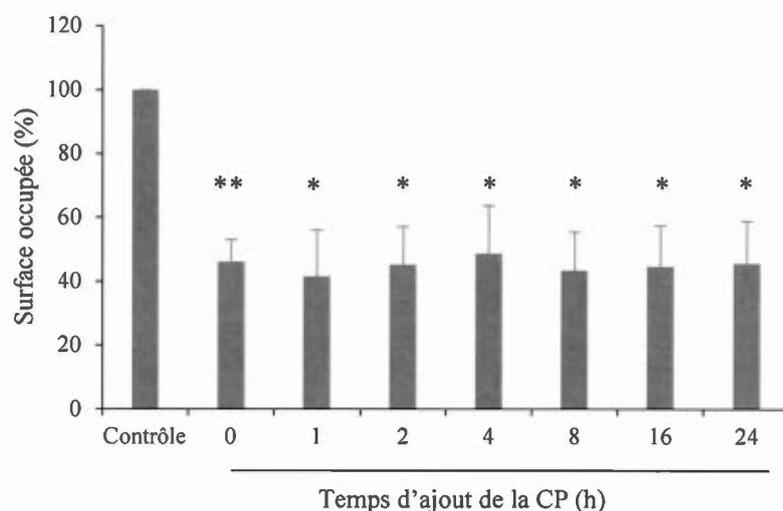


**Figure 3.4 La CP n'affecte pas l'évolution temporelle des niveaux totaux de la N-cadhérine et de la β1-intégrine.** Les neurones de J4 ont été incubés en absence (contrôle), ou en présence de CP (0,5 mg/mL) puis ont été récoltés à 0h, 8h, 16h, 24h et 48h. (A, B) Immunobuvardage représentatif de la N-cadhérine et de la β1-intégrine intracellulaires, respectivement. La β-actine ou la kinase ERK ont été utilisées comme témoins endogènes du chargement en protéines. (C, D) Analyse densitométrique de différents immunobuvardages de la N-cadhérine et de la β1-intégrine, respectivement. Pour chacune de ces protéines, l'intensité de signal d'un échantillon donné a d'abord été normalisée par l'intensité de signal de son témoin endogène, puis exprimée en pourcentage par rapport au traitement contrôle de 48h. Les résultats sont rapportés avec une moyenne et un écart-moyen sur la moyenne d'au moins trois études indépendantes. Le symbole \* indique une différence significative avec le contrôle de 48h, le symbole ° indique une différence significative entre un échantillon contrôle d'un temps donné et l'échantillon contrôle de 0h, et le symbole # indique une différence significative entre un échantillon CP d'un temps donné et l'échantillon CP de 0h. Il n'y a aucune différence significative entre le traitement contrôle et le traitement CP pour chacun des temps étudiés.

A



B



**Figure 3.5 La neuroagrégation est déclenchée en ajoutant la CP entre 0h et 24h.**

Les neurones de J4 ont été incubés en absence (contrôle) ou en présence de CP (0,5 mg/mL) ajoutée à différents temps jusqu'à 24h. (A) Photographies (100x) des cultures cellulaires des neurones de J6. (B) Évaluation de la surface occupée par les cellules de J6. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle, et rapportés avec une moyenne et l'écart-moyen (voir symboles statistiques). Le symbole \* indique une différence significative avec le contrôle ( $p < 0.05$ ).

### 3.2.3 Analyses des niveaux de surface pour la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine

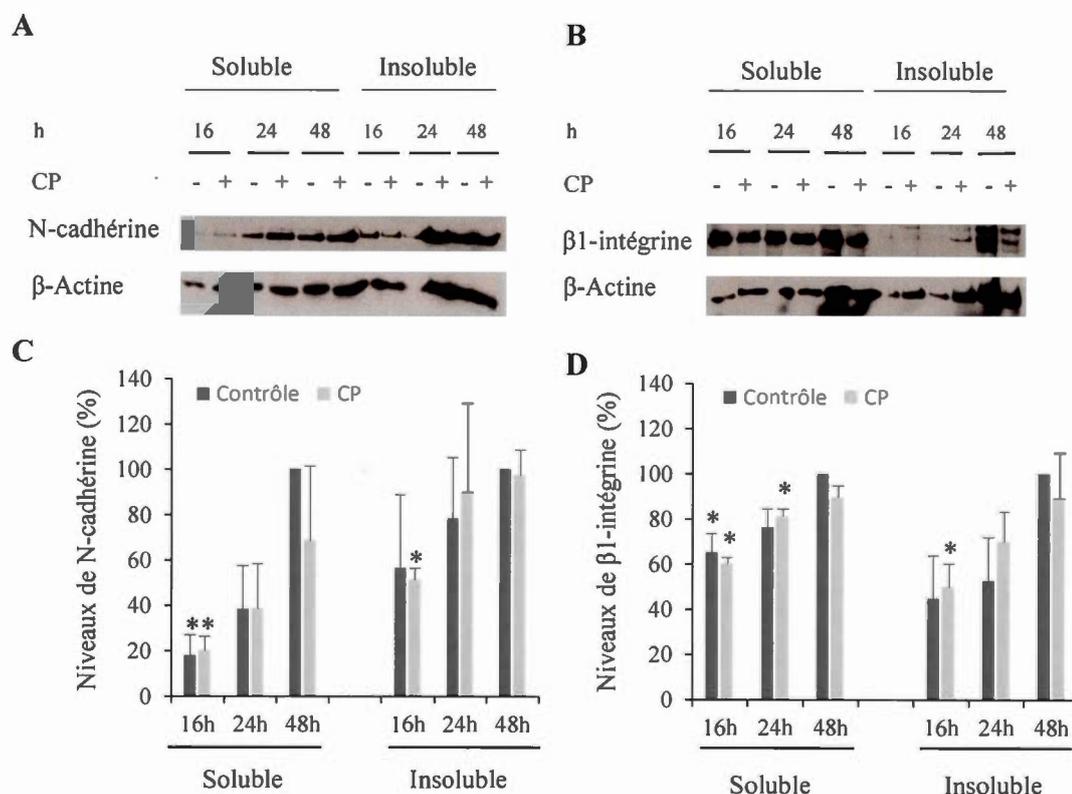
Nous avons pensé que la CP pourrait induire des changements dans les niveaux de N-cadhérine et de  $\beta$ 1-intégrine localisées à la surface cellulaire. Pour étudier cette possibilité, nous avons utilisé différentes approches: taux de solubilité dans le Triton X-100, taux de marquage suite à une biotinylation des protéines de la surface cellulaire, taux de délestage dans le milieu de culture, et phosphorylation de FAK.

#### a) La CP n'affecte pas la distribution de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine dans les fractions cellulaires solubles et insolubles dans le Triton X-100

Lorsqu'elles sont engagées dans des liens d'adhérence cellulaire, les molécules de N-cadhérine et de  $\beta$ 1-intégrine à la surface cellulaire deviennent insolubles dans le Triton X-100 (Causeret *et al.*, 2005 ; Leong *et al.*, 2000 ; Yao *et al.*, 2012). Nous avons donc lysé les cellules avec ce détergent puis centrifugé les suspensions cellulaires pour séparer la fraction insoluble (culot) de la fraction soluble (surnageant). Les deux fractions ont été analysées par immunobuvardage. L'évaluation a été faite pour des cultures de 16 h et plus à cause des faibles niveaux de N-cadhérine en bas de 16 h (Fig. 3.4).

L'analyse de la N-cadhérine dans le traitement contrôle montre que ses niveaux d'expression augmentent de façon progressive entre 16 h et 48 h que l'on soit dans la fraction soluble ou insoluble (Fig. 3.6 A et C). Il n'y a pas de différence significative entre le traitement contrôle et celui avec la CP. Dans la fraction soluble, la  $\beta$ 1-intégrine a tendance à augmenter entre 16 h et 48 h en absence ou en présence de CP, cependant on peut observer une augmentation dans sa portion insoluble entre 16 h et 48 h (Fig. 3.6 B et D) bien que cela soit légèrement significatif. De plus, les figures 3.6 A et 3.6 B montrent que la proportion des molécules de  $\beta$ 1-intégrine retrouvées dans la fraction insoluble par rapport à la fraction soluble est plus faible que dans le cas de la N-

cadhérine. On peut donc dire que l'engagement des molécules de  $\beta$ 1-intégrine est plus faible que celui des molécules de N-cadhérine. L'adhérence cellule-MEC médiée par la  $\beta$ 1-intégrine pourrait être désavantagée par rapport aux interactions cellule-cellule médiée par la N-cadhérine. Si la CP n'a pas d'impact sur l'expression ou l'engagement de ces deux molécules d'adhésion, son action neuroagréative pourrait bénéficier d'un contexte où les interactions cellule-cellule seraient mieux installées que les interactions cellule-MEC.



**Figure 3.6 La CP n'affecte pas la distribution de la N-cadhérine et la  $\beta 1$ -intégrine dans les fractions cellulaires solubles et insolubles dans le Triton X-100.** Les neurones de J4 ont été incubés en absence (contrôle) ou en présence de CP (0,5 mg/mL) pour différents temps puis lysés en présence de Triton X-100 pour générer les fractions solubles et insolubles dans ce détergent. (A, B) Immunobuvardage représentatif de la N-cadhérine et de la  $\beta 1$ -intégrine intracellulaires, respectivement. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme témoin endogène du chargement en protéine. (C, D) Analyse densitométrique de différents immunobuvardages de la N-cadhérine et de la  $\beta 1$ -intégrine respectivement dans la fraction soluble et insoluble. Pour chacune de ces protéines, l'intensité de signal de chaque échantillon a d'abord été normalisée par l'intensité de signal de la  $\beta$ -actine, puis exprimée en pourcentage par rapport au contrôle de 48h dans leur fraction respective. Les résultats sont rapportés avec une moyenne et un écart-moyen d'au moins trois études indépendantes. Le symbole \* indique une différence significative avec le contrôle de 48h ( $P < 0.05$ ). Il n'y a aucune différence significative entre le traitement contrôle et le traitement CP correspondant.

### **b) Essais de marquage de la N-cadhérine de surface cellulaire**

Nous avons tenté de marquer les protéines de surface des neurones P19, avec la biotine (annexe 1.1), afin de déterminer l'impact de la CP sur la quantité de N-cadhérine et de  $\beta$ 1-intégrine acheminée à la membrane plasmique plutôt que sur leurs niveaux totaux dans la cellule. Nous avons commencé avec la N-cadhérine, avec l'idée d'étendre cette stratégie à la  $\beta$ 1-intégrine si elle fonctionnait bien. Les résultats n'ont pas été encourageants aussi bien avec la stratégie utilisant des billes de Neutravidine-agarose que celle basée sur l'immunoprécipitation de la N-cadhérine. Les signaux étaient absents ou trop faibles, et peu reproductibles.

Nous avons aussi voulu étudier l'effet de la CP sur l'expression de la N-cadhérine et la  $\beta$ 1-intégrine à la surface de neurones P19 par cytométrie de flux. Malheureusement, les neurones P19 se sont révélés fragiles aux procédures de détachement et nous avons eu de la difficulté à assurer leur viabilité. Les résultats de cytométrie sont donc peu fiables. La fragilité pourrait venir de deux faits :

- a) Plusieurs neurones sont reliés les uns autres par des projections neuritiques difficiles à défaire sans digestion enzymatique. D'autre part, une digestion enzymatique est aussi nécessaire pour défaire les agrégats induits par la CP. Dans les deux cas, une digestion prolongée peut nuire aux cellules.
- b) Les neurones sont cultivés en absence de sérum, donc probablement exposés à moins de facteurs nourriciers.

Nous avons aussi envisagé d'évaluer l'expression de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine de surface par microscopie de fluorescence. Nous avons mis cette approche de côté considérant que l'agrégation pouvait diminuer l'accès aux anticorps entre les cellules et semer un doute sur l'interprétation des résultats.

### c) Étude du délestage de la N-cadhérine et de la $\beta$ 1-intégrine dans les milieux de culture

De nombreuses molécules d'adhérence cellulaire perdent leurs domaines extracellulaires dans le milieu extracellulaire à la suite de protéolyses post-traductionnelles (Sadeqzadeh *et al.*, 2014). Ce processus est souvent désigné comme un délestage ou "shedding" du domaine extracellulaire. Les métalloprotéases de la famille ADAM ainsi que les métalloprotéases matricielles (MMP) sont des enzymes impliquées dans le clivage du domaine extracellulaire de molécules d'adhérence (Dwivedi *et al.*, 2009 ; Paudel *et al.*, 2013). Les fragments solubles libérés agissent comme des agonistes ou antagonistes pour réguler des fonctions cellulaires comme l'apoptose, l'adhérence, la croissance, la migration et la différenciation cellulaire (Sadeqzadeh *et al.*, 2014).

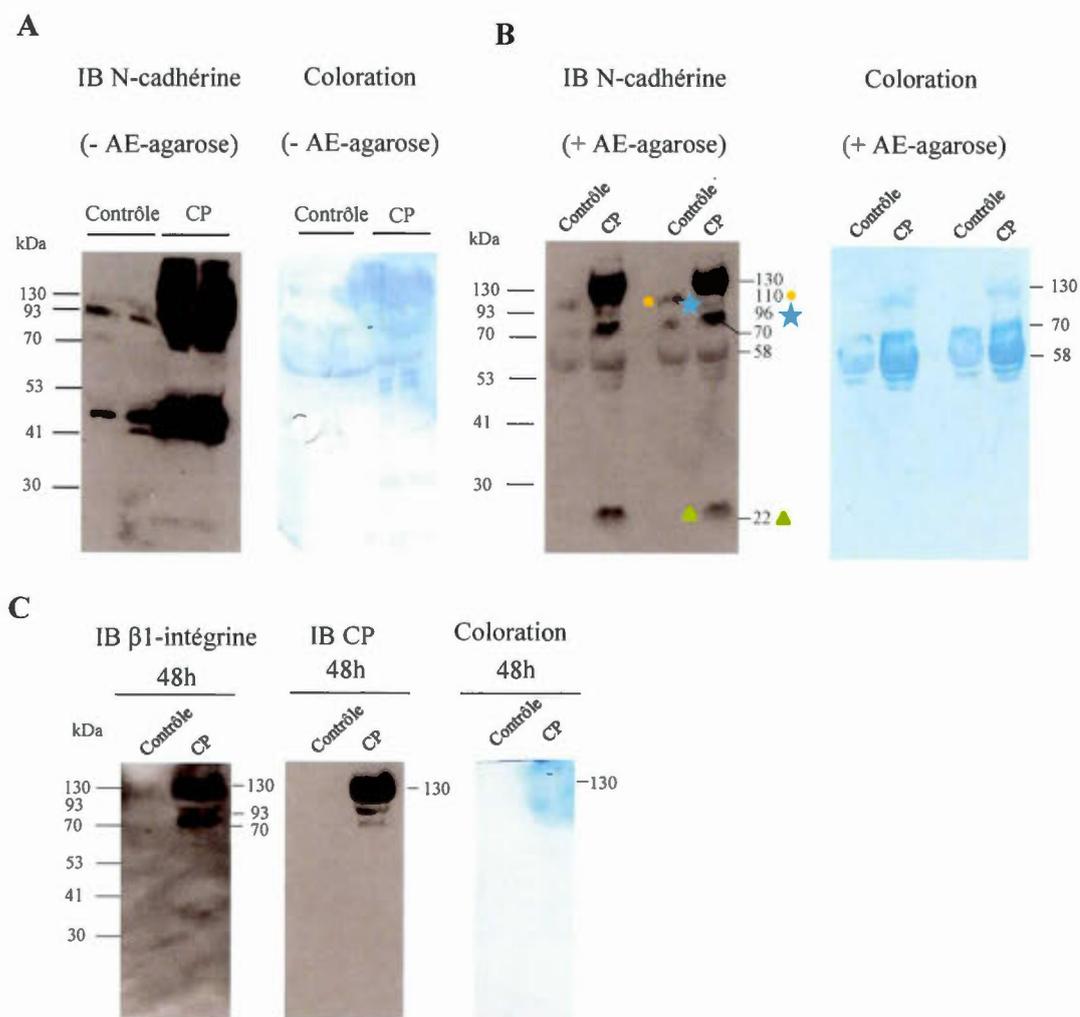
Ici, on a voulu savoir si la CP induit un délestage de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine de surface. Les milieux de cultures ont été concentrés 50 fois par centrifugation sur filtre de porosité 3K, puis analysés par immunobuvardage avec un anticorps reconnaissant la partie extracellulaire de la protéine. Les résultats du 1<sup>er</sup> essai (Fig. 3.7 A) montrent la présence de bandes distinctes dans le milieu contrôle (~90 et 50 kDa) mais dans le milieu de traitement avec la CP, on observe deux zones d'excès en protéines : une première zone s'étendant du haut du gel jusqu'à 70kDa, et une deuxième dans la région de 40-50kDa. La concentration des milieux a amené une surconcentration de la CP qui interfère dans l'analyse des signaux spécifiques de la N-cadhérine. L'anticorps anti N-cadhérine se lie non spécifiquement aux bandes riches en protéine. Suite à cela, nous avons décidé d'appauvrir le milieu en CP en l'incubant avec des billes d'AE-agarose avant l'immunobuvardage (Fig. 3.7 B). On peut remarquer la présence de plusieurs bandes dans les pistes CP à 130, 96, 70, 58 et 22 kDa ce qui diffère du contrôle où l'on observe la présence de bandes à 110, 70 et 58 kDa. La bande de 110 kDa (cercle orange), qui ne semble pas se retrouver dans les pistes CP, serait due à la N-cadhérine. Elle n'est pas due à une absorption non spécifique de l'anticorps

