

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PROFIL PROTÉOLYTIQUE DE LA REELINE DURANT LA
DIFFÉRENCIATION NEUROECTODERMIQUE DE CELLULES SOUCHES P19

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

CLARA LAFORTUNE-SGAMBATO

JUIN 2016

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.»

*La science est surtout une prise
de conscience de plus en plus
complète de ce qui peut et doit
être découvert.*

Boris Vian

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier ma directrice de recherche la Pre Joanne Paquin pour avoir cru en mon potentiel et m'avoir accueillie dans son laboratoire. Sa disponibilité, sa patience, son écoute et son soutien m'ont permis de grandement progresser, tant au plan de ma pensée scientifique, que du développement de mes compétences.

Je souhaiterais aussi remercier ma collègue de laboratoire Lyvia Fourcade qui a pris le temps de me former à mon arrivée, qui a toujours été disponible pour m'aider et qui m'a beaucoup encouragée (surtout pour mes présentations orales).

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude aux techniciennes de laboratoire du département de chimie, Louise Martin-Falstrault, Isabelle Cloutier et Marie-Josée Crevier pour leur disponibilité constante face à mes questionnements et mes besoins de matériel.

Je tiens à remercier la Pre Diana Averill ainsi que son équipe pour m'avoir permis d'utiliser leur système d'imagerie afin de finaliser mes immunobuvardages dans les meilleures conditions. De plus, les membres de son équipe ont été très présents pour moi en tant que collègues de substitution. Leur support a été très apprécié en particulier dans les derniers temps de ma maîtrise. Je souhaiterais remercier tout particulièrement Maureen Redza pour sa bonne humeur anglo-saxonne et ses goûts musicaux intéressants (ou pas tant) et Audrey Glory pour sa présence, son grand soutien, parfois douloureux, et surtout pour son acharnement dans sa volonté de rester parmi nous encore quelques temps (*Ne quid nimis*). Ces deux dernières m'ont grandement encouragée dans le processus d'écriture de mon mémoire.

Mes remerciements s'adressent également au Pr Robert Day de l'université de Sherbrooke pour nous avoir fourni l'inhibiteur Multi-Leu et au Dr Ajoy Basak de l'institut de recherche de l'Hôpital d'Ottawa pour nous avoir fourni le peptide 7B2.

Je remercie bien évidemment ma famille pour son soutien, ainsi que mes amis qui sont toujours aussi présents pour moi malgré la distance pour certains.

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

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
RÉSUMÉ	xiv
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Migration et organisation neuronales dans le cerveau en développement	2
1.3 La reeline	7
1.3.1 Structure.....	7
1.3.2 Rôle dans le cerveau en développement et adulte	10
1.3.3 Mécanismes d'action	12
1.3.4 Rôles de fragments de la reeline	14
1.3.5 Maladies associées à un mal fonctionnement de la reeline	15
1.4 Protéases candidates du clivage de la reeline	16
1.4.1 Stratégies utilisées pour l'identification de protéases de clivage de la reeline.....	16
1.4.2 Implication potentielle de métalloprotéases et de protéases à sérine.....	18
1.4.3 Autres protéases candidates	20
1.5 La lignée cellulaire P19 comme modèle de jeunes neurones	21
1.5.1 Caractéristiques générales.....	21
1.5.2 Caractéristiques des cultures neuroectodermales P19	23
1.5.3 Expression de la reeline et ses partenaires de signalisation dans le modèle P19	25

1.5.4	Expression de protéases dans le modèle P19	25
1.6	La céruloplasmine.....	26
1.6.1	Structure.....	27
1.6.2	Rôles	29
1.6.3	Activité protéasique et cuivre dans les actions de la CP sur les neurones P19.....	30
1.7	Hypothèses et objectifs du projet.....	31
	CHAPITRE II	33
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	33
2.1	Culture cellulaire	33
2.1.1	Propagation des cellules P19	33
2.1.2	Différenciation de cellules P19 en neurones.....	34
2.1.3	Traitement des neurones	35
2.1.4	Milieu enrichi en reeline	35
2.2	Récolte des milieux de culture et des extraits cellulaires	38
2.2.1	Milieux de culture.....	38
2.2.2	Extraits cellulaires.....	38
2.3	Électrophorèse et immunobuvardage	39
2.3.1	Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS- PAGE).....	39
2.3.2	Électrotransfert.....	39
2.3.3	Immunobuvardage	40
2.4	Dosage des protéines	42
2.5	Purification de la CP	42
2.6	Statistiques.....	43
	CHAPITRE III	45
	RÉSULTATS	45
3.1	Analyse phénotypique de cultures à long terme de cellules P19 différenciées et traitées ou non avec de la CP	45
3.2	Impact à long terme de la CP et du SBTI/aprotinine sur la morphologie des cultures de neurones P19 et l'expression de la reeline	49

3.3	Effet d'un milieu pré-enrichi en reeline sur la morphologie des cultures neuronales P19.....	54
3.4	Effets de divers inhibiteurs de protéases sur le clivage de la reeline.....	56
3.4.1	Les inhibiteurs de métalloprotéases	57
3.4.2	Les inhibiteurs de protéases à sérine.....	60
3.4.3	Les autres inhibiteurs de protéases	66
3.4.4	Combinaison d'inhibiteurs.....	69
	CHAPITRE IV	74
	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	74
4.1	Profil temporel du clivage de la reeline dans les cultures de neurones P19.....	75
4.2	Impact d'inhibiteurs de différentes classes de protéases sur le profil protéolytique de la reeline	76
4.3	Implication de la CP dans le clivage de la reeline	82
4.4	Aspects morphologiques des cultures neuronales P19	83
4.5	Conclusion	85
	ANNEXES	86
ANNEXE 1	EXPRESSION DE LA REELINE DANS DES CULTURES DE NEURONES, OU DES EXTRAITS DE CERVEAUX SELON DES DONNÉES PUBLIÉES	86
ANNEXE 2	DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS D'INHIBITEURS DE PROTÉASES À UTILISER EN CULTURE.....	88
ANNEXE 3	IMPACT DE LA SER ₂ CU SUR LES CULTURES NEURONALES P19	90
	BIBLIOGRAPHIE	94

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Migration des neurones le long des fibres radiales dans le cortex.	4
1.2 Développement des couches neuronales dans le cortex.	6
1.3 Structure de la reeline native et de ses fragments	9
1.4 Comparaison de l'organisation des couches de neurones dans le cortex entre phénotypes normal et <i>reeler</i>	11
1.5 Signalisation de la reeline.....	13
1.6 Modèle cellulaire P19.....	22
1.7 Micrographies de cultures de cellules P19	24
1.8 Structure de la CP.....	28
2.1 Différenciation des cellules souches P19 et traitement des cultures de neurones	36
3.1 Morphologie et évolution de l'expression de marqueurs phénotypiques et de la reeline dans des cultures de neurones P19 au long terme traitées ou non à la CP	47
3.2 Impact de la CP et du SBTI/aprotinine sur la morphologie et sur l'expression de la reeline dans les cultures neuronales P19 de J6 à J12	51
3.3 Effet d'un milieu enrichi en reeline sur la morphologie et le profil protéolytique de la reeline dans les cultures neuronales P19 de J6 à J12 55	
3.4 Effet d'inhibiteurs de métalloprotéases sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19.....	58
3.5 Effet d'inhibiteurs de protéases à sérine sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19.....	63
3.6 Effet d'inhibiteurs de convertases sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19.....	65

3.7	Effet d'inhibiteurs d'autres types de protéases sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19	67
3.8	Effet de la combinaison d'un inhibiteur de métalloprotéase avec un inhibiteur de convertases sur la morphologie des cultures de neurones P19 et sur le clivage de la reeline	72
3.9	Effet d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de convertases sur la morphologie des cultures de neurones P19 et le clivage de la reeline	73
A.1	Immunobuvardages de la reeline dans des cultures de neurones ou des extraits de cerveaux	87
A.2	Effet comparé de la CP et de la Ser ₂ Cu sur la morphologie des cultures neuronales P19 et sur l'expression de la reeline	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Effets connus d'inhibiteurs de protéases.....	20
1.2 Protéases surexprimées lors de la différenciation de cellules souches P19 en neurones	26
2.1 Les inhibiteurs de protéases utilisés sur les neurones P19.....	37
2.2 Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages	41
2.3 Liste des anticorps secondaires utilisés pour les immunobuvardages.....	42
3.1 Pourcentage d'inhibition du clivage de la reeline avec différents inhibiteurs de protéases sur des cultures de neurones P19.....	71
4.1 Résumé des résultats obtenus sur l'inhibition du clivage de la reeline dans la littérature et dans cette étude.....	81
A.1 Intervalles de concentrations d'inhibiteurs essayés sur des cultures neuronales P19	89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

7B2	Peptide 7B2
ADAM	Désintégrine/métalloprotéinase (<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>)
ADAMTS	Désintégrine/métalloprotéinase avec motif thrombospondine (<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ApoE	Apolipoprotéine E
ApoER2	Récepteur de l'apolipoprotéine E de type 2 (<i>apolipoprotein E receptor 2</i>)
APP	Protéine précurseur de l'amyloïde (<i>amyloid precursor protein</i>)
AR	Acide rétinoïque
ARN	Acide ribonucléique
BACE-1	β -sécrétase 1 (<i>beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>)
BSA	Albumine sérique bovine
CP	Céruloplasmine
C-t	Terminaison-C
Dab-1	<i>Disabled-1</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGCG	Gallate d'épigallocatechine (ester d'épigallocatechine et d'acide gallique)
EGF	Facteur de croissance épidermal (<i>epidermal growth factor</i>)
En	Jour embryonnaire n
FBS	Sérum fœtal bovin (<i>fetal bovine serum</i>)
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique
FI-1	Inhibiteur-I de furine
FI-II	Inhibiteur-II de furine

GABA	Acide γ -aminobutyrique
GFAP	Protéine fibrillaire gliale acide (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSK3 β	Glycogène-synthase-kinase-3 beta
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
His ₂ Cu	Histidine ₂ -cuivre
HRP	Peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)
Kpi	Tampon phosphate de potassium
MAP-2	Protéine associée aux microtubules-2 (<i>microtubule associated protein-2</i>)
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Médium essentiel d'Eagle modifié- α (<i>α-modified Eagle Essential Medium</i>)
MMP	Métalloprotéases de la matrice extracellulaire (<i>Matrix metalloproteinases</i>)
NBS	Neurobasal supplémenté
NF-M	Neurofilament-M
NGF	Facteur de croissance des nerfs (<i>nerve growth factor</i>)
NPxY	Domaine non-phosphorylable contenant un résidu de tyrosine (<i>non-phosphorylable domain containing tyrosine residu</i>)
N-t	Terminaison-N
PAI-1	Inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PBS	Tampon phosphate salin (<i>phosphate buffer saline</i>)
PC	Plaque corticale
PC2	Proprotéine convertase 2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PVDF	Polyvinylidène difluoré
RAR	Récepteurs de l'acide rétinoïque (<i>retinoic acid receptors</i>)
RXR	Récepteurs de rétinoïdes (<i>retinoid receptors</i>)
SBTI	Inhibiteur de trypsine de la fève de soya (<i>soybean trypsin inhibitor</i>)
SDS	Dodécylsulfate de sodium (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
Ser ₂ Cu	Sérine ₂ -cuivre
SNC	Système nerveux central

SNP	Système nerveux périphérique
SYP	Synaptophysine
Tau	Protéine stabilisatrice des microtubules (<i>tubule-associated unit</i>)
TBS	Tampon Tris-salin
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène (<i>tissue-type plasminogen activator</i>)
Tyr ou Y	Acide aminé tyrosine
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLDLr	Récepteur de lipoprotéines de très faible densité (<i>very low density lipoprotein receptor</i>)
ZI	Zone intermédiaire
ZM	Zone marginale
ZV	Zone ventriculaire

RÉSUMÉ

La reeline, une glycoprotéine sécrétoire du cerveau, joue un rôle essentiel dans l'organisation des couches neuronales chez l'embryon ainsi que dans la plasticité synaptique chez l'adulte. Un dysfonctionnement de la reeline est associé à des maladies neurologiques telles que l'Alzheimer ou la schizophrénie. Cette protéine existe sous des formes de 400, 300 et 180 kDa possédant la même extrémité N. Les rôles précis des fragments 300K et 180K ainsi que l'identité des protéases responsables de leur génération restent peu connus. Nous utilisons le modèle de cellules souches embryonnaires P19, capables de se différencier en dérivées du neuroectoderme, pour étudier la régulation de la reeline dans un contexte développemental. Les cultures de cellules P19 différenciées contiennent surtout des neurones aux jours 4 à 7 de la différenciation, auxquels s'ajoutent des astrocytes au-delà de jour 8. La céruloplasmine (CP), une protéine à cuivre extracellulaire synthétisée par les astrocytes, induit la génération de la reeline 300K dans des cultures de neurones P19 de jour 6. À l'aide des cultures neuroectodermiques P19, nous avons voulu (1) déterminer s'il existe une relation entre l'apparition de fragments de la reeline et celle des astrocytes, (2) identifier la ou les classes de protéases impliquées dans la fragmentation de la reeline, et (3) évaluer si l'ajout de la CP au-delà de jour 6 a un impact sur ces cultures. Les résultats d'immunobuvardage montrent que les cultures produisent d'abord la reeline 400K et 180K, puis la reeline 300K à partir du jour 8, donc bien avant l'apparition d'astrocytes qui sont détectés à partir du jour 10. Ces cultures ne produisent pas de CP endogène de façon détectable. L'ajout d'inhibiteurs de protéases de jour 6 à jour 8 a montré que des inhibiteurs de métalloprotéases, de protéases à sérine et de protéases à cystéine ont, à des degrés divers, inhibé la génération de la reeline de 180K ou celle de 300K. Aucun de ces inhibiteurs n'a causé une inhibition complète suggérant qu'il pourrait y avoir plus d'une protéase capable de générer ces fragments. Dès le jour 10, les cultures montrent l'apparition d'îlots cellulaires exhibant des projections neuritiques rayonnantes que l'on retrouve très faiblement lorsque les cultures sont traitées avec de la CP exogène. L'ensemble des résultats suggère qu'une ou plusieurs cascades protéolytiques, d'origine neuronale plutôt qu'astrocytaire, pourrait être impliquée dans la génération de la reeline 180K et de 300K, et que la CP aurait une influence sur l'organisation neuronale.

Mots clés : reeline, céruloplasmine, cellules P19, différenciation neuronale, protéases, inhibiteurs, immunobuvardage

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Un grand nombre de protéines participe au bon développement du système nerveux central (SNC). La reeline possède un rôle majeur dans ce processus. Lorsqu'elle est absente, les couches de neurones constituant le cortex sont complètement désorganisées. Le fonctionnement de cette protéine reste encore peu connu, cependant les recherches ont montré que la forme native de la reeline ainsi que ses différents fragments ont un rôle essentiel durant le développement embryonnaire, ainsi que chez l'adulte. Des anomalies dans la production de la reeline ont été reliées à diverses maladies neurologiques comme l'autisme, la schizophrénie ou encore la maladie d'Alzheimer. Il reste à mieux comprendre les acteurs responsables du clivage de la reeline, donc de la production de ses différents fragments, ainsi que le rôle de chacun d'entre eux. Diverses protéases ont été proposées comme étant des acteurs potentiels dans le clivage de la reeline, principalement des métalloprotéases et des protéases à sérine. Une autre protéine, sans activité protéolytique, la céruloplasmine (CP), semble jouer un rôle dans l'expression de la reeline. La CP est une protéine à cuivre très importante dans le métabolisme du fer. Elle est principalement présente dans la circulation sanguine, mais est aussi retrouvée dans le cerveau à la surface des astrocytes. Des travaux antérieurs du laboratoire ont proposé un rôle de la CP dans l'organisation des neurones puisqu'elle induit leur agrégation, et qu'elle stimule la génération du fragment de 300K de la reeline à un stade précoce du développement des neurones. Ces travaux ont été réalisés avec des neurones dérivés de cellules P19, des cellules souches de type embryonnaire qui constituent un excellent modèle pour

ce projet puisqu'elles ont la faculté de se différencier en une population de neurones et d'astrocytes très semblable à la population retrouvée dans le SNC. De plus, les neurones P19 génèrent naturellement de la reeline et expriment des protéases capables de cliver cette protéine. Ils constituent donc un excellent modèle pour poursuivre les études sur la reeline et les relations avec la CP.

Pour mieux comprendre ces aspects, cette introduction décrira dans un premier temps les étapes de migration et d'organisation neuronales qui se passent durant le développement du cerveau. Ensuite, les propriétés et l'importance de la reeline et de la CP dans le développement seront détaillées, suivi d'une présentation approfondie du modèle cellulaire P19. Enfin, les différents objectifs et hypothèses de recherche seront exposés.

1.2 Migration et organisation neuronales dans le cerveau en développement

C'est au cours de la gastrulation que se forment les trois feuillets de l'embryon, c'est-à-dire l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. L'ectoderme, feuillet externe retrouvé au niveau du dos de l'embryon, le long de la ligne médiane, forme la plaque neurale. La plaque neurale donne naissance au SNC composé du cerveau et de la moelle épinière. Le système nerveux périphérique est quant à lui généré par la crête neurale et est composé des nerfs crâniens, rachidiens, et autonomes, ainsi que de leurs ganglions respectifs. Ensuite, la plaque neurale se replie durant l'étape de neurulation pour former le tube neural duquel sont issus l'encéphale ainsi que la moelle épinière (Purves et Coquery, 2008 ; Slack, 2004 ; Wolpert et Beddington, 2004). Les différentes régions primitives du cerveau, prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale, sont formées suite à des mouvements morphogénétiques du tube neural (Purves et Coquery, 2008).

L'acide rétinoïque (AR) a un rôle dans la formation de l'axe neural. En effet, des changements dans la concentration d'AR ont des répercussions sur le cerveau postérieur. L'AR formerait un gradient de concentration postéro-antérieur le long du cerveau postérieur (Slack, 2004). L'AR est un dérivé de la vitamine A appartenant à la superfamille des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes (Purves et Coquery, 2008). Il influence l'expression génique en se liant aux récepteurs nucléaires RAR (*retinoic acid receptors*) et RXR (*retinoid receptors*) (di Masi *et al.*, 2015).

Le tube neural, constitué de cellules précurseurs neurales, produit une grande diversité de neurones ainsi que de cellules gliales. La zone ventriculaire de prolifération, située sur la bordure de la lumière du tube neural, est le lieu de naissance de ces cellules (Fig. 1.1A et B). Suite à leur production, les neurones ne se divisent plus et migrent à partir de cette zone le long de la glie radiale, aussi bien dans l'encéphale que dans la moelle épinière, pour ainsi atteindre leur positionnement définitif (Purves et Coquery, 2008 ; Wolpert et Beddington, 2004). Plusieurs protéines d'adhésion permettent les interactions entre neurones et fibres gliales radiales (Fig. 1.1 C). C'est le cas de l' $\alpha3\beta1$ intégrine et de la laminine, par exemple. La fibronectine est, de plus, impliquée dans les interactions neurone-neurone permettant ainsi la formation des différentes couches de neurones dans le cortex (Rubenstein et Rakic, 2013).

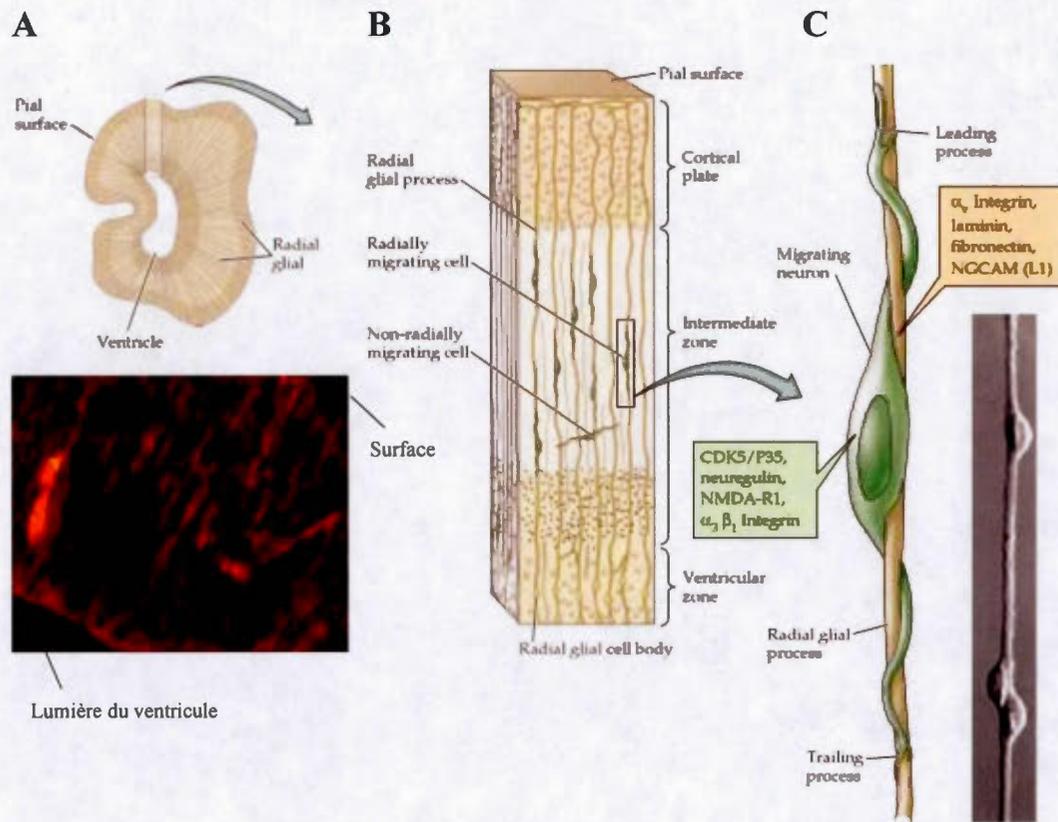


Figure 1.1 Migration des neurones le long des fibres radiales dans le cortex. (A) Schéma et micrographie de la migration neuronale durant le développement dans le prosencéphale. Les neurones, marqués avec un anticorps dirigé contre la neuréguiline, s'organisent en fonction des fibres radiales. Ces fibres radiales sont orientées du ventricule vers la surface corticale (*pial surface*). (B) Un agrandissement d'une partie du prosencéphale illustré en (A) montre l'attachement des neurones aux fibres radiales dans la zone intermédiaire, les menant jusqu'à leur positionnement définitif dans la plaque corticale. (C) Schéma et micrographie de neurones en migration sur une fibre radiale gliale. De nombreuses protéines d'adhésion ont été retrouvées au niveau des neurones (vert) et des fibres gliales (orangé). Figure tirée de Purves et Coquery (2008)

Chez les mammifères, le cortex est divisé en six différentes couches numérotées de I à VI, la couche I étant la couche la plus externe. Chaque couche est constituée de neurones aux formes et connexions distinctes. Le moment de formation des neurones détermine le site de leur positionnement définitif. En effet, les premières cellules formées au niveau de la zone ventriculaire forment la couche la plus interne, les cellules produites plus tardivement migrent au-delà des premières couches de cellules pour se positionner au-dessus d'elles (Purves et Coquery, 2008 ; Sekine *et al.*, 2014 ; Wolpert et Beddington, 2004). La formation des couches neuronales en fonction du temps dans le cortex embryonnaire de souris est représentée dans la Figure 1.2. Les neurones migrent le long de la glie radiale à travers la zone intermédiaire et la plaque corticale. Lorsqu'ils atteignent la couche de neurones la plus externe, ils se détachent de la glie radiale pour gagner leur emplacement définitif dans la plaque corticale, sous la zone marginale (Sekine *et al.*, 2014).

Le devenir et la différenciation des neurones sont influencés par la nature de leur environnement. De nombreux facteurs de croissance permettent la formation de différents types de neurones. De plus, la migration et le positionnement des neurones sont guidés par des signaux émis par des cellules avoisinantes. Ces signaux changent donc au cours de la migration des neurones puisque l'environnement change lui aussi (Britto *et al.*, 2014 ; Purves et Coquery, 2008). La neurogénèse a lieu au cours du développement de l'embryon et se poursuit au cours de la vie postnatale (Slack, 2004).

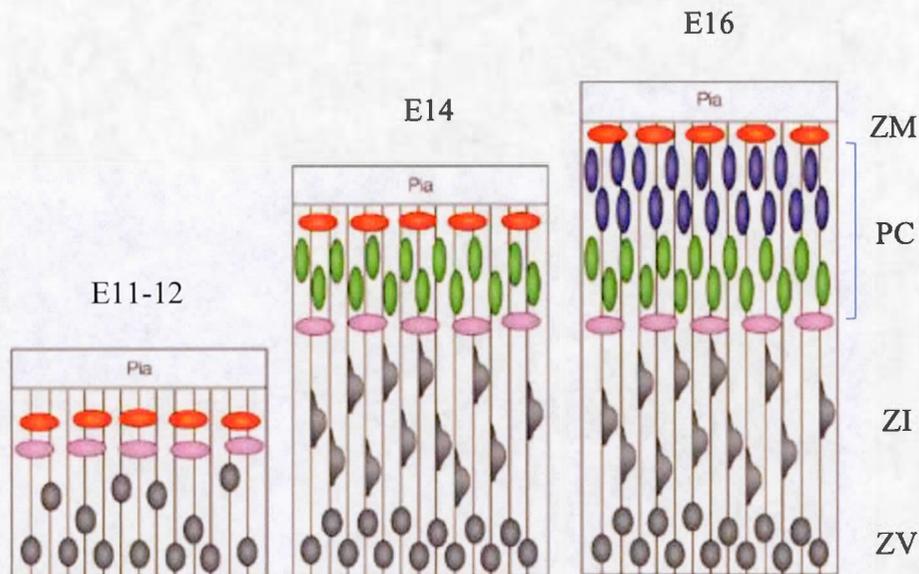


Figure 1.2 Développement des couches neuronales dans le cortex. Ce schéma illustre l'organisation du cortex entre les jours embryonnaires 11 et 16 (E11-16). Les neurones migrent le long de la glie radiale à partir de la zone ventriculaire (ZV), à travers la zone intermédiaire (ZI) pour atteindre leur positionnement précis et définitif dans la plaque corticale (PC) sous la zone marginale (ZM), laquelle contient les cellules de Cajal-Retzius productrices de reeline (cellules rouges). La migration des différentes couches de neurones dépend du moment de leur formation et se fait de l'intérieur vers l'extérieur. Ainsi, la première couche de neurones formée (cellules roses) migrera moins loin que la deuxième (cellules vertes) qui, elles-mêmes, migreront moins loin que la troisième couche de neurones (cellules bleues). Figure inspirée de Tissir et Goffinet (2003)

1.3 La reeline

1.3.1 Structure

La reeline est une grosse glycoprotéine de la matrice extracellulaire (MEC), d'environ 400 kDa, connue pour avoir un rôle majeur dans le processus de migration neuronale au cours du développement embryonnaire ainsi que dans le maintien de la plasticité synaptique et dans la mémoire à long terme dans le cerveau adulte. Au cours du développement, la reeline est sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius dans la zone marginale du cerveau (cellules rouges, Fig. 1.2). Chez l'adulte, ce sont les cellules GABAergiques qui sécrètent la reeline dans le cortex cérébral (Knuesel, 2010 ; Lacor *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 2015).

La reeline est constituée de 3461 acides aminés et peut être séparée en trois grandes parties (Fig. 1.3). La portion centrale de la reeline est composée de huit domaines de répétition (I à VIII) comportant chacun de 350 à 390 acides aminés. Au milieu de chaque domaine, on retrouve un motif présent dans le facteur de croissance épithélial (motif *EGF-like*), d'environ 30 acides aminés, entouré de deux sous-domaines similaires A et B. La partie N-terminale (N-t) est composée d'environ 200 à 300 acides aminés et possède une séquence qui a 25% d'homologie avec la protéine F-spondine, une protéine présente dans le tube neural et importante dans la croissance des neurites. Enfin, la portion C-terminale (C-t) est fortement chargée et assez courte puisqu'elle contient 33 acides aminés (Fatemi, 2005 ; Knuesel, 2010 ; Koie *et al.*, 2014 ; Panteri *et al.*, 2006).