anti-N-cadhérine à une protéine abondante puisqu'il n'y a pas de signal de protéines coloré à cette hauteur. Par contre, les bandes de 70 et 58 kDa retrouvées dans toutes les pistes de l'immunobuvardage de N-cadhérine pourraient être dues à une adsorption non spécifique de l'anticorps anti N-cadhérine puisqu'elles correspondent à des protéines abondantes par coloration. Les bandes de 96 kDa (étoile bleue) et de 22 kDa (triangle vert) des pistes CP seraient aussi dues à la N-cadhérine puisqu'elles ne correspondent pas à des bandes colorées, surtout la 22 kDa (donc, on ne peut pas parler d'adsorption non spécifique de l'anticorps). Ces deux bandes pourraient provenir du clivage de la bande de 110 kDa. Il reste tout de même encore un peu de CP dans le milieu concentré traité à l'AE-agarose. Pour la Fig. 3.7 C, les milieux incubés avec l'AE-agarose ont aussi été analysés par immunobuvardage pour la  $\beta$ 1-intégrine. Aucune bande appartenant à la  $\beta$ 1-intégrine n'est visible dans le contrôle ou dans le traitement avec la CP lors de la coloration (Fig. 3.7 C). En effet, la bande visible correspondrait à de la CP.

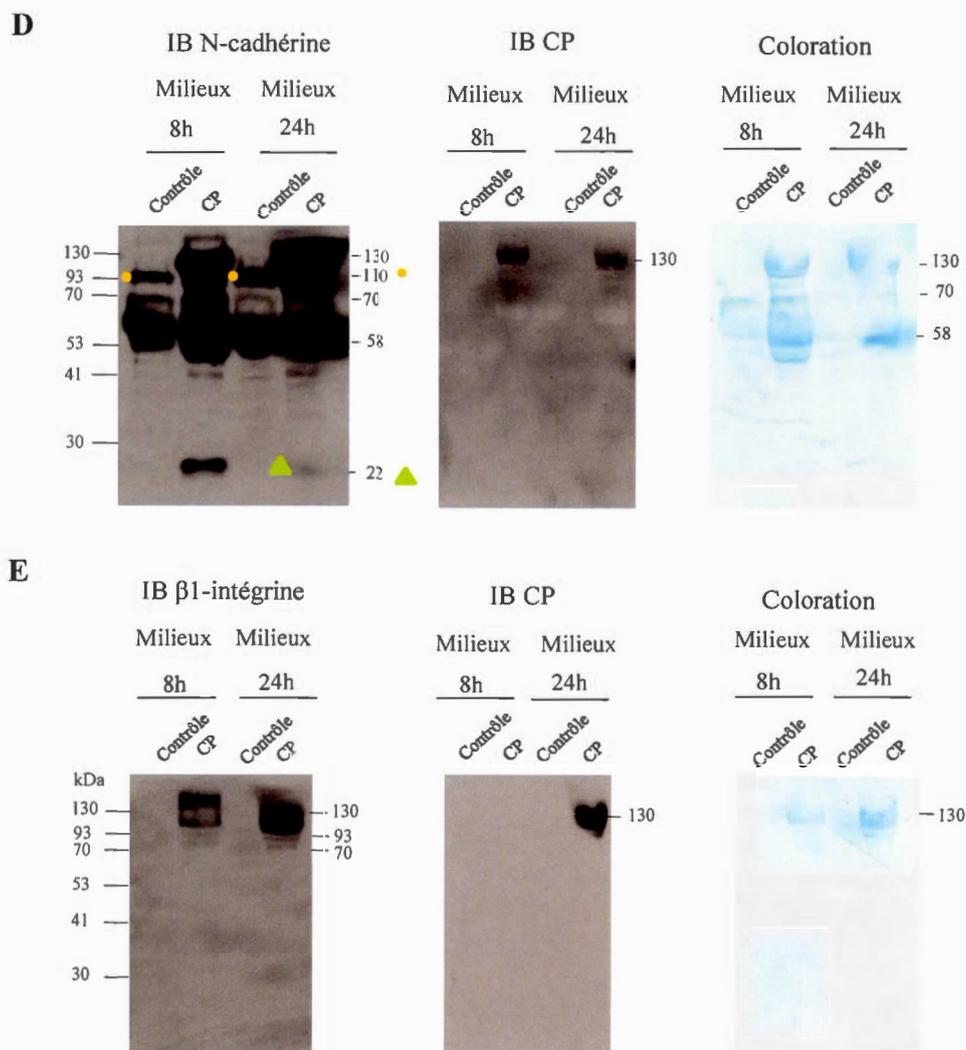
Par la suite, on a voulu savoir si le délestage de ces molécules d'adhérence pouvait avoir lieu avant 48h (Fig. 3.7 D, E). Pour la N-cadhérine, la bande de 110 kDa (cercle orange) est visible à 8 h et 24 h dans les pistes contrôle. Il est difficile de distinguer les espèces de 110 et 96 kDa dans les pistes CP à cause de l'excès des protéines. Par contre, l'espèce de 22 kDa (triangle vert) est visible à 8 h et 24 h dans les pistes CP et absentes dans les pistes contrôle. Notons qu'il y a diminution d'intensité pour celle à 24 h. Cela pourrait-être dû à une différence de chargement en protéines. Nous n'avons pas encore trouvé une bonne façon d'assurer un chargement égal pour l'analyse des milieux. En ce qui concerne la  $\beta$ 1-intégrine, aucun changement, aucune bande n'est détectable, sauf pour celle correspondant à de la CP.

Donc, de toutes ces informations, on peut en déduire que la CP semble induire la libération d'une petite portion de la N-cadhérine extracellulaire dans le milieu de culture. Cet évènement demeure modeste puisque le fragment de 22 kDa qui le suggère

est détecté après avoir été concentré 50 fois. Cependant, l'étude de la  $\beta$ 1-intégrine n'a pas montré de libération de fragment extracellulaire dans le milieu de culture.



**Figure 3.7 Étude du délestage extracellulaire de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine par immunobuvardage.** (A) Des neurones de J4 ont été cultivés pendant 48h en absence (contrôle) ou en présence de CP (0.5 mg/ml) dans du milieu NB-ITA pauvre en protéines. Les milieux de culture ont été recueillis, concentrés 50 fois, et analysés par immunobuvardage (IB) de la N-cadhérine extracellulaire. La membrane IB a ensuite été colorée au bleu de Coomassie. (B) Comme en A, sauf qu'une étape d'incubation avec des billes d'AE-agarose a été ajoutée avant l'étape de concentration. Les milieux ont été analysés en double. (C) Comme en B, sauf que des IB ont été faite pour la  $\beta$ 1-intégrine extracellulaire et la CP (suite à la page suivante).



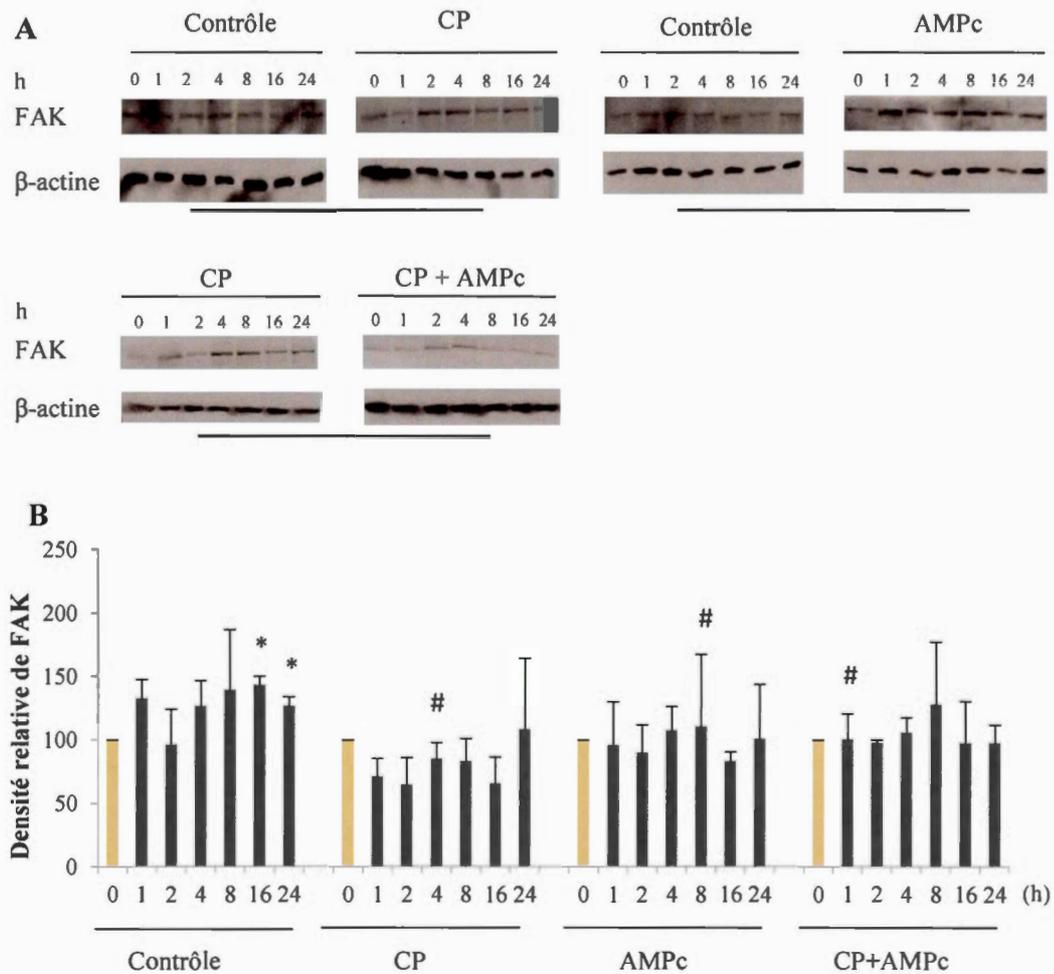
**Figure 3.7 (suite) Étude du délestage extracellulaire de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine par immunobuvardage. (D, E) Milieux de 8h et 24h. La taille (kDa) et la position des marqueurs de poids moléculaire sont indiquées à gauche des figures, la taille des bandes est indiquée à droite. Trois sont indexées avec des puces de couleurs : bandes à 110 kDa (●), 96 kDa (★) et 22 kDa (▲).**

#### d) Étude des niveaux d'expression de FAK et p-FAK

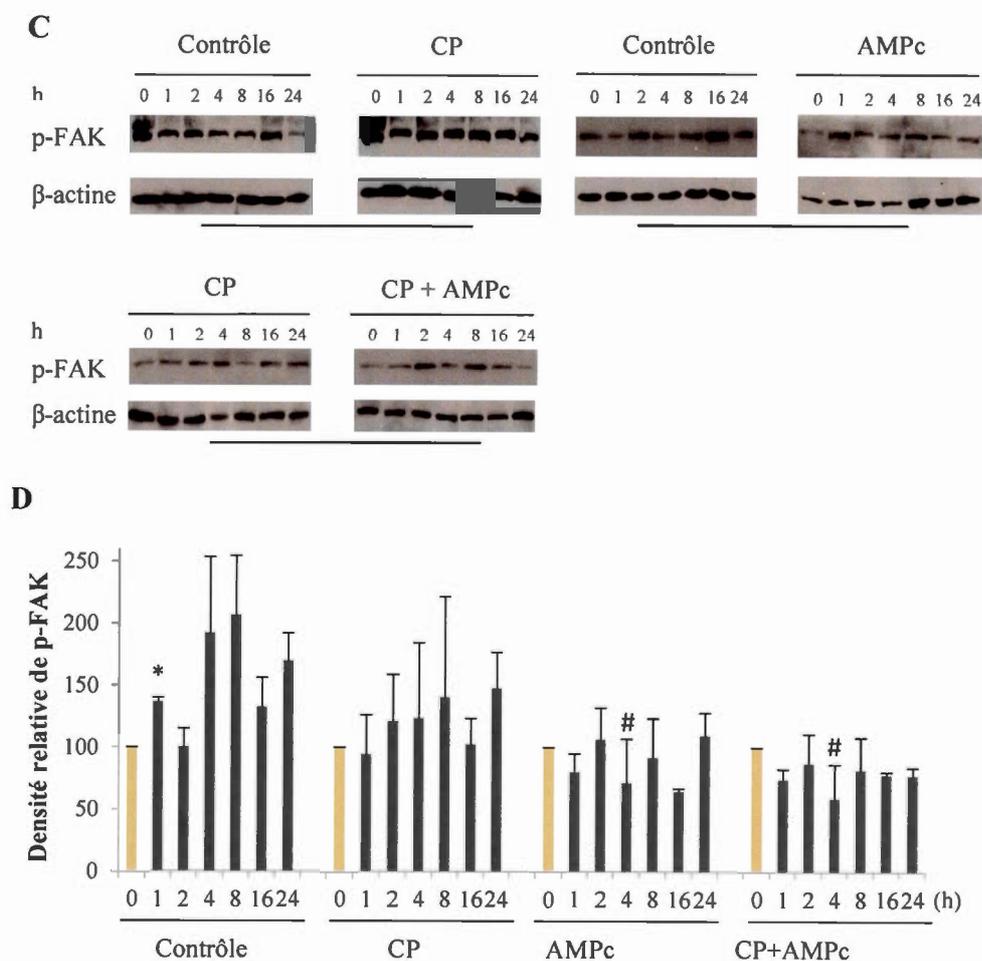
FAK est une protéine kinase omniprésente et fortement exprimée dans le cerveau (Peng et Guan, 2011) qui joue un rôle important dans l'adhérence et la survie cellulaire (Wang *et al.*, 2012). Elle est une composante de la signalisation des intégrines. En effet, les intégrines peuvent recruter FAK par leur domaine N-terminal et induire la phosphorylation de cette kinase. La phosphorylation de FAK sur la Tyr397 est étroitement liée à une activité catalytique accrue de FAK et, par conséquent à une augmentation de la phosphorylation de tyrosines de d'autres protéines d'adhérence focale (Parsons, 2003):

Dans cette expérience, nous avons voulu savoir si la CP pouvait affecter la signalisation des intégrines en étudiant la phosphorylation de FAK. Dans la figure 3.8, on constate peu de variation significative du niveau total de FAK (panneaux A+B) dans le temps pour chacun des traitements, celui du contrôle et de la CP. Le niveau de p-FAK (panneaux C+D), tend à augmenter entre 0 h et 8 h pour le contrôle et la CP même si il n'y a pas vraiment de différence significative. Toutefois, on observe une tendance de la CP à augmenter le rapport p-FAK/FAK au cours du temps (panneau E).