Il existe deux sites de clivage sur la reeline *in vivo*, un site N-t et un site C-t (Fig. 1.3). Le clivage N-t de la reeline se fait entre les domaines de répétition II et III et le clivage C-t entre les domaines de répétition VI et VII. Le site précis du clivage C-t reste encore inconnu, cependant le site de clivage N-t a été récemment identifié et se situe entre la Proline 1244 et l'Alanine 1245. Ces clivages de la reeline génèrent des fragments d'environ 300 kDa et 180 kDa conservant la partie N-t native ainsi que

trois autres fragments (Koie *et al.*, 2014). Un épitope sur la portion N-t de la reeline permet à l'anticorps G10 d'identifier la forme native de 400 kDa, ainsi que les fragments de 300 kDa et 180 kDa (Jossin *et al.*, 2003). Plusieurs équipes de recherche ont montré que des protéases à sérine, comme l'activateur tissulaire du plasminogène, et des métalloprotéases, telle que ADAMTS-4, pourraient être impliquées dans le clivage de la reeline (Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Krstic *et al.*, 2012). L'implication de différentes protéases est abordée à la section 1.4.

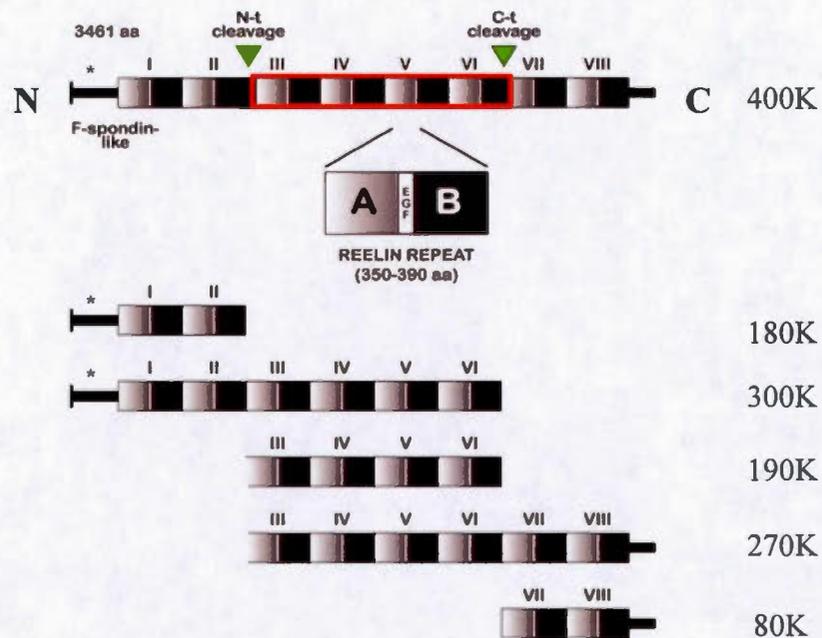


Figure 1.3 Structure de la reeline native et de ses fragments. La reeline est une protéine d'approximativement 400K contenant 3461 acides aminés. Sa structure comporte un domaine F-spondine suivi de huit domaines de répétition comportant chacun un motif présent dans le facteur de croissance épithélial (EGF). La reeline peut être clivée au site N-t, entre les domaines II et III, et au site C-t, entre les domaines VI et VII. Un épitope (*) sur la partie N-t permet de détecter la reeline avec l'anticorps G10. La portion centrale de la reeline (encadré en rouge) est essentielle à la fixation de la protéine aux récepteurs VLDLR et apoER2 à la surface des neurones. Figure inspirée de Knuesel (2010)

1.3.2 Rôle dans le cerveau en développement et adulte

Les souris possédant un phénotype *reeler*, c'est-à-dire n'ayant pas de reeline fonctionnelle causé par une mutation sur le gène de la protéine, ont permis de montrer l'importance de la reeline dans le développement et l'organisation du cerveau. En effet, chez les souris *reeler*, les différentes couches de neurones composant le cortex apparaissent complètement désorganisées (Fig. 1.4). Les couches de neurones sont inversées, l'alignement des neurones et des fibres nerveuses n'est plus adéquat en comparaison avec les souris normales (Fatemi, 2005 ; Tissir et Goffinet, 2003). Les premières étapes de la migration neuronale se déroulent de la même façon chez les souris normales et *reeler*. Cependant, il semble manquer un signal permettant aux neurones d'identifier leur positionnement définitif et d'arrêter leur migration (Tissir et Goffinet, 2003). Les souris *reeler* sont viables mais montrent d'importants défauts au niveau de la motricité, de l'apprentissage et de la plasticité synaptique, comparativement aux souris normales (Doehner et Knuesel, 2010 ; Frotscher, 1998 ; Krueger *et al.*, 2006 ; Rogers *et al.*, 2013).

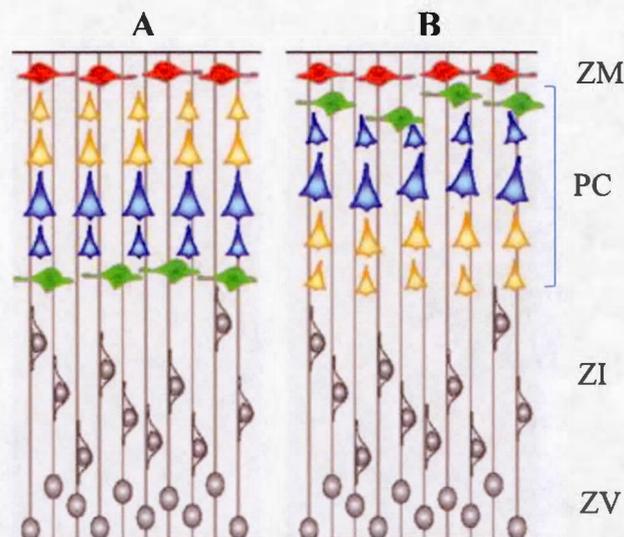


Figure 1.4 Comparaison de l'organisation des couches de neurones dans le cortex entre phénotypes normal et *reeler*. (A) Dans le cas du phénotype normal, les couches de neurones sont bien organisées dans la plaque corticale (PC). (B) Dans le phénotype *reeler*, contenant une mutation sur le gène codant pour la reeline, les couches de neurones sont désordonnées et désalignées. Les premières étapes de la migration des neurones le long de la glie radiale s'effectuent de la même façon que pour le phénotype normal. Cependant les couches de neurones sont inversées et perdent leur alignement dans la PC. ZM : zone marginales ; ZI : zone intermédiaire ; ZV : zone ventriculaire. Figure inspirée de (Kwan *et al.*, 2012).

La reeline possède un rôle important non seulement lors du développement embryonnaire mais également dans le cerveau adulte. Au cours du développement, les cellules de Cajal-Retzius disparaissent et ce sont les cellules GABAergiques qui sécréteront la reeline. Elle jouera alors un rôle important dans la neurotransmission. Des études ont montré que les deux récepteurs de la reeline, le récepteur de lipoprotéines de très faible densité (VLDLR) et le récepteur de l'apolipoprotéine de type 2 (ApoER2), sont essentiels pour maintenir la plasticité synaptique ainsi que

pour les transmissions synaptiques, la mémoire et l'apprentissage chez l'adulte (Herz et Chen, 2006).

1.3.3 Mécanismes d'action

Une fois sécrétée, la reeline peut se fixer sur deux récepteurs à la surface des neurones, VLDLR et ApoER2. La reeline peut se lier à l'un ou l'autre de ces récepteurs ou aux deux, dépendamment de leur présence à la surface des cellules. La fixation à un seul de ces deux récepteurs est nécessaire et suffisante à l'activation de la voie de signalisation. Suite à la liaison et ainsi à l'activation des récepteurs par la reeline, la protéine intracellulaire adaptatrice Disabled-1 (Dab-1) est phosphorylée au niveau de tyrosines (Sekine *et al.*, 2014 ; Tissir et Goffinet, 2003). Ce sont les tyrosines kinases Src et Fyn qui provoquent la phosphorylation de Dab-1 au niveau des quatre tyrosines Y185, Y198, Y220 et Y232 (Fig. 1.5) (Knuesel, 2010).

La phosphorylation de Dab-1 provoque l'activation de plusieurs cascades de signalisation (Fig. 1.5). Ainsi, la voie de signalisation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) permet ultimement la phosphorylation de la protéine Tau, responsable de la stabilisation des microtubules (Folsom et Fatemi, 2013 ; Knuesel, 2010). Dab-1 active aussi la voie impliquant Crk et CrkL, deux protéines adaptatrices essentielles dans la bonne organisation des couches de neurones. Le complexe Crk/CrkL-C3G active la GTPase Rap1, importante dans la stabilisation du squelette d'actine. Dab-1 est par la suite ubiquitinée par une E3 ligase et acheminée au protéasome (Knuesel, 2010 ; Sekine *et al.*, 2014).

Dernièrement, des chercheurs ont soulevé la possibilité que la reeline pourrait aussi interagir avec un autre récepteur à la surface des neurones, la protéine du précurseur amyloïde (APP). L'impact de cette liaison est encore peu connu mais elle serait nécessaire au développement des neurites (Doehner et Knuesel, 2010 ; Knuesel, 2010 ; Sharaf *et al.*, 2015).

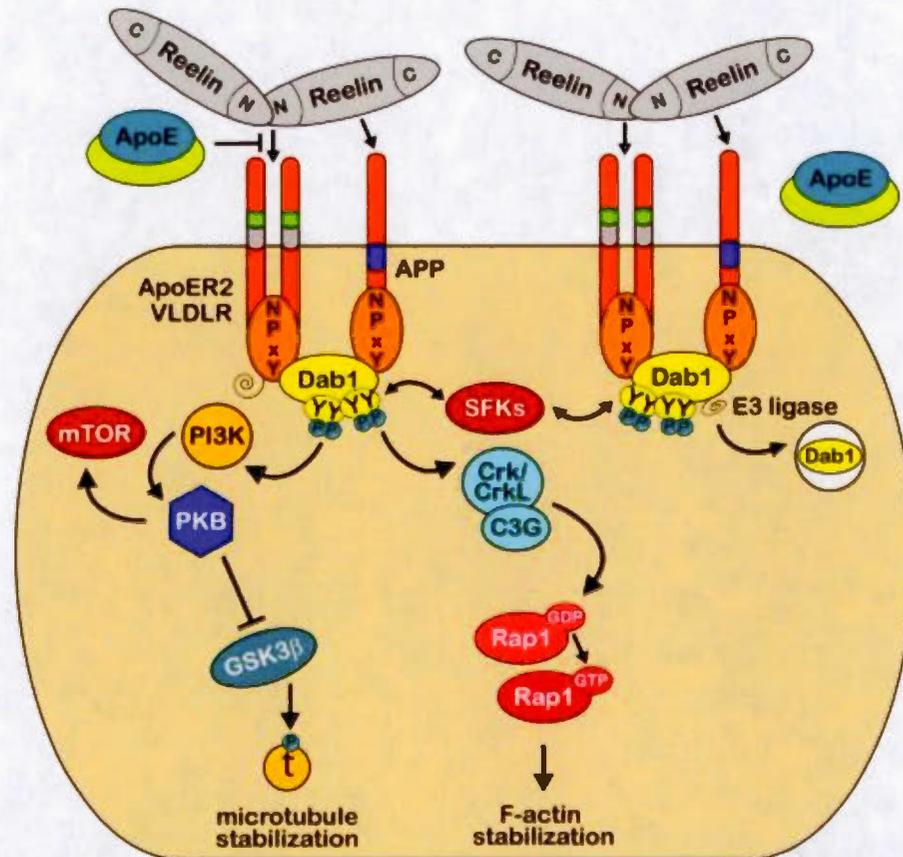


Figure 1.5 **Signalisation de la reeline.** La reeline peut se lier à des récepteurs à la surface des neurones, le récepteur de lipoprotéines de très faible densité (VLDLR), le récepteur de l'apolipoprotéine de type 2 (ApoER2) et possiblement la protéine du précurseur amyloïde (APP). Suite à cette fixation, Dab-1 interagit avec le motif NPxY de ces récepteurs, ce qui entraîne la phosphorylation de 4 de ses propres tyrosines. Plusieurs cascades de signalisation sont activées et permettent une migration et une organisation des neurones adéquates. Dab-1 est ensuite désactivée par ubiquitination et dégradation protéasomique. (voir le texte principal). Figure tirée de Knuesel (2010)

Le rôle précis de la reeline dans la migration neuronale reste encore peu compris. Des équipes de recherche soutiennent que la reeline pourrait agir comme un signal d'activation, d'autres comme signal d'arrêt de la migration neuronale (Caffrey *et al.*, 2014 ; Jossin *et al.*, 2007 ; Kubo *et al.*, 2010 ; Tissir et Goffinet, 2003). Ces actions opposées pourraient dépendre du contexte environnemental local. Comme mentionné précédemment, il semble manquer un signal d'arrêt de migration chez les souris *reeler* (Tissir et Goffinet, 2003). De plus, le défaut d'orientation des neurones chez les souris *reeler* suggère que la reeline aurait un rôle attractif sur ceux-ci (Zhao et Frotscher, 2010).

Des études *in vitro* de la reeline ont mis en évidence qu'elle pouvait provoquer le clivage de la laminine et de la fibronectine suggérant que la reeline est en mesure de modifier la lame basale et ainsi aider la migration neuronale à travers la plaque corticale (Quattrocchi *et al.*, 2002). Toutefois, des études plus poussées ont mis en doute l'existence d'une activité protéolytique de la reeline (Kohno et Hattori, 2010).

1.3.4 Rôles de fragments de la reeline

Des études *in vitro* utilisant des fragments de la reeline produits par ADN recombinant ont permis de révéler l'importance des différentes régions de la protéine dans la signalisation. Ainsi, la partie N-t permet la formation de dimères ou oligomères de reeline menant à une activation plus efficace des voies de signalisation, possiblement en regroupant les molécules de récepteurs à la surface cellulaire. La portion centrale de la reeline, située entre les domaines de répétition III et VI, est absolument essentielle pour la fixation de la reeline à ses récepteurs et l'activation des voies de signalisation. Enfin, la partie C-t de la reeline, entre le domaine VII et l'extrémité C-t, améliore l'efficacité des différentes voies de signalisation (Jossin *et*

al., 2007 ; Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Koie *et al.*, 2014 ; Trotter *et al.*, 2014). L'impact physiologique de l'existence des fragments *in vivo* est moins bien compris. Le fragment 300K, capable de se lier aux récepteurs ApoER2 et VLDLR, pourrait agir à plus longue distance que la forme native 400K car il diffuse plus facilement (Jossin *et al.*, 2007 ; Jossin *et al.*, 2004).

1.3.5 Maladies associées à un mal fonctionnement de la reeline

Tel que mentionné préalablement, la reeline possède un rôle essentiel dans l'organisation du cortex lors du développement embryonnaire, ainsi que dans le cerveau adulte. Plusieurs recherches ont relié un déséquilibre de la signalisation de la reeline avec différentes maladies neurologiques telles que l'autisme, la schizophrénie, les troubles bipolaires ou encore des maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer ou le Parkinson (Fatemi *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2015). En effet, des études ont montré que des niveaux plus bas de reeline, du récepteur VLDLR et de la protéine adaptatrice Dab-1 étaient observés dans différentes régions du cerveau chez des sujets souffrant d'autisme (Fatemi *et al.*, 2005). De plus, des niveaux plus élevés de reeline ont été observés dans le cerveau de patients atteints d'Alzheimer (Botella-Lopez *et al.*, 2006). Dans le cas de la schizophrénie, d'autres recherches ont montré que les niveaux de reeline présents dans le sang étaient plus élevés chez les patients atteints de cette maladie comparativement aux sujets sains (Hornig *et al.*, 2015) alors que les niveaux de reeline apparaissent réduits dans plusieurs régions du cerveau (Folsom et Fatemi, 2013 ; Herz et Chen, 2006). Les niveaux relatifs des différentes formes de la reeline (400K, 300K et 180K) sont aussi affectés. En effet, par exemple chez les patients autistes, une diminution du niveau de reeline 400K est observé dans certaines parties du cerveau. Dans le cas de patients souffrants d'Alzheimer, c'est le niveau de reeline 180K qui apparaît plus élevé que la normale (Fatemi, 2005).

1.4 Protéases candidates du clivage de la reeline

Tel qu'indiqué précédemment, plusieurs études ont montré l'implication possible de diverses protéases dans le clivage de la reeline. Ces protéases seraient principalement des protéases à sérine concernant le clivage du côté C-t de la reeline, et des métalloprotéases pour les clivages en N-t et C-t (Krstic *et al.*, 2012 ; Trotter *et al.*, 2014).

1.4.1 Stratégies utilisées pour l'identification de protéases de clivage de la reeline

Pour identifier ces protéases, plusieurs approches ont été utilisées :

- a) Certains chercheurs ont utilisé de la reeline recombinante *in vitro*, c'est-à-dire isolée à partir d'un milieu de culture riche en reeline produite par divers types cellulaires. La reeline récoltée et enrichie partiellement ou parfois purifiée peut alors être mise en contact avec des protéases ainsi que des inhibiteurs de protéases (Hisanaga *et al.*, 2012 ; Jossin *et al.*, 2007 ; Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Krstic *et al.*, 2012).
- b) Le gène de la reeline peut être introduit dans des cellules, comme des cellules HeLa, leur permettant ainsi de produire de la reeline recombinante et ses fragments. Ces cellules peuvent ensuite être traitées avec des inhibiteurs de protéases (Hisanaga *et al.*, 2012 ; Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Krstic *et al.*, 2012).
- c) Des cultures de neurones pouvant produire naturellement de la reeline ont été mises en contact avec des inhibiteurs de protéases (De Rouvroit *et al.*, 1999 ; Ducharme, 2013 ; Hisanaga *et al.*, 2012 ; Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Salmi, 2015).

- d) Enfin, des cultures de neurones, ne produisant pas de reeline, ont été mises en contact avec de la reeline recombinante, puis avec des inhibiteurs de protéases (Jossin *et al.*, 2007).

Ces différentes stratégies comportent chacune leurs limites. La production de reeline recombinante *in vitro*, la stratégie (a), permet d'obtenir la forme native de 400K de la reeline. Cette stratégie permet d'identifier des protéases capables de cliver la reeline mais n'indique pas si ces protéases sont celles qui agissent *in vivo*. D'autre part, les milieux de culture des cellules dans lesquelles le gène de la reeline a été introduit peuvent contenir des protéases capables de cliver la reeline. On se retrouve alors avec des préparations de reeline contenant déjà les fragments de 300K et 180K en plus de la forme native et possiblement des traces de protéases endogènes. On ne sait plus si la protéase exogène testée agit directement sur la reeline ou plutôt indirectement via une cascade protéolytique impliquant les protéases endogènes (Kohno, T. *et al.*, 2009 ; Krstic *et al.*, 2012). Dans la stratégie (b), les protéases des cellules non neuronales capables de cliver la reeline ne sont pas nécessairement les mêmes que les protéases neuronales. Les stratégies (c) et (d), qui consistent en l'utilisation de cultures de neurones exprimant naturellement les protéases provoquant le clivage de la reeline, permettent d'obtenir des résultats plus représentatifs physiologiquement qu'avec les autres méthodes. La reeline sera directement en contact avec différentes protéases naturellement exprimées par les neurones en culture. Cependant, les cultures de neurones ne produisent pas toujours tous les fragments de la reeline (Annexe 1 et Fig A.1). Le fragment de 300K est rarement détecté dans les cultures exprimant la reeline endogène comme dans celles qui ne l'expriment pas (Ducharme *et al.*, 2010 ; Kohno, S. *et al.*, 2009).

1.4.2 Implication potentielle de métalloprotéases et de protéases à sérine

Les métalloprotéases ADAMTS-4 et ADAMTS-5 de la MEC se sont révélées capables de cliver la reeline aux sites N-t et C-t dans des études sur de la reeline recombinante exprimée par des cellules non neuronales comme des cellules HeLa, des cellules de rein, ou encore sur de la reeline recombinante *in vitro*. Ces résultats ont été mis en évidence par l'utilisation de différents inhibiteurs de métalloprotéases tels que la catéchine EGCG (ester d'épigallocatechine et d'acide gallique), le chélateur de métaux 1,10-phénantroline ou encore le picéatannol (Tableau 1.1). En effet, des études effectuées sur des cellules de rein HEK293, exprimant la reeline recombinante, ont montré que ces substances inhibaient le clivage de la reeline aux sites N-t et C-t (Hisanaga *et al.*, 2012 ; Krstic *et al.*, 2012). Un autre inhibiteur de métalloprotéases, le GM6001, inhibe le clivage du site N-t de la reeline dans des cultures de neurones exprimant naturellement la reeline (neurones primaires, neurones différenciés de cellules souches P19) (Ducharme, 2013 ; Jossin *et al.*, 2007).

L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une protéase à sérine connue pour avoir un rôle dans la plasticité neuronale, dans l'organisation des neurones ainsi que dans la croissance des neurites (Tsirka, 2002). Des études faites sur de la reeline recombinante exprimée par des cellules non neuronales et sur de la reeline recombinante *in vitro*, ont montré que le tPA peut cliver la reeline au niveau de son site de clivage C-t uniquement (Krstic *et al.*, 2012). La serpine E1 (ou PAI-1 : Inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène), une protéine inhibitrice de protéases à sérine dont le tPA, fortement exprimée par les astrocytes (Kim *et al.*, 2014), est en mesure d'inhiber le clivage de la reeline par le tPA dans des cultures de cellules de rein HEK293 exprimant la reeline recombinante ou *in vitro* en présence de tPA et de reeline recombinants (Krstic *et al.*, 2012). Selon le Tableau 1.1, la serpine E1 inhibe le clivage N-t donc elle n'inhiberait pas l'action du tPA qui clive seulement en C-t.

D'autres expériences *in vitro* sur de la reeline recombinante montrent que l'inhibiteur de trypsine de la fève de soya (SBTI) et l'aprotinine, deux inhibiteurs de protéases à sérine à large spectre, n'affectent pas le clivage de la reeline par le tPA mais inhibent son clivage au site N-t par la métalloprotéase MMP9 (Krstic *et al.*, 2012).

Des inhibiteurs de la furine (FI), une protéase à sérine de la famille des convertases, empêchent la maturation de la métalloprotéase ADAMTS-4. L'inhibiteur-1 de la furine (FI-I) a été identifié comme pouvant inhiber le clivage de la reeline au site N-t dans des cultures de neurones corticaux primaires exprimant naturellement la reeline et inhiber les deux sites de clivage dans des cultures de cellules de rein (HEK293T) exprimant la reeline recombinante. Cependant, l'inhibiteur-II de la furine (FI-II) n'a aucun effet. La furine n'agirait pas directement sur la reeline, plutôt indirectement en activant la métalloprotéase ADAMTS-4 (Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Krstic *et al.*, 2012).

Tableau 1.1 Effets connus d'inhibiteurs de protéases.

Protéases cibles	Inhibiteurs	Reeline		Ref	
Métalloprotéases	Catéchine EGCG	↓300K	↓↓180K	4	*
	GM-6001		↓180K	1, 2	#
	1,10-Phénanthroline	↓300K	↓↓180K	4	*
	Picéatannol	↓300K	↓↓180K	4	*
Protéases à sérine	Inhibiteur-I de furine	↓300K	↓↓180K	3, 4	* #
	Serpin E1		↓180K	4	*+

Des inhibiteurs de protéases à sérine et de métalloprotéases ont été identifiés comme pouvant inhiber le clivage de la reeline en ses sites N-t et C-t. Une diminution plus ou moins forte des niveaux des fragments de 180K et de 300K de la reeline a été montrée par immunobuvardage. Ces différentes études ont été effectuées dans des cellules produisant de la reeline recombinante (*), dans des neurones (#) ou encore avec de la reeline recombinante *in vitro* (+). (1) Ducharme *et al.* (2010) ; (2) Jossin *et al.* (2007) ; (3) Kohno, S. *et al.* (2009) ; (4) Krstic *et al.* (2012)

1.4.3 Autres protéases candidates

Outre les métalloprotéases et les protéases à sérine, d'autres types de protéases pourraient jouer un rôle dans le clivage de la reeline. Le MG-132 et la lactacystine sont des inhibiteurs de protéases à cystéine et de protéases à thréonine respectivement, et ce sont tous les deux des inhibiteurs du protéasome (Cho *et al.*, 2013 ; Felsenberg *et al.*, 2014 ; Powers *et al.*, 2002). Leur action affecte la mémoire à long terme chez les abeilles (Felsenberg *et al.*, 2014). Des études ont aussi montré que le MG-132 pouvait inhiber l'activité du tPA (Cho *et al.*, 2013)

1.5 La lignée cellulaire P19 comme modèle de jeunes neurones

1.5.1 Caractéristiques générales

Le modèle cellulaire utilisé dans le présent travail est le modèle P19. Les cellules P19 sont des cellules d'un carcinome embryonnaire de souris, similaires à des cellules souches embryonnaires primaires. Les cellules P19 proviennent d'un tératocarcinome développé dans un testicule de souris adulte après qu'on y ait implanté des cellules d'un embryon de souris de 7,5 jour. Le caryotype euploïde mâle des cellules P19 leur donne une grande stabilité génétique (McBurney, 1993). Ce sont des cellules immortelles, proliférant rapidement, et pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires avec un traitement adéquat (MacPherson et McBurney, 1995 ; McBurney, 1993 ; Staines *et al.*, 1996) (Fig. 1.6). Les traitements les plus utilisés sont l'AR et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Les types cellulaires obtenus seront différents selon le choix du traitement effectué et selon la concentration utilisée. Ainsi, suite à une exposition à une concentration de 10^{-6} M d'AR les cellules P19 se différencient en neurones et en astrocytes alors qu'à une concentration d'AR de 10^{-7} M ou moins, elles se différencient en cellules de muscle cardiaque et de muscle squelettique (Bouchard et Paquin, 2009 ; Ducharme *et al.*, 2010).

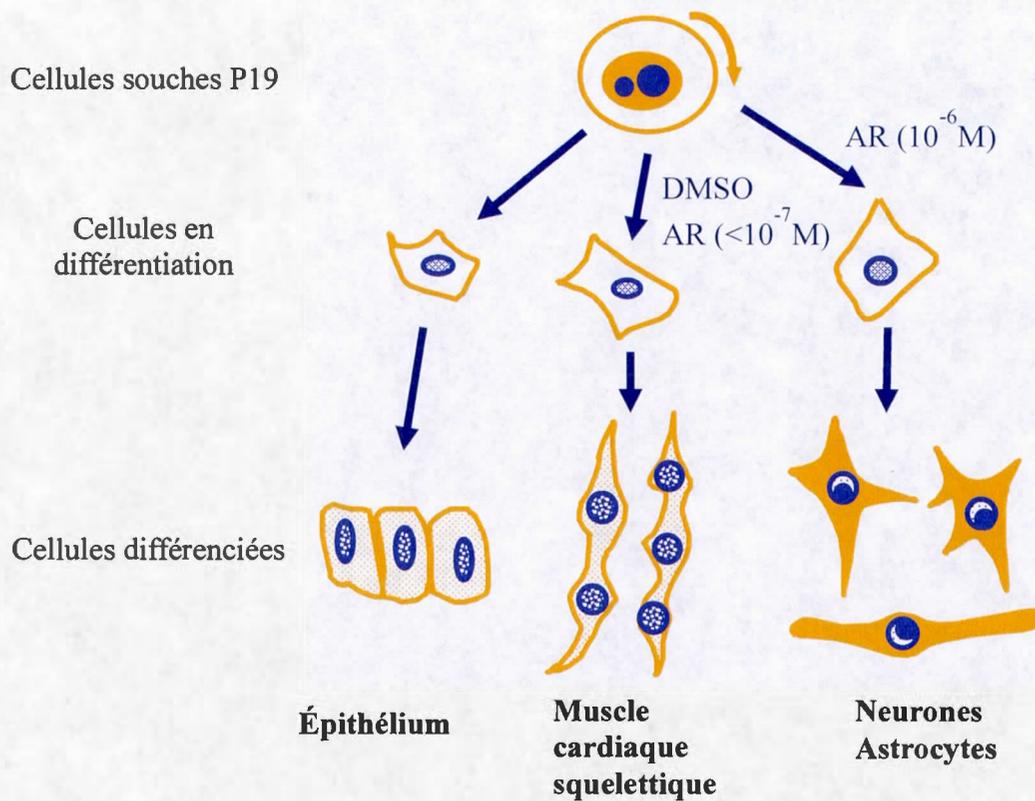


Figure 1.6 **Modèle cellulaire P19.** Les cellules P19 sont des cellules d'un carcinome embryonnaire de souris. Elles sont immortelles, pluripotentes et prolifèrent rapidement. Les cellules P19 peuvent se différencier en plusieurs types cellulaire selon le traitement appliqué (DMSO, AR). Figure inspirée de Rudnicki et McBurney (1987)

1.5.2 Caractéristiques des cultures neuroectodermales P19

Ce modèle cellulaire a été choisi car les cellules P19 ont la capacité de se différencier en neurones très représentatifs de ceux retrouvés dans le SNC, et permettent d'étudier le développement de jeunes neurones par des méthodes rapides et simples (Cadet et Paquin, 2000 ; Ducharme *et al.*, 2010 ; McBurney *et al.*, 1988 ; Ulrich et Majumder, 2006). En effet, suite à un traitement de 4 jours à l'AR, les cellules P19 se différencient en neurones (Fig. 1.7). Ce sont des neurones qui sont majoritairement présents, à plus de 90%, dans un premier temps (J4-J7). Leur proportion en culture commence à diminuer à partir du jour 7 environ (J7). Ces neurones expriment un grand nombre de marqueurs neuronaux spécifiques tels que le neurofilament-M (NF-M), la protéine Tau, la synaptophysine (SYP) ou encore la protéine associée aux microtubules-2 (MAP-2). Plusieurs neuropeptides sont aussi produits par les neurones P19 tels que le neuropeptide Y ou la somatostatine, ainsi que plusieurs neurotransmetteurs comme l'acide aminobutyrique (GABA) et le glutamate majoritairement (MacPherson et McBurney, 1995 ; Ulrich et Majumder, 2006). À J10, beaucoup de fibroblastes et des astrocytes sont présents. Les astrocytes expriment la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) (Jeannotte *et al.*, 1997 ; McBurney, 1993 ; Ulrich et Majumder, 2006).