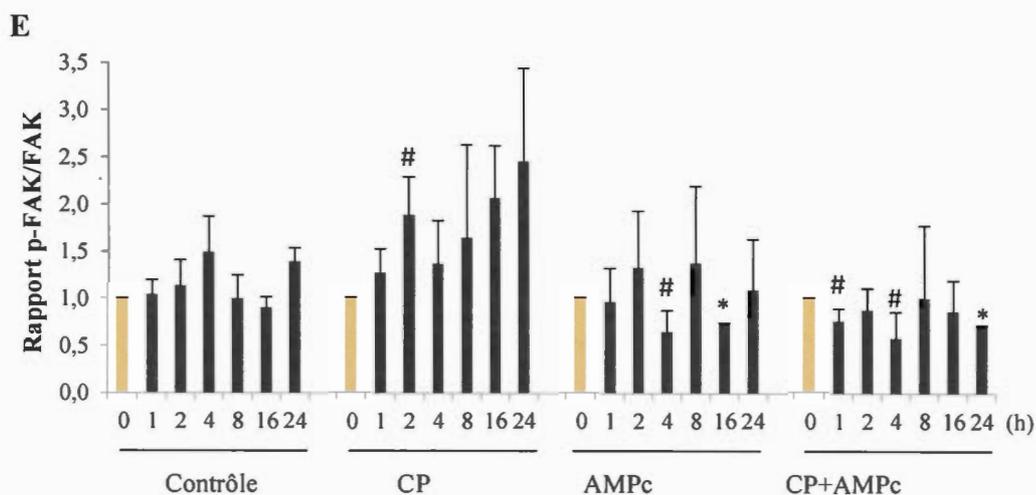
Dans les mêmes études, nous avons aussi analysé l'effet de l'AMPc. En effet, en plus d'avoir une action inhibitrice sur l'agrégation des neurones provoquée par la CP (Ducharme, 2013), il a été montré que l'AMPc peut activer la fonction des  $\beta$ 1-intégrines (Ivins *et al.*, 2004 ; Whittard et Akiyama, 2001). Dans les conditions où il y a de l'AMPc (AMPc et CP+AMPc), il y a peu de variation significative sur les niveaux de FAK et p-FAK (Fig. 3.8 B+D) ainsi que sur les rapports pFAK/FAK (Fig. 3.8 E). Il semble y avoir toutefois une baisse de ce rapport en comparaison des traitements contrôle et CP (Fig. 3.8 E). Ceci suggère une légère influence de l'AMPc sur la  $\beta$ 1-intégrine.



**Figure 3.8 Effet de la CP et de l'AMPC sur la signalisation de FAK et p-FAK.** Les neurones de J4 ont été incubés en absence (contrôle) ou en présence de CP (0.5 mg/mL) et d'AMPC (1 mM) puis ont été récoltés aux temps indiqués pour des études d'immunobuvardage. (A) Immunobuvardage représentatif de FAK. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme témoin endogène du chargement en protéine. Les panneaux reliés par un trait horizontal sous l'immunobuvardage  $\beta$ -actine proviennent d'un même gel. (B) Analyse densitométrique de FAK. (suite à la page suivante)



**Figure 3.8 (suite) Effet de la CP et l'AMPc sur la signalisation de FAK et p-FAK.** (C) Immunobuvardage représentatif de p-FAK. La  $\beta$ -actine a été utilisée comme témoin endogène du chargement en protéine. Les panneaux reliés par un trait horizontal sous l'immunobuvardage  $\beta$ -actine proviennent d'un même gel. (D) Analyse densitométrique p-FAK. (suite à la page suivante).

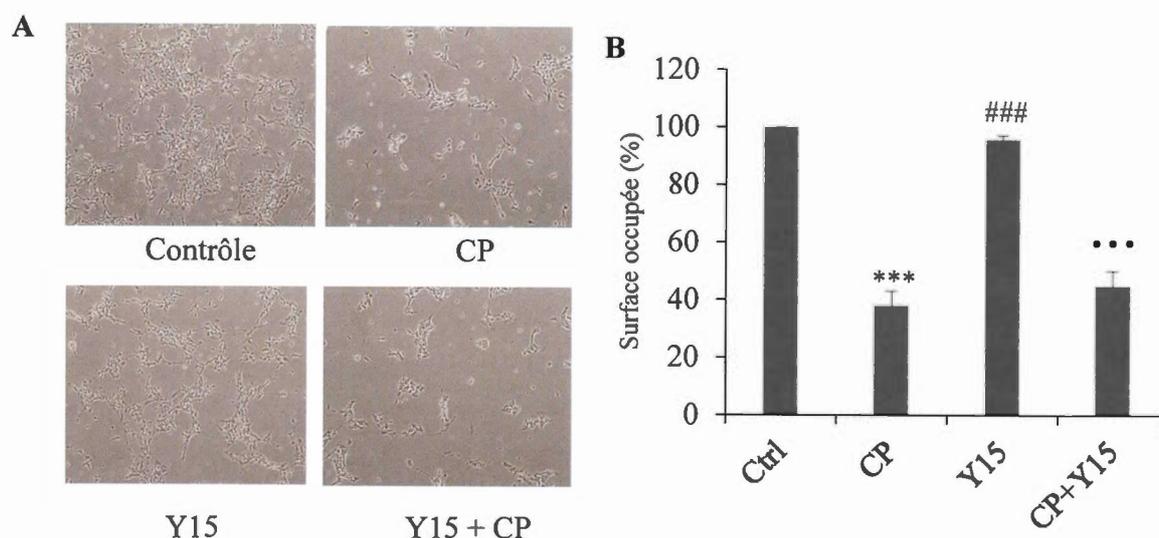


**Figure 3.8 (suite) ) Effet de la CP et l'AMPc sur la signalisation de FAK et p-FAK. (E) Analyse densitométrique p-FAK/FAK.** L'intensité de signal a d'abord été normalisée par l'intensité de signal de  $\beta$ -actine, puis exprimée en pourcentage par rapport au traitement contrôle de 0h. FAK et p-FAK ont été analysés dans les mêmes expériences avec les mêmes échantillons. Les résultats sont rapportés avec une moyenne et un écart-moyen sur la moyenne d'au moins trois études indépendantes. Le symbole \* indique une différence significative avec le contrôle de 0h et le symbole #, une différence significative avec le contrôle du même temps ( $P < 0.05$ ).

#### e) Y15 n'est ni pro-agrégatif, ni anti-neuroagréatif

En dernier lieu, pour s'assurer que l'action neuroagréative de la CP n'avait pas d'influence sur la voie intégrine/FAK ni n'était influencée par cette voie, nous nous sommes intéressés à une petite molécule, le 1,2,4,5-benzène-tétramine tétrachlorhydrate (Y15) qui a pour effet d'inhiber la phosphorylation de FAK (Golubovskaya *et al.*, 2008). Les résultats de la figure 3.9 montrent qu'Y15 n'empêche pas l'étalement des neurones et les cultures traitées avec Y15 montrent le même

étalement que les cultures contrôle. De plus, la présence d'Y15 n'empêche pas l'action neuroagrégitve de la CP.



**Figure 3.9 Y15 n'est ni pro-agrégatif, ni anti-neuroagrégitif.** Les neurones de J4 ont été traités en absence (contrôle) et en présence de CP (0.5 mg/ml) et/ou d'Y15 (1 μM). Y15 a été ajouté 1 heure avant l'ajout de la CP. **(A)** Photographies (100x) des cultures des neurones de J6. **(B)** Évaluation de la surface occupée par les cellules à J6. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle, et rapportés avec une moyenne et l'écart-moyen de quatre études indépendantes. Le symbole \*\*\* indique une différence significative avec le contrôle ( $P < 0.005$ ), ### représente une différence significative avec la CP ( $P < 0.005$ ), et ... , une différence significative avec Y15 ( $P < 0.005$ ).

### 3.3 Étude sur l'importance du cuivre dans l'agrégation des neurones P19.

#### 3.3.1 Évaluation de l'effet de différents composés à cuivre sur la morphologie et la viabilité de cultures de neurones P19

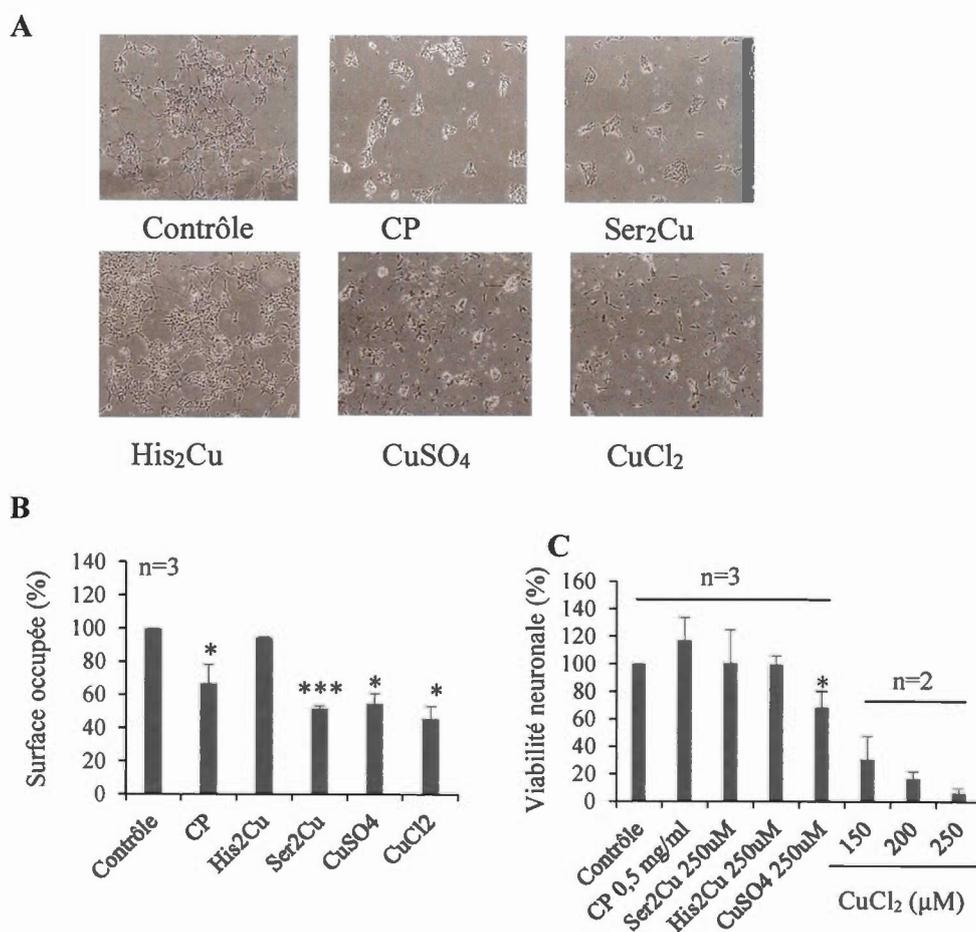
L'effet de certains composés à cuivre sur les neurones P19 a été étudié par Maltais *et al.* (2003). Il a été mentionné que la CP ne compromet pas la viabilité des neurones P19 à une concentration qui induit la neuroagrégation lorsqu'elle est de 0.5 mg/ml ou de 3.8  $\mu\text{M}$ . Comme la protéine contient six atomes de cuivre dans sa structure, cela correspond à une concentration de 22.8  $\mu\text{M}$  de cuivre. Deux sels de cuivre, le  $\text{CuCl}_2$  ainsi que le  $\text{CuSO}_4$ , n'induisent pas de neuroagrégation pour des concentrations allant jusqu'à 49,2  $\mu\text{M}$ . Testés à 246  $\mu\text{M}$ , ils ont causé de la mort cellulaire. L' $\text{His}_2\text{Cu}$  préparé selon la méthode Sarkar, n'induit pas non plus d'agrégation et ce, pour des concentrations allant de 23 à 390  $\mu\text{M}$  (Maltais *et al.*, 2003).

Cependant, la  $\text{Ser}_2\text{Cu}$ , un autre composé à cuivre préparé par l'équipe du Dr. Mateescu selon la méthode de Pop *et al.* (2003), a été testé sur notre modèle P19 et a montré une action neuroagrégative à des concentrations de 100 à 200  $\mu\text{M}$  (Salmi, 2015). Nous nous sommes demandé si le choix de l'acide aminé associé au cuivre ou la méthode de fabrication avait influencé la capacité d'induire une neuroagrégation dans le cas du composé à base de sérine. Nous avons donc évalué l'action neuroagrégative de  $\text{Ser}_2\text{Cu}$  préparée selon la méthode Sarkar. Les résultats de la figure 3.10 A et B confirment l'absence d'effet neuroagrégatif de l' $\text{His}_2\text{Cu}$ . Par contre, la  $\text{Ser}_2\text{Cu}$ , préparé comme l' $\text{His}_2\text{Cu}$  selon la méthode Sarkar, exhibe un tel effet, comme le fait la CP. Le  $\text{CuCl}_2$  et le  $\text{CuSO}_4$  à la même concentration en cuivre que la  $\text{Ser}_2\text{Cu}$ , semble aussi induire une neuroagrégation. Cependant, la présence de nombreuses cellules flottantes dans les cultures, en absence et en présence des composés à cuivre,

suggéraient que la neuroagrégation n'étant qu'apparente, et due probablement à une neurotoxicité de sels de cuivre aux concentrations utilisées.

Nous avons donc effectué un test de viabilité sur les neurones cultivés en absence et en présence des différents composés à cuivre. Nous avons tout d'abord mesuré l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) relâchée dans les milieux qui est une façon simple de mesurer la viabilité. La mortalité cellulaire peut causer un bris de la membrane physique et la relâche de molécules cytoplasmiques telle que la LDH. Cependant, dans un test de vérification fait avec des extraits cellulaires, nous nous sommes aperçu que la  $Ser_2Cu$ , le  $CuCl_2$  et plus faiblement la CP diminuent la réponse de la LDH quand ils sont ajoutés aux extraits cellulaires. Ceci nous laisse penser que ces composés à cuivre peuvent soit inhiber l'activité LDH elle-même, soit interférer dans la lecture du NADH (annexe 2.1). Suite à quoi nous avons opté pour le test MTT qui mesure l'activité mitochondriale. Pour s'assurer d'une échelle de réponse (Abs) suffisamment grande, nous avons d'abord testé différentes densités d'ensemencement cellulaire et avons choisi la densité de  $0,75 \cdot 10^6$  cellules (annexe 2.2). À cette densité quatre fois plus élevée que celle utilisée pour la neuroagrégation, il n'y a pas de neuroagrégation et le MTT peut donc avoir accès à toutes les cellules. La figure 3.10 C montre que la CP, l' $His_2Cu$  et la  $Ser_2Cu$  ne provoquent pas de mortalité neuronale. Toutefois, le  $CuSO_4$  et davantage le  $CuCl_2$  causent une diminution de la viabilité neuronale à des concentrations égales ou supérieures à  $150 \mu M$ .

De toutes ces analyses, on peut penser que le cuivre de la CP est important pour induire la neuroagrégation sans perte de viabilité cellulaire puisqu'un petit composé tel que la  $Ser_2Cu$  reproduit cet effet. Par contre, les sels de cuivre peuvent être toxiques pour les neurones P19. Le cuivre associé à une biomolécule (ici un AA) perd donc de sa toxicité.