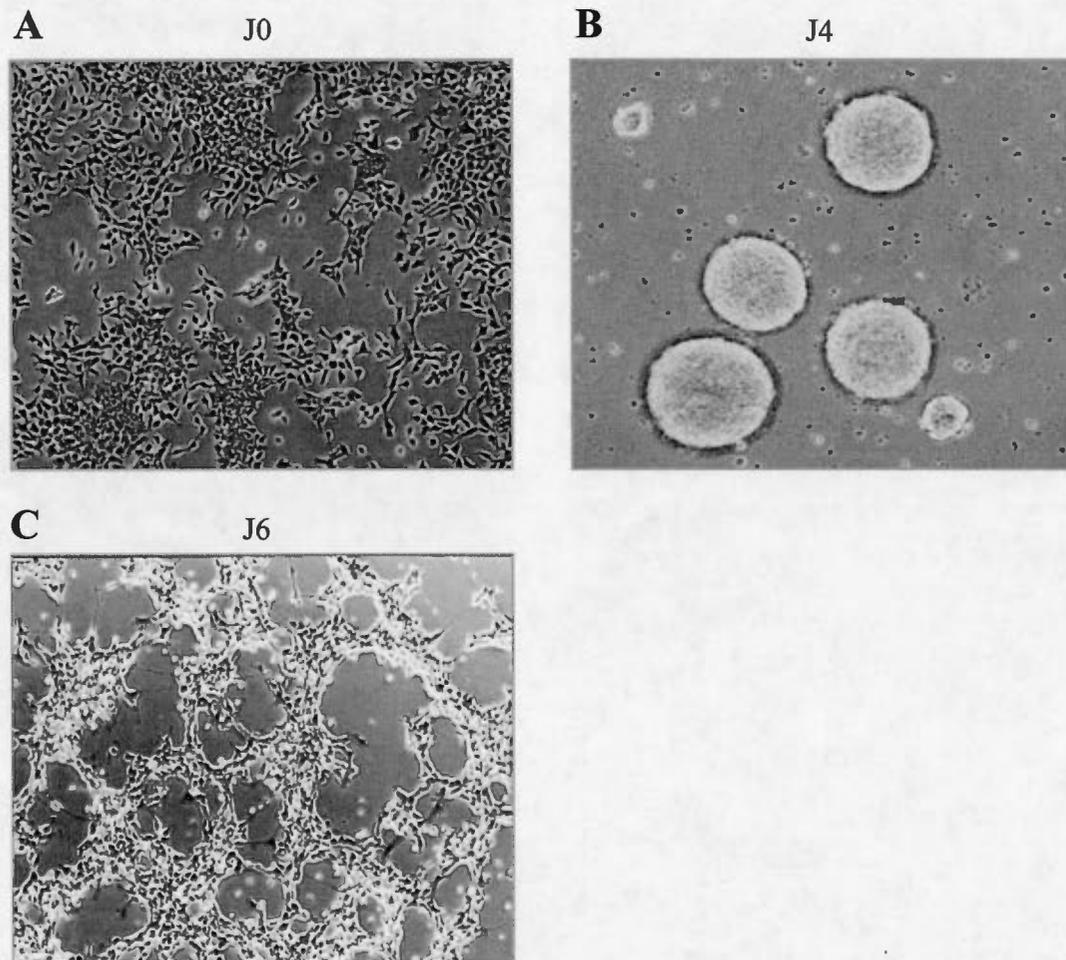


Figure 1.7 Micrographies de cultures de cellules P19. (A) Des cellules souches P19 non différenciées, en pétri tissulaire. (B) Les cellules P19 en pétri bactériologique forment des sphéroïdes flottants durant les 4 jours de traitement à l'AR. (C) Des neurones P19 au sixième jour de différenciation, cultivés de J4 à J6 en pétri tissulaire.

1.5.3 Expression de la reeline et ses partenaires de signalisation dans le modèle P19

Les cellules P19 sont un très bon modèle d'étude pour le présent projet de recherche car elles produisent naturellement de la reeline. En effet, les études réalisées par Ducharme *et al.* (2010) avec l'anticorps G10 ont montré que les cellules P19 indifférenciées produisent de la reeline 400K. Au cours des 4 jours de la différenciation des cellules P19 par l'AR, de la reeline 400K et 180K sont retrouvées dans les milieux de culture. Au jour 6 de la différenciation neuronale, les formes de 400K et 180K sont détectables dans le milieu avec des traces de reeline de 300K (Ducharme *et al.*, 2010). Les récepteurs ApoER2 et VLDLR, ainsi que la protéine adaptatrice Dab-1 sont aussi exprimés dans le modèle neuronal P19 (Ducharme *et al.*, 2010 ; Howell *et al.*, 1997)

1.5.4 Expression de protéases dans le modèle P19

Des études de puces à ADN ont permis de déterminer les différents gènes surexprimés lors de la différenciation des cellules P19 avec l'AR (Hatada *et al.*, 2008). En examinant ces résultats, l'équipe de Krstic *et al.* (2012) a pu regrouper plusieurs protéases fortement surexprimées dont 19 protéases à sérine, 20 métalloprotéases et 4 convertases (Tableau 1.2). D'autres études vont dans le même sens et montrent l'expression de certaines protéases par les neurones P19. En effet, la métalloprotéase ADAM23, par exemple, est exprimée par les neurones P19 et jouerait un rôle important dans leur différenciation (Sun *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que la métalloprotéase MT5 est exprimée par les neurones P19 (Hayashita-Kinoh *et al.*, 2001). De plus, la prohormone convertase 2 (PC2/PCSK2), une protéase à sérine extracellulaire présente dans le cerveau et possédant un rôle fondamental dans le développement de l'embryon, se retrouve naturellement dans les cultures de neurones

P19 suite à leur différenciation par l'AR. La PC2 a un inhibiteur spécifique naturel, le peptide 7B2 (Jeannotte *et al.*, 1997 ; Poirier *et al.*, 2006 ; Zhu et Lindberg, 1995).

Tableau 1.2 Protéases surexprimées lors de la différenciation de cellules souches P19 en neurones

Serine Protease	GeneCards ID	Metalloprotease	GeneCards ID	Convertase	GeneCards ID
TMPRSS5	GC11M113592	BMP1	GC08P022022	PCSK5	GC09P078505
PRSS12	GC04M119201	ADAM-1	GC12P112336	PCSK6	GC15M101844
PLAT (tPA)	GC08M042050	ADAM-8	GC10M135075	PCSK2	GC20P017206
HABP2	GC10P115302	ADAM-10	GC15M058887	CPE	GC04P166300
PREPL	GC02M044543	ADAM-11	GC17P042847		
PRSS23	GC11P086511	ADAM-19	GC05M156836		
FAP	GC02M162991	ADAM-21	GC14P070924		
HGFAC	GC04P003413	ADAM-23	GC02P207272	Protease Inhibitors	GeneCards ID
RHBDL3	GC17P030593	MMP24 (MT5)	GC20P033814	SERPINI1	GC03P167453
MASP1	GC03M186935	MMP16 (MT3)	GC08M089118	SERPINE2	GC02M224839
MASP2	GC01M011086	ADAMTS-3	GC04M073136	WFIKKN2	GC17P048912
ZFYVE27	GC10P099486	ADAMTS-4	GC01M161159	FSTL5	GC04M162305
ZFYVE28	GC04M002238	ADAMTS-5	GC21M028290	TFPI	GC02M188295
PRTN3	GC19P000840	ADAMTS-7	GC15M079051	LXN	GC03M158366
DPP6	GC07P153584	ADAMTS-12	GC05M033495	TMEFF1	GC09P103207
DPP10	GC02P115295	ADAMTS-13	GC09P136279	TMEFF2	GC02M192777
BAI2	GC01M032192	ADAMTS-19	GC05P128824	SPOCK1	GC05M136339
BAI3	GC06P069404	TRHDE	GC12P072453	SERPING1	GC11P057364
SEC11L1	GC15M085212	ECEL1	GC02M233308		
		PAPPA	GC09P118916		

Ces résultats sont sélectionnés à partir d'une étude utilisant des puces à ADN réalisée à partir de cellules souches P19 différenciés en neurones (Hatada *et al.*, 2008).
Tableau tiré de (Krstic *et al.*, 2012)

1.6 La céruloplasmine

La CP est une glycoprotéine d'environ 132 kDa appartenant au groupe des α 2-globulines et retrouvée dans le sang suite à sa synthèse par les hépatocytes dans le foie. Elle lie jusqu'à 95% du cuivre sanguin chez l'humain et possède une importante activité ferroxidasique lui donnant un grand rôle dans la régulation du métabolisme du fer (Ducharme *et al.*, 2010 ; Patel *et al.*, 2000 ; Qian et Ke, 2001 ; Vassiliev *et al.*, 2005 ; Zaitseva *et al.*, 1996). La CP est aussi retrouvée dans le système nerveux

central, fixé à la surface des astrocytes grâce à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Patel *et al.*, 2000).

1.6.1 Structure

La CP est constituée d'une seule chaîne de 1046 acides aminés divisée en six domaines (Fig. 1.8). Ces domaines sont regroupés en paires (D1-D2, D3-D4, D5-D6) de 330 à 340 acides aminés chacune, très similaires les unes aux autres (Vassiliev *et al.*, 2005). La CP appartient à la famille des métalloprotéines à cuivre bleu comme l'ascorbate oxydase ou la laccase (Vachette *et al.*, 2002). Elle peut lier jusqu'à six ions cuivre de façon permanente et possède deux emplacements pour lier des atomes de cuivre labiles au niveau des domaines 4 et 6. Les trois cuivres permanents retrouvés dans les domaines 2, 4 et 6 sont responsables de la couleur bleue de la CP et ceux retrouvés au niveau des domaines 1 et 6 sont responsables de l'activité catalytique (Lindley *et al.*, 1997 ; Machonkin *et al.*, 1998 ; Vassiliev *et al.*, 2005).

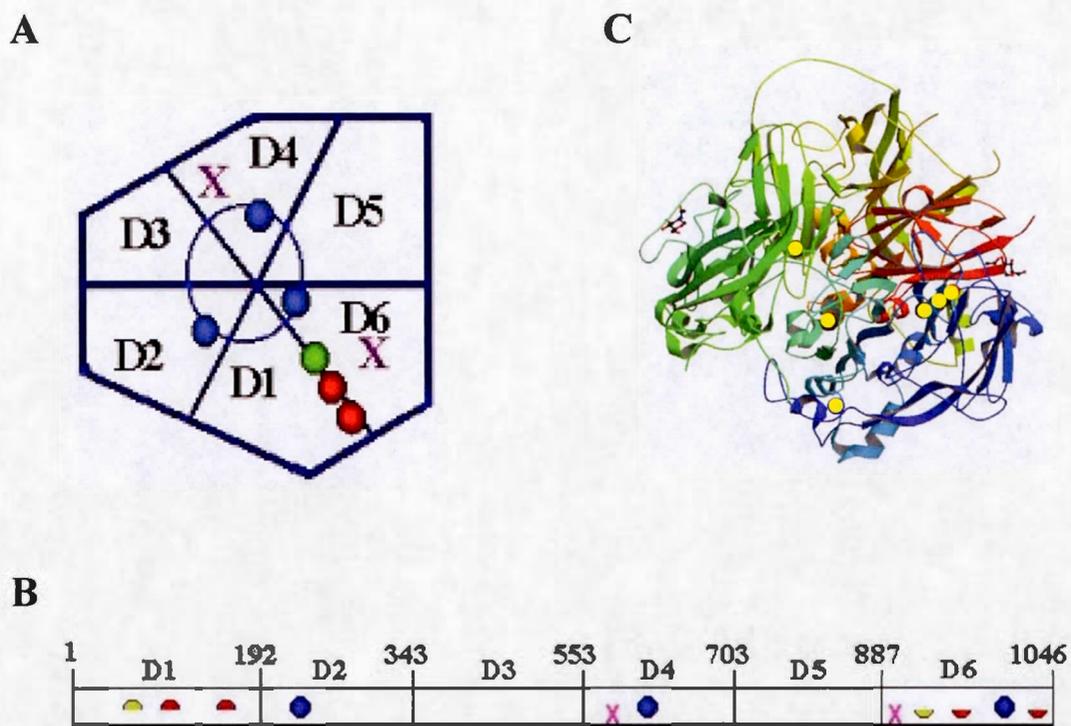


Figure 1.8 Structure de la CP. (A et B) La CP comprend six domaines regroupés en paires de 330 à 340 acides aminés (D1-D2, D3-D4, D5-D6). En bleu sont représentés les atomes de cuivre de type I responsables de la couleur bleue de la protéine. Les atomes de cuivre de type II et III sont visibles en vert et rouge respectivement. Ils forment le site catalytique. Notons que les domaines D1 et D6 contiennent des demi-sites de liaison pour ces atomes de cuivre ; la juxtaposition de ces domaines crée des sites complets. Les X montrent l'emplacement des atomes de cuivre labiles. (C) Les six domaines de la CP sont représentés sous des couleurs différentes et avec leurs structures secondaires déterminées par diffractométrie de rayons X. Les atomes de cuivre sont représentés par les symboles ●. Figure inspirée de Zaitseva *et al.* (1996), Takahashi *et al.* (1984) et Samygina *et al.* (2013).

1.6.2 Rôles

La CP est la ferroxidase la plus présente dans le plasma (Patel *et al.*, 2000). Comme dit précédemment, elle possède un rôle très important dans la régulation du métabolisme du fer puisqu'elle est capable d'oxyder le Fe^{2+} en Fe^{3+} qui pourra ensuite être internalisé par la transferrine. Cette fonction est essentielle puisque le fer libre sous forme Fe^{2+} peut générer des radicaux libres fortement toxiques pour l'organisme (Lindley *et al.*, 1997 ; Patel *et al.*, 2000 ; Vachette *et al.*, 2002). Des études ont montré que des patients ayant des déficits en CP accumulaient des dépôts de fer dans différents organes dont le cerveau, où ils peuvent provoquer des maladies neurodégénératives (Ducharme *et al.*, 2010 ; Harris *et al.*, 1995 ; Kono, 2012 ; Patel *et al.*, 2000 ; Qian et Ke, 2001).

Le centre catalytique de la CP est responsable de son activité ferroxidasique. Ce même centre est capable d'activité oxydasique sur d'autres substrats que le fer. Contrairement à d'autres oxydases, la CP forme de l'eau plutôt que du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à partir de molécules d'oxygène, évitant ainsi la formation de radicaux toxiques due au H_2O_2 . (Vassiliev *et al.*, 2005). Cette singularité tout comme l'oxydation du fer confère à la CP des propriétés d'antioxydant. Par contre, des études ont rapporté un rôle pro-oxydant dans certaines conditions. Enfin, la CP est aussi connue pour son rôle dans la régulation de l'inflammation (Qian et Ke, 2001 ; Samygina *et al.*, 2013 ; Vassiliev *et al.*, 2005).

En outre, la CP pourrait avoir un rôle dans le développement du système nerveux. Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré que la CP avait la capacité d'induire l'agrégation des neurones P19 nouvellement différenciés ainsi que de stimuler le clivage de la reeline au niveau de son site C-t (Ducharme *et al.*, 2010). Ces deux actions soulèvent un rôle possible de la CP dans le développement du cerveau, possiblement au niveau de l'organisation des neurones. Le fait que la CP stimule la génération de la reeline 300K n'est pas une curiosité de la

culture cellulaire. En effet, des études faites sur le cerveau de souris CP^{-/-} ont montré un plus faible niveau de reeline 300K (5 fois) que le cerveau de type sauvage aux jours embryonnaires 12.5 à 17.5 (Ducharme, 2013).

1.6.3 Activité protéasique et cuivre dans les actions de la CP sur les neurones P19

Les mécanismes impliqués dans les actions de la CP sur les neurones P19 sont peu connus, mais elles peuvent être inhibées par l'action du SBTI et de l'aprotinine, deux inhibiteurs à large spectre de protéases à sérine (Ducharme, 2013). La céruloplasmine a des homologies de séquence avec les facteurs V et VIII de la coagulation sanguine, qui sont des cofacteurs indispensables à l'activation du facteur X (David et Patel, 2000 ; Pittman *et al.*, 1994). Le rivaroxaban, un inhibiteur du facteur Xa de la coagulation sanguine, est utilisé comme traitement de maladies sanguines comme la maladie thromboembolique veineuse (Konigsbrugge *et al.*, 2015). Des études faites sur le modèle de neurones P19 montrent que le rivaroxaban peut inhiber les deux actions de la CP (Salmi, 2015).

Le cuivre joue un rôle essentiel au bon développement du cerveau. Des études menées chez des rats ayant une déficience en cuivre montrent des défauts de développement du cerveau, marqués par une diminution de la myélination et de la synaptogénèse. Des anomalies sont aussi observées dans le cas de la maladie de Menkes qui est caractérisée par une déficience dans le métabolisme du cuivre, provoquant des symptômes neurologiques comme un retard mental ou un retard dans le développement du cerveau et finalement provoque la mort à un jeune âge. (El Meskini *et al.*, 2007 ; Gybina *et al.*, 2009). Le cuivre pourrait avoir un rôle dans les actions neuronales de la CP. En effet, les résultats d'études précédentes montrent que des composés à cuivre ont des actions similaires à la CP sur l'agrégation des

neurones. En effet, la Ser₂Cu (un complexe formé de deux molécules de sérine et d'un atome de cuivre) peut, comme la CP, induire l'agrégation des neurones P19 ; cependant, elle n'a pas d'action sur le clivage de la reeline. L'His₂Cu, un autre composé à cuivre, a lui aussi été étudié sur le modèle cellulaire P19 mais aucun effet neuroagréatif ou sur la reeline n'a été observé (Ducharme, 2013 ; Maltais *et al.*, 2003 ; Salmi, 2015). De plus, le cuivre semble avoir un rôle important dans l'agrégation des neurones P19. En effet, la CP débarrassée de son cuivre par dénaturation à la chaleur ne modifie pas l'organisation des neurones P19 (Maltais *et al.*, 2003). Fait intéressant, le rivaroxaban et la combinaison SBTI/aprotinine inhibent l'action neuroagréative de la Ser₂Cu tout comme dans le cas de la CP (Salmi, 2015).

1.7 Hypothèses et objectifs du projet

Le modèle cellulaire P19 apparaît comme un excellent modèle pour l'étude des neurones durant le développement embryonnaire, permettant d'étudier certains aspects de l'expression et des actions de la reeline dans un contexte développemental. L'identification des protéases responsables du clivage de la reeline pourrait aider à mieux comprendre le rôle de chacun des fragments de la reeline dans les processus de migration, d'organisation et de maturation neuronales durant le développement. De meilleures connaissances sur le clivage de la reeline permettront aussi d'approfondir notre compréhension du rôle de la CP dans le développement du système nerveux.

Dans ce contexte, nous avons trois hypothèses et trois objectifs :

1. Les cultures de neurones P19 nouvellement différenciés produisent peu de reeline 300K. Si elles sont incubées plus longtemps, ces cultures pourraient acquérir la capacité de produire ce fragment de la reeline suite à l'apparition d'astrocytes exprimant la CP à leur surface.

Notre premier objectif sera donc d'analyser le profil d'expression de marqueurs de neurones et d'astrocytes, ainsi que le profil de la CP et de la reeline dans les cultures à long terme de neurones P19 pour déterminer s'il existe une corrélation entre l'apparition d'astrocytes et la génération de reeline 300K

2. La reeline 300K pourrait avoir une influence sur l'organisation et la morphologie des cultures neuronales à long terme.

Notre deuxième objectif sera d'examiner la morphologie de cultures de neurones P19 traitées pendant plusieurs jours avec de la CP, capable de stimuler la génération de la reeline 300K. Ces études seront aussi faites en présence de SBTI et d'aprotinine connus pour inhiber les actions de la CP sur le court terme (neuroagrégation et génération de reeline 300K). Nous analyserons aussi le profil de la reeline pour déterminer s'il y a une relation possible entre ce profil et les changements morphologiques.

3. L'utilisation d'inhibiteurs de protéases pourrait aider à identifier des protéases candidates du clivage de la reeline.

Notre troisième objectif sera d'analyser le profil protéolytique de la reeline à la suite du traitement des cultures de neurones P19 avec différents inhibiteurs de protéases. Nous nous sommes intéressés aux cultures plus âgées dont on verra qu'elles peuvent générer de la reeline 300K en absence de CP.

CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

2.1.1 Propagation des cellules P19

Les cellules P19 ont été fournies originellement par le Dr M. W. McBurney (Université d'Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada). La culture de ces cellules se fait en monocouches d'après le protocole détaillé par Maltais et al., 2003 et Ducharme et al., 2010. Les cellules sont incubées à 37°C et dans une atmosphère de 5% de CO₂ dans un milieu complet (MC) fait de milieu minimal essentiel d'Eagle de modification α (α -MEM; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) contenant 10% (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS; Wisent Inc, St-Bruno, Qc, Canada) ainsi que 50 U/mL de pénicilline et de 50 μ g/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Les passages se font tous les deux jours, à une confluence de 70 à 80%. Les cellules sont lavées deux fois avec un tampon phosphate salin (PBS : NaCl 0.8% (p/v), KCl 0.02% (p/v), KH₂PO₄ 0.02% (p/v), Na₂HPO₄ 0.115% (p/v), pH 7.3), puis décollées et individualisées à l'aide d'une solution de PBS contenant 0.025% (p/v) de trypsine (Sigma-Aldrich) et 1mM d'EDTA (Sigma-Aldrich). L'action de la trypsine-EDTA s'arrête suite à l'addition d'un volume équivalent de MC. Les cellules sont par la suite centrifugées 1 min à 1000g puis resuspendues dans du milieu MC. Le compte des cellules se fait à l'aide d'un microscope inversé TE (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), sur un hémacymètre (Fischer Scientific, Montréal, Québec, Canada). Enfin, un million de cellules sontensemencées dans un pétri tissulaire Sarstedt de 100 mm de diamètre contenant 10 mL de MC.

2.1.2 Différenciation de cellules P19 en neurones

Les cellules P19 sont différenciées et cultivées jusqu'à leur huitième ou douzième jour de différenciation selon les cas. Les cellules indifférenciées sont traitées durant quatre jours avec de l'AR à une concentration de 10^{-6} M. Dans un premier temps, au jour 0 (J0), 1,5 millions de cellules P19 indifférenciées sontensemencées dans un pétri bactériologique de 100 mm de diamètre (Fischer Scientific, Montréal, Québec, Canada) dans 10 mL de milieu de différenciation neuronal composé d' α -MEM auquel s'ajoute 5% (v/v) FBS et 5% (v/v) de sérum de boeuf adulte (PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada), des antibiotiques (50 U/mL de pénicilline et 50 U/mL de streptomycine) ainsi que 0.5 μ M d'AR (Sigma Aldrich), et sont incubées pendant deux jours. Au jour 2 (J2), le milieu de différenciation est renouvelé et les cellules sont encore incubées deux jours. Ensuite, au quatrième jour (J4), les cellules, assemblés en sphéroïdes flottants (Fig. 1.7), sont rincées avec du PBS dans un tube de 15 mL (Sarstedt). Elle sont par la suite individualisées par pipetage à l'aide d'une solution de PBS composée de 0.025% (p/v) de trypsine et 1 mM d'EDTA. L'action de la trypsine est arrêtée par l'addition de milieu complet. Les cellules sont alors resuspendues dans du milieu Neurobasal supplémenté sans sérum (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)). Enfin, les cellules sontensemencées dans des pétris tissulaires de 60 mm de diamètre (Sarstedt/Cedarlane) dans du milieu NBS à une densité variant entre 0.3675 et 1.47 millions de cellules selon le temps prévu d'incubation subséquente. Ces pétris sont préalablement gélatinisés 20 min avec une solution d'eau nanopure contenant 0.1% (p/v) de gélatine (Sigma-Aldrich) puis incubés avec un milieu complet pendant 20 min avant de mettre le milieu NBS. Les pétris sont abondamment rincés avec du PBS entre chacune de ces étapes.

2.1.3 Traitement des neurones

Selon les traitements effectués sur les neurones, les différentes substances ont été introduites au jour 4 (J4) ou au J6 de leur différenciation (Fig. 2.1). La CP (0.5 mg/mL), l'association SBTI/aprotinine (100/30 µg/ml) et leur combinaison ont été introduites dans les milieux au J4 lors de l'ensemencement des neurones décrit précédemment. Les cellules ont alors été incubées avec ces substances au cours d'une période pouvant varier de deux à six jours.

Les inhibiteurs de protéases ont été introduits dans les milieux à J6 à des concentrations rapportées dans le Tableau 2.1. Les neurones sont incubés avec ces produits durant deux jours avant d'être récoltés.

2.1.4 Milieu enrichi en reeline

Pour obtenir un milieu enrichi en reeline, des neurones P19 ont été cultivés jusqu'à J9 après un changement de milieu à J7. Une fois le milieu de culture récolté à J9, il est débarrassé des débris cellulaires par centrifugation. Ces milieux ont ensuite été ajoutés à des cultures de neurones de J4 à des concentrations finales de 25% ou de 50% dans le milieu d'ensemencement.

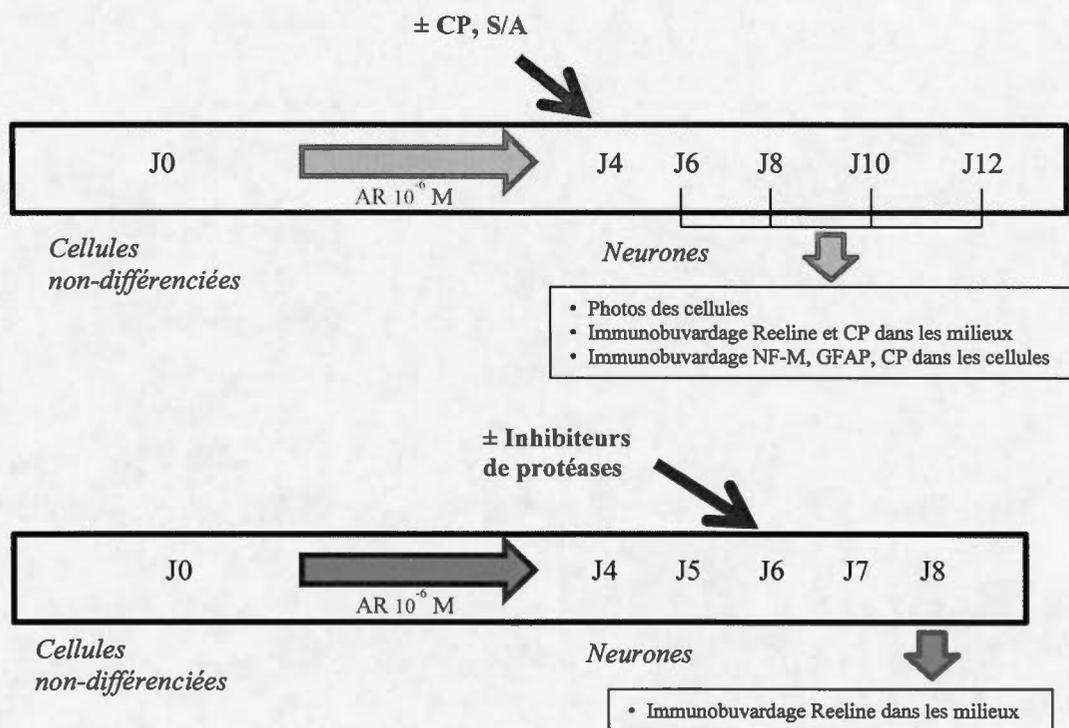


Figure 2.1 Différenciation des cellules souches P19 et traitement des cultures de neurones. Les cellules P19 sont différenciées en neurones suite à une exposition de 4 jours à l'acide rétinoïque (AR) puis ces neurones sont traités à J4 (CP, S/A) ou à J6 (inhibiteurs de protéases). Les photographies et les récoltes des cellules et des milieux se font aux jours 6, 8, 10 et 12 dans le premier cas, et au jour 8 dans le deuxième cas. S/A : SBTI/aprotinine

Tableau 2.1 Les inhibiteurs de protéases utilisés sur les neurones P19.

Cibles	Inhibiteurs	Source	Concentration
Métalloprotéases	GM-6001	EMD Millipore	20 μ M
	Picéatamol	Enzo	12 et 1,2 μ M
	Catéchine EGCG	Sigma-Aldrich	15 et 1,5 μ M
	1,10- Phénanthroline	Sigma-Aldrich	50, 5 et 0,5 μ M
Protéases à sérine	Inhibiteur-I de furine	Enzo	2 et 20 μ M
	Inhibiteur-II de furine	BACHEM	2 et 10 μ M
	Peptide 7B2	Dr A. Basak, Institut de recherche de l'Hôpital d'Ottawa, Ottawa, ON	10 μ M
	Serpine E1 (PAI-1)	EMD Millipore	100 ng/ml
	Rivaroxaban	Cederlane	15 μ M
	<i>Soybean trypsin inhibitor</i>	Sigma-Aldrich	100 et 200 μ g/ml
	Aprotinine	Roche Diagnostics	30 et 60 μ g/ml
	Pefabloc	Sigma-Aldrich	100, 250 et 500 μ M
	Donépézil	Sigma-Aldrich	10 et 50 μ M
	S17092	Sigma-Aldrich	20 et 30 mg/ml
Protéases à cystéine	MG-132	EMD Millipore	0,01 μ M
Protéases à thréonine	Lactacystine	EMD Millipore	0,1 et 1 μ M
Protéases aspartiques	Inhibiteur de BACE-1	Axon Medchem	5 et 10 μ M
Éventail de protéases	Cocktail-1 d'inhibiteurs de protéases	Sigma-Aldrich	

Dr Ajoy Basak (Institut de recherche de l'Hôpital d'Ottawa, Ottawa, ON), Axon Medchem (Virginia, USA), BACHEM (Torrance, USA), Cedarlane laboratories (Burlington, ON, Canada), EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada), Enzo (Farmingdale, NY, USA), Millipore (Billerica, MA, USA), Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada), Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, Canada). BACE-1 : *beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*.

2.2 Récolte des milieux de culture et des extraits cellulaires

2.2.1 Milieux de culture

De J6 à J12 de la différenciation, les milieux sont récoltés et clarifiés par centrifugation. Ils sont ensuite additionnés d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1/300 Cocktail-1 Sigma-Aldrich) avant d'être conservés à -20°C en attendant leur analyse.

2.2.2 Extraits cellulaires

De J6 à J12 de la différenciation, les milieux de culture sont retirés et les cellules incubées dans du milieu HBS (20 mM de Hepes à pH 7.4, 20 mM de D-glucose, 140 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl₂ et 0,8 mM de MgCl₂) contenant des inhibiteurs de phosphatases (1 mM d'orthovanadate de sodium 1 mM et 1 mM de NaF) ainsi que des inhibiteurs de protéases (1/300 Cocktail-1, Sigma-Aldrich). Après 5 à 10 min, les neurones sont récoltés par grattage et centrifugés à 1000g dans des tubes de 15 mL (Sarsted). Le culot est resuspendu dans un 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 dodécylsulfate (SDS) (tous de Sigma-Aldrich)) contenant 1 mM orthovanadate de sodium, 1 mM de NaF et 1/300 de cocktail-1 d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich). Les suspensions sont incubées durant 30 min à 4°C puis centrifugées à 14000g 10 min à 4°C dans une microcentrifugeuse Eppendorf 5415C. Les surnageants obtenus sont dosés en protéines puis conservés à -20°C.

2.3 Électrophorèse et immunobuvardage

2.3.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

À chaque échantillon est ajouté du tampon échantillon (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% (v/v) glycérol, 2% (p/v) SDS, 5% (v/v) β -mercaptoéthanol et 6.2% (p/v) bleu de bromophénol) avant d'être chauffés à 100°C durant 3 min puis clarifiés par centrifugation. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide de 6% (reeline) ou 10% en présence de SDS. Les échantillons des gels de 6% migrent 35 min à 85 V puis 1h30 à 150 V. Les autres échantillons (gels de 10%) migrent 15 min à 100 V puis 1h15 à 150 V. La migration s'effectue dans un tampon d'électrophorèse (1% (p/v) SDS, 3% (p/v) Tris et 14% (p/v) glycérine) dans un Mini-Protean TetraCell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie, USA). Dans le cas des échantillons chargés sur les gels de 10%, un mélange de marqueurs de poids moléculaire (de 22 à 235 kDa ; Bio Basic Inc., Ontario, Canada) est utilisé.

2.3.2 Électrotransfert

A la fin de la migration des échantillons, les gels de polyacrylamide sont équilibrés dans un tampon de transfert (10 mM Tris, 96 mM glycine, 0.01% SDS et 20% (v/v) méthanol) durant 5 min puis déposés sur des membranes de polyvinylidène difluoré (PVDF) (Boehringer-Mannheim, Montréal, Québec, Canada). Ces membranes ont d'abord été activées 1 min dans du méthanol, lavées dans de l'eau nanopure, puis équilibrées au moins 15 min dans du tampon de transfert. Le montage gel et membrane de PVDF est installé dans un système demi-sec Trans-blot SD (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA). Le transfert s'effectue durant 35 min à 15 V (1-2 gels) ou à 20 V (3-4) gels. Une fois le transfert terminé, les membranes sont baignées au moins 1h dans un tampon de blocage constitué de tampon Tris salin-Tween 0.1% (TBS-Tw: 150mM 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 d'albumine sérique bovine (BSA), sous agitation douce.

2.3.3 Immunobuvardage

Suite au blocage, les membranes sont lavées quatre fois 15 min avec du TBS-Tw, puis incubées au minimum 1h avec un anticorps primaire (Tableau 2.2). Les membranes subissent ensuite des étapes de lavage comme précédemment avant d'être incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort (HRP) (Tableau 2.3). Les membranes sont ensuite lavées. La détection se fait par chimioluminescence en incubant les membranes dans 2 mL du réactif Immobilon Western Chemiluminescence HRP Substrate (Millipore, Nepean, ON, Canada) pendant 1 min puis en les exposant à un film HyBlot CL (Denville Scientific Inc., Toronto, ON, Canada) ou par le système d'imagerie Fusion FX7 (MBI, Montréal, Qc, Canada). Les analyses densitométriques sont effectuées avec le logiciel ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

Tableau 2.2 Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunobuvardages

Antigène	Dilution et tampon	Hôte	Source
Reeline	1/1000 Signal boost 1% sérum de chèvre	Souris (monoclonal IgG)	Millipore (MAB5364 = G10)
SYP	1/200 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN3 0.1%	Lapin (polyclonal IgG)	Santa Cruz (SC-9116)
NF-M	1/1000 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN3 0.1%	Souris (monoclonal IgG1)	Cederlane (2838)
GFAP	1/400 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN3 0.1%	Souris (monoclonal IgG)	Sigma-Aldrich (G3893)
β -Actine	1/10 000 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN3 0.1%	Souris (monoclonal IgG)	Sigma-Aldrich (A5441)
CP	1/1000 TBS-Tw 0.1%, BSA 3%, NaN3 0.1%	Lapin (polyclonal IgG)	Dako, Mississauga, Ontario, Canada (A0031)

Abcam (Toronto, ON, Canada), Millipore (Billerica, MA, USA), R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) et Sigma-Aldrich (Mississauga, ON, Canada). Le signal boost est obtenu chez EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada).

Tableau 2.3 Liste des anticorps secondaires utilisés pour les immunobuvardages

Anticorps	Dilution et tampon	Hôte	Source (no. catalogue)
HRP-anti IgG de souris	1/2500 TBS-Tw 0.01%, 3% BSA	Chèvre (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories (115-035-062)
HRP-anti IgG de lapin	1 /2500 TBS-Tw 0.01%, 3% BSA	Chèvre (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories (711-035-152)

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

2.4 Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées par une micro-méthode utilisant l'acide bicinchonique (BCA) (Pierce Chemical, Rockford, Illinois, USA). Le réactif est préparé selon les recommandations du fabricant. Un volume de 150 µl d'échantillon est mélangé à 150 µl de réactif dans des puits d'une plaque de 96 puits. Après une incubation de 2 h à 37°C, l'absorbance est lue à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU-6 (Beckman, Mississauga, Ontario, Canada). La courbe d'étalonnage est faite avec du BSA.

2.5 Purification de la CP

La purification de la CP se fait à partir de 10L de sang de bœuf selon le protocole originellement développé par l'équipe du Dr. Mateescu (Mateescu *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1994). Suite au prélèvement (Boucherie-abattoir Tarte Enr., Marieville, Québec, Canada), le sang est recueilli dans 1L une solution de citrate de sodium 2,5% afin de limiter l'apparition de caillots sanguins. Ce mélange est ensuite

centrifugé à deux reprises durant 20 min à 8000g, à 4°C. Les érythrocytes sont éliminés et le plasma est alors précipité avec du sulfate d'ammonium à 35% de saturation durant 2h à 4°C sous agitation, puis centrifugé durant 20 min à 10000g à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu subit une nouvelle précipitation au sulfate d'ammonium jusqu'à une saturation de 55% pendant 1h à 4°C sous agitation et est ensuite centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est resuspendu dans un volume de 800 mL de tampon phosphate de potassium (Kpi) 10 mM à pH 7.2, puis dialysé trois fois 10h dans 15L de ce même tampon, et enfin centrifugé comme précédemment. Le surnageant obtenu est ensuite déposé sur 50 à 60 ml de gel d'AE-agarose qui a été équilibré dans une solution de Kpi 10 mM à pH 7.2. Le gel est lavé avec 10 volumes de Kpi 20 mM à pH 7.2 puis avec 10 volumes de Kpi 30 mM à pH 7.2. L'élution s'effectue avec une solution de Kpi 200 mM à pH 7.2 et l'éluat est récolté par portion de 2 ml à un débit de 20 ml/min. Les fractions récoltées contenant de la CP sont identifiables par leur couleur bleue. Les absorbances à 610 nm, correspondant au cuivre de la CP, et à 280 nm, correspondant aux protéines, sont déterminées. Les échantillons qui possèdent un rapport d'absorbance 610/280 nm supérieur ou égal à 0,04 sont conservés. La solution est ensuite diluée deux fois pour diminuer sa concentration de Kpi, puis elle est concentrée en protéine par ultracentrifugation sur des filtres d'une porosité de 5K (Spin-X® UF Concentrator, Corning®). Finalement, un dosage de protéine est effectué sur l'échantillon de CP afin de déterminer sa concentration et sa pureté est évaluée par (SDS-PAGE) et coloration au bleu de Coomassie.

2.6 Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), en utilisant un test One-way ANOVA

couplé avec un test de Tukey ou Dunnett. Une valeur de $P < 0.05$ a été utilisée pour identifier des différences significatives.

CHAPITRE III RÉSULTATS

3.1 **Analyse phénotypique de cultures à long terme de cellules P19 différenciées et traitées ou non avec de la CP**

La différenciation des cellules P19 avec l'AR génère d'abord des neurones, puis des astrocytes. Avec le temps, les extensions neuritiques des neurones se spécialisent en axones et en dendrites capables de synaptogénèse (Cadet et Paquin, 2000 ; Staines *et al.*, 1996). Sachant que la CP est présente à la surface d'astrocytes dans le cerveau adulte et que sa présence est reliée à une augmentation de la reeline 300K dans les jeunes cultures de neurones P19 et dans le cerveau embryonnaire (Ducharme *et al.*, 2010), une première série d'expériences visait à déterminer si la culture à long terme de cellules P19 différenciées, c'est-à-dire jusqu'à l'apparition d'astrocytes, était accompagnée d'une expression de la CP et d'une production de reeline 300K. L'expression de marqueurs phénotypiques dans les extraits cellulaires a donc été analysée à J6, J8, J10 et J12 ainsi que l'expression de la CP et de la reeline dans les milieux de culture. Ce profil temporel a été étudié dans des cultures témoins et dans des cultures ayant reçu de la CP à J4. Pour ces expériences, la densité d'ensemencement à J4 a été adaptée à la durée de la culture. Ainsi, les cellules ont été ensemencées à 100% (1,47 millions), 65%, 35% et 25% pour des récoltes à J6, J8, J10 et J12 respectivement. De cette façon, les cultures étaient à des confluences similaires le jour de la récolte (Fig. 3.1A) et elles n'ont pas été dérangées par des trypsinisations ou des changements de milieux durant toute la durée de la culture. Les marqueurs phénotypiques ont été NF-M pour les neurones, GFAP pour les astrocytes et SYP pour la capacité de production des synapses.

Dans les cultures de contrôle (Ctl), les neurones sont toujours présents de J6 à J12 comme le montre l'expression du marqueur NF-M (Fig. 3.1B et D). Les niveaux de NF-M baissent après J6 à cause, tout d'abord, de l'apparition de fibroblaste. Les astrocytes commencent à apparaître à J10 et leur proportion en culture augmente fortement à J12. On peut trouver curieux que les niveaux du marqueur NF-M ne diminuent pas avec l'augmentation de GFAP. Cela pourrait être dû à la présence de neurites plus longs ou de plus fort calibre (Fig. 3.1A). Les neurofilaments sont des éléments du cytosquelette stabilisateurs des neurites, qu'ils soient axones ou dendrites (Harrison, 1994). Dans les cultures neuronales P19, chaque neurone exprimerait plus de NF-M avec le temps en relation avec le développement de connexions synaptiques. La forte expression de SYP à J10 et J12 (Fig. 3.1B et D) appuie cette hypothèse ainsi que l'établissement d'un réseau de projections cellulaires (Fig 3.1A Ctl J10 et J12)

Des résultats d'immunobuvardages, non présentés, ont montré que la CP n'était pas détectable de façon endogène dans les extraits cellulaires ou dans les milieux de culture de neurones Ctl de J6 à J12. L'ajout de CP exogène ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des différents marqueurs. En effet, leurs niveaux d'expression restent similaires entre les cultures témoins et celles traitées à la CP de J6 à J12. À J6, la reeline 300K est présente dans les cultures de neurones traitées à la CP, mais très faiblement dans les cultures Ctl (Fig, 3.1 C et D). Elle apparaît dans les cultures Ctl à partir de J8, donc avant l'apparition des astrocytes. Les niveaux de reeline 300K augmentent graduellement au cours du temps, mais restent toujours plus élevés dans les milieux des neurones traités à la CP (tendance de J6 à J10, significatif à J12).

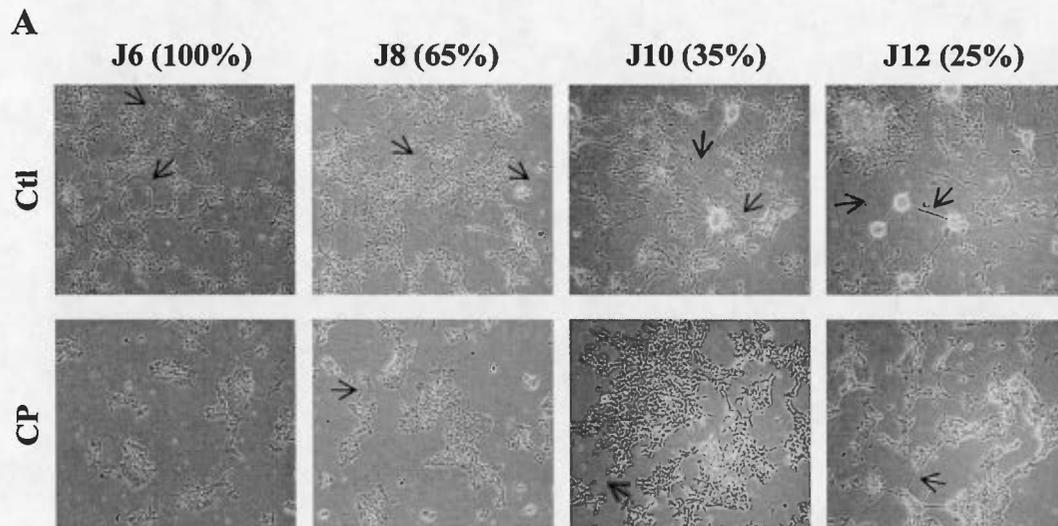


Figure 3.1 Morphologie et évolution de l'expression de marqueurs phénotypiques et de la reeline dans des cultures de neurones P19 au long terme traitées ou non à la CP. (A) Photographies (100x) de cultures de neurones P19 en absence (Ctl) ou en présence de CP (0,5 mg/ml). Les neurones sontensemencés à différentes densités (100% = 1,47 millions dans un pètri tissulaire de 60 mm de diamètre) afin d'obtenir des confluences équivalentes entre les jours 6 et 12. La CP est ajoutée à J4. Les flèches pointent vers des projections/connexions neuritiques. (Suite à la page suivante).

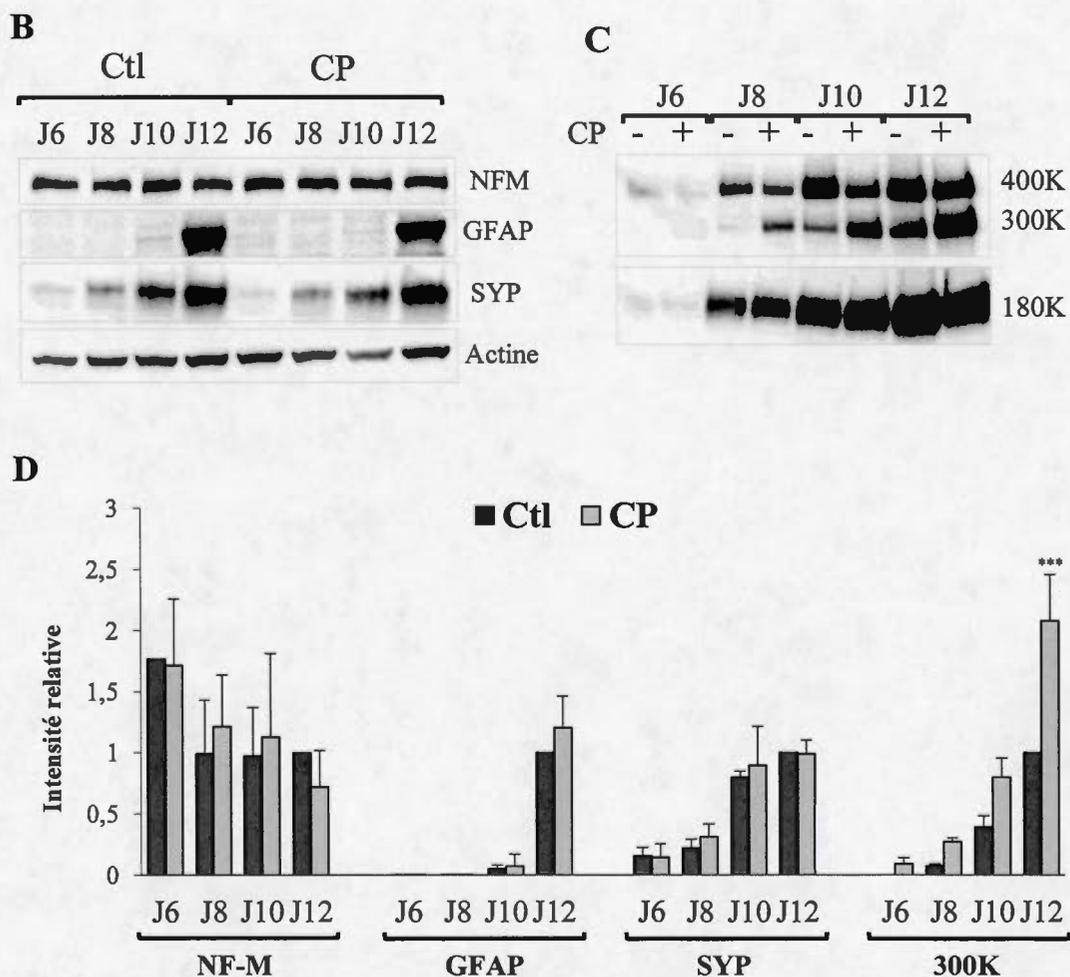


Figure 3.1 (Suite) **(B)** Immunobuvardage du NF-M (160K), de la GFAP (55K) et de la SYP (37K). La β -actine a été utilisée comme témoin de chargement en protéines. **(C)** Immunobuvardage de la reeline 400K, 300K et 180K. L'anticorps G10 utilisé se fixe à un épitope de la portion N-t de la reeline. **(D)** Analyse densitométrique (moyennes \pm écarts moyens) d'au moins 3 études indépendantes pour les immunobuvardages montrés en **B** et **C**. L'intensité de signal des marqueurs GFAP, NF-M et SYP a été normalisée par celle de la β -actine correspondante, puis par rapport au contrôle (Ctl) J12 de la série. *** représente une différence significative par rapport au Ctl du même jour ($p < 0,005$).

3.2 **Impact à long terme de la CP et du SBTI/aprotinine sur la morphologie des cultures de neurones P19 et l'expression de la reeline**

Des cultures de neurones P19 ont étéensemencées en plus faible densité (50%) au J4 afin de suivre leur évolution jusqu'au J12, sans passage ou changement de milieu durant cette période. Elles sont traitées avec de la CP ou du SBTI et de l'aprotinine (SBTI/aprotinine), deux inhibiteurs de protéases à sérine à large spectre. La CP a aussi été combinée avec du SBTI/aprotinine.

Comme rapporté par Ducharme *et al.* (2010), les photos de J6 dans la figure 3.1A montrent que lorsque les neurones de J4 sont cultivés en présence de CP pendant 48h, ils s'agrègent les uns aux autres et étendent peu de neurites, contrairement aux neurones des cultures non traitées (Ctl) qui sont bien étalés et étendent des projections neuritiques. Les projections sont moins visibles lorsque la densité d'ensemencement est plus faible (Fig. 3.1A 100% et Fig. 3.2A 25%), cependant les neurones traités avec de la CP demeurent moins étalés que les neurones Ctl.

L'effet de la CP sur des cultures de plus longue durée a été analysé. Les cultures de neurones P19 Ctl apparaissent bien étalées jusqu'à J8 et agrégées lorsqu'elles sont traitées avec de la CP (Fig. 3.2A). À partir de J10, des îlots rayonnants, c'est-à-dire des regroupement de neurones d'où sortent de nombreuses et longues extensions, apparaissent dans les cultures Ctl. Ces structures sont peu ou pas visibles lorsque les cellules sont traitées avec de la CP. Lorsqu'il y a des regroupements de cellules avec la CP, ils n'exhibent pas ou peu de projections rayonnantes. Les îlots rayonnants commencent à apparaître à J12 plutôt qu'à J10 dans le traitement avec la CP. C'est aussi le cas dans la Figure 3.1A.

Des études précédentes ont montré que le SBTI/aprotinine pouvait inhiber l'action agrégative de la CP ainsi que l'effet de la CP sur la reeline 300K dans des

cultures de jeunes neurones P19 (J6) (Salmi, 2015). Lorsque le SBTI/aprotinine est ajouté seul dans les cultures neuronales, leur morphologie est similaire aux cultures Ctl, les cellules sont bien étalées et les ilots rayonnants apparaissent à J10. Cependant les structures rayonnantes sont moins nombreuses à J10 et J12. Lorsque les cultures sont traitées avec de la CP et du SBTI/aprotinine, les neurones s'étalent d'avantage à partir de J8, par rapport aux cultures contenant uniquement de la CP, et les structures rayonnantes apparaissent à J12 (Fig. 3.2B).

Les résultats ne montrent pas de différence significative dans le profil protéolytique de la reeline dans les cultures de neurones traitées avec du SBTI/aprotinine comparativement au Ctl (Fig. 3.2C-E), même si les niveaux totaux de reeline semblent un peu moins élevés avec le SBTI/aprotinine. Cependant, le SBTI/aprotinine diminue la génération de la reeline 300K observée dans le traitement avec la CP aux jours 10 et 12 (Fig. 3.2 F – H). En outre, cette diminution de la reeline 300K s'accompagne d'une diminution de la reeline 180K (significatif à J12, tendance à J10). Ces résultats montrent que le SBTI/aprotinine inhibent en partie les effets de la CP sur la morphologie des cultures de neurones P19 et sur le profil d'expression de la reeline au long terme.

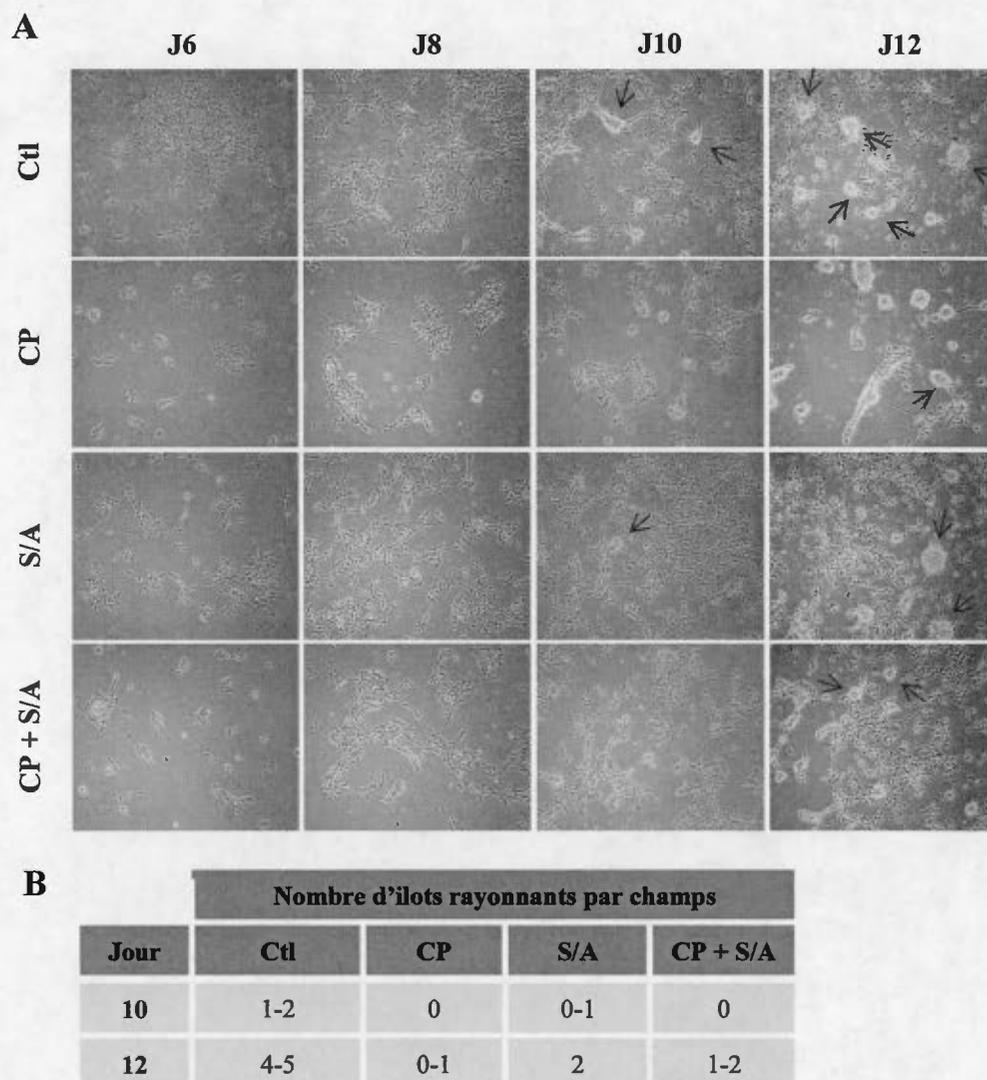


Figure 3.2 Impact de la CP et du SBTI/aprotinine sur la morphologie et sur l'expression de la reeline dans les cultures neuronales P19 de J6 à J12. Les cultures neuronales P19 n'ont reçu aucun traitement (Ctl) ou ont été traitées avec de la CP (0,5 mg/ml) ou avec du SBTI/aprotinine (S/A : 100/30 µg/ml) depuis le J4 jusqu'au jour de la photographie. Les cellules ont étéensemencées à J4 à une densité de 0,74 million dans un pétri tissulaire de 60 mm de diamètre. (A) Photographies (100x) des cultures neuronales de J6 à J12 avec les différents traitements. Les flèches pointent vers des îlots rayonnants. (B) Nombre d'îlots rayonnants moyen pour 3 champs dans les cultures selon 3 études indépendantes. (Suite à la page suivante).