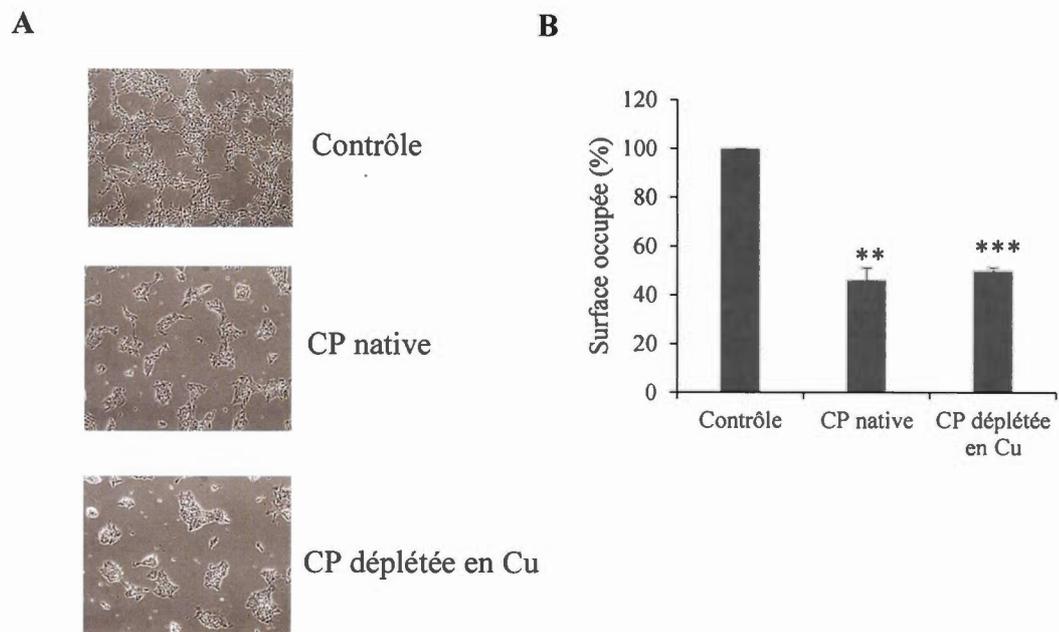
**Figure 3.10 Évaluation de l'effet de différents composés à cuivre sur la morphologie et la viabilité de cultures de neurones P19.** Les neurones de J4 ont été incubés pendant 48h en absence (contrôle), ou en présence de CP, d'His<sub>2</sub>Cu ou de Ser<sub>2</sub>Cu façon Sarkar (S), de CuSO<sub>4</sub> ou de CuCl<sub>2</sub>. **(A)** Photographies (100x) des cultures de neurones et **(B)** Évaluation de la surface occupée par les cellules à 48 h (J6). Dans ces expériences, la concentration de la CP était de 0,5 mg/mL et celle des autres composés de 250 µM. **(C)** Effet des composés à cuivre sur la viabilité neuronale déterminée par le test MTT. Les concentrations sont indiquées. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle, et rapportés avec une moyenne et l'écart-moyen de deux ou trois études indépendantes. Les symboles \* et \*\*\* indiquent une différence significative avec le traitement contrôle (P<0.05 et 0.005, respectivement) lorsqu'il y a eu trois études différentes.

### 3.3.2 La CP déplétée en cuivre et l'agrégation des neurones P19

Le cuivre est un élément essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques et dans la synthèse de neurotransmetteurs (Trocello *et al.*, 2010). Il est même essentiel à la neurogenèse (Fu *et al.*, 2015 ; Gybina *et al.*, 2009 ; Watanabe et Tezuka, 2006). En effet, le chélateur bathocuproïne sulfonate (BCS) inhibe la différenciation neuronale des cellules P19. Nous avons testé le BCS et la D-pénicillamine, un autre chélateur de cuivre, afin de voir s'ils inhiberaient la neuroagrégation induite par la CP et la Ser<sub>2</sub>Cu. Cependant, nous avons été confrontés à certains problèmes techniques, notamment la coloration du milieu de culture en orange et beaucoup de débris cellulaire à J6 lors des traitements incorporant un chélateur de cuivre, et ce même à de très faibles quantités. Donc par manque de temps pour l'ajustement du protocole, nous n'avons pas poursuivi dans cette voie.

Pour évaluer l'importance du cuivre dans l'action neuronale de la CP, nous avons traité la protéine avec du cyanure de sodium (NaCN) pour la déléter de son cuivre en suivant le protocole de Hirano *et al.* (2005). La CP ainsi traitée n'absorbait plus à 610 nm et n'avait plus d'activité oxydasique envers la pPD.

Les résultats de la figure 3.11, nous montre que malgré l'absence ou la diminution du cuivre dans la CP, la protéine a quand même induit une agrégation des neurones (Fig. 3.11 A) avec 50% de la surface occupée par rapport au contrôle (Fig 3.11 B). Le cuivre ne jouerait pas un rôle de premier plan dans l'action neuroagrégative de la CP.



**Figure 3.11 la CP déplétée en cuivre induit la neuroagrégation.** Des neurones de J4 ont été incubés en absence (contrôle), ou en présence de CP native ou déplétée en cuivre (0,5 mg/mL). **(A)** Photographies (100x) des cultures cellulaires à 48h (J6). **(B)** Évaluation de la surface occupée par les cellules à J6. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle, et rapportés avec une moyenne et un écart sur la moyenne de trois études indépendantes. Les symboles \*\*\* indiquent une différence significative avec le contrôle ( $P < 0.005$  et  $P < 0.05$ , respectivement).

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Le projet de recherche de ce mémoire a comporté trois volets : i) synthétiser une nouvelle résine d'AE-agarose capable d'une plus grande rétention de la CP et l'évaluer comme matériel chromatographique dans la purification de la CP, ii) déterminer si l'un des mécanismes de l'action neuroagréative de la CP peut impliquer la N-cadhérine ou la  $\beta 1$ -integrine, deux protéines d'adhérence cellulaire importantes dans le développement du système nerveux, et iii) déterminer dans quelle mesure cette action neuroagréative dépend du cuivre. Nous avons synthétisé une résine d'AE-agarose avec une capacité de rétention de la CP cinq fois plus grande mais son impact sur la pureté finale de la CP n'est pas tout à fait clair. En utilisant différentes approches, nous pouvons dire que la N-cadhérine et la  $\beta 1$ -integrine ne sont pas impliquées dans l'action neuroagréative des préparations de CP. Enfin, alors que le petit composé  $\text{Ser}_2\text{Cu}$  a une action neuroagréative similaire à celle de la CP, la CP appauvrie en cuivre conserve cette action. Nous commentons maintenant les résultats de ces trois volets.

#### **4.1 Purification de la CP**

Nous avons synthétisé une résine d'AE-agarose de plus grande capacité de rétention de la CP. L'avantage est une plus grande rapidité de la chromatographie (au lieu de faire 3 dépôts indépendants d'échantillon sur 100 ml de résine, nous faisons un

seul dépôt sur 50-75 ml de résine). Nous obtenons avec cette résine une CP de pureté similaire ou plus grande à celle obtenue avec une résine de plus faible capacité (rapport  $DO_{610/280}$  d'environ 0.040). Par contre, nous ne sommes pas sûrs que la CP que nous obtenons est plus ou moins pure que celle des préparations rapportées dans la littérature. Ainsi le rapport  $DO_{610/280}$  de notre CP varie de 0.040 à 0.043 alors que des valeurs d'environ 0.050 sont mentionnées par d'autres chercheurs (Musci *et al.*, 1993 ; Sokolov *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 1994). Par contre, notre degré d'enrichissement basé sur l'activité oxydasique est environ 2 fois plus élevé que celui rapporté dans la littérature. Possiblement, il pourrait y avoir une hétérogénéité de la teneur en cuivre des molécules de CP.

Nous ne sommes pas assurés d'une bonne reproductibilité de la synthèse d'AE-agarose et cela, à cause de la compétition qui existe entre les groupes OH de l'agarose et les groupes  $NH_2$  du chloroéthylamine pour la liaison d'une molécule du réactif chloroéthylamine. En effet, les molécules de chloroéthylamine peuvent former un polymère à cause de la plus grande réactivité de ce composé pour les groupes  $NH_2$  (présents sur le réactif mais absents sur l'agarose) que pour les groupes OH de l'agarose. Cette polymérisation permettrait de former des tentacules AE de différentes longueurs sur la résine qui expliqueraient l'affinité pour la CP (Stern *et al.*, 1992). La taille et le nombre des tentacules greffés pourraient varier d'une synthèse de résine à l'autre.

Nous pensons qu'il y a aussi des tentacules libres, non fixés sur la résine, en se fiant aux résultats de coloration à la ninhydrine. En effet, tout de suite après leur synthèse et des lavages extensifs avec de l'eau par succion sous vide, les billes d'AE-agarose sont fortement colorées à la ninhydrine (annexe 3). Par contre, après leur utilisation dans la purification de la CP et une régénération avec NaOH, urée et HCl, les billes d'AE-agarose se colorent peu à la ninhydrine (annexe 3) bien qu'elles conservent leur capacité de lier la CP. Nous croyons que des polymères d'AE non fixés à l'agarose mais emprisonnés dans les pores des billes sont majoritairement

responsables de la coloration à la ninhydrine. Nous pouvons nous demander dans quelle mesure ces polymères lient des protéines plasmatiques. Possiblement, au cours des utilisations de la résine, nous nous débarrassons de ces polymères et de la possibilité de retenir des protéines contaminantes.

Nous nous sommes intéressés à une possible contamination des préparations de CP par le facteur X car la CP a des homologies de séquences avec les facteurs V et VIII qui ont un impact sur l'activité du facteur X. Nos préparations contiennent un peu de facteur X mais cette contamination est peu importante et ne porte pas à conséquence lors des expériences de neuroagrégation avec les cellules.

Le groupe de Musci et Calabrese (Musci *et al.*, 1993) ont déjà rapporté la présence de thrombine, une protéase de la coagulation sanguine, dans les préparations de CP obtenues par chromatographie sur AE-agarose. La prothrombine existe sous la forme d'une seule chaîne polypeptidique d'une taille d'environ 70 kDa. Elle pourrait correspondre à la bande de 70 kDa vue dans les préparations de CP 2 et 3 de la figure 3.1, en conditions non réductrices. Par contre, cette bande de 70 kDa est absente en condition réductrices dans la préparation de CP 2. La thrombine active a une taille apparente de 36 kDa et se compose de deux chaînes polypeptidiques (30 et 6 kDa) reliées par des ponts disulfures (Pozzi *et al.*, 2013). Nous ne voyons pas d'espèces ayant ces tailles moléculaires dans nos préparations. La prothrombine/thrombine ne serait donc pas présente à des niveaux détectables par la coloration. Musci et Calabrese ont mentionné pouvoir se débarrasser de la prothrombine/thrombine par une élution avec du chlorure de calcium avant de procéder à l'élution de la CP. Nous avons testé l'élution avec ce sel de calcium mais, dans les conditions de Musci *et al.* (1993), la CP se décrochait aussi. Il serait bien d'analyser nos préparations de CP par microséquencage et spectrométrie de masse pour avoir une meilleure idée de leur pureté.

Considérant que plusieurs protéases plasmatiques sont purifiées par chromatographie échangeuse d'anions (très souvent, en utilisant des groupements diéthylaminoéthyles (Zakas *et al.*, 2012 ; Zaqueo *et al.*, 2014)), nous avons testé la possibilité de purifier davantage la CP en introduisant une étape de tamisage moléculaire après chromatographie sur AE-agarose afin de se débarrasser des protéines  $\leq 100$  kDa. Nous avons exploré cette possibilité par chromatographie liquide de haute performance (CLHP) sur une colonne analytique (annexe 4). Nous avons détecté une espèce non identifiée d'environ 30K qui correspond à environ 15-20% du matériel protéique, mais le reste a élué avec des valeurs de PM inférieures à la plus petite protéine étalon. Ceci laisse penser que la CP est retenue indûment sur la colonne utilisée, soit par des interactions de type chimique avec le matériel chromatographique, soit par des interférences plutôt mécaniques qui pourraient être reliées à des degrés divers de dénaturation de la chaîne polypeptidique, ou soit par une combinaison de ces deux possibilités. Notons que la CP conserve son activité catalytique dans le tampon de tamisage, ce qui amène à penser que la dénaturation, s'il y a, serait due aux hautes pressions chromatographiques. L'utilité d'un tamisage moléculaire serait à retester en CLHP en utilisant un débit plus faible engendrant moins de pression (Vachette *et al.*, 2002), ou en chromatographie classique ou en FPLC (*fast protein liquid chromatography*), plus douces pour les protéines.

#### 4.2 Molécules d'adhérence N-cadhérine et $\beta$ 1-intégrine

Nous avons pensé que la N-cadhérine et la  $\beta$ 1-intégrine pouvaient être des cibles de l'action neuroagrégitrice de la CP. Les résultats obtenus à la section 3.2 montrent que la CP n'a aucun impact sur ces molécules que ce soit au niveau de l'expression totale en protéines ou de l'expression à la surface membranaire et cela, dans une fenêtre de temps de 48 h. Toutefois, on dénote quand même une tendance de la CP à induire la libération d'une petite portion extracellulaire (~22 kDa) de la N-cadhérine. Lors du

développement embryonnaire, la libération du domaine extracellulaire va jouer un rôle majeur dans la régulation de l'adhérence cellulaire, la migration cellulaire et la croissance des neurites dépendamment de sa localisation au niveau du tube neurale (Nakagawa et Takeichi, 1998). Une fois l'ectodomaine relâché, la portion C-terminale restante, qui est liée à la membrane, devient un substrat pour une protéolyse intramembranaire par la présiniline/ $\gamma$ -sécrétase (Reiss *et al.*, 2005). Cette protéolyse génère un fragment cytoplasmique qui a un rôle dans la signalisation (Reiss *et al.*, 2005). Pour avoir un meilleur signal des fragments extracellulaires relâchés, il faudrait effectuer un marquage de surface et utiliser plus de neurones.

Comme les cultures de neurones P19 contiennent différents types de neurones (Wei *et al.*, 2002), nous avons envisagé le fait que la CP pouvait avoir un impact sur la N-cadhérine et la  $\beta$ 1-intégrine sur une sous-population de neurones. Aussi, nous avons tenté d'analyser l'expression de ces protéines par cytométrie de flux, cependant nos cellules se sont révélées fragiles : il y avait trop de mort cellulaire lors de la dissociation en cellules individuelles, ce qui aurait soulevé une incertitude sur l'interprétation des résultats. Il faudrait trouver une stratégie de dissociation cellulaire plus douce.

Une autre approche intéressante afin d'élargir notre analyse sur d'autres protéines de surface qui pourraient être ciblées par la CP serait une analyse sur les ARNm des neurones P19 sur micropuces d'ADN. En effet, elle fournirait des informations quantitatives de l'expression géniques des molécules d'adhérence ou autres molécules de surface. Toutefois, cette méthode ne nous fournirait pas d'informations sur la localisation cellulaire de ces protéines. Outre les protéines d'adhérence cellulaire, les protéines de la MEC pourraient avoir une implication dans l'action neuronale de la CP. L'analyse globale des ARN pourrait s'avérer utile pour repérer des gènes à expression modifiée par le traitement avec la CP et sélectionner ceux qui sont reliés aux types de molécules recherchées pour la validation par PCR

### 4.3 Influence du cuivre

Le cuivre, un oligo-élément essentiel dans les organismes, joue un rôle important dans la fonction de plusieurs protéines (Karlsson *et al.*, 2013). En plus de se lier à la CP à 90-95%, le cuivre circulant se lie à de l'histidine libre et à l'albumine (Sarkar *et al.*, 1993). L'histidine est l'un des plus puissants ligands de métaux de coordination et joue un rôle important dans la liaison d'ions métalliques par les protéines (Neumann et Sass-Kortsak, 1967). Ainsi, des résidus d'histidine sont impliqués dans la coordination d'atomes de cuivre de la CP (Mukhopadhyay *et al.*, 1997).