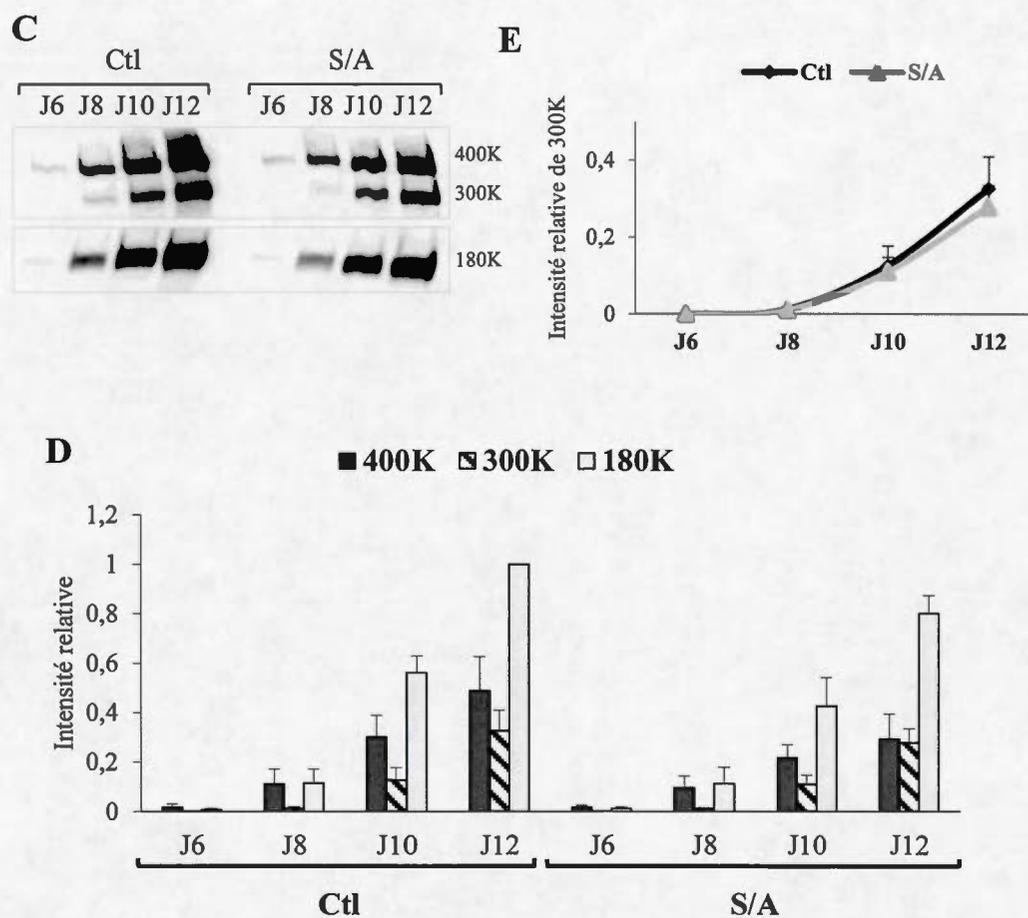


Figure 3.2 (Suite) (C et F) Immunobuvardage de la reeline pour les traitements indiqués. (D et G) Analyses densitométriques des formes 400K, 300K et 180K de la reeline (moyennes \pm écarts moyens) de 3 études indépendantes. Les signaux sont normalisés par rapport à la reeline 400K de la culture Ctl à J12 (D) ou de la culture traitée avec de la CP à J12 (G). Le symbole # représente une différence significative en présence de S/A (## : $p < 0,01$). (E et H) Analyses densitométriques de la reeline 300K uniquement.

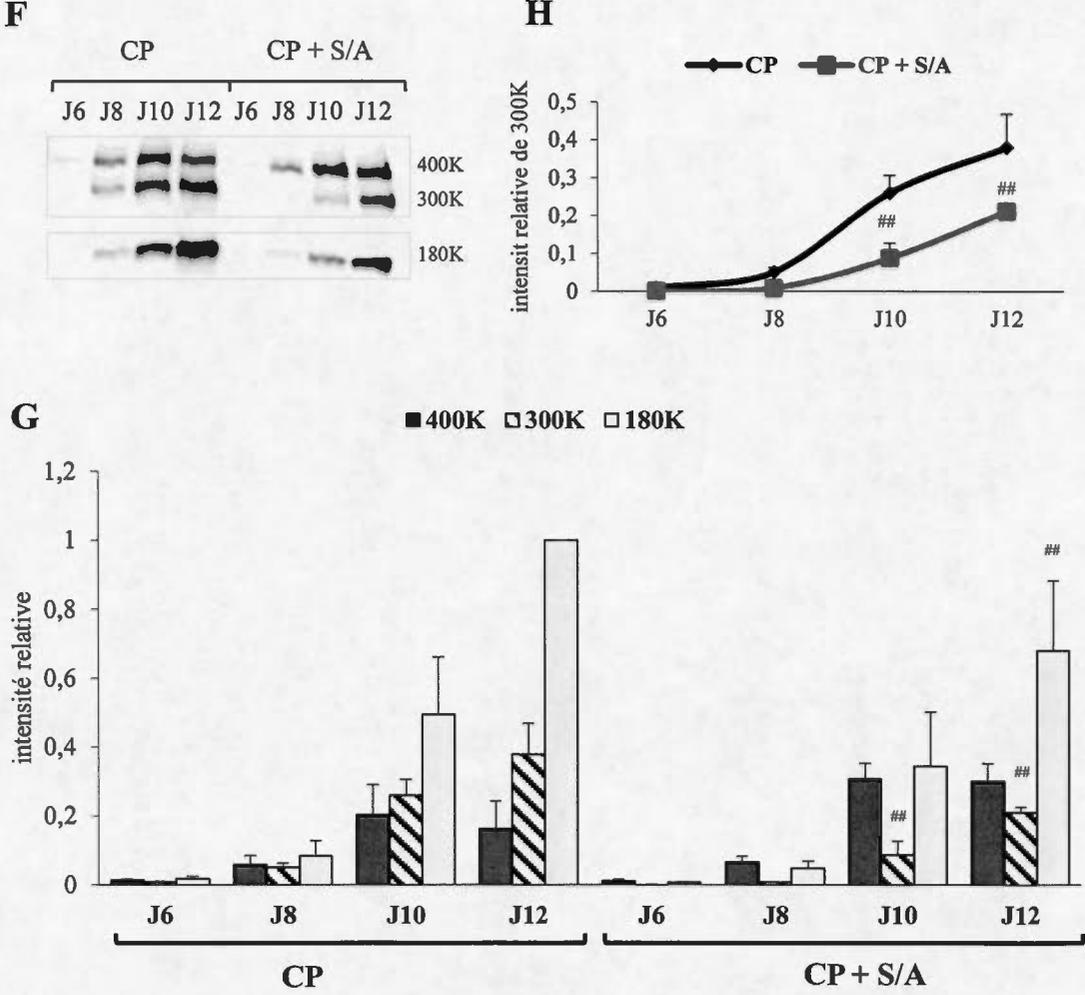


Figure 3.2 (Suite)

3.3 Effet d'un milieu pré-enrichi en reeline sur la morphologie des cultures neuronales P19

En considérant l'apparition d'ilots rayonnants dans les cultures Ctl de neurones P19 à partir du J10 (Figs. 3.1A et 3.2A), nous nous sommes demandé si la reeline pouvait être responsable de leur génération. En effet, la concentration de reeline dans les milieux augmente fortement à partir de J10 (Fig. 3.2C et D). Pour cela, des cultures de neurones P19 ont été incubées dans un milieu pré-enrichi en reeline de J4 à J12. Ce milieu pré-enrichi représentait 25 ou 50% du volume total du milieu de culture.

À J10, les ilots rayonnants commencent à apparaître mais uniquement dans les cultures Ctl, c'est-à-dire celles n'ayant pas reçu de supplément de reeline (Fig. 3.3A). À J12 ils sont présents en plus grand nombre dans les Ctl et commencent à apparaître dans les cultures pré-enrichies. Cependant, à J12 le milieu pré-enrichi semble être toxique pour les cellules puisqu'on observe des cellules flottantes, des cellules arrondies et des débris cellulaires dans les cultures. Cette toxicité peut s'expliquer par l'utilisation d'un milieu plus âgé ayant accumulé des déchets cellulaires. Les résultats observés de J6 à J10 suggèrent que la reeline n'est probablement pas à l'origine de la formation des ilots rayonnants. La présence de toxicité à J12 ne permet pas de conclure sur l'absence de ces structures.

À J6 et à J8, les niveaux de reeline sont plus élevés dans les milieux de culture qui ont été préalablement pré-enrichis (Fig. 3.3B). À J10 les niveaux de reeline sont relativement équivalents dans tous les milieux de culture. À J12, ils sont plus faibles dans les milieux pré-enrichis, certainement à cause de l'augmentation de la mortalité des neurones.

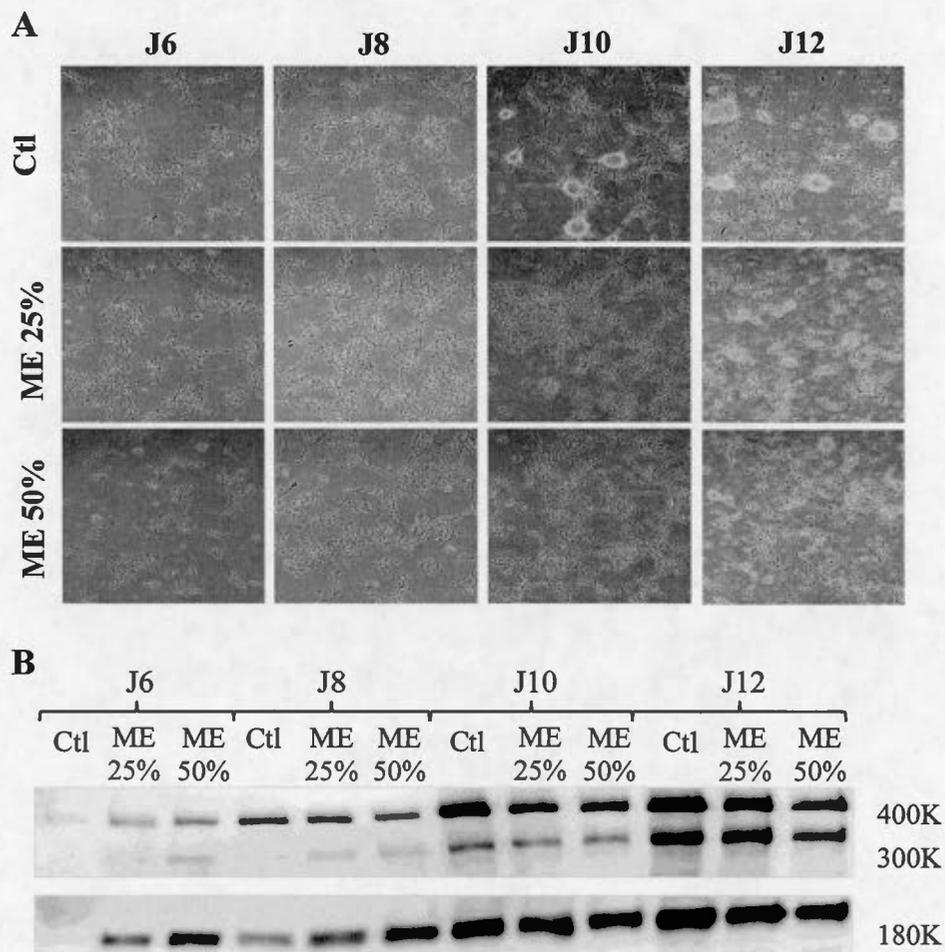


Figure 3.3 Effet d'un milieu enrichi en reeline sur la morphologie et le profil protéolytique de la reeline dans les cultures neuronales P19 de J6 à J12. Un milieu pré-enrichi en reeline à 0% (Ctl), 25% (ME 25%) ou 50% (ME 50%) a été ajouté, à J4, à des cultures de neurones P19 ensemencés à une densité de 0,74 million. (A) Photographies (100x) des cultures prises aux jours 6, 8, 10 et 12. (B) Immunobuvardage de la reeline. Exemples de photographies et d'immunobuvardage sélectionnés à partir de 3 études indépendantes.

3.4 Effets de divers inhibiteurs de protéases sur le clivage de la reeline

Les effets d'inhibiteurs de protéases sur le clivage de la reeline dans des cultures neuronales P19 ont été étudiés entre les jours 6 et 8. En effet, à J6 les neurones produisent de la reeline de 400K et 180K mais la reeline de 300K reste encore quasiment inexistante alors qu'à J8, les 3 formes de la reeline sont détectables (Fig 3.2F). De cette façon, l'effet des inhibiteurs sur le clivage de la reeline sera observable sur ces différentes formes. Pour cette série d'expériences, 1 million de neurones sontensemencés à J4 dans des pétris tissulaires de 60 mm afin d'obtenir une confluence optimale à J8 et avoir une bonne production de reeline.

Dans cette série d'expériences, les niveaux de chaque forme de la reeline (400K, 300K et 180K) ont été évalués par rapport au niveau total de reeline retrouvé dans chaque culture. Cette façon de quantifier est indépendante des variations dans les chargements en protéines d'un échantillon à l'autre, et indépendante des variations dans la production totale de reeline d'un traitement à l'autre. Les variations dans la production totale de reeline peuvent dépendre de variations dans la composition cellulaire des cultures. En effet, les cultures neuronales P19 contiennent des populations mixtes de neurones en plus de contenir, au-delà des J6-J7, des fibroblastes et des cellules gliales. On ne sait pas dans quelle mesure les différents traitements peuvent affecter la proportion de neurones producteurs de reeline.

En plus d'analyser l'effet de chaque inhibiteur sur le profil d'expression de la reeline, nous avons aussi pris des photos des cultures pour dépister tout effet toxique important (en particulier, la présence de cellules flottantes). Différentes concentrations ont été testées pour plusieurs inhibiteurs (Annexe 2 et Tableau A.1) et celles qui ont montré un effet toxique important n'ont pas été conservées.

3.4.1 Les inhibiteurs de métalloprotéases

Les inhibiteurs de métalloprotéases choisis sont la catéchine EGCG, un inhibiteur de l'activité des métalloprotéases de la famille ADAMTS, le picéatannol, un inhibiteur sélectif des ADAMTS-4 et -5, ainsi que les chélateurs de métaux 1,10-phénanthroline et GM6001 (Jossin *et al.*, 2007 ; Krstic *et al.*, 2012). Seul le GM6001 a déjà été utilisé sur des cultures de neurones additionnées de reeline recombinante (Jossin *et al.*, 2007), les autres inhibiteurs de métalloprotéases ont été employés sur de la reeline recombinante *in vitro* ou avec des cellules non neuronales exprimant de la reeline recombinante (Krstic *et al.*, 2012).

Les micrographies des cultures de neurones ne montrent pas de différence notable de morphologie entre les cellules traitées et les contrôles (Fig. 3.4A)

Le profil protéolytique de la reeline ne montre aucune différence entre les cultures Ctl et les cellules traitées avec les inhibiteurs de métalloprotéases EGCG et 1,10-phénanthroline (Fig. 3.4B). Cependant les inhibiteurs picéatannol et GM6001 inhibent de façon significative la production de reeline 300K, ainsi que de 180K dans le cas du picéatannol à 12 μ M (Fig. 3.4C).

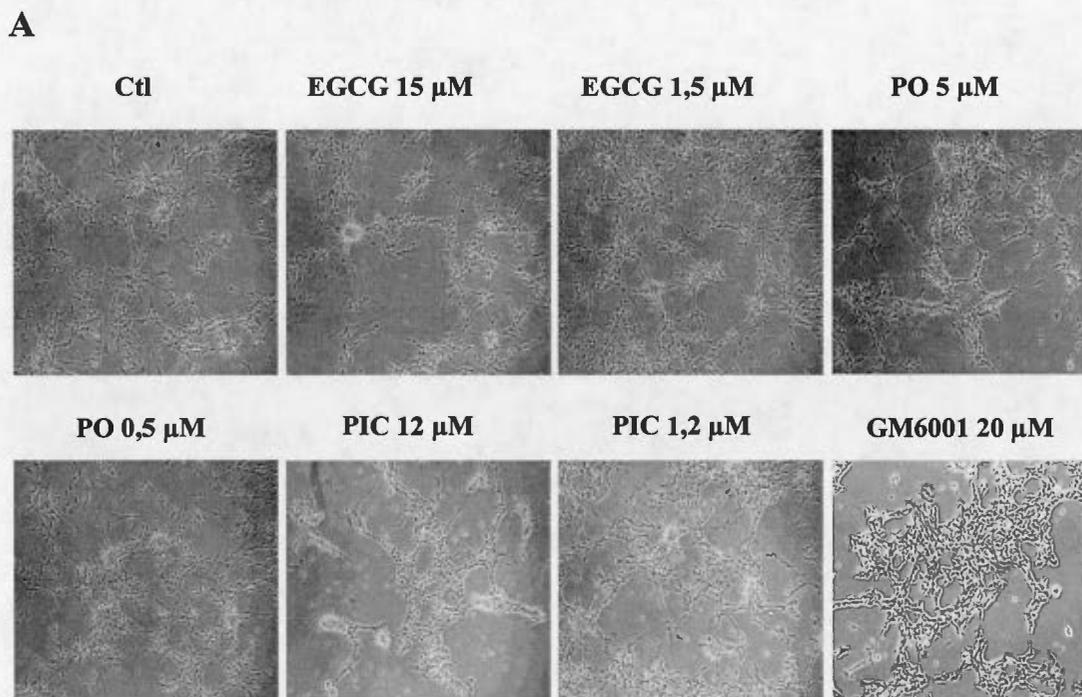


Figure 3.4 Effet d'inhibiteurs de métalloprotéases sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19. À J6, les inhibiteurs mentionnés ont été ajoutés, aux concentrations indiquées, dans les milieux de cultures de neurones P19. À J8, les cultures ont été photographiées (100x) (A) et les milieux ont été récoltés pour effectuer l'analyse de la reeline par immunobuvardage (B et C). Des exemples d'immunobuvardages sont montrés ainsi que les résultats d'analyses densitométriques (moyennes \pm écarts-moyens) d'au moins 3 études indépendantes. Pour chaque culture, l'intensité de chaque forme de la reeline est rapportée sur l'intensité du total des trois formes de la protéine. Le symbole * représente une différence significative par rapport au Ctl (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$). PO : 1,10-phénanthroline ; PIC : picéatannol. (Suite page suivante)

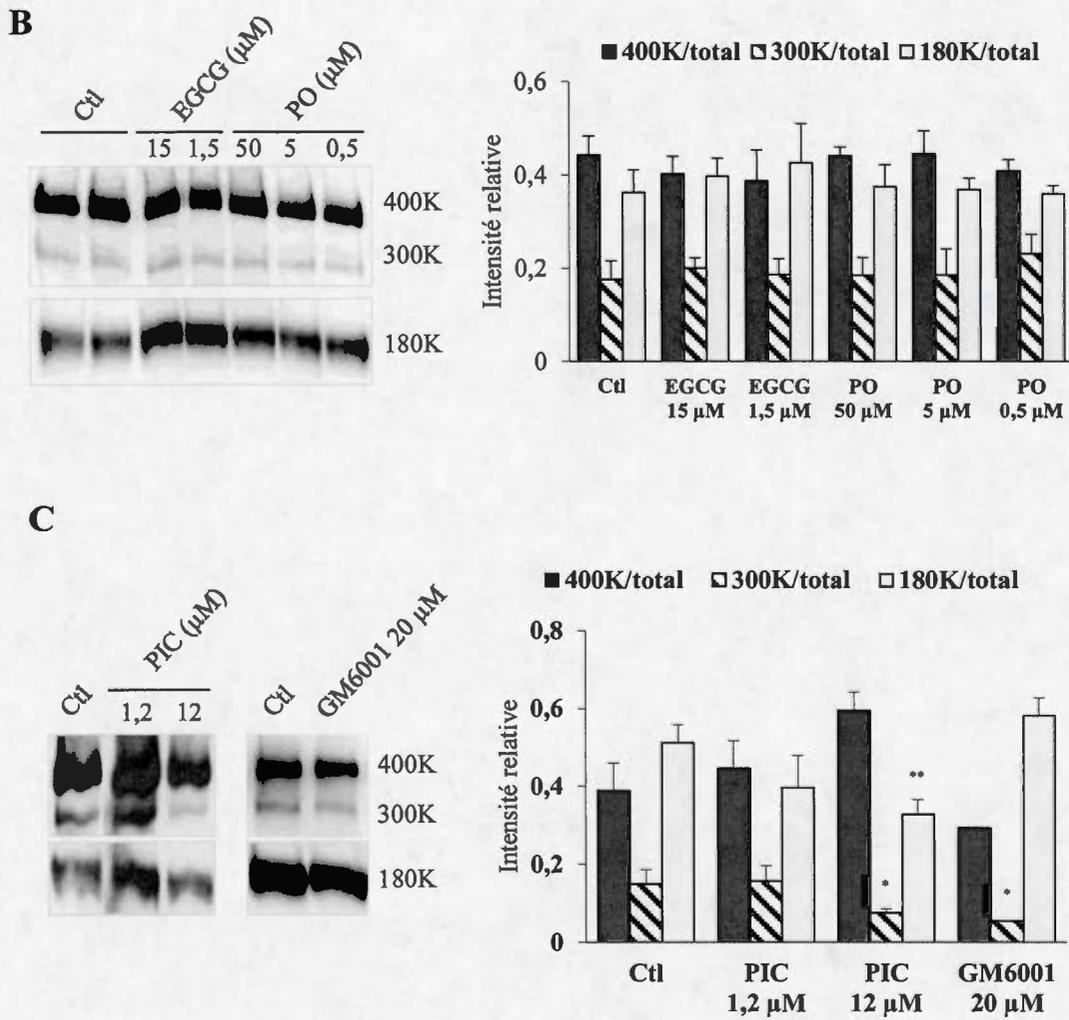


Figure 3.4 (Suite)

3.4.2 Les inhibiteurs de protéases à sérine

Les inhibiteurs de protéases à sérine sélectionnés pour cette étude sont (a) des inhibiteurs à large spectre : la combinaison SBTI et aprotinine (SBTI/aprotinine), et le Pefabloc, (b) un inhibiteur du tPA et de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) : la serpine E1 (PAI-1), (c) un inhibiteur du facteur X de la coagulation sanguine : le Rivaroxaban, (d) un inhibiteur de l'acétylcholinestérase : le donépézil, (e) un inhibiteur de prolyl-endopeptidases : le S17092 et enfin (f) trois inhibiteurs de convertases : le peptide 7B2 et les inhibiteurs de furine I et II (FI-I et FI-II).

La morphologie des neurones P19 reste très similaire entre les cultures de cellules traitées avec les inhibiteurs de protéases à sérine mentionnés et leur Ctl respectif (Figs. 3.5A et 3.6A).

Le SBTI/aprotinine et le Rivaroxaban ont déjà été utilisés sur des cultures de jeunes neurones P19 (J4-J6) n'exprimant pas ou peu de reeline 300K. Ils ont inhibé l'action stimulatrice de la CP exogène sur la génération de la reeline 300K (Ducharme, 2013 ; Salmi, 2015). Plusieurs études ont montré que le tPA et uPA sont des protéases capables de cliver la reeline au niveau de son site N-t et que le PAI-1 inhibe cette action. Cet inhibiteur a été utilisé uniquement sur de la reeline recombinante *in vitro* ou avec des cellules non neuronales exprimant de la reeline recombinante (Krstic *et al.*, 2012). Le PAI-1 n'a jamais été utilisé dans un contexte neuronal. Les résultats de la Figure 3.5B montrent que le SBTI/aprotinine, le PAI-1 et Rivaroxaban n'ont pas modifié le profil protéolytique de la reeline dans les cultures neuronales.

Le Pefabloc n'a pas fait l'objet d'étude sur la reeline dans la littérature. C'est un inhibiteur irréversible de protéases à sérine. Il a été sélectionné pour sa petite taille (0,24 kDa). Il peut diffuser plus facilement dans le milieu et à la surface des cellules

que le SBTI/aprotinine (22/6 kDa) ou le PAI-1 (43 kDa), et être moins spécifique que le Rivaroxaban. La Figure 3.4C montre que le Pefabloc inhibe de façon significative la production de reeline 300K.

Le donépézil est utilisé comme traitement de l'Alzheimer. C'est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, une hydrolase ayant un site catalytique de protéase à sérine (Kwon *et al.*, 2014 ; Mancini *et al.*, 2007). Il agit aussi comme un inhibiteur de la protéase BACE-1 (Mancini *et al.*, 2007). Le donépézil est une molécule de petite taille capable de s'introduire dans la pochette catalytique étroite et profonde de l'acétylcholinestérase (Petrov, 2015). Il a été testé sur les cultures neuronales P19 en supposant que le site catalytique de la protéase agissant sur le clivage de la reeline pourrait avoir ces caractéristiques. Les résultats obtenus à la Figure 3.4D montrent qu'il a un effet sur le clivage de la reeline. En effet, le traitement des cultures de neurones P19 au donépézil montre une inhibition significative de la forme 300K de la reeline.

Des études récentes ont montré que la reeline est clivée à son site N-t après une proline suggérant l'implication d'un membre de la famille des prolyl-endopeptidases qui sont des protéases à sérine clivant après des prolines (Cavasin *et al.*, 2004 ; Koie *et al.*, 2014). Le S17092, un inhibiteur spécifique des prolyl-endopeptidases, a été utilisé sur des cultures neuronales P19. Il a provoqué une diminution du niveau de reeline de 300K de façon significative (Fig. 3.4E).

La famille des convertase est composé de neuf protéases à sérine, dont la furine, PACE4 et PC2. Ces protéases possèdent un rôle important dans le développement. En effet, un déséquilibre de leur niveau d'expression a été associé à différentes pathologies, telles que des troubles neurologiques (Jeannotte *et al.*, 1997 ; Poirier *et al.*, 2006). De plus, les convertases PACE4 et PC2 sont exprimées dans le modèle neuronal P19 (Jeannotte *et al.*, 1997 ; Poirier *et al.*, 2006). FI-I inhibe la furine, PACE4, PC6, PC7 et PC2 alors que FI-II inhibe la furine, PACE4 et PC1. Des

études ont montré que seul FI-I inhibe le clivage N-t de la reeline, suggérant ainsi un rôle possible de PC2 dans ce clivage selon Kohno, S. *et al.* (2009). Le peptide 7B2, un inhibiteur spécifique de la convertase PC2 (Jeannotte *et al.*, 1997), a donc été envisagé comme un bon candidat dans l'étude du clivage de la reeline. Les inhibiteurs de furine ont déjà été employés sur des cellules non neuronales exprimant de la reeline recombinante ou sur des neurones corticaux primaires n'exprimant pas de reeline 300K contrairement aux neurones P19 utilisés dans notre étude. Le peptide 7B2 n'a aucun effet sur l'expression des différentes formes de la reeline (Fig. 3.6B). Néanmoins, FI-I inhibe la formation du fragment de 300K de la reeline, et aussi du 180K, accompagné d'une augmentation de la proportion de la forme de 400K, à la concentration la plus élevée. FI-II provoque une inhibition significative du fragment de 300K de la reeline uniquement. Finalement, Multi-Leu, qui est un inhibiteur spécifique de PACE4 (Couture *et al.*, 2015), a été utilisé sur des cultures de neurones P19. En effet, comme FI-I et FI-II ont un impact sur le profil protéolytique de la reeline, PACE4 apparaît comme un bon candidat concernant le clivage de la reeline. Multi-Leu semble diminuer légèrement la production de reeline de 180K (résultats non montrés ; test effectué 2 fois dû à la quantité limitée de ce peptide).