L'histidine facilite l'absorption du cuivre par les cellules (Deschamps *et al.*, 2005 ; Neumann et Sass-Kortsak, 1967). L'importance physiologique du complexe  $\text{His}_2\text{Cu}$  dans les applications thérapeutiques est bien connue et a conduit à son application dans le traitement de la maladie de Menkes (Deschamps *et al.*, 2005). Cette maladie génétique mortelle provoque une dégénérescence cérébrale rapidement progressive. La base biochimique de cette maladie est un défaut dans le transport du cuivre depuis les cellules intestinales jusque dans tout l'organisme (DiDonato et Sarkar, 1997). Le traitement des patients atteints de la maladie de Menkes a donc pour but de rétablir les niveaux de cuivre dans l'organisme par l'administration de cuivre ( $\text{His}_2\text{Cu}$ ) par voie sous-cutanée (Sarkar *et al.*, 1993). Si ce traitement est appliqué tôt après la naissance, il empêche les complications neurologiques de la maladie : le retard mental (Sarkar *et al.*, 1993).

Les résultats montrent que l'ajout de l' $\text{His}_2\text{Cu}$  dans le milieu neuronal à J6 ne provoque pas d'agrégation, ce qui n'est pas le cas pour la  $\text{Ser}_2\text{Cu}$  (Fig. 3.10). Ceci peut s'expliquer par le fait que la L-His possède trois sites potentiels pour la liaison des métaux, dont l'atome d'azote du noyau imidazole qui est le principal moyen par lequel les ions métalliques se lient aux protéines (Deschamps *et al.*, 2005).

L'action neuroagrégative de la Ser<sub>2</sub>Cu pourrait être due à l'absence de noyau imidazole, ce qui permettrait de libérer plus facilement le cuivre vers les cellules. Tout comme pour la CP, l'action agrégative de la Ser<sub>2</sub>Cu est inhibée par le SBTI, l'Aprotinine et le rivaroxaban (Salmi, 2015). Cette ressemblance d'action nous a amenés à investiguer l'importance du cuivre dans l'effet neuroagrégatif de la CP. Nous avons tenté de neutraliser l'action neuroagrégative de la CP en ajoutant des chélateurs de cuivre dans le milieu de culture, notamment le BCS et la D-pénicillamine. Cependant ces chélateurs ont donné une teinte très orangée au milieu de culture et généré de nombreux débris cellulaires, et ce même à des concentrations très faibles (0.5 µM). Cette approche s'est donc révélée toxique pour les neurones et n'a pas été poursuivie davantage.

Nous avons déplété la CP de son cuivre afin de voir si elle induisait la neuroagrégation. Le traitement au cyanure a fait perdre sa couleur bleue à la CP ainsi que son activité oxydasique. Fait étonnant, la CP ainsi traitée est capable d'induire la neuroagrégation. Par contre, des études antérieures effectuées par Maltais *et al.* (2003) ont montré que la CP dénaturée par la chaleur, ne provoque pas l'agrégation de neurones P19. Il se peut que la CP traitée au cyanure n'ait pas perdu tous ses atomes de cuivre et qu'elle ait conservé suffisamment de sa conformation pour agir sur les neurones P19. La chaleur, par contre, aurait détruit la conformation. L'analyse de cuivre en spectrométrie atomique serait une bonne approche, pour approfondir le rôle du cuivre dans la CP.

#### 4.4 Conclusion

Nous avons synthétisé une résine d'AE-agarose ayant une plus grande capacité de rétention de la CP. L'activité oxydasique spécifique a montré une CP plus pure mais le rapport de la teneur en cuivre par rapport à la teneur en protéine n'est pas aussi élevé

que ceux de la littérature. Une étape de tamissage moléculaire pourrait être ajoutée pour s'assurer d'une plus grande homogénéité des préparations de CP. La N-cadhérine et la  $\beta 1$ -intégrine sont peut-être nécessaires à l'action neuroagréative de la CP en fournissant un contexte cellulaire particulier (ex : des molécules de N-cadhérine apparaissent davantage engagées que celles de la  $\beta 1$ -intégrine), mais leurs niveaux d'expression ou d'engagement ne sont pas affectés par le traitement des neurones avec la CP. Néanmoins, d'autres molécules d'adhérence pourraient être impliquées dans l'action neuroagréative de la CP. L'action neuroagréative de la  $Ser_2Cu$  suggère une implication du cuivre dans l'action neuroagréative de la CP alors que les résultats de déplétion en cuivre montrent le contraire. La CP dépourvu de cuivre a montré une activité oxydasique nulle, ce qui nous permet de dire que cette activité n'intervient pas dans l'action neuroagréative de la CP. Cependant, les résultats sur la déplétion doivent être approfondis afin d'évaluer si elle a été complète ou partielle.

## ANNEXES

### **ANNEXE 1. Marquage de protéines avec le système biotine Neutravidine**

#### **1.1 Biotinylation et analyse des protéines de surface**

Les études d'analyse par immunobuvardage ont montré que la CP n'induit pas de changement dans les niveaux totaux d'expression de la N-cadhérine et de la  $\beta$ 1-intégrine. Par contre, il était possible que la CP ait eu une influence sur la proportion de N-cadhérine et  $\beta$ 1-intégrine acheminées à la membrane plasmique. Nous avons donc biotinylé les protéines de la surface cellulaire pour examiner la proportion de N-cadhérine biotinylée par deux approches.

##### **1.1.1 Marquage des neurones et analyse de la N-cadhérine biotinylée après enrichissement avec des billes de Neutravidine-agarose**

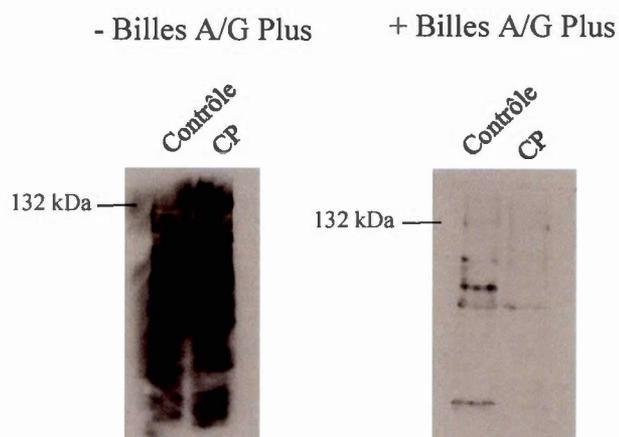
Les neurones de J5 ou J6 ont été incubés avec du sulfo-NHS-SS-Biotine (Thermo Scientific) durant 30 min à 4°C. Ensuite, les neurones ont été culottés par centrifugation, puis resuspendus durant 10 min dans du tampon de lyse froid supplémenté d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases.

Le lysat obtenu après centrifugation a été incubés avec des billes de Neutravidine-agarose, préalablement lavées et équilibrées dans du PBS, durant 3 h à 4°C. Le tout a été centrifugé puis les billes ont été lavées avec du PBS et éluées dans du tampon d'échantillon 4x. Après centrifugation, les surnageants récoltés ont été

analysés par électrophorèse et immunobuvardage avec l'anticorps anti N-cadhérine. Aucun signal n'a été détecté (données non montrées).

### **1.1.2 Analyses de la N-cadhérine biotinylée après enrichissement par immunoprécipitation**

Le lysat cellulaire obtenu après biotinylation a été mis en présence d'anticorps N-cadhérine dirigé contre la portion intracellulaire et incubé avec des billes conjuguées à des protéines A/G plus (Santa Cruz) durant 1 h à 4°C. Après centrifugation, les billes ont été lavées dans du PBS puis incubées dans du tampon d'échantillon 4x comme tampon d'éluat. Le tout fut centrifugé et le surnageant récolté a été déposé sur gel pour être analysé par électrophorèse puis par immunobuvardage avec la Neutravidine-péroxydase (POD). L'éluat n'a donné que de très faibles signaux non reproductibles (données non montrées).



**Figure A.1.1.2 Immunoprécipitation de la N-cadhérine.** Les neurones de J4 ont été incubés en absence (contrôle) ou en présence de CP (0.5 mg/ml). Ensuite ils ont été récoltés à J5, marqué à la biotine, lysés, soumis à une immunoprécipitation de la N-cadhérine et analysés par immunobuvardage de la biotine, avant (-) et après (+) traitement avec des billes A/G Plus. Le poids moléculaire de la N-cadhérine est indiqué à gauche des figures.

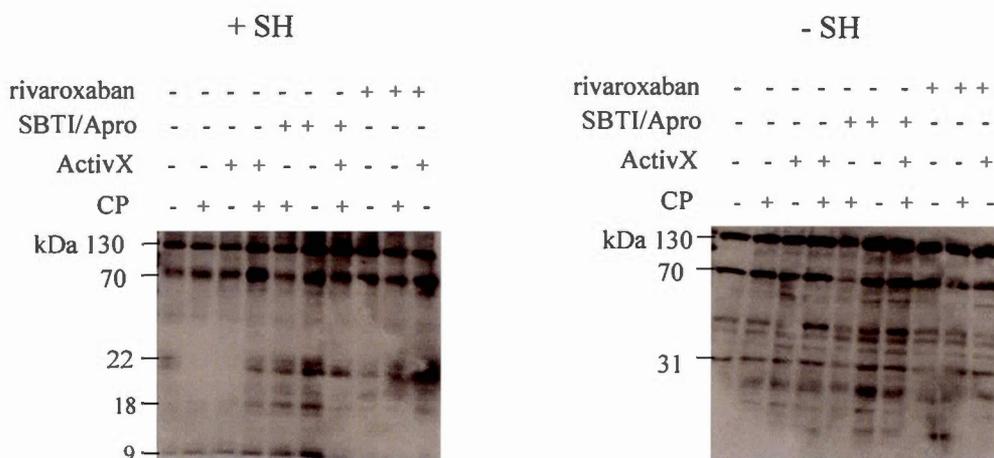
## 1.2 Biotinylation d'affinité de protéase à sérine (étude exploratoire)

On sait qu'une protéase à sérine est impliquée dans la neuroagrégation des neurones, étant donné que cette neuroagrégation est inhibée par la combinaison SBTI/Apro ainsi que par le rivaroxaban. Cependant on ne connaît pas l'identité de cette protéine. Cette protéase a une action limitée dans le temps puisqu'elle agit dans les deux premières heures suivant le traitement des neurones avec la CP (Salmi, 2015). Le système biotine-Neutravidine pouvant aider à identifier cette protéine.

Dans cette expérience, on a essayé de marquer cette protéase en incubant les neurones P19 avec une sonde ActivX-biotine (ActivX Desthiobiotin-FP Serine Hydrolase; Thermo Scientific) avant l'ajout des différents agents (CP, SBTI/Apro et rivaroxaban).

Une seule étude a été faite. Par la suite, les neurones ont été récoltés puis leurs lysats analysés par buvardage avec la Neutravidine-POD en présence et en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les résultats ne nous permettent pas de déterminer la protéase impliquée. En effet, la neutravidine-POD donne facilement des signaux non-spécifiques (les signaux sont présents dans les pistes sans ActivX). Si on enlève les bandes communes à tous les traitements de cellules, il ne semble pas y avoir de marquage spécifique à l'activX. La protéase recherchée est sûrement peu abondante ou peut-être exprimée par une sous-population de neurones d'où l'absence de signal.

A



**Figure A.1.2 Marquage en vue d'étudier une protéase à sérine.** Les neurones de J4 ont été mis en présence d'une sonde activX (2  $\mu$ M) puis incubés en absence (contrôle), ou en présence de CP (0,5 mg/mL), de SBTI (100 $\mu$ M), d'Apro (30 $\mu$ M), de rivaroxaban (10 $\mu$ M) pendant 48 h. Immunobuvardage des lysat neuronaux avec la neutravidine-POD en présence (A) et en absence (B) de  $\beta$ -mercaptoéthanol (SH).

## ANNEXE 2. Test de viabilité neuronale

### 2.1 Les composés à cuivre interfèrent dans le dosage de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une oxydoréductase qui catalyse l'interconversion du pyruvate et du lactate. Les cellules déchargent la LDH dans la circulation sanguine après lésions tissulaires ou de globule rouge. L'enzyme étant assez stable, elle est utilisée pour évaluer la présence des dommages et de la toxicité des cellules. Comme les milieux de culture sont utilisés pour la mesure de largage de la LDH et que ces milieux contiennent les composés de cuivre à tester, nous avons d'abord déterminé si ces composés interfèrent dans la mesure et ceci, en utilisant des extraits cellulaires.

Les neurones de J6, les témoins et ceux traités avec des composés à cuivre, ont été resuspendus et homogénéisés à l'aide d'un mini potter à raison de  $1.10^6$  cellules dans 500  $\mu$ L de tampon LDH (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été déposés sur une microplaque de 96 puits. L'ajout de composés à cuivre lors de la mesure de l'activité LDH des extraits cellulaires a été faite pour déterminer l'impact du cuivre sur la réaction LDH. Par la suite, l'absorbance de 450 nm a été lu à  $t=0$ , puis toute les 5 min à 37°C jusqu'à ce que la plus haute valeur dépasse celle de la courbe standard. L'activité a été calculée selon les indications du manufacturier (Sigma-Aldrich) et exprimée en milliunités/mL. Cependant nous nous sommes aperçus que certains des composés à cuivre ont une tendance à diminuer la réponse à la LDH quand ils sont ajoutés aux extraits cellulaires (Tableau A 2.1).

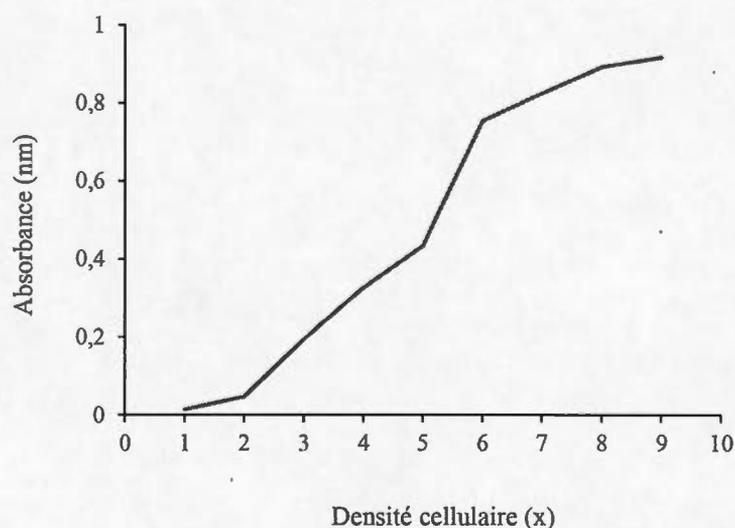
**Tableau A 2.1 Effet de différents composés à cuivre sur l'activité LDH présente dans un extrait cellulaire**

	Absorbance	Activité LDH (%)
Contrôle	0.446	100
Cp 0.5mg/ml	0.398	89
Ser <sub>2</sub> Cu 250μM	0.257	58
His <sub>2</sub> Cu (S) 250μM	0.493	111
CuCl <sub>2</sub> 250μM	0.233	52
CuSO <sub>4</sub> 250μM	0.503	112

## 2.2 Courbe de signal du MTT

Le test MTT est une approche destinée à mesurer la viabilité cellulaire. La réduction du MTT se produit à travers une cellule vivante et peut être considérablement affectée par un certain nombre de facteurs, y compris les perturbations métaboliques, les changements dans les activités oxydoréductases ainsi que le trafic intracellulaire (Stepanenko et Dmitrenko, 2015). Les neurones de J4 ont étéensemencés à différentes densités cellulaires dans des plaques tissulaires (Sarstedt) de 12 puits. À J6, les cellules ont été rincées avec du tampon HEPES salin [HBS-G/Ca<sup>2+</sup>/Mg : HEPES (20 mM), D-glucose (20 mM), NaCl (140 mM), KCl (4 mM), CaCl<sub>2</sub> (1.8 mM) et MgCl<sub>2</sub> (0.8 mM), pH=7,4] puis ont été incubées dans 500 μL du même tampon contenant 0.5 mg/mL de MTT pendant 3 h à 37°C. Les cristaux formés ont été dissouts avec du DMSO, puis l'absorbance a été lu à 550 nm et 664 nm. Dès lors, une courbe de signal a pu être

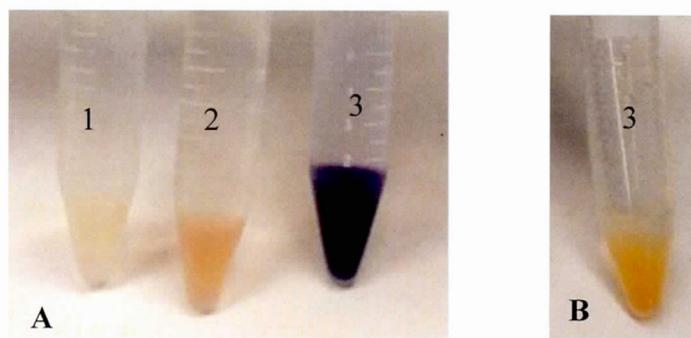
effectuée afin de déterminer une densité cellulaire d'ensemencement permettant d'avoir une échelle DO suffisamment étendue tout en requérant un nombre raisonnable de cellules (Fig. A.2.2). À la densité choisie (4X), il n'y a pas d'agrégation des neurones de sorte que le MTT a accès à toutes les cellules.



**Figure A 2.2 Courbe de signal du MTT.** Les cellules de J4 ont été ensemencées à différentes densités allant de  $0.18 \times 10^6$  cellules (1x) à  $1.8 \times 10^6$  cellules (10x) puis incubés avec 500  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) pendant 4 h à 37°C. L'absorbance a été mesurée à 550 et 664 nm, puis la viabilité a été calculé en soustrayant les deux absorbances. La densité choisie est de  $0.75 \times 10^6$  cellules par puits.

### **ANNEXE 3. Coloration de la résine AE-agarose à la ninhydrine**

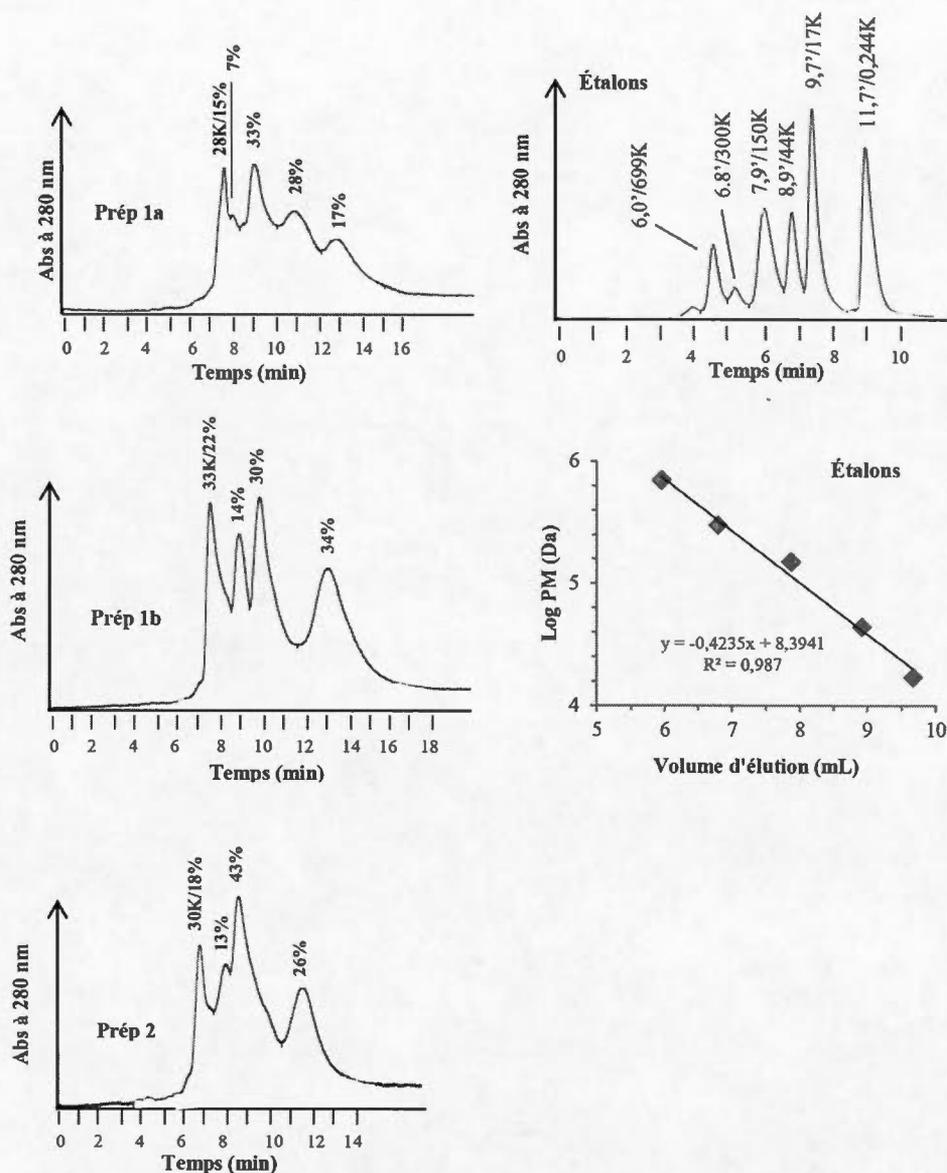
Après la synthèse de la résine, nous avons fait une coloration à la ninhydrine pour vérifier la présence de groupements amino associés aux billes. La ninhydrine colore ces groupements en violet. Le test à la ninhydrine sur la résine AE-agarose fraîchement synthétisée et abondamment rincée n'est pas un bon indicateur du degré de greffage de groupement aminoéthyl. La coloration violette peut être due non seulement aux groupements amino greffés mais aussi à la présence de polymères de chloroéthylamine de différentes longueurs non attachés aux billes mais emprisonnés dans les pores de ces billes. En effet, cette coloration diminue en appliquant ce traitement de régénération (NaCl, urée, NaOH, HCl). Les solutions de régénération changent possiblement la taille des pores de la résine qui facilitent la sortie des polymères libres. Donc, il est conseillé d'appliquer le traitement de régénération avant de faire le traitement à la ninhydrine.



**Figure A.3 Coloration de résines AE-agarose à la ninhydrine.** (A) De gauche à droite: 1) résine faiblement rétentive de CP, utilisée pour la purification de CP, régénérée, puis colorée à la ninhydrine; 2) résine fortement rétentive de CP, utilisée pour la purification de CP, régénérée, puis colorée à la ninhydrine; 3) résine fortement rétentive de CP et fraîchement colorée à la ninhydrine après synthèse et lavage à l'eau. Notons la forte diminution de la coloration lorsqu'une résine a déjà été utilisée pour une purification de la CP (comparer 2 et 3). Il n'y a pas eu d'autre diminution apparente après des utilisations supplémentaires. Notons aussi que la résine faiblement rétentive est d'un beige plus pâle que celui de la résine fortement rétentive (comparer 1 et 2). La résine non dérivée est blanche (non montré). (B) La résine 3 du panneau A, colorée en violet, a été soumise à la régénération sans avoir été utilisée pour la chromatographie. Chacune des différentes solutions de la régénération (NaCl, urée, NaOH et HCl) a stimulé une relâche de couleur mauve dans le surnageant.

**ANNEXE 4. Analyses des préparations de CP 1a, 1b et 2 par tamissage en CLHP**

Une étude de tamissage par CLHP sur une colonne analytique a été réalisée pour déterminer la possibilité de purifier davantage la CP en introduisant une étape chromatographique supplémentaire pour se débarrasser des protéines plus petites que 100 kDa. Les préparations 1a, 1b et 2 ont été comparées. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé de pics correspondants à des tailles de 130 et 116 kDa. La majorité (à plus de 80%) du matériel protéique a élué au-delà du plus petit étalon protéique (17 kDa), ce qui fait dire que la CP s'est soit dénaturée par la pression ou s'est adsorbée sur le matériel chromatographique. La CP incubée dans le tampon de chromatographie mais non soumise au tamissage a conservé son activité oxydasique.



**Figure A.4** Analyse des préparations 1a, 1b et 2 de CP par tamisage en CLHP. Les préparations de CP (à gauche, 25  $\mu$ g de protéines) et le mélange des étalons de poids moléculaire (PM) de BioRad (à droite) ont été chromatographiés sur une colonne Yarra SEC-3000 (3  $\mu$ m, 300 x 7,8 mm), à un débit de 1,0 mL/min et dans un tampon de pH 7,0 contenant 0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 M NaCl et 0,05%  $\text{NaN}_3$ . La courbe d'étalonnage est aussi montrée. Les pics d'étalons sont identifiés par leur temps d'élution et leur PM. Les pics sur les profils de CP sont identifiés par leur PM, s'il se trouve dans la courbe d'étalonnage (> 17K), et par leur surface (en % de la surface totale

## RÉFÉRENCES

- Adams, C.L., Chen, Y.T., Smith, S.J. et Nelson, W.J. (1998). Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol*, 142(4), 1105-1119.
- Aiga, M., Levinson, J.N. et Bamji, S.X. (2011). N-cadherin and neuroligins cooperate to regulate synapse formation in hippocampal cultures. *J Biol Chem*, 286(1), 851-858.
- Akagi, T., Murata, K., Shishido, T. et Hanafusa, H. (2002). v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol*, 22(20), 7015-7023.
- Akiyama, H. et McGeer, P.L. (1990). Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J Neuroimmunol*, 30(1), 81-93.
- Aldred, A.R., Grimes, A., Schreiber, G. et Mercer, J.F. (1987). Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis. *J Biol Chem*, 262(6), 2875-2878.
- Anastasiadis, P.Z. et Reynolds, A.B. (2001). Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5), 604-610.
- Aouffen, M., Paquin, J., De Grandpre, E., Nadeau, R. et Mateescu, M.A. (2001). Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuronoprotective properties. *Biochem Cell Biol*, 79(4), 489-497.
- Atanasiu, R.L., Stea, D., Mateescu, M.A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R. et Rochette, L. (1998). Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Mol Cell Biochem*, 189(1-2), 127-135.
- Avizienyte, E., Wyke, A.W., Jones, R.J., McLean, G.W., Westhoff, M.A., Brunton, V.G. et Frame, M.C. (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol*, 4(8), 632-638.
- Baron, P., Gomez-Marin, O., Casas, C., Heil, J., Will, N., Condie, R., Burke, B., Najarian, J.S. et Sutherland, D.E. (1991). Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *J Surg Res*, 51(1), 60-65.
- Barrell, B.G., Bankier, A.T. et Drouin, J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. *Nature*, 282(5735), 189-194.
- Belvindrah, R., Graus-Porta, D., Goebbels, S., Nave, K.A. et Muller, U. (2007). Beta1 integrins in radial glia but not in migrating neurons are essential for the formation of cell layers in the cerebral cortex. *J Neurosci*, 27(50), 13854-13865.
- Benson, D.L., Schnapp, L.M., Shapiro, L. et Huntley, G.W. (2000). Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol*, 10(11), 473-482.

- Berthon, G. (1993). Is copper pro- or anti-inflammatory? A reconciling view and a novel approach for the use of copper in the control of inflammation. *Agents Actions*, 39(3-4), 210-217.
- Bouchard, F. et Paquin, J. (2009). Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells. *Stem Cells Dev*, 18(7), 1023-1032.
- Bourgin, C., Murai, K.K., Richter, M. et Pasquale, E.B. (2007). The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting beta1-integrin signaling pathways. *J Cell Biol*, 178(7), 1295-1307.
- Brigidi, G.S. et Bamji, S.X. (2011). Cadherin-catenin adhesion complexes at the synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 21(2), 208-214.
- Broniowska, K.A., Zhang, Y. et Hogg, N. (2006). Requirement of transmembrane transport for S-nitrosocysteine-dependent modification of intracellular thiols. *J Biol Chem*, 281(45), 33835-33841.
- Brooks, P.C., Strömblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. et Cheresch, D.A. (1996). Localization of Matrix Metalloproteinase MMP-2 to the Surface of Invasive Cells by Interaction with Integrin  $\alpha v \beta 3$ . *Cell*, 85(5), 683-693.
- Brown, M.A., Stenberg, L.M. et Mauk, A.G. (2002). Identification of catalytically important amino acids in human ceruloplasmin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*, 520(1-3), 8-12.
- Bryant, D.M. et Stow, J.L. (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends in Cell Biology*, 14(8), 427-434.
- Buisson, N. 1993. La purification de la céruloplasmine et son interaction avec les membranes microsomales étude préliminaire. Université du Québec à Montréal. Thèse (Maîtrise en chimie).
- Cadet, N. et Paquin, J. (2000). Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons. *Brain Res Dev Brain Res*, 120(2), 211-221.
- Calabrese, L., Mateescu, M.A., Carbonaro, M. et Mondovi, B. (1988). Reexamination of spectroscopic properties of ceruloplasmin freshly isolated with a novel very rapid single-step procedure. *Biochem Int*, 16(2), 199-208.
- Calderwood, D.A., Shattil, S.J. et Ginsberg, M.H. (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 275(30), 22607-22610.
- Causeret, M., Taulet, N., Comunale, F., Favard, C. et Gauthier-Rouviere, C. (2005). N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts. *Mol Biol Cell*, 16(5), 2168-2180.
- Chahine, R., Mateescu, M.A., Roger, S., Yamaguchi, N., de Champlain, J. et Nadeau, R. (1991). Protective effects of ceruloplasmin against electrolysis-induced oxygen free radicals in rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*, 69(10), 1459-1464.
- Chan, C.S., Weeber, E.J., Kurup, S., Sweatt, J.D. et Davis, R.L. (2003). Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci*, 23(18), 7107-7116.

- Chan, C.S., Weeber, E.J., Zong, L., Fuchs, E., Sweatt, J.D. et Davis, R.L. (2006). Beta 1-integrins are required for hippocampal AMPA receptor-dependent synaptic transmission, synaptic plasticity, and working memory. *J Neurosci*, 26(1), 223-232.
- Chiu, F.C., Feng, L., Chan, S.O., Padin, C. et Federoff, J.H. (1995). Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 30(1), 77-86.
- Church, W.R., Jernigan, R.L., Toole, J., Hewick, R.M., Knopf, J., Knutson, G.J., Nesheim, M.E., Mann, K.G. et Fass, D.N. (1984). Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(22), 6934-6937.
- Ciruna, B. et Rossant, J. (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell*, 1(1), 37-49.
- Clegg, D.O., Wingerd, K.L., Hikita, S.T. et Tolhurst, E.C. (2003). Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front Biosci*, 8, d723-750.
- Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P. et Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol*, 163(4), 847-857.
- Cousins, R.J. (1985). Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev*, 65(2), 238-309.
- Curzon, G. (1961). Some properties of coupled iron-ceruloplasmin oxidation systems. *Biochem J*, 79, 656-663.
- Dansie, L.E. et Ethell, I.M. (2011). Casting a net on dendritic spines: The extracellular matrix and its receptors. *Developmental Neurobiology*, 71(11), 956-981.
- Davis, M.A., Ireton, R.C. et Reynolds, A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*, 163(3), 525-534.
- De Domenico, I., Ward, D.M., di Patti, M.C., Jeong, S.Y., David, S., Musci, G. et Kaplan, J. (2007). Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *Embo j*, 26(12), 2823-2831.
- de Mol, N.J. (1985). Interaction of phenothiazine drugs with human ceruloplasmin. Relation between activation of catecholamine neurotransmitter oxidation and electron donating ability of phenothiazine drugs. *Biochem Pharmacol*, 34(15), 2605-2609.
- de Silva, D.M., Askwith, C.C. et Kaplan, J. (1996). Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes. *Physiol Rev*, 76(1), 31-47.
- Dedhar, S., Robertson, K. et Gray, V. (1991). Induction of expression of the alpha v beta 1 and alpha v beta 3 integrin heterodimers during retinoic acid-induced neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 266(32), 21846-21852.