L'ensemble des résultats suggère que des protéases à sérine auraient un rôle dans le clivage de la reeline. Cependant, aucun des inhibiteurs utilisés ici n'a permis d'obtenir une inhibition complète.

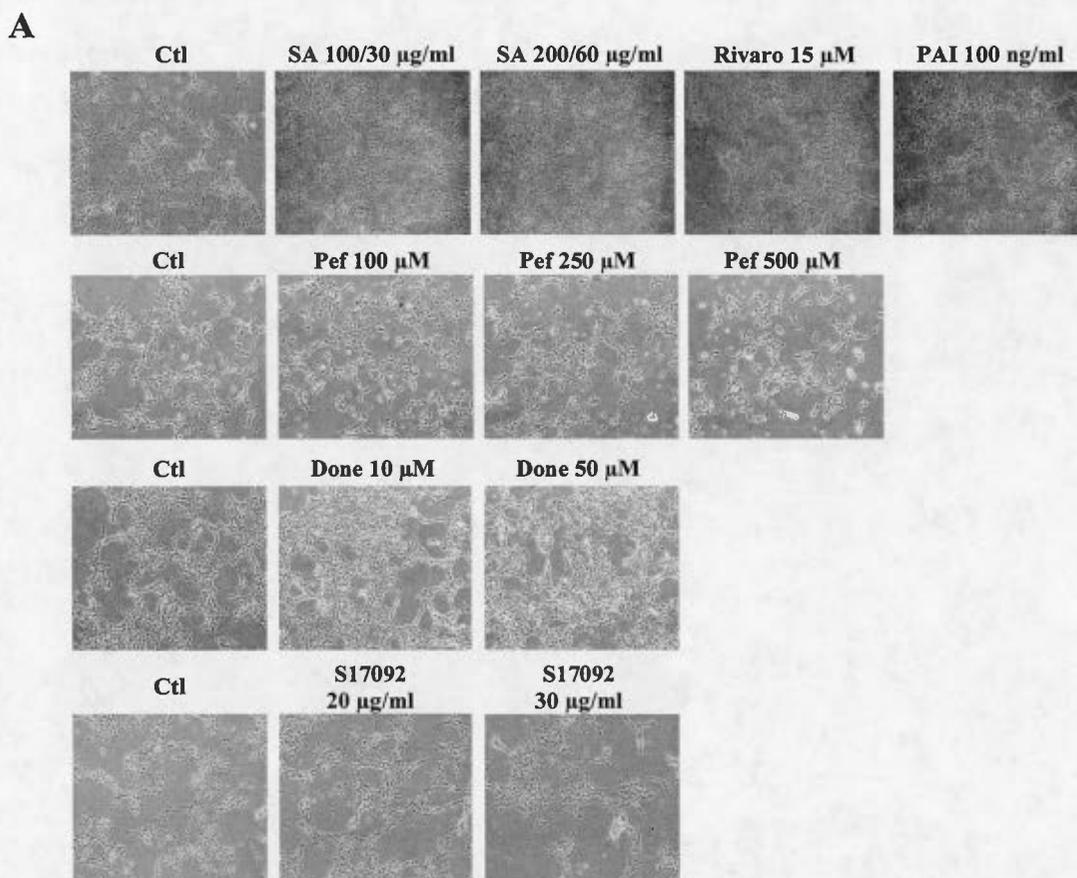


Figure 3.5 Effet d'inhibiteurs de protéases à sérine sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19. À J6, les inhibiteurs mentionnés ont été ajoutés, aux concentrations indiquées, dans les milieux de cultures de neurones P19. À J8, les cultures ont été photographiées (100x) (A) et les milieux ont été récoltés pour l'analyse de la reeline par immunobuvardage (B – E). Des exemples d'immunobuvardages sont montrés ainsi que les résultats d'analyses densitométriques (moyennes \pm écarts-moyens) d'au moins 3 études indépendantes. Pour chaque culture, l'intensité de chaque forme de la reeline est rapportée sur l'intensité du total des trois formes de la protéine. Le symbole * représente une différence significative par rapport au Ctl (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$). S/A : SBTI/aprotinine ; Rivaro : Rivaroxaban ; PAI : PAI-1, inhibiteur d'activateur du plasminogène ; Pef : pefabloc ; Done : donépézil. (Suite à la page suivante)

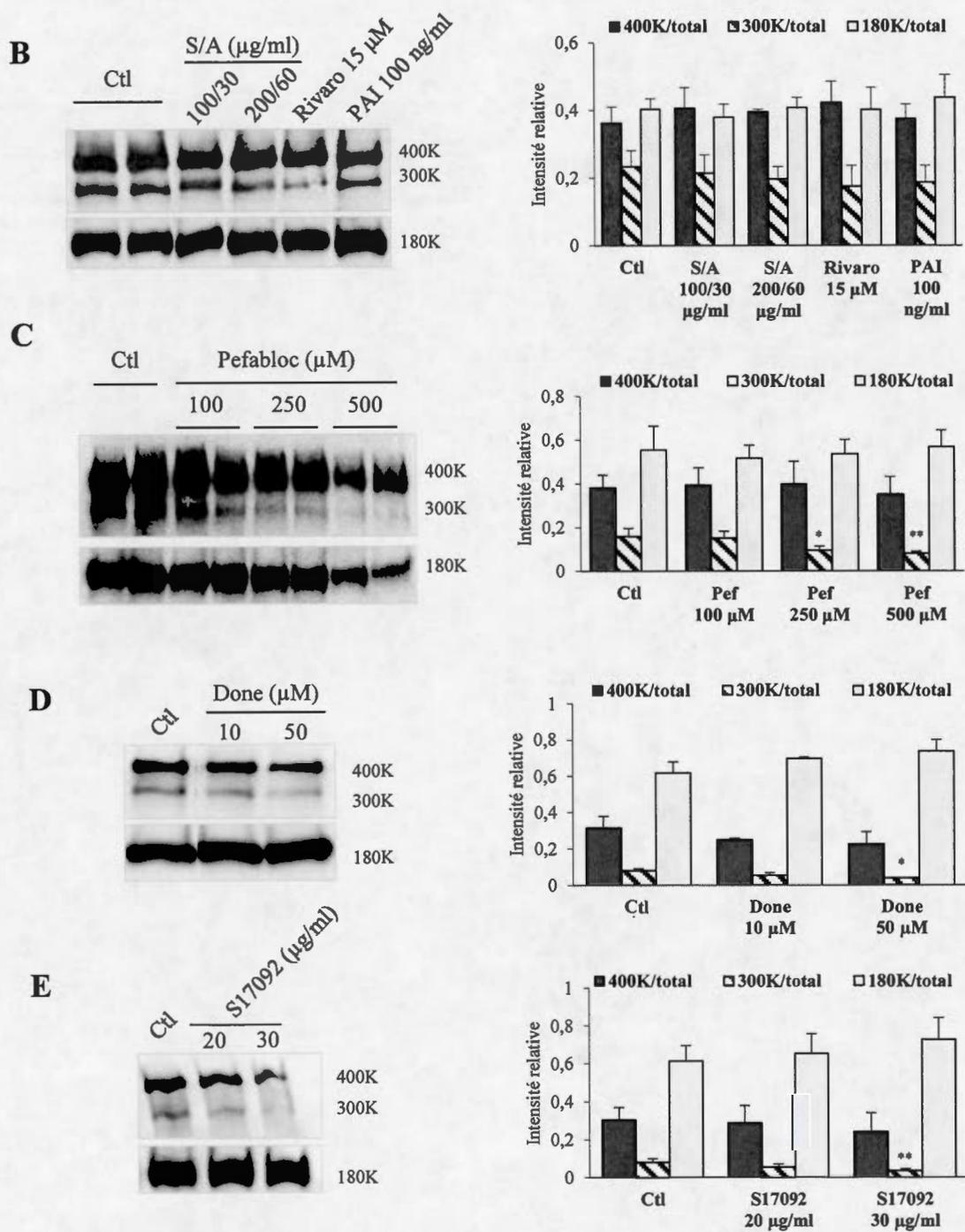


Figure 3.5 (Suite)

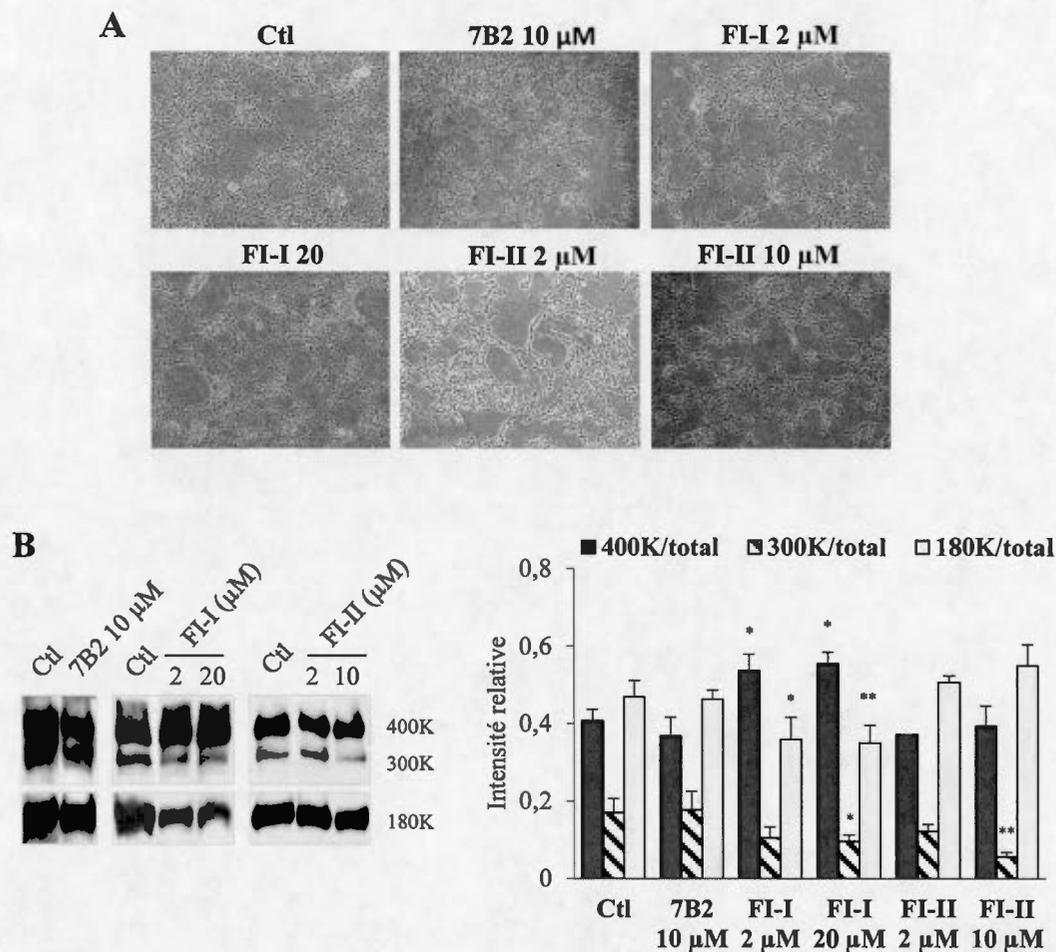


Figure 3.6 Effet d'inhibiteurs de convertases sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19. À J6, les inhibiteurs mentionnés ont été ajoutés, aux concentrations indiquées, dans les milieux de cultures de neurones P19. À J8, les cultures ont été photographiées (100x) (A) et les milieux ont été récoltés pour effectuer l'analyse de la reeline par immunobuvardage (B). Des exemples d'immunobuvardages sont montrées ainsi que les résultats d'analyses densitométriques (moyennes \pm écarts-moyens) d'au moins 3 études indépendantes. Pour chaque culture, l'intensité de chaque forme de la reeline est rapportée sur l'intensité du total des trois formes de la protéine. Le symbole * représente une différence significative par rapport au Ctl (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$). FI : inhibiteur de furine ; 7B2 : peptide 7B2

3.4.3 Les autres inhibiteurs de protéases

Aucun des inhibiteurs testés pour les métalloprotéases et les protéases à sérine n'a été capable d'inhiber complètement le clivage de la reeline à un des deux sites ou aux deux sites de clivage. D'autres types de protéases ont des rôles dans le développement du SNC, et pourraient être impliqués dans le devenir de la reeline. Nous avons testé les inhibiteurs MG-132 et lactacystine, qui ciblent des activités de protéases à cystéine et de protéases à thréonine respectivement et ont des effets sur la mémoire à long terme chez les abeilles. Les deux inhibent le protéasome (Felsenberg *et al.*, 2014). L'inhibiteur de BACE-1/ β -sécrétase est un inhibiteur spécifique de cette protéase à aspartate. La β -sécrétase est connue pour cliver l'APP et participer à la formation de fibres amyloïdes (Stachel *et al.*, 2004). La reeline peut interagir avec l'APP à la surface des neurones. Cette liaison serait importante pour le développement des neurites (Doehner et Knuesel, 2010 ; Knuesel, 2010 ; Sharaf *et al.*, 2015).

La morphologie des neurones P19 ne semble pas être affectée par les traitements avec ces différents inhibiteurs, de J6 à J8 (Fig. 3.7A).

La lactacystine n'a pas d'effet sur les niveaux relatifs des formes 400K, 300K et 180K de la reeline. Le MG-132 inhibe de façon significative la formation de la forme de 300K (Fig. 3.7B). La proportion de reeline 300K apparaît plus faible suite au traitement avec l'inhibiteur de BACE-1, mais cela n'est pas statistiquement significatif (Fig. 3.7C).

Les résultats obtenus avec le MG-132 et peut-être ceux avec le BACE-1 suggèrent que d'autres types de protéases pourraient jouer un rôle dans le clivage de la reeline, en plus des protéases à sérine et des métalloprotéases.

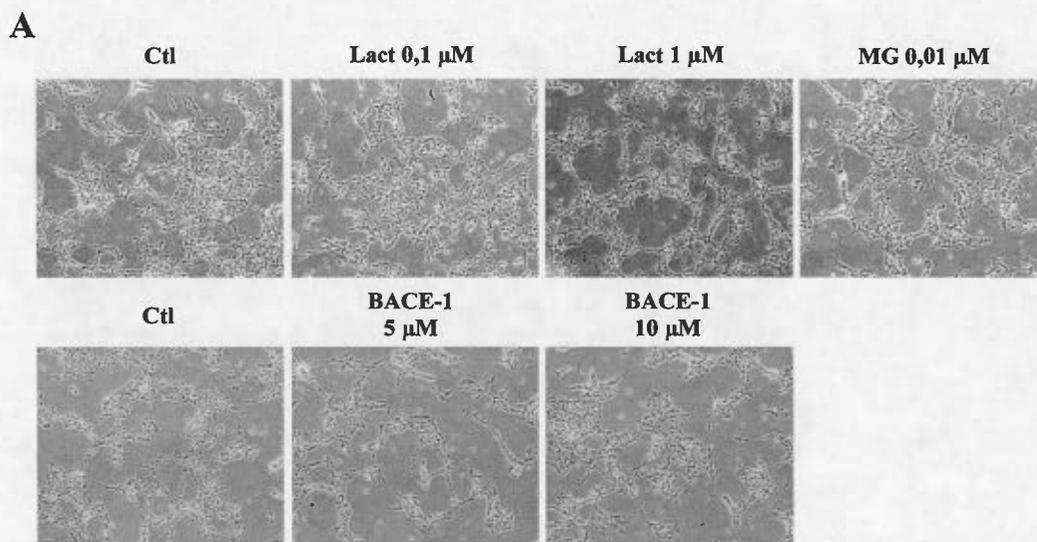


Figure 3.7 Effet d'inhibiteurs d'autres types de protéases sur la morphologie et sur le profil protéolytique de la reeline des cultures neuronales P19. À J6, les inhibiteurs mentionnés ont été ajoutés, aux concentrations indiquées, dans les milieux de cultures de neurones P19. À J8, les cultures ont été photographiées (100x) (A) et les milieux ont été récoltés pour effectuer l'analyse de la reeline par immunobuvardage (B et C). Des exemples d'immunobuvardages sont montrées ainsi que les résultats d'analyses densitométriques (moyennes \pm écarts-moyens) d'au moins 3 études indépendantes. Pour chaque culture, l'intensité de chaque forme de la reeline est rapportée sur l'intensité du total des trois formes de la protéine. Le symbole ** représente une différence significative par rapport au Ctl (** : $p < 0,01$). Lact : lactacystine ; BACE-1 : inhibiteur de BACE-1. (Suite à la page suivante)

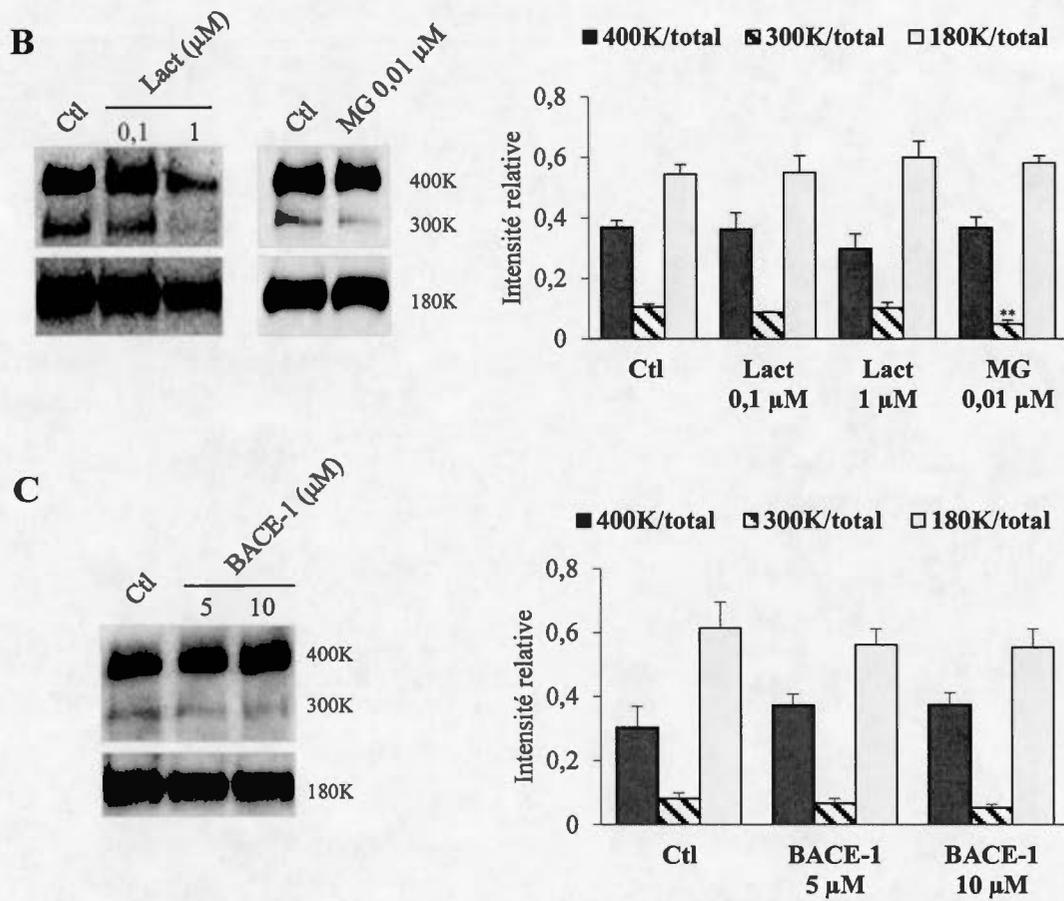


Figure 3.7 (Suite)

3.4.4 Combinaison d'inhibiteurs

Différents types de protéases semblent impliqués dans le clivage de la reeline, principalement des métalloprotéases et des protéases à sérine (Tableau 3.1). Cependant, aucun inhibiteur utilisé individuellement n'a été en mesure d'inhiber totalement ce clivage. L'association de différents types d'inhibiteurs dans des cultures de neurones P19 pourrait induire une inhibition plus efficace.

Le GM6001 ainsi que les inhibiteurs de la furine sont les inhibiteurs qui ont montré la plus grande inhibition du clivage de la reeline et appartiennent à deux catégories d'inhibiteurs différentes. Ils ont alors été utilisés conjointement dans des cultures de neurones (Fig. 3.8). Il est intéressant de noter que la furine est un activateur de métalloprotéases (Krstic *et al.*, 2012). La morphologie des cellules, est similaire entre le Ctl et le traitement avec GM6001 + FI-II (Fig. 3.8A). Cependant, la combinaison du GM6001 avec le FI-I semble légèrement toxique, l'étalement cellulaire est moindre à J8 (Fig. 3.8A), et le niveau de reeline total diminue (Fig. 3.8B). La proportion de reeline 400K est plus élevée et celle de 180K plus faible dans les milieux de culture avec les deux traitements, et significativement avec le FI-I. Néanmoins, la proportion de reeline 300K reste inchangée entre les différentes combinaisons et le Ctl (Fig. 3.8B immunobuvardage). Ces résultats montrent que la combinaison du GM6001 avec un inhibiteur de furine modifie l'expression de la reeline dans les milieux de cultures neuronales, mais différemment de lorsqu'ils sont utilisés séparément. En effet, lorsqu'ils sont utilisés seuls, c'est la production du fragment de 300K qui est inhibé, alors que les combinaisons entraînent l'inhibition de la forme de 180K.

Le cocktail-1 d'inhibiteurs de protéases (CIP) de Sigma-Aldrich cible plusieurs types de protéases. Il contient de l'aprotinine et du péfabloc, deux inhibiteurs de protéases à sérine, ainsi que des inhibiteurs de protéines à cystéine (le E-64 et la leupeptine), un inhibiteur de protéases à aspartate (la pepstatine) et enfin un

inhibiteur d'aminopeptidases (la bestatine). Il a été utilisé sur des cultures de neurones P19. Les concentrations utilisées ont été établies dans un premier temps par rapport aux concentrations d'aprotinine déjà testées puis ajustées selon leur toxicité sur les cultures neuronales. Aux concentrations utilisées, le cocktail d'inhibiteurs de protéases n'a affecté ni la morphologie des cellules P19 ni le profil protéolytique de la reeline (Fig. 3.9).

Tableau 3.1 Pourcentage d'inhibition du clivage de la reeline avec différents inhibiteurs de protéases sur des cultures de neurones P19.

Cibles	Inhibiteurs	% inhibition		
		300K	180K	
Métalloprotéases	GM-6001	63 ± 1		
	1,10-Phénanthroline			
	Picéatannol	50 ± 8	40 ± 8	
	Catéchine EGCG			
Protéases à sérine	Général			
		SBTI/Aprotinine		
		Pefabloc	40 ± 15	
	Convertases	Peptide 7B2		
		Inhibiteur-1 de furine	44 ± 10	22 ± 10
		Inhibiteur-2 de furine	67 ± 7	
	tPA, uPA	Serpine E1		
	Facteur X	Rivaroxaban		
	Acétylcholinestérase	Donépézil	46 ± 3	
	Prolyl endopeptidases	S17092	59 ± 14	
Protéases à cystéine (protéasome)	MG-132	53 ± 11		
Protéases à thréonine (protéasome)	Lactacystine			
Protéases à aspartate (β-sécrétase)	Inhibiteur de BACE-1			

Les pourcentages d'inhibition sont indiqués pour les concentrations d'inhibiteurs qui ont provoqué les plus fortes inhibitions uniquement.

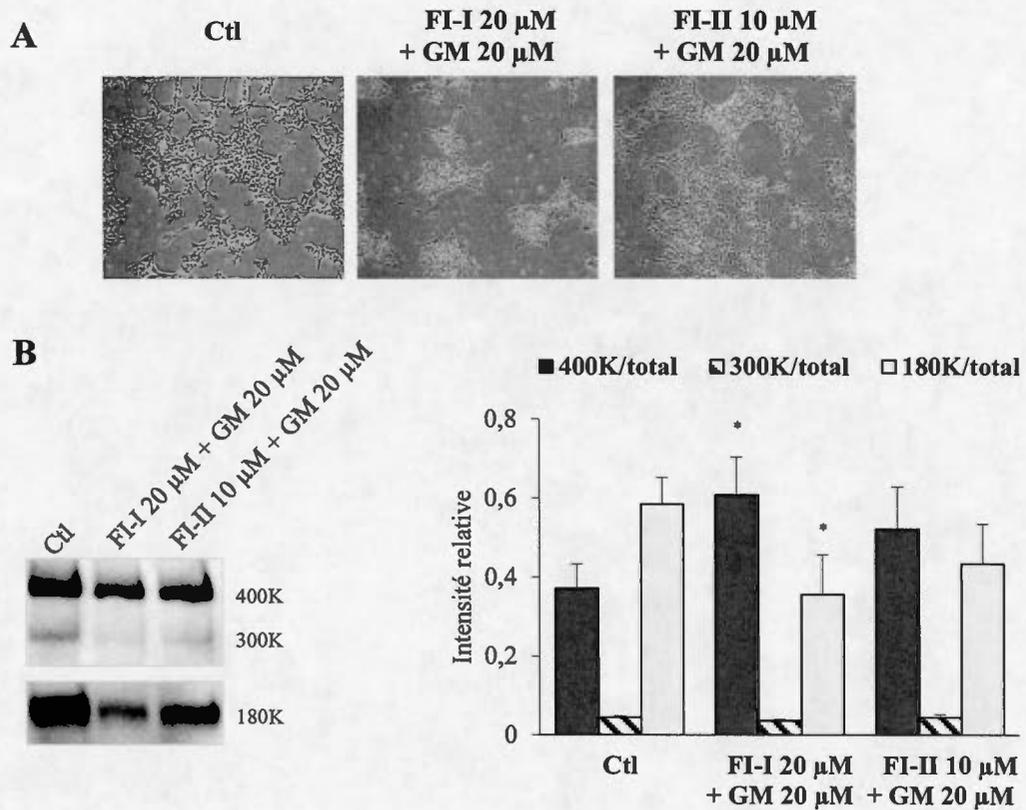


Figure 3.8 Effet de la combinaison d'un inhibiteur de métalloprotéase avec un inhibiteur de convertases sur la morphologie des cultures de neurones P19 et sur le clivage de la reeline. À J6, les inhibiteurs mentionnés ont été ajoutés, aux concentrations indiquées, dans les milieux de cultures de neurones P19. À J8, les cultures ont été photographiées (100x) (A) et les milieux ont été récoltés pour effectuer l'analyse de la reeline par immunobuvardage (B). Des exemples d'immunobuvardages sont montrés ainsi que les résultats d'analyses densitométriques (moyennes \pm écarts-moyens) d'au moins 3 études indépendantes. Pour chaque culture, l'intensité de chaque forme de la reeline est rapportée sur l'intensité du total des trois formes de la protéine. Le symbole * représente une différence significative par rapport au Ctl (* : $p < 0,05$). FI : inhibiteur de furine ; GM : GM6001

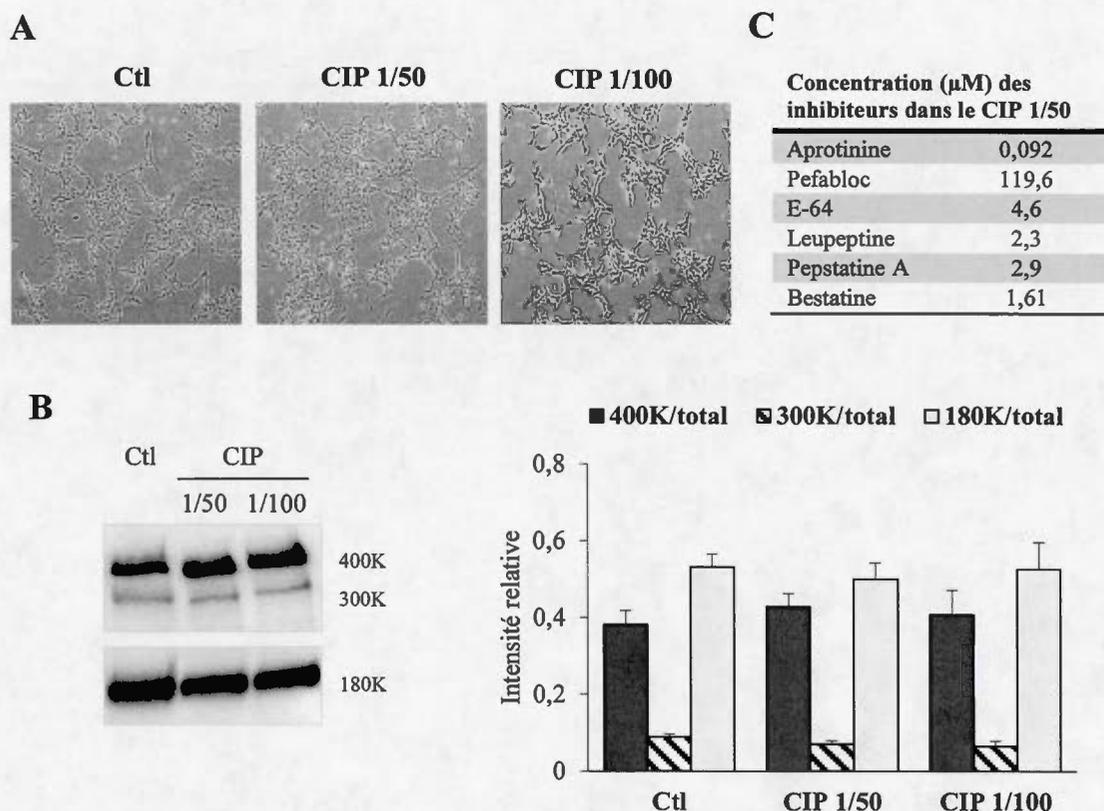


Figure 3.9 Effet d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de convertases sur la morphologie des cultures de neurones P19 et le clivage de la reeline. À J6, un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été ajouté dans les milieux de cultures de neurones P19. À J8, les cultures ont été photographiées (A) et les milieux ont été récoltés pour effectuer l'analyse de la reeline par immunobuvardage (B). un exemple d'immunobuvardage est montré ainsi que les résultats d'analyses densitométriques (moyennes \pm écarts-moyens) d'au moins 3 études indépendantes. Pour chaque culture (ou chaque piste sur le gel), l'intensité de chaque forme de la reeline est rapportée sur l'intensité du total des trois formes de la protéine. CIP : cocktail-1 d'inhibiteurs de protéases de Sigma-Aldrich. Aprotinine 0,092 μM correspond à 0,6 $\mu\text{g/ml}$.