- DeMali, K.A., Wennerberg, K. et Burridge, K. (2003). Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 15(5), 572-582.
- Deschamps, P., Kulkarni, P.P., Gautam-Basak, M. et Sarkar, B. (2005). The saga of copper(II)-l-histidine. *Coordination Chemistry Reviews*, 249(9-10), 895-909.
- DiDonato, M. et Sarkar, B. (1997). Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1360(1), 3-16.
- Dods, S.R., Hardick, O., Stevens, B. et Bracewell, D.G. (2015). Fabricating electrospun cellulose nanofibre adsorbents for ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A*, 1376, 74-83.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J. et Weis, W.I. (2005).  $\alpha$ -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- $\beta$ -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell*, 123(5), 903-915.
- Ducharme, P. 2007. L'action neuroagréative de la céruloplasmine impliquerait une activité protéolytique. Mémoire de Maîtrise. Université du Québec à Montréal, Montréal. 111 pages.
- Ducharme, P. 2013. Rôle potentiel de la céruloplasmine dans le développement du cerveau. Thèse de doctorat. Université du Québec à Montréal, Montréal. 261 pages.
- Dwivedi, A., Slater, S.C. et George, S.J. (2009). MMP-9 and -12 cause N-cadherin shedding and thereby beta-catenin signalling and vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res*, 81(1), 178-186.
- Dwulet, F.E. et Putnam, F.W. (1981). Complete amino acid sequence of a 50,000-dalton fragment of human ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(2), 790-794.
- Ehrlich, J.S., Hansen, M.D.H. et Nelson, W.J. (2002). Spatio-Temporal Regulation of Rac1 Localization and Lamellipodia Dynamics during Epithelial Cell-Cell Adhesion. *Developmental Cell*, 3(2), 259-270.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J. et Liddington, R.C. (2000). Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin  $\alpha 2\beta 1$ . *Cell*, 101(1), 47-56.
- Evans, G.W. (1973). Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol Rev*, 53(3), 535-570.
- Fleming, R.E., Whitman, I.P. et Gitlin, J.D. (1991). Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxia. *Am J Physiol*, 260(2 Pt 1), L68-74.
- Flierl, U., Fraccarollo, D., Micka, J., Bauersachs, J. et Schafer, A. (2013). The direct factor Xa inhibitor Rivaroxaban reduces platelet activation in congestive heart failure. *Pharmacol Res*, 74, 49-55.
- Floris, G., Medda, R., Padiglia, A. et Musci, G. (2000). The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach. *Biochem Pharmacol*, 60(12), 1735-1741.
- Folsom, T.D. et Fatemi, S.H. (2013). The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, 68(0), 122-135.

- Foty, R.A. et Steinberg, M.S. (2005). The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. *Dev Biol*, 278(1), 255-263.
- Fox, P.L., Mukhopadhyay, C. et Ehrenwald, E. (1995). Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci*, 56(21), 1749-1758.
- Frieden, E. (1986). Perspectives on copper biochemistry. *Clin Physiol Biochem*, 4(1), 11-19.
- Fu, S., O'Neal, S., Hong, L., Jiang, W. et Zheng, W. (2015). Elevated adult neurogenesis in brain subventricular zone following in vivo manganese exposure: roles of copper and DMT1. *Toxicol Sci*, 143(2), 482-498.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E.M., Behrens, J., Sommer, T. et Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. [10.1038/ncb758]. *Nat Cell Biol*, 4(3), 222-231.
- Gallin, W.J., Edelman, G.M. et Cunningham, B.A. (1983). Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(4), 1038-1042.
- Gambling, L., Kennedy, C. et McArdle, H.J. (2011). Iron and copper in fetal development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(6), 637-644.
- Ganaraja, B., Pavithran, P. et Ghosh, S. (2004). Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress. *Indian J Med Sci*, 58(4), 150-154.
- Gao, X., Bian, W., Yang, J., Tang, K., Kitani, H., Atsumi, T. et Jing, N. (2001). A role of N-cadherin in neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(5), 1098-1103.
- Gao, X., Yang, J., Bian, W. et Jing, N.H. (1999). N-cadherin Invovles in P19 Cell in vitro Neuronal Differentiation. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 31(5), 610-613.
- Gartner, A., Fornasiero, E.F. et Dotti, C.G. (2015). Cadherins as regulators of neuronal polarity. *Cell Adh Migr*, 9(3), 175-182.
- Germann, U.A. et Lerch, K. (1986). Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*: amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(23), 8854-8858.
- Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G. et Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 277(5323), 225-228.
- Gitlin, J.D. (1998). Aceruloplasminemia. *Pediatr Res*, 44(3), 271-276.
- Goldstein, I.M., Kaplan, H.B., Edelson, H.S. et Weissmann, G. (1979). A new function for ceruloplasmin as an acute-phase reactant in inflammation: a scavenger of superoxide anion radicals. *Trans Assoc Am Physicians*, 92, 360-369.
- Golubovskaya, V.M., Nyberg, C., Zheng, M., Kweh, F., Magis, A., Ostrov, D. et Cance, W.G. (2008). A small molecule inhibitor, 1,2,4,5-benzenetetraamine

- tetrahydrochloride, targeting the y397 site of focal adhesion kinase decreases tumor growth. *J Med Chem*, 51(23), 7405-7416.
- Goult, B.T., Bouaouina, M., Harburger, D.S., Bate, N., Patel, B., Anthis, N.J., Campbell, I.D., Calderwood, D.A., Barsukov, I.L., Roberts, G.C. et Critchley, D.R. (2009). The structure of the N-terminus of kindlin-1: a domain important for  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrin activation. *J Mol Biol*, 394(5), 944-956.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C. et Muller, U. (2001).  $\beta$ 1-class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron*, 31(3), 367-379.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., Orban, P., Klein, R., Schittny, J.C. et Müller, U. (2001).  $\beta$ 1-Class Integrins Regulate the Development of Laminae and Folia in the Cerebral and Cerebellar Cortex. *Neuron*, 31(3), 367-379.
- Gupton, S.L. et Gertler, F.B. (2010). Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis. *Dev Cell*, 18(5), 725-736.
- Gutteridge, J.M. (1985). Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interact*, 56(1), 113-120.
- Gybina, Tkac, I. et Prohaska, J.R. (2009). Copper deficiency alters the neurochemical profile of developing rat brain. *Nutr Neurosci*, 12(3), 114-122.
- Halbleib, J.M. et Nelson, W.J. (2006). Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, 20(23), 3199-3214.
- Harris, Z.L., Klomp, L.W. et Gitlin, J.D. (1998). Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*, 67(5 Suppl), 972s-977s.
- Hatta, K., Takagi, S., Fujisawa, H. et Takeichi, M. (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol*, 120(1), 215-227.
- Hatta, K. et Takeichi, M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature*, 320(6061), 447-449.
- Healy, J. et Tipton, K. (2007). Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm*, 114(6), 777-781.
- Heuberger, J. et Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(2), a002915.
- Hirano, K., Ogihara, T., Ogihara, H., Hiroi, M., Hasegawa, M. et Tamai, H. (2005). Identification of apo- and holo-forms of ceruloplasmin in patients with Wilson's disease using native polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Biochem*, 38(1), 9-12.
- Hirano, S. et Takeichi, M. (2012). Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiol Rev*, 92(2), 597-634.

- Hu, P. et Luo, B.H. (2013). Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane. *J Cell Physiol*, 228(2), 306-312.
- Huang, Z., Shimazu, K., Woo, N.H., Zang, K., Muller, U., Lu, B. et Reichardt, L.F. (2006). Distinct roles of the beta 1-class integrins at the developing and the mature hippocampal excitatory synapse. *J Neurosci*, 26(43), 11208-11219.
- Huber, A.H. et Weis, W.I. (2001). The Structure of the  $\beta$ -Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by  $\beta$ -Catenin. *Cell*, 105(3), 391-402.
- Hulpiau, P. et van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(2), 349-369.
- Hulpiau, P. et van Roy, F. (2011). New insights into the evolution of metazoan cadherins. *Mol Biol Evol*, 28(1), 647-657.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110(6), 673-687.
- Inuzuka, H., Redies, C. et Takeichi, M. (1991). Differential expression of R- and N-cadherin in neural and mesodermal tissues during early chicken development. *Development*, 113(3), 959-967.
- Ivins, J.K., Parry, M.K. et Long, D.A. (2004). A novel cAMP-dependent pathway activates neuronal integrin function in retinal neurons. *J Neurosci*, 24(5), 1212-1216.
- Jackson, G.E., Mkhonta-Gama, L., Voyer, A. et Kelly, M. (2000). Design of copper-based anti-inflammatory drugs. *J Inorg Biochem*, 79(1-4), 147-152.
- Jaeger, J.L., Shimizu, N. et Gitlin, J.D. (1991). Tissue-specific ceruloplasmin gene expression in the mammary gland. *Biochem J*, 280 (Pt 3), 671-677.
- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P. et Fuchs, E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature*, 422(6929), 317-322.
- Jeannotte, R., Paquin, J., Petit-Turcotte, C. et Day, R. (1997). Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *DNA Cell Biol*, 16(10), 1175-1187.
- Jossin, Y., Bar, I., Ignatova, N., Tissir, F., De Rouvroit, C.L. et Goffinet, A.M. (2003). The reelin signaling pathway: some recent developments. *Cereb Cortex*, 13(6), 627-633.
- Juan, S.H. et Aust, S.D. (1998). Studies on the interaction between ferritin and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys*, 355(1), 56-62.
- Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G.L. et Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev Biol*, 304(1), 22-33.
- Kaplan, J. et O'Halloran, T.V. (1996). Iron metabolism in eukaryotes: Mars and Venus at it again. *Science*, 271(5255), 1510-1512.
- Karlsson, H.L., Cronholm, P., Hedberg, Y., Tornberg, M., De Battice, L., Svedhem, S. et Wallinder, I.O. (2013). Cell membrane damage and protein interaction

- induced by copper containing nanoparticles—Importance of the metal release process. *Toxicology*, 313(1), 59-69.
- Kawauchi, T. (2012). Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. *Int J Mol Sci*, 13(4), 4564-4590.
- Kloss, C.U., Bohatschek, M., Kreutzberg, G.W. et Raivich, G. (2001). Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol*, 168(1), 32-46.
- Knuesel, I. (2010). Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*, 91(4), 257-274.
- Kobielak, A. et Fuchs, E. (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8), 614-625.
- Kono, S. (2012). Aceruloplasminemia. *Curr Drug Targets*, 13(9), 1190-1199.
- Krstic, D., Rodriguez, M. et Knuesel, I. (2012). Regulated proteolytic processing of Reelin through interplay of tissue plasminogen activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and their modulators. *PLoS One*, 7(10), e47793.
- Kryczka, J., Stasiak, M., Dziki, L., Mik, M., Dziki, A. et Cierniewski, C. (2012). Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the beta1 integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. *J Biol Chem*, 287(43), 36556-36566.
- Lacor, P.N., Grayson, D.R., Auta, J., Sugaya, I., Costa, E. et Guidotti, A. (2000). Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3556-3561.
- Lammers, R., Lerch, M.M. et Ullrich, A. (2000). The carboxyl-terminal tyrosine residue of protein-tyrosine phosphatase alpha mediates association with focal adhesion plaques. *J Biol Chem*, 275(5), 3391-3396.
- Laplante, I., Beliveau, R. et Paquin, J. (2004). RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells. *J Neurobiol*, 60(3), 289-307.
- Lee, H.S. et Tomarev, S.I. (2007). Optimedin induces expression of N-cadherin and stimulates aggregation of NGF-stimulated PC12 cells. *Exp Cell Res*, 313(1), 98-108.
- Leong, L., Menko, A.S. et Grunwald, G.B. (2000). Differential expression of N- and B-cadherin during lens development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(11), 3503-3510.
- Lilien, J. et Balsamo, J. (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of  $\beta$ -catenin. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5), 459-465.
- Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R. et Lomeli, N. (1998). Copper transport. *Am J Clin Nutr*, 67(5 Suppl), 965s-971s.
- Lindley, P.F., Card, G., Zaitseva, I., Zaitsev, V., Reinhammar, B., SelinLindgren, E. et Yoshida, K. (1997). An X-ray structural study of human ceruloplasmin in

- relation to ferroxidase activity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2(4), 454-463.
- Liu, S., Calderwood, D.A. et Ginsberg, M.H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3563-3571.
- Lovstad, R.A. (1981). The protective action of ceruloplasmin on Fe<sup>2+</sup> stimulated lysis of rat erythrocytes. *Int J Biochem*, 13(2), 221-224.
- Machonkin, T.E., Zhang, H.H., Hedman, B., Hodgson, K.O. et Solomon, E.I. (1998). Spectroscopic and magnetic studies of human ceruloplasmin: identification of a redox-inactive reduced Type 1 copper site. *Biochemistry*, 37(26), 9570-9578.
- Mackiewicz, A., Ganapathi, M.K., Schultz, D. et Kushner, I. (1987). Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins. *J Exp Med*, 166(1), 253-258.
- MacPherson, P.A. et McBurney, M.W. (1995). P19 Embryonal Carcinoma Cells: A Source of Cultured Neurons Amenable to Genetic Manipulation. *Methods*, 7(3), 238-252.
- Maltais, D., Desroches, D., Aouffen, M., Mateescu, M.A., Wang, R. et Paquin, J. (2003). The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization. *Neuroscience*, 121(1), 73-82.
- Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. et Robakis, N.K. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo j*, 21(8), 1948-1956.
- Marciano, D.K., Denda, S. et Reichardt, L.F. (2007). Methods for identifying novel integrin ligands. *Methods Enzymol*, 426, 223-237.
- Marques, L., Auriac, A., Willemetz, A., Banha, J., Silva, B., Canonne-Hergaux, F. et Costa, L. (2012). Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis*, 48(2), 110-120.
- Mateescu, M.A., Chahine, R., Roger, S., Atanasiu, R., Yamaguchi, N., Lalumiere, G. et Nadeau, R. (1995). Protection of myocardial tissue against deleterious effects of oxygen free radicals by ceruloplasmin. *Arzneimittelforschung*, 45(4), 476-480.
- McBurney, M.W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*, 37(1), 135-140.
- Meyer, L.A., Durley, A.P., Prohaska, J.R. et Harris, Z.L. (2001). Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J Biol Chem*, 276(39), 36857-36861.
- Milner, R. et Campbell, I.L. (2002). The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *Journal of Neuroscience Research*, 69(3), 286-291.