CHAPITRE IV DISCUSSION ET CONCLUSION

La reeline, une protéine de 400K, est indispensable au bon positionnement des neurones durant le développement embryonnaire et possède aussi un rôle important dans le cerveau adulte, notamment au niveau de la mémoire à long terme. On la retrouve sous forme de fragments incluant les fragments de 300K et de 180K possédant l'extrémité N-t native. En effet, la reeline peut être clivée *in vivo* à deux sites (N-t et C-t), mais les protéases responsables de ces clivages restent peu connues. Un des objectifs de cette étude a été d'identifier ces protéases afin d'aider à mieux comprendre les mécanismes de formation et le rôle physiologique des fragments de la reeline dans le développement du système nerveux. Le modèle de cellules souches embryonnaires P19 de souris a été utilisé dans cette étude. En effet, il constitue un excellent modèle pour l'étude de la différenciation et du développement neuroectodermale car ces cellules peuvent se différencier en neurones représentatifs de ceux retrouvés dans SNC et ils sont en mesure de produire de la reeline.

Nous avons trouvé que les cultures neuronales P19 nouvellement différenciées produisent de la reeline de 180K, puis, plus tard, de la reeline de 300K. Ces fragments sont générés durant la période où les cultures sont fortement enrichies en neurones et contiennent peu ou pas d'astrocytes. Les neurones naissants expriment donc une ou des protéases capables de cliver la reeline à ses deux sites.

Nous avons testé l'effet d'inhibiteurs de différentes classes de protéases sur le clivage de la reeline dans les cultures enrichies en neurones. Des inhibiteurs de métalloprotéases, de protéases à sérine et de protéases à cystéine ont inhibé, parfois jusqu'à 50%, la génération des formes de 300K et de 180K de la reeline. Cependant,

aucun inhibiteur de protéases testé n'a pu inhiber complètement le clivage de la reeline (Tableau 3.1).

La CP, une ferroxidase, stimule la génération de la reeline 300K dans les cultures neuronales P19 par des mécanismes non encore compris. Lorsqu'elle est ajoutée aux cultures, elle semble retarder l'apparition d'îlots cellulaires exhibant un réseau rayonnant de neurites. Cependant, il est difficile de connaître l'impact d'un milieu pré-enrichi en reeline (400K, 300K et 180K) selon la méthode d'enrichissement que nous avons utilisée. En effet, ce milieu pré-enrichi a induit de la toxicité dans les cultures.

4.1 Profil temporel du clivage de la reeline dans les cultures de neurones P19

Le niveau de chaque forme de la reeline change durant le développement embryonnaire (Ducharme, 2013) ainsi que dans certaines maladies. Un changement dans les niveaux relatifs des différentes formes de la reeline (400K, 300K et 180K) a été relié à différentes maladies neurologiques. En effet, par exemple chez les patients autistes, le niveau de reeline 400K est plus faible dans certaines parties du cerveau que chez des sujets sains. Alors que chez des patients atteints d'Alzheimer, c'est le niveau de reeline 180K qui apparaît plus élevé que la normale (Fatemi, 2005). Le rôle physiologique des fragments *in vivo* est peu compris. Le fragment de 300K, capable de se lier aux récepteurs ApoER2 et VLDLR, pourrait agir à plus longue distance que la forme native 400K car il diffuse plus facilement (Jossin *et al.*, 2007 ; Jossin *et al.*, 2004). Le fragment 180K ne possède pas la portion centrale de la protéine capable de se lier aux récepteurs. Néanmoins, il contient la séquence de reeline qui favorise la formation de dimères ou d'oligomères de reeline menant à une activation plus efficace des voies de signalisation. Une augmentation de reeline 180K pourrait engendrer la formation d'oligomères plus courts ou moins efficaces.

Des études effectuées chez la souris montrent que les fragments de 300K et de 180K apparaissent dès que la reeline est exprimée dans le cerveau embryonnaire, au jour embryonnaire 12.5 (Ducharme, 2013). Cependant, le type de cellules produisant la ou les protéases responsables du clivage de la reeline, à ce stade du développement du cerveau, est encore inconnu. Les résultats de la Figure 3.1 montrent que, dans les cultures neuronales P19, l'apparition des astrocytes est détectable uniquement à partir de J10 et augmente fortement à J12. Le modèle révèle que des protéases de clivage de la reeline peuvent être d'origine neuronale. En effet, les formes de 400K et 180K sont présentes dès le J6 et la forme de 300K est détectable dès le J8. Le modèle P19 se distingue donc d'autres modèles de neurones où l'espèce 300K est peu ou pas détectable (Annexe 1 et Fig. A.1)

4.2 Impact d'inhibiteurs de différentes classes de protéases sur le profil protéolytique de la reeline

L'étude des protéases responsables du clivage de la reeline est relativement récente. Les premiers travaux publiés par De Rouvroit *et al.* (1999) ont montré l'implication possible de métalloprotéases dans le clivage N-t de la reeline grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de protéases. Presque 10 ans plus tard, une autre étude suggère aussi un rôle de métalloprotéases dans le clivage N-t de la reeline par l'utilisation du GM6001 (Jossin *et al.*, 2007). Ensuite, ce sont les convertases qui attirent l'attention de l'équipe d'Hattori (Kohno, S. *et al.*, 2009). En effet, cette équipe a montré que l'inhibiteur FI-I pouvait inhiber le clivage N-t de la reeline. Ensuite, Krstic *et al.* (2012) montrent, dans des études *in vitro*, que le tPA, une protéase à sérine, est capable de cliver le site C-t de la reeline et que les métalloprotéases ADAMTS-4 et -5 sont en mesure de cliver les sites N-t et C-t de la reeline. Enfin, Trotter *et al.* (2014) confirme que le tPA peut cliver la reeline en son site C-t par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le PAI-1, *in vitro*. Cependant, des

études effectuées sur des souris knockout pour le tPA n'ont montré aucune différence dans les niveaux de la reeline et de ses fragments dans le cerveau adulte (Trotter *et al.*, 2014). Le tPA n'aurait pas d'impact sur le clivage de la reeline dans des conditions basales, il agirait sur la reeline seulement dans le cas d'activité synaptique intense.

Les sites précis du clivage de la reeline ont été déterminés récemment. Le site de clivage N-t est situé entre la Proline 1244 et l'Alanine 1245 (Koie *et al.*, 2014) et le site de clivage C-t, est situé entre les domaines de répétition VI et VII, entre l'Alanine 2688 et l'Aspartate 2689 (Sato *et al.*, 2015). Les méprines α et β , deux métalloprotéases de la famille des metzincines (Broder et Becker-Pauly, 2013), sont capables de cliver le lien Ala2688-Asp2689 de la reeline *in vitro*. Cependant, *in vivo*, même si ces méprines sont présentes dans le cervelet, le blocage de leur activité a peu d'impact sur le clivage de la reeline (Sato *et al.*, 2015). Les méprines α et β rejoignent le groupe des modulateurs potentiels de la reeline. Nos résultats, avec des inhibiteurs de protéases, sont rapportés dans le Tableau 4.1. Comme dans les autres travaux publiés utilisant des cultures de neurones ou des tranches de cerveaux, la génération de reeline 180K est diminuée par l'effet d'inhibiteurs de métalloprotéases et de convertases dans les neurones P19. Dans le cas de la reeline 300K, une ou des protéases à cystéine et une ou des protéases à sérine, en plus des convertases, pourraient aussi être impliquées. Il s'agirait possiblement d'une protéase à sérine dont le site catalytique pourrait avoir des dimensions particulières ou dont la localisation à la membrane le rend plus difficile d'accès. En effet, la combinaison SBTI/aprotinine et le péfabloc sont des inhibiteurs à sérine à large spectre, mais seul le péfabloc a provoqué l'inhibition du clivage de la reeline. Le péfabloc, un inhibiteur de taille plus petite, pourrait donc agir sur un plus grand nombre de protéases (Barelli *et al.*, 1999 ; Bellemere *et al.*, 2003 ; Bellemere *et al.*, 2005 ; Egger *et al.*, 2003). Le S17092, un inhibiteur de protéases à sérine a empêché le clivage de la reeline de façon significative. C'est un inhibiteur spécifique des prolyl-endoropeptidases. De plus, il est

connu comme ayant un potentiel thérapeutique concernant les pertes de mémoire dans le cas de maladies neurodégénératives (Barelli *et al.*, 1999 ; Bellemere *et al.*, 2003 ; Bellemere *et al.*, 2005). Selon l'équipe de Koie *et al.* (2014), le site de clivage N-t de la reeline est situé après une proline. Les résultats attendus étaient donc une diminution du niveau de reeline de 180K, mais c'est le niveau de reeline de 300K qui a diminué. Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence de plusieurs Proline très proches du site de clivage C-t, aux positions 2687 et 2692. En effet, il pourrait exister plusieurs sites très rapprochés de clivages de la reeline, et leur sélection pourrait dépendre du contexte biologique dans lequel sont exprimées les protéases (ex : régions du cerveau, état d'activité de neurotransmission). Ces sites étant très proches les uns des autres, aucune différence dans la taille des fragments ne pourrait être détectée par immunobuvardage.

Peu d'inhibiteurs ont influencé le clivage de la reeline et aucun inhibiteur n'a pu inhiber complètement ce clivage. De plus, l'ensemble des résultats obtenus sont généralement moins prononcés que ceux retrouvés dans la littérature (Tableau 4.1). Ces divergences peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales différentes. En effet, le contexte environnemental n'est pas le même lorsque la reeline est isolée et étudiée *in vitro*, transfectée dans différents types cellulaires non neuronaux, ou encore étudiée dans des cultures de neurones (sous forme recombinante ou endogène). Lorsque la reeline est isolée, elle n'est peut-être pas complètement pure. En effet, elle est enrichie par chromatographie de milieux de cultures (cellules transfectées ou neurones corticaux) sur Héparine Sépharose la plupart du temps (Hisanaga *et al.*, 2012 ; Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Koie *et al.*, 2014). Dans un contexte neuronal, il peut exister des cascades protéolytiques compensatoires permettant ainsi le clivage de la reeline malgré l'utilisation d'un inhibiteur particulier. Il y a, en outre, des différences au niveau des concentrations d'inhibiteurs utilisées. En effet, elles sont généralement beaucoup plus fortes dans la littérature. Les études *in vitro* permettent effectivement l'utilisation de fortes doses d'inhibiteurs qui s'avèrent

toxiques *in vivo*. De plus, les neurones sont probablement plus sensibles que des cellules cancéreuses ou des cellules de rein, qui sont souvent utilisées comme modèle d'étude du clivage de la reeline. Plusieurs inhibiteurs ont été utilisés durant un laps de temps plus court avec d'autres types de modèles cellulaires. Dans notre cas, il est nécessaire de laisser les neurones P19 en contact avec les inhibiteurs durant 48h afin de permettre aux neurones d'accumuler les différentes formes de la reeline.

Nous avons ensuite décidé d'utiliser un inhibiteur de métalloprotéases combiné avec un inhibiteur de protéases à sérine afin d'obtenir une meilleure inhibition du clivage de la reeline (Fig. 3.9). Pour cela, le GM6001 est utilisé avec le FI-I ou avec le FI-II. Ces combinaisons d'inhibiteurs ajoutés aux cultures neuronales provoquent l'inhibition de la production de la reeline 180K et non de la reeline 300K, contrairement à leur effet lorsqu'ils sont utilisés seuls. De la même façon, Koie *et al.* (2014) ont montré que lorsqu'ils inhibent le clivage N-t de la reeline dans des cultures de neurones primaires corticaux, par mutation du site de clivage, ils augmentent les niveaux de la reeline de 400K mais aussi de la reeline de 300K.

L'utilisation d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CIP), composé d'un mélange d'inhibiteurs de protéases à sérine, à cystéine et à aspartate, n'a quant à lui donné aucun résultat. Les concentrations de chaque inhibiteur ne sont probablement pas suffisamment élevées pour induire une inhibition. C'est le cas du Pefabloc, par exemple, qui a pu inhiber le clivage de la reeline de façon significative à des concentrations de 250 et 500 μM , mais dont la présence à 120 μM dans le cocktail d'inhibiteurs de protéases ne lui permet pas d'avoir cet effet. Le grand nombre d'inhibiteurs contenus dans le cocktail d'inhibiteurs de protéases rend difficile l'augmentation de la concentration utilisée dans les cultures de neurones sans induire de la toxicité. Il faut que les inhibiteurs soient utilisés à des concentrations suffisantes pour inhiber le clivage de la reeline sans provoquer de toxicité. Par exemple, il n'a pas été possible d'employer le picéatannol en combinaison avec des

inhibiteurs de furine car la toxicité devenait trop forte. Une diminution des concentrations des inhibiteurs provoquait une absence d'inhibition du clivage de la reeline.

L'utilisation d'inhibiteurs dans les cultures neuronales a ses limites. En effet, certaines protéases n'ont pas d'inhibiteur spécifique pouvant être utilisé en culture et certains produits provoquent une grande toxicité rendant l'interprétation des résultats difficile. Il serait intéressant d'utiliser des siRNA afin d'inhiber de façon plus spécifique l'expression de protéases et ainsi observer leur implication dans le clivage de la reeline. L'équipe de Hatada *et al.* (2008) a effectué des études de micropuces à ARN sur de jeunes neurones P19 (J6) afin de connaître les gènes, incluant ceux des protéases, surexprimés lors de la différenciation des neurones. De cette étude, Krstic *et al.* (2012) n'ont relevé que les gènes de protéases à sérine et de métalloprotéases, ce qui mène déjà à 42 protéases. Il faudrait y ajouter d'autres types de protéases surexprimées.

Une autre avenue serait d'essayer de purifier la ou les protéases responsables du clivage de la reeline. Les deux sites de clivage de la reeline étant maintenant connus, il serait possible de synthétiser de courts peptides contenant les sites de clivage. Ces peptides serviraient de substrats pour doser les protéases qui hydrolysent la reeline. Il serait alors possible de suivre ces protéases dans des procédés de purification qui pourraient aider à leur identification. Contrairement aux préparations de reeline, ces fragments seront dénués de contaminant. Il faudrait expérimenter la purification de la (ou des) protéase(s) à partir de milieux de culture ainsi que d'extraits cellulaires, avec des neurones P19 par exemple.

Tableau 4.1 Résumé des résultats obtenus sur l'inhibition du clivage de la reeline dans la littérature et dans cette étude.

Cibles	Inhibiteurs	Littérature ^(a)	Résultats P19	
Métalloprotéases	GM6001	↓180K	↓300K	
	1,10-Phénanthroline	↓300K ↓↓180K	=	
	Picéatannol	↓300K ↓↓180K	↓300K ↓180K	
	Catéchine EGCG	↓300K ↓↓180K	=	
	Général	SBTI/Aprotinine ^(b)	=	=
		Pefabloc		↓300K
Protéases à sérine	Peptide 7B2		=	
	Convertases	Inhibiteur-I de furine	↓300K ↓↓180K	↓300K ↓180K
		Inhibiteur-II de furine	=	↓300K
	tPA, uPA	Serpine E1	↓180K	=
	Facteur X	Rivaroxaban ^(b)		=
	Acétylcholinestérase	Donépézil		↓300K
Prolyl endopeptidases	S17092		↓300K	
Protéases à cystéine (protéasome)	MG-132		↓300K	
Protéases à thréonine (protéasome)	Lactacystine		=	
Protéases à aspartate (β-sécrétase)	Inhibiteur de BACE-1		=	
Métalloprotéases + convertases	GM6001 + Inhibiteur-I de furine		↓180K	
	GM6001 + Inhibiteur-II de furine		=	
Éventail de protéases	Cocktail d'inhibiteurs de protéases		=	

^(a) Les résultats proviennent d'études réalisées principalement sur la reeline recombinante *in vitro*, sur des cellules non-neuronales exprimant la reeline recombinante ou, plus rarement, sur des neurones exprimant une reeline endogène (Hisanaga *et al.*, 2012 ; Jossin *et al.*, 2007 ; Kohno, S. *et al.*, 2009 ; Krstic *et al.*, 2012).

^(b) Le SBTI/aprotinine et le Rivaroxaban inhibent la génération de 300K dans les cultures de neurones P19 seulement lorsque cette génération a été stimulée par un traitement avec de la CP (Ducharme, 2013 ; Salmi, 2015).

Le symbole = indique aucun changement significatif dans le taux de génération de reeline de 300K et de 180K ; ↓↓ indique une inhibition plus importante que ↓.

4.3 Implication de la CP dans le clivage de la reeline

La CP n'est pas nécessaire au clivage de la reeline dans le modèle P19, mais son ajout stimule la génération de la reeline 300K. Ceci est en accord avec des études antérieures effectuées sur des cerveaux de souris, durant la période de formation des couches neuronales du cerveau. Elles ont montré que les cerveaux embryonnaires de souris CP^{-/-} produisent de la reeline 300K mais en plus faible quantité (5 fois moins environ) que ceux des souris sauvages (Ducharme, 2013). Ces résultats suggèrent que la CP pourrait être responsable de l'activation d'une voie protéolytique provoquant le clivage de la reeline. La CP possède des homologies de séquence avec les facteurs V et VIII de la coagulation sanguine qui peuvent lier des protéases et ainsi participer à l'activation de cascades protéolytiques (Church *et al.*, 1984). La CP pourrait, de la même façon, lier et amener des protéases dans l'environnement de la reeline et ainsi provoquer son clivage.

Les inhibiteurs qui ont empêché les actions de la CP sur le clivage de la reeline (Ducharme, 2013 ; Salmi, 2015) n'ont pas eu d'effet sur le profil protéolytique de la reeline dans les cultures de neurones Ctl. C'est le cas pour le SBTI/aprotinine et le Rivaroxaban. Ainsi, les protéases influencées par la CP pourraient être différentes de celles qui agissent sur la reeline en absence de CP.

Dans une autre étude, non présentée, l'analyse des milieux de culture concentrés et des lysats cellulaires n'ont pas montré de présence de CP endogène. Ces résultats suggèrent que la population d'astrocytes retrouvée entre les J6 et J12, dans les cultures neuronales P19, ne produisent pas de CP. Ceci s'accorde avec le fait qu'*in vivo*, tous les astrocytes ne synthétisent pas la CP, ce sont principalement les astrocytes proches des vaisseaux sanguins et ceux au niveau des méninges qui expriment cette protéine (Vassiliev *et al.*, 2005).

4.4 Aspects morphologiques des cultures neuronales P19

Une étude a montré l'importance de l'ultime extrémité C-t de la reeline dans le développement, puisqu'elle serait essentielle pour la croissance des dendrites ainsi que pour le maintien de la zone marginale du cortex (Kohno *et al.*, 2015). L'étude de la morphologie des neurones P19 montre une agrégation des neurones, lorsqu'ils sont traités avec de la CP, depuis le J4 jusqu'aux jours 6 et 8 (Fig. 3.1) (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003). Il y a moins de neurites dans les cultures traitées que dans les cultures Ctl. Cependant, lorsque la morphologie est étudiée plus tardivement, les cultures Ctl montrent l'apparition d'îlots cellulaires exhibant des projections rayonnantes à partir de J10, qui augmentent et grossissent à J12. Ces îlots ne sont pas ou peu présents lorsque les cellules sont traitées avec de la CP. Ces résultats suggèrent que la CP pourrait, en stimulant le clivage de la reeline au site C-t, retarder l'apparition des connexions neuritiques. Plus positivement, empêcher une mise en place trop précoce de connexions.

Des études ont montré que la reeline, lorsqu'injectée de façon ectopique dans le cerveau de souris, pouvait y provoquer la formation d'agrégats neuronaux (Kubo *et al.*, 2010). Dans le présent travail, les résultats des études effectuées avec des milieux enrichis en reeline suggèrent que la reeline ne serait pas responsable de la formation de ces amas de cellules. Cependant, l'utilisation d'un milieu trop âgé pourrait avoir affecté la viabilité des cellules sur le long terme et empêcher l'apparition de ces structures, rendant ainsi l'interprétation des résultats difficile. Notons aussi que la proportion de fragments de reeline dans la préparation de reeline de Kubo *et al.* (2010) pourrait différer de celle de notre milieu pré-enrichi. La comparaison des résultats obtenus devient alors difficile. Il serait intéressant de reproduire cette étude en utilisant une reeline plus pure dans un milieu dépourvu de débris cellulaires.

Nous savons que de la CP dépourvue de cuivre, par dénaturation à la chaleur, ne provoque pas d'agrégation chez de jeunes neurones P19 et que le SBTI/aprotinine

peut inhiber l'action de la CP sur l'agrégation des neurones ainsi que sur le profil protéolytique de la reeline (Ducharme *et al.*, 2010 ; Maltais *et al.*, 2003). De plus, des études antérieures ont montré que la Ser₂Cu, un petit composé à cuivre, provoque aussi l'agrégation des neurones P19 durant la période de J4 à J6 et cela, dans un mécanisme qui peut aussi être inhibé par du SBTI/aprotinine (Salmi, 2015). L'impact de la Ser₂Cu sur le profil de la reeline et la morphologie des cultures à long terme (au-delà du J6), a été analysé et comparé à celui de la CP (Annexe 3 et Fig. A.2). Les résultats ont montré que l'apparition des îlots rayonnants semble retardée en présence de Ser₂Cu comme c'est le cas pour la CP. La morphologie des neurones suite au traitement avec de la Ser₂Cu est similaire à celle des cultures traitées avec de la CP jusqu'à J12. Un rôle des protéases à sérine dans la formation de ces structures est donc à envisager. Il serait intéressant de combiner la Ser₂Cu avec du SBTI/aprotinine. Cependant, l'effet de la Ser₂Cu sur l'expression de la reeline est différente de celle de la CP. En effet, la production total de reeline en présence de Ser₂Cu est plus faible et la proportion de 300K ne semble pas plus grande par rapport au Ctl comme avec de la CP. Ces résultats suggèrent que la Ser₂Cu n'a pas d'impact sur le clivage de la reeline et ainsi que le cuivre ne serait pas suffisant pour activer des protéases impliquées dans le clivage de la reeline.

La culture de neurones individuels ne permet peut-être pas de comprendre tous les impacts morphologiques de la CP, du cuivre et de la reeline. En effet, l'environnement n'est pas aussi complet qu'*in vivo*, où les neurones sont au contact de divers types cellulaires incluant les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules bordant les vaisseaux sanguins, et les fibres radiales gliales qui guident la migration neuronale. Par exemple, on ne sait pas s'il existe des cellules gliales radiales dans nos cultures. L'utilisation d'un marqueur comme la vimentine pourrait nous permettre de déterminer la présence ou l'absence de ces cellules dans le modèle P19 (Rakic, 2003). De plus, l'utilisation de tranches de cerveau pourrait être une méthode plus adaptée,

plus complète afin de déterminer les protéases responsables du clivage de la reeline dans un contexte développemental.

4.5 Conclusion

Le modèle P19 s'est avéré être un excellent modèle d'étude de la reeline puisqu'il est en mesure de produire naturellement des protéases capables de cliver la reeline au niveau de ses deux sites de clivage. Cette étude nous a permis de confirmer et de découvrir l'implication de plusieurs types de protéases, dont des protéases à sérine (clivages N-t et C-t), des métalloprotéases (clivages N-t et C-t) et des protéases à cystéine (clivage C-t), dans le processus de clivage de la reeline dans un contexte développemental. De plus, l'apparition tardive des astrocytes dans les cultures de neurones a permis de déterminer que des protéases d'origine neuronale peuvent cliver la reeline. Finalement, la CP n'est pas essentielle au clivage de la reeline, mais sa présence est associée à une plus grande production de la reeline 300K aussi bien *ex vivo* (ajout de CP exogène à des cultures de neurones P19) qu'*in vivo* (comparaison de cerveaux embryonnaires de souris de type sauvage et CP^{-/-} dans une étude antérieure)

ANNEXES

ANNEXE 1 EXPRESSION DE LA REELINE DANS DES CULTURES DE NEURONES, OU DES EXTRAITS DE CERVEAUX SELON DES DONNÉES PUBLIÉES

Certaines équipes de recherche, peu nombreuses, ont utilisé des cultures de neurones comme modèle d'étude afin de déterminer les protéases responsables du clivage de la reeline. L'analyse du profil protéolytique de la reeline montre pas ou peu de présence de reeline de 300K dans les modèles utilisés, durant la période étudiée (Fig. A.1A et B). Néanmoins, on commence à voir l'apparition de la reeline 300K dans des cultures de neurones P19 de J6 (48h ; Fig. A.1C). Cette espèce est bien présente dans le cerveau de rat adulte (Fig. A.1D). Ces résultats soulignent la pertinence du modèle P19, capable d'exprimer les trois formes de la reeline.

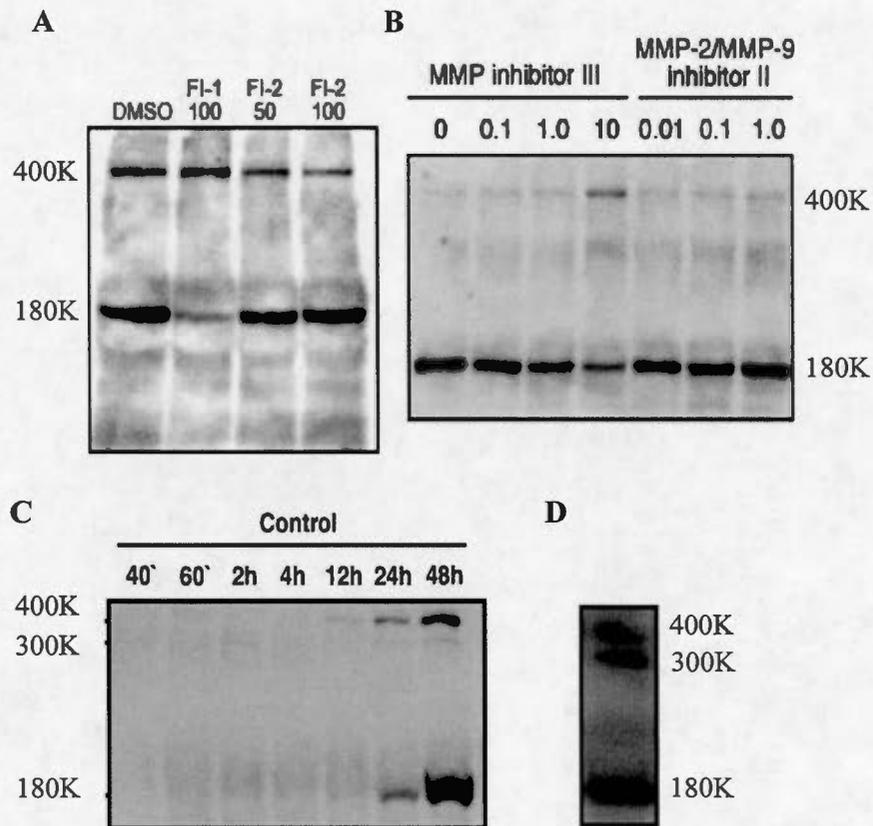


Figure A.1 Immunobuvardages de la reeline dans des cultures de neurones ou des extraits de cerveaux. Cultures de neurones corticaux primaires de souris selon (A) Kohno, S. *et al.* (2009) et Hisanaga *et al.* (2012). (C) Cultures de neurones P19 de J4 (0') à J6 (48h) et (D) extraits de cerveau de rat selon Ducharme *et al.* (2010).

ANNEXE 2 DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS D'INHIBITEURS DE PROTÉASES À UTILISER EN CULTURE

Afin de déterminer les concentration d'inhibiteurs de protéases adéquates pour traiter les cultures neuronales dans notre étude, plusieurs concentrations ont été testées en se référant dans un premier temps aux doses retrouvées dans les publications. Les modèles cellulaires et les techniques employées étant différents, plusieurs concentrations ont dû être ajustées car elles se sont avérées toxiques pour les cultures de neurones P19. Les concentrations finales utilisées sont les concentrations les plus fortes n'ayant pas provoquées de toxicité. Afin de déterminer cette concentration optimale, un intervalle de concentrations a été testé (Tableau A.1).

Tableau A.1 Intervalles de concentrations d'inhibiteurs essayés sur des cultures neuronales P19

Cibles	Inhibiteurs	Concentrations testées
Métalloprotéases	GM-6001	5 – 80 μ M
	1,10-Phénanthroline	0,5 – 50 μ M
	Picéatannol	0,6 – 60 μ M
	Catéchine EGCG	1,5 – 150 μ M
Protéases à sérine	SBTI/Aprotinine	100/30 – 200/60 μ g/ml
	Pefabloc	10 – 500 μ M
	Peptide 7B2	10 – 20 μ M
	Inhibiteur-1 de furine	0,1 – 20 μ M
	Inhibiteur-2 de furine	2 -10 μ M
	Serpine E1	100 – 500 ng/ml
	Rivaroxaban	15 – 75 μ M
	Donépézil	0,1 – 100 μ M
	S17092	5 – 100 μ g/ml
	Protéases à cystéine	MG-132
Protéases à thréonine	Lactacystine	0,1 – 10 μ M
Protéases à aspartate	Inhibiteur de BACE-1	1 – 20 μ M
Éventail de protéases	Cocktail d'inhibiteurs de protéases	1 – 1/100

ANNEXE 3 IMPACT DE LA SER₂CU SUR LES CULTURES NEURONALES P19

Des études antérieures ont montré que la Ser₂Cu, un petit composé à cuivre, provoque l'agrégation chez de jeunes neurones P19 (J6), comme le fait la CP (Salmi, 2015). Nous avons voulu étudier les effets au long terme (J6-J12) de la Ser₂Cu sur la morphologie des cultures de neurones P19 ainsi que sur le profil protéolytique de la reeline, afin de déterminer un rôle potentiel du cuivre sur ces actions.

La solution de Ser₂Cu est préparée selon la méthode de Sarkar (Sarkar, 1999) le jour même de son utilisation avec les cellules. De la L-sérine et du CuCl₂ sont dissous, à des concentrations finales respectives de 2 M et 1M, dans de l'eau contenant 0.9% (p/v) de NaCl. Le pH de la solution est ajusté à 7.4, puis la solution est stérilisée par passage sur filtre de 0,2 µm. La solution de Ser₂Cu est conservée à l'obscurité et à 4°C.

Les résultats de la Figure A.2A montrent que la Ser₂Cu a le même effet que la CP sur la morphologie des cultures de neurones jusqu'à J12. D'abord, aux J6 et J8 il y a moins de projections neuronales dans les cultures CP et Ser₂Cu que dans les cultures Ctl. De plus, la Ser₂Cu, comme la CP, empêche ou retarde l'apparition des ilots cellulaires exhibant des projections rayonnantes par rapport aux cultures Ctl (Fig. A.2A et B).

Le profil protéolytique de la reeline (Fig. A.2C) montre que les cultures de neurones traitées à la Ser₂Cu produisent moins de reeline. La proportion de 300K n'apparaît pas supérieure avec ce traitement. La présence de Ser₂Cu n'augmente donc pas le clivage de la reeline. Ces résultats suggèrent que le cuivre, dans une forme biologique minimale (associé à un acide aminé), ne serait pas capable stimuler le

clivage de la reeline. Par contre, il peut avoir un impact sur l'organisation des neurones.

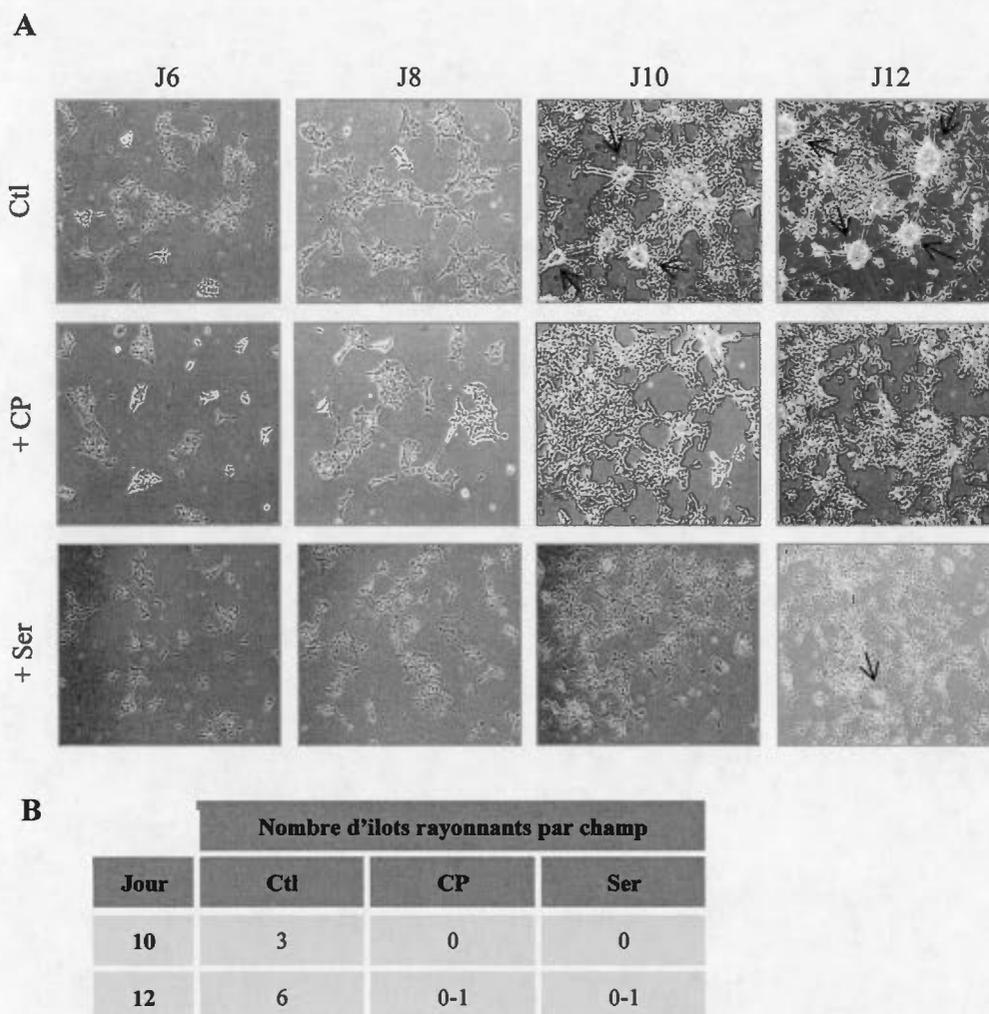


Figure A.2 Effet comparé de la CP et de la Ser_2Cu sur la morphologie des cultures neuronales P19 et sur l'expression de la reeline. Les cultures neuronales P19 n'ont reçu aucun traitement (Ctl) ou ont été traitées avec de la CP (0,5 mg/ml) ou avec de la Ser_2Cu (Ser ; 200 μ M) depuis le J4 jusqu'au jour de la photographie. Les cellules ont été ensemencées à J4 à une densité de 0,74 millions dans un pétri tissulaire de 60 mm de diamètre. (A) Photographies (100x) des cultures neuronales de J6 à J12 avec les différents traitements. Les flèches pointent vers des îlots rayonnants. (B) Nombre moyen d'îlots rayonnants pour 3 champs dans les cultures selon 3 études indépendantes.

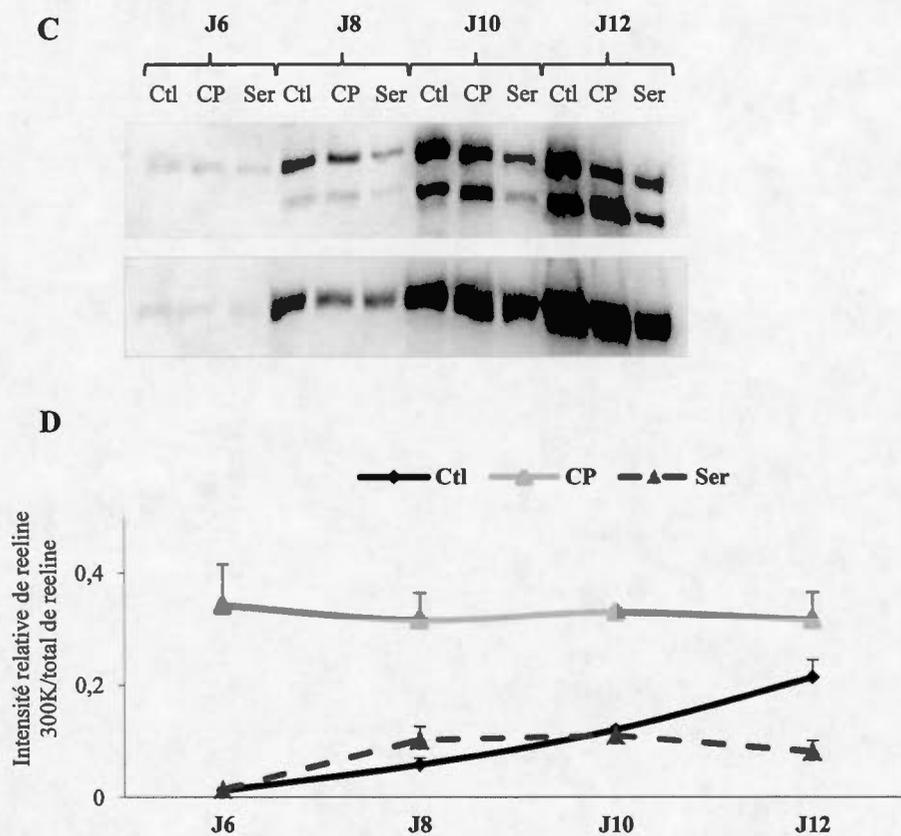


Figure A.2 (Suite) (C) Immunobuvardage de la reeline pour les traitements indiqués. (D) Analyses densitométriques de la reeline de 300K par rapport au total de reeline pour chaque traitement (moyennes \pm écarts moyens) de 3 études indépendantes.

BIBLIOGRAPHIE

- Barelli, H., Petit, A., Hirsch, E., Wilk, S., De Nanteuil, G., Morain, P. et Checler, F. (1999). S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 257(3), 657-661.
- Bellemere, G., Morain, P., Vaudry, H. et Jegou, S. (2003). Effect of S 17092, a novel prolyl endopeptidase inhibitor, on substance P and alpha-melanocyte-stimulating hormone breakdown in the rat brain. *J Neurochem*, 84(5), 919-929.
- Bellemere, G., Vaudry, H., Morain, P. et Jegou, S. (2005). Effect of prolyl endopeptidase inhibition on arginine-vasopressin and thyrotrophin-releasing hormone catabolism in the rat brain. *J Neuroendocrinol*, 17(5), 306-313.
- Botella-Lopez, A., Burgaya, F., Gavin, R., Garcia-Ayllon, M.S., Gomez-Tortosa, E., Pena-Casanova, J., Urena, J.M., Del Rio, J.A., Blesa, R., Soriano, E. et Saez-Valero, J. (2006). Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14), 5573-5578.
- Bouchard, F. et Paquin, J. (2009). Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells. *Stem Cells Dev*, 18(7), 1023-1032.
- Britto, J.M., Tait, K.J., Lee, E.P., Gamble, R.S., Hattori, M. et Tan, S.S. (2014). Exogenous Reelin modifies the migratory behavior of neurons depending on cortical location. *Cereb Cortex*, 24(11), 2835-2847.
- Broder, C. et Becker-Pauly, C. (2013). The metalloproteases meprin alpha and meprin beta: unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. *Biochem J*, 450(2), 253-264.
- 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.
- Caffrey, J.R., Hughes, B.D., Britto, J.M. et Landman, K.A. (2014). An in silico agent-based model demonstrates Reelin function in directing lamination of neurons during cortical development. *PLoS One*, 9(10), e110415.
- Cavasin, M.A., Rhaleb, N.E., Yang, X.P. et Carretero, O.A. (2004). Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP. *Hypertension*, 43(5), 1140-1145.
- Cho, K.S., Kwon, K.J., Jeon, S.J., Joo, S.H., Kim, K.C., Cheong, J.H., Bahn, G.H., Kim, H.Y., Han, S.H., Shin, C.Y. et Yang, S.-I. (2013). Transcriptional Upregulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Rat Primary Astrocytes

- by a Proteasomal Inhibitor MG132. *Biomolecules & Therapeutics*, 21(2), 107-113.
- 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.
- Couture, F., Ly, K., Levesque, C., Kwiatkowska, A., Ait-Mohand, S., Desjardins, R., Guerin, B. et Day, R. (2015). Multi-Leu PACE4 Inhibitor Retention within Cells Is PACE4 Dependent and a Prerequisite for Antiproliferative Activity. *Biomed Res Int*, 2015, 824014.
- David, S. et Patel, B.N. (2000). Ceruloplasmin: Structure and function of an essential ferroxidase. Dans Sudarshan, K. M. (éd.), *Advances in Structural Biology* (Vol. 6, p. 211-237) : JAI.
- De Rouvroit, C.L., de Bergeyck, V., Cortvrindt, C., Bar, I., Eeckhout, Y. et Goffinet, A.M. (1999). Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase. *Exp Neurol*, 156(1), 214-217.
- di Masi, A., Leboffe, L., De Marinis, E., Pagano, F., Cicconi, L., Rochette-Egly, C., Lo-Coco, F., Ascenzi, P. et Nervi, C. (2015). Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med*, 41, 1-115.
- Doehner, J. et Knuesel, I. (2010). Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging. *Aging Dis*, 1(1), 12-29.
- Ducharme, P. (2013). *Rôle potentiel de la céruloplasmine dans le développement du cerveau*. Thèse de Doctorat. Université du Québec à Montréal, Montréal.
- Ducharme, P., Maltais, D., Desroches, D., Mateescu, M.A. et Paquin, J. (2010). Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage. *Neuroscience*, 167(3), 633-643.
- Egger, L., Schneider, J., Rheme, C., Tapernoux, M., Hacki, J. et Borner, C. (2003). Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell Death Differ*, 10(10), 1188-1203.
- El Meskini, R., Crabtree, K.L., Cline, L.B., Mains, R.E., Eipper, B.A. et Ronnett, G.V. (2007). ATP7A (Menkes protein) functions in axonal targeting and synaptogenesis. *Mol Cell Neurosci*, 34(3), 409-421.
- Fatemi, S.H. (2005). Reelin glycoprotein: structure, biology and roles in health and disease. *Mol Psychiatry*, 10(3), 251-257.
- Fatemi, S.H., Reutiman, T.J. et Folsom, T.D. (2009). Chronic psychotropic drug treatment causes differential expression of Reelin signaling system in frontal cortex of rats. *Schizophr Res*, 111(1-3), 138-152.
- Fatemi, S.H., Snow, A.V., Stary, J.M., Araghi-Niknam, M., Reutiman, T.J., Lee, S., Brooks, A.I. et Pearce, D.A. (2005). Reelin signaling is impaired in autism. *Biol Psychiatry*, 57(7), 777-787.
- Felsenberg, J., Dyck, Y., Kloss, A., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M. et Eisenhardt, D. (2014). Two inhibitors of the ubiquitin proteasome system enhance long-term

- memory formation upon olfactory conditioning in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Exp Biol*, 217(19), 3441-3446.
- Folsom, T.D. et Fatemi, S.H. (2013). The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*, 68, 122-135.
- Frotscher, M. (1998). Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol*, 8(5), 570-575.
- Gybina, A.A., Tkac, I. et Prohaska, J.R. (2009). Copper deficiency alters the neurochemical profile of developing rat brain. *Nutr Neurosci*, 12(3), 114-122.
- Harris, Z.L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R.T. et Gitlin, J.D. (1995). Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7), 2539-2543.
- Harrison, P.J. (1994). Regulation of Gene Expression and Brain Function. 39.
- Hatada, I., Morita, S., Kimura, M., Horii, T., Yamashita, R. et Nakai, K. (2008). Genome-wide demethylation during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *J Hum Genet*, 53(2), 185-191.
- Hayashita-Kinoh, H., Kinoh, H., Okada, A., Komori, K., Itoh, Y., Chiba, T., Kajita, M., Yana, I. et Seiki, M. (2001). Membrane-type 5 matrix metalloproteinase is expressed in differentiated neurons and regulates axonal growth. *Cell Growth Differ*, 12(11), 573-580.
- Herz, J. et Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 7(11), 850-859.
- Hisanaga, A., Morishita, S., Suzuki, K., Sasaki, K., Koie, M., Kohno, T. et Hattori, M. (2012). A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner. *FEBS Lett*, 586(19), 3349-3353.
- Hornig, T., Sturm, L., Fiebich, B. et Tebartz van Elst, L. (2015). Increased Blood-Reelin-Levels in First Episode Schizophrenia. *PLoS One*, 10(8), e0134671.
- Howell, B.W., Gertler, F.B. et Cooper, J.A. (1997). Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *Embo j*, 16(1), 121-132.
- 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.
- Jossin, Y., Gui, L. et Goffinet, A.M. (2007). Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons. *J Neurosci*, 27(16), 4243-4252.
- Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C. et Goffinet, A.M. (2004). The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development. *J Neurosci*, 24(2), 514-521.

- Kim, J.D., Toda, C., D'Agostino, G., Zeiss, C.J., DiLeone, R.J., Elsworth, J.D., Kibbey, R.G., Chan, O., Harvey, B.K., Richie, C.T., Savolainen, M., Myohanen, T., Jeong, J.K. et Diano, S. (2014). Hypothalamic prolyl endopeptidase (PREP) regulates pancreatic insulin and glucagon secretion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(32), 11876-11881.
- Knuesel, I. (2010). Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol*, 91(4), 257-274.
- Kohno, S., Kohno, T., Nakano, Y., Suzuki, K., Ishii, M., Tagami, H., Baba, A. et Hattori, M. (2009). Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin. *Biochem Biophys Res Commun*, 380(1), 93-97.
- Kohno, T. et Hattori, M. (2010). Re-evaluation of protease activity of reelin. *Biol Pharm Bull*, 33(6), 1047-1049.
- Kohno, T., Honda, T., Kubo, K., Nakano, Y., Tsuchiya, A., Murakami, T., Banno, H., Nakajima, K. et Hattori, M. (2015). Importance of Reelin C-terminal region in the development and maintenance of the postnatal cerebral cortex and its regulation by specific proteolysis. *J Neurosci*, 35(11), 4776-4787.
- Kohno, T., Nakano, Y., Kitoh, N., Yagi, H., Kato, K., Baba, A. et Hattori, M. (2009). C-terminal region-dependent change of antibody-binding to the Eighth Reelin repeat reflects the signaling activity of Reelin. *J Neurosci Res*, 87(14), 3043-3053.
- Koie, M., Okumura, K., Hisanaga, A., Kamei, T., Sasaki, K., Deng, M., Baba, A., Kohno, T. et Hattori, M. (2014). Cleavage within Reelin repeat 3 regulates the duration and range of the signaling activity of Reelin protein. *J Biol Chem*, 289(18), 12922-12930.
- Konigsbrugge, O., Quehenberger, P., Belik, S., Weigel, G., Seger, C., Griesmacher, A., Pabinger, I. et Ay, C. (2015). Anti-coagulation assessment with prothrombin time and anti-Xa assays in real-world patients on treatment with rivaroxaban. *Ann Hematol*, 94(9), 1463-1471.
- 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.
- Krueger, D.D., Howell, J.L., Hebert, B.F., Olausson, P., Taylor, J.R. et Nairn, A.C. (2006). Assessment of cognitive function in the heterozygous reeler mouse. *Psychopharmacology*, 189(1), 95-104.
- Kubo, K., Honda, T., Tomita, K., Sekine, K., Ishii, K., Uto, A., Kobayashi, K., Tabata, H. et Nakajima, K. (2010). Ectopic Reelin induces neuronal aggregation with a normal birthdate-dependent "inside-out" alignment in the developing neocortex. *J Neurosci*, 30(33), 10953-10966.
- Kwan, K.Y., Šestan, N. et Anton, E.S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*, 139(9), 1535-1546.

- Kwon, K.J., Kim, M.K., Lee, E.J., Kim, J.N., Choi, B.R., Kim, S.Y., Cho, K.S., Han, J.S., Kim, H.Y., Shin, C.Y. et Han, S.H. (2014). Effects of donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor, on neurogenesis in a rat model of vascular dementia. *J Neurol Sci*, 347(1-2), 66-77.
- 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.
- Lindley, P.F., Card, G., Zaitseva, I., Zaitsev, V., Reinhammar, B., Selin-Lindgren, E. et Yoshida, K. (1997). An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2(4), 454-463.
- 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.
- 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.
- Mancini, F., Naldi, M., Cavrini, V. et Andrisano, V. (2007). Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Anal Bioanal Chem*, 388(5-6), 1175-1183.
- Mateescu, M.A., Wang, W.T., Befani, O., Dumoulin, M.J. et Mondov, B. (1999). Simultaneous chromatographic separation of ceruloplasmin and serum amine oxidase. Dans Aboul-Enein, H. Y. (éd.), *Analytical and Preparative Separation Methods of Biomacromolecules* (p. 431-444). New York : Taylor & Francis.
- McBurney, M.W. (1993). P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol*, 37(1), 135-140.
- McBurney, M.W., Reuhl, K.R., Ally, A.I., Nasipuri, S., Bell, J.C. et Craig, J. (1988). Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J Neurosci*, 8(3), 1063-1073.
- 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.
- Patel, B.N., 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.
- Petrov, K. (2015). Macrocyclic derivatives of 6-methyluracil: New ligands of the peripheral anionic site of acetylcholinesterase. *Int J Risk Saf Med*, 27 Suppl 1, S72-73.

- Pittman, D.D., Marquette, K.A. et Kaufman, R.J. (1994). Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function. *Blood*, 84(12), 4214-4225.
- 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.
- Powers, J.C., Asgian, J.L., Ekici, O.D. et James, K.E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem Rev*, 102(12), 4639-4750.
- Purves, D. et Coquery, J.-M. (2008). *Neurosciences*. Bruxelles : De Boeck.
- Qian, Z.M. et Ke, Y. (2001). Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain Research Reviews*, 35(3), 287-294.
- Quattrocchi, C.C., Wannenes, F., Persico, A.M., Ciafre, S.A., D'Arcangelo, G., Farace, M.G. et Keller, F. (2002). Reelin is a serine protease of the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 277(1), 303-309.
- Rakic, P. (2003). Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex*, 13(6), 541-549.
- Rogers, J.T., Zhao, L., Trotter, J.H., Rusiana, I., Peters, M.M., Li, Q., Donaldson, E., Banko, J.L., Keenoy, K.E., Rebeck, G.W., Hoe, H.S., D'Arcangelo, G. et Weeber, E.J. (2013). Reelin supplementation recovers sensorimotor gating, synaptic plasticity and associative learning deficits in the heterozygous reeler mouse. *J Psychopharmacol*, 27(4), 386-395.
- Rubenstein, J. et Rakic, P. (2013). *Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections: Comprehensive Developmental Neuroscience*. (Vol. 2) : Elsevier Science.
- Rudnicki, M.A. et McBurney, M.W. (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. Dans Robertson, E. J. (éd.), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* (p. 19-49). Oxford : IRL Press Limited.
- Salmi, H. (2015). *Effets de modulateurs de kinases et de protéases à sérine sur les actions neurotrophiques de la céruloplasmine*. Mémoire de Maitrise. Université du Québec à Montréal., Montréal.
- Samygina, V.R., Sokolov, A.V., Bourenkov, G., Petoukhov, M.V., Pulina, M.O., Zakharova, E.T., Vasilyev, V.B., Bartunik, H. et Svergun, D.I. (2013). Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins. *PLoS One*, 8(7), e67145.
- Sarkar, B. (1999). Treatment of Wilson and menkes diseases. *Chem Rev*, 99(9), 2535-2544.
- Sato, Y., Kobayashi, D., Kohno, T., Kidani, Y., Prox, J., Becker-Pauly, C. et Hattori, M. (2015). Determination of cleavage site of Reelin between its sixth and seventh repeat and contribution of meprin metalloproteases to the cleavage. *J Biochem*

- Sekine, K., Kubo, K. et Nakajima, K. (2014). How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? *Neurosci Res*, 86, 50-58.
- Sharaf, A., Rahhal, B., Spittau, B. et Roussa, E. (2015). Localization of reelin signaling pathway components in murine midbrain and striatum. *Cell Tissue Res*, 359(2), 393-407.
- Slack, J.M.W. (2004). *Biologie du développement*. Bruxelles : De Boeck.
- Stachel, S.J., Coburn, C.A., Steele, T.G., Jones, K.G., Loutzenhiser, E.F., Grego, A.R., Rajapakse, H.A., Lai, M.T., Crouthamel, M.C., Xu, M., Tugusheva, K., Lineberger, J.E., Pietrak, B.L., Espeseth, A.S., Shi, X.P., Chen-Dodson, E., Holloway, M.K., Munshi, S., Simon, A.J., Kuo, L. et Vacca, J.P. (2004). Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem*, 47(26), 6447-6450.
- Staines, W.A., Craig, J., Reuhl, K. et McBurney, M.W. (1996). Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. *Neuroscience*, 71(3), 845-853.
- Sun, Y., Wang, Y., Zhang, J., Tao, J., Wang, C., Jing, N., Wu, C., Deng, K. et Qiao, S. (2007). ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Neurochem Res*, 32(7), 1217-1223.
- 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.
- Tissir, F. et Goffinet, A.M. (2003). Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci*, 4(6), 496-505.
- Trotter, J.H., Lussier, A.L., Psilos, K.E., Mahoney, H.L., Sponaugle, A.E., Hoe, H.S., Rebeck, G.W. et Weeber, E.J. (2014). Extracellular proteolysis of reelin by tissue plasminogen