- Mittal, B. et David, S. (1994). A monoclonal antibody that recognizes an adhesion molecule expressed by certain cells of neuroectodermal and mesenchymal origin. *Mol Cell Neurosci*, 5(1), 63-77.
- Molski, M. et Konarski, J. (2006). Neuronal differentiation and synapse formation in the space-time with temporal fractal dimension. *Synapse*, 60(8), 567-572.
- Mukhopadhyay, C.K., Attieh, Z.K. et Fox, P.L. (1998). Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science*, 279(5351), 714-717.
- Mukhopadhyay, C.K., Mazumder, B., Lindley, P.F. et Fox, P.L. (1997). Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(21), 11546-11551.
- Mullins, Heuser, J.A. et Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11), 6181-6186.
- Musci, G., Bonaccorsi di Patti, M.C., Fagiolo, U. et Calabrese, L. (1993). Age-related changes in human ceruloplasmin. Evidence for oxidative modifications. *J Biol Chem*, 268(18), 13388-13395.
- Nakagawa, S. et Takeichi, M. (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development*, 121(5), 1321-1332.
- Nakagawa, S. et Takeichi, M. (1998). Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development*, 125(15), 2963-2971.
- Neumann, P.Z. et Sass-Kortsak, A. (1967). The state of copper in human serum: evidence for an amino acid-bound fraction. *J Clin Invest*, 46(4), 646-658.
- Niessen, C.M. et Gumbiner, B.M. (2002). Cadherin-mediated cell sorting not determined by binding or adhesion specificity. *J Cell Biol*, 156(2), 389-399.
- Nikkhah, G., Tonn, J.C., Hoffmann, O., Kraemer, H.P., Darling, J.L., Schönmayr, R. et Schachenmayr, W. (1992). The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. *Journal of Neuro-Oncology*, 13(1), 1-11.
- Nollet, F., Kools, P. et van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, 299(3), 551-572.
- Noren, N.K., Liu, B.P., Burridge, K. et Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol*, 150(3), 567-580.
- Nunes Dda, S., Gonzaga, H.T., Ribeiro Vda, S., da Cunha, J.P., Jr. et Costa-Cruz, J.M. (2013). *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions obtained by ion-exchange chromatography: potential source of immunodominant markers applicable in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 76(1), 36-41.
- Owen, J.D., Ruest, P.J., Fry, D.W. et Hanks, S.K. (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits

- adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol*, 19(7), 4806-4818.
- Panteri, R., Paiardini, A. et Keller, F. (2006). A 3D model of Reelin subrepeat regions predicts Reelin binding to carbohydrates. *Brain Res*, 1116(1), 222-230.
- Paquin, J., Danalache, B.A., Jankowski, M., McCann, S.M. et Gutkowska, J. (2002). Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14), 9550-9555.
- Paradis, M., Gagne, J., Mateescu, M.A. et Paquin, J. (2010). The effects of nitric oxide-oxidase and putative glutathione-peroxidase activities of ceruloplasmin on the viability of cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 49(12), 2019-2027.
- Parnas, D. et Linial, M. (1997). Culture density regulates both the cholinergic phenotype and the expression of the CNTF receptor in P19 neurons. *J Mol Neurosci*, 8(2), 115-130.
- Parr-Sturgess, C.A., Tinker, C.L., Hart, C.A., Brown, M.D., Clarke, N.W. et Parkin, E.T. (2012). Copper modulates zinc metalloproteinase-dependent ectodomain shedding of key signaling and adhesion proteins and promotes the invasion of prostate cancer epithelial cells. *Mol Cancer Res*, 10(10), 1282-1293.
- Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116(Pt 8), 1409-1416.
- Patel, Ciatto, C., Chen, C.P., Bahna, F., Rajebhosale, M., Arkus, N., Schieren, I., Jessell, T.M., Honig, B., Price, S.R. et Shapiro, L. (2006). Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell*, 124(6), 1255-1268.
- Patel et David, S. (1997). A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J Biol Chem*, 272(32), 20185-20190.
- Patel, Dunn, R.J. et David, S. (2000). Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J Biol Chem*, 275(6), 4305-4310.
- Paudel, S., Kim, Y.-H., Huh, M.-I., Kim, S.-J., Chang, Y., Park, Y.J., Lee, K.W. et Jung, J.-C. (2013). ADAM10 mediates N-cadherin ectodomain shedding during retinal ganglion cell differentiation in primary cultured retinal cells from the developing chick retina. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(4), 942-954.
- Paulson, A.F., Prasad, M.S., Thuringer, A.H. et Manzerra, P. (2014). Regulation of cadherin expression in nervous system development. *Cell Adh Migr*, 8(1), 19-28.
- Peng, X. et Guan, J.L. (2011). Focal adhesion kinase: from in vitro studies to functional analyses in vivo. *Curr Protein Pept Sci*, 12(1), 52-67.
- Perret, E., Benoliel, A.M., Nassoy, P., Pierres, A., Delmas, V., Thiery, J.P., Bongrand, P. et Feracci, H. (2002). Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *Embo j*, 21(11), 2537-2546.

- Poirier, S., Prat, A., Marcinkiewicz, E., Paquin, J., Chitramuthu, B.P., Baranowski, D., Cadieux, B., Bennett, H.P. et Seidah, N.G. (2006). Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system. *J Neurochem*, 98(3), 838-850.
- Pozzi, N., Chen, Z., Gohara, D.W., Niu, W., Heyduk, T. et Di Cera, E. (2013). Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *J Biol Chem*, 288(31), 22734-22744.
- Qian, Z.M. et Ke, Y. (2001). Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain Res Brain Res Rev*, 35(3), 287-294.
- Redies, C. (2000). Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 61(6), 611-648.
- Redies, C., Hertel, N. et Hübner, C.A. (2012). Cadherins and neuropsychiatric disorders. *Brain Research*, 1470(0), 130-144.
- Redies, C., Treubert-Zimmermann, U. et Luo, J. (2003). Cadherins as regulators for the emergence of neural nets from embryonic divisions. *J Physiol Paris*, 97(1), 5-15.
- Rehberg, K., Kliche, S., Madencioglu, D.A., Thiere, M., Muller, B., Meineke, B.M., Freund, C., Budinger, E. et Stork, O. (2014). The serine/threonine kinase Ndr2 controls integrin trafficking and integrin-dependent neurite growth. *J Neurosci*, 34(15), 5342-5354.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D. et Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo j*, 24(4), 742-752.
- Retta, S.F., Balzac, F. et Avolio, M. (2006). Rap1: a turnabout for the crosstalk between cadherins and integrins. *Eur J Cell Biol*, 85(3-4), 283-293.
- Ribeiro Vda, S., Nunes Dda, S., Gonzaga, H.T., da Cunha-Junior, J.P. et Costa-Cruz, J.M. (2014). Diethylaminoethyl (DEAE) binding fraction from *Taenia solium* metacystode improves the neurocysticercosis serodiagnosis. *Parasitol Res*, 113(7), 2569-2575.
- Richardson, J., Thomas, K.A., Rubin, B.H. et Richardson, D.C. (1975). Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(4), 1349-1353.
- Rudnicki, M.A. et McBurney, M.W. (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, 19-49.
- Sadeqzadeh, E., de Bock, C.E., Wojtalewicz, N., Holt, J.E., Smith, N.D., Dun, M.D., Schwarte-Waldhoff, I. et Thorne, R.F. (2014). Furin processing dictates ectodomain shedding of human FAT1 cadherin. *Experimental Cell Research*, 323(1), 41-55.
- Salmi, H. 2015. Effet de modulateurs de kinases et de protéases à sérine sur les actions neurotrophiques de la céruloplasmine. Mémoire de maîtrise. Université du Québec à Montréal, Montréal. 112 pages.

- Salzer, J.L., Lovejoy, L., Linder, M.C. et Rosen, C. (1998). Ran-2, a glial lineage marker, is a GPI-anchored form of ceruloplasmin. *J Neurosci Res*, 54(2), 147-157.
- Sarkar, B. (1999). Treatment of Wilson and menkes diseases. *Chem Rev*, 99(9), 2535-2544.
- Sarkar, B., Lingertat-Walsh, K. et Clarke, J.T. (1993). Copper-histidine therapy for Menkes disease. *J Pediatr*, 123(5), 828-830.
- Schmid, R.S. et Anton, E.S. (2003). Role of integrins in the development of the cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 13(3), 219-224.
- Sekine, K., Kubo, K.-i. et Nakajima, K. (2014). How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? *Neuroscience Research*, 86(0), 50-58.
- Sharma, S. et Notter, M.F. (1988). Characterization of neurotransmitter phenotype during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Dev Biol*, 125(2), 246-254.
- Shi, Y. et Ethell, I.M. (2006). Integrins control dendritic spine plasticity in hippocampal neurons through NMDA receptor and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated actin reorganization. *J Neurosci*, 26(6), 1813-1822.
- Shimoyama, Y., Tsujimoto, G., Kitajima, M. et Natori, M. (2000). Identification of three human type-II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-II classic cadherins. *Biochem J*, 349(Pt 1), 159-167.
- Sokolov, A.V., Zakharova, E.T., Shavlovskii, M.M. et Vasil'ev, V.B. (2005). [Isolation of stable human ceruloplasmin and its interaction with salmon protamine]. *Bioorg Khim*, 31(3), 269-279.
- Somjen, D., Katzburg, S., Gigi, R., Dolkart, O., Sharon, O., Salai, M. et Stern, N. (2013). Rivaroxaban, a direct inhibitor of the coagulation factor Xa interferes with hormonal-induced physiological modulations in human female osteoblastic cell line SaSO2. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 135, 67-70.
- Stemmler, M.P., Hecht, A. et Kemler, R. (2005). E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development*, 132(5), 965-976.
- Stepanenko, A.A. et Dmitrenko, V.V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*
- Stern, R.V., Caffrey, J.M. et Frieden, E. (1992). A tentacle gel simplifies the purification of ceruloplasmin. *Biochem Int*, 27(2), 281-289.
- Stocks, J., Gutteridge, J.M., Sharp, R.J. et Dormandy, T.L. (1974). The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and alpha-tocopherol. *Clin Sci Mol Med*, 47(3), 223-233.
- Strathdee, G. (2002). Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Seminars in Cancer Biology*, 12(5), 373-379.

- Suzuki, S.C. et Takeichi, M. (2008). Cadherins in neuronal morphogenesis and function. *Development, Growth & Differentiation*, 50, S119-S130.
- Takahashi, N., Ortel, T.L. et Putnam, F.W. (1984). Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(2), 390-394.
- Takeichi, M. (2006). [History and development of cell-cell adhesion studies]. *Seikagaku*, 78(7), 577-578.
- Takeichi, M. (2007). The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci*, 8(1), 11-20.
- Takeichi, M., Matsunami, H., Inoue, T., Kimura, Y., Suzuki, S. et Tanaka, T. (1997). Roles of cadherins in patterning of the developing brain. *Dev Neurosci*, 19(1), 86-87.
- Texel, S.J., Xu, X. et Harris, Z.L. (2008). Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 6), 1277-1281.
- Thomas, T.F., Ganetsky, V. et Spinler, S.A. (2013). Rivaroxaban: an oral factor Xa inhibitor. *Clin Ther*, 35(1), 4-27.
- Trocello, J.M., Chappuis, P., El Balkhi, S., Poupon, J., Leyendecker, A., Chaine, P. et Woimant, F. (2010). Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. *La Revue de Médecine Interne*, 31(11), 750-756.
- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K.R., Wheelock, M.J. et Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol*, 135(3), 767-779.
- Uemura, K., Kihara, T., Kuzuya, A., Okawa, K., Nishimoto, T., Ninomiya, H., Sugimoto, H., Kinoshita, A. et Shimohama, S. (2006). Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neurosci Lett*, 402(3), 278-283.
- Vachette, P., Dainese, E., Vasyliiev, V.B., Di Muro, P., Beltramini, M., Svergun, D.I., De Filippis, V. et Salvato, B. (2002). A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin. *J Biol Chem*, 277(43), 40823-40831.
- Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V. et Fuchs, E. (2002). Actin Cable Dynamics and Rho/Rock Orchestrate a Polarized Cytoskeletal Architecture in the Early Steps of Assembling a Stratified Epithelium. *Developmental Cell*, 3(3), 367-381.
- Vassiliev, V., Harris, Z.L. et Zatta, P. (2005). Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 49(3), 633-640.
- Walker, F.J. et Fay, P.J. (1990). Characterization of an interaction between protein C and ceruloplasmin. *J Biol Chem*, 265(4), 1834-1836.
- Wang, Dumoulin, M.J., Befani, O., Mondovi, B. et Mateescu, M.A. (1994). Joint chromatographic purification of bovine serum ceruloplasmin and amineoxidase. *Prep Biochem*, 24(3-4), 237-250.
- Wang, He, W., Bian, H., Liu, C. et Li, S. (2012). Small molecule induction of neural-like cells from bone marrow-mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 113(5), 1527-1536.

- Wang et Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*, 434(3), 365-381.
- Watanabe et Tezuka, M. (2006). Copper is Required for Retinoic Acid Receptor-Dependent Transcription and Neuronal Differentiation in P19 Embryonal Carcinoma Cells. *Journal of Health Science*, 52(5), 540-548.
- Weaver, C.D., Yoshida, C.K., de Curtis, I. et Reichardt, L.F. (1995). Expression and in vitro function of beta 1-integrin laminin receptors in the developing avian ciliary ganglion. *J Neurosci*, 15(7 Pt 2), 5275-5285.
- Webb, D.J., Zhang, H., Majumdar, D. et Horwitz, A.F. (2007). alpha5 integrin signaling regulates the formation of spines and synapses in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 282(10), 6929-6935.
- Wei, Y., Harris, T. et Childs, G. (2002). Global gene expression patterns during neural differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. *Differentiation*, 70(4-5), 204-219.
- Whittard, J.D. et Akiyama, S.K. (2001). Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J Cell Sci*, 114(Pt 18), 3265-3272.
- Williams, E.J., Williams, G., Howell, F.V., Skaper, S.D., Walsh, F.S. et Doherty, P. (2001). Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem*, 276(47), 43879-43886.
- Yang, Massa et Longo. (2006). LAR protein tyrosine phosphatase receptor associates with TrkB and modulates neurotrophic signaling pathways. *J Neurobiol*, 66(13), 1420-1436.
- Yang, F., Naylor, S.L., Lum, J.B., Cutshaw, S., McCombs, J.L., Naberhaus, K.H., McGill, J.R., Adrian, G.S., Moore, C.M., Barnett, D.R. et al. (1986). Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(10), 3257-3261.
- Yao, W., Yu, X., Fang, Z., Yin, P., Zhao, C., Li, N., Wang, L., Li, Z. et Zha, X. (2012). Profilin1 facilitates staurosporine-triggered apoptosis by stabilizing the integrin beta1-actin complex in breast cancer cells. *J Cell Mol Med*, 16(4), 824-835.
- Yoshida, C. et Takeichi, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, 28(2), 217-224.
- Zaitsev, V.N., Zaitseva, I., Papiz, M. et Lindley, P.F. (1999). An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. *J Biol Inorg Chem*, 4(5), 579-587.
- Zaitseva, I., Zaitsev, V., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A. et Lindley, P. (1996). The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 angstrom: Nature of the copper centres. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1(1), 15-23.

- Zakas, P.M., Gangadharan, B., Almeida-Porada, G., Porada, C.D., Spencer, H.T. et Doering, C.B. (2012). Development and characterization of recombinant ovine coagulation factor VIII. *PLoS One*, 7(11), e49481.
- Zaqueo, K.D., Kayano, A.M., Simoes-Silva, R., Moreira-Dill, L.S., Fernandes, C.F., Fuly, A.L., Maltarollo, V.G., Honorio, K.M., da Silva, S.L., Acosta, G., Caballol, M.A., de Oliveira, E., Albericio, F., Calderon, L.A., Soares, A.M. et Stabeli, R.G. (2014). Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biomed Res Int*, 2014, 595186.
- Zeng, L., Si, X., Yu, W.P., Le, H.T., Ng, K.P., Teng, R.M., Ryan, K., Wang, D.Z., Ponniah, S. et Pallen, C.J. (2003). PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol*, 160(1), 137-146.
- Zhang, J., Woodhead, G.J., Swaminathan, S.K., Noles, S.R., McQuinn, E.R., Pisarek, A.J., Stocker, A.M., Mutch, C.A., Funatsu, N. et Chenn, A. (2010). Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *Dev Cell*, 18(3), 472-479.
- Zhao, S., Chai, X., Forster, E. et Frotscher, M. (2004). Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development*, 131(20), 5117-5125.
- Zhao, S. et Frotscher, M. (2010). Go or stop? Divergent roles of Reelin in radial neuronal migration. *Neuroscientist*, 16(4), 421-434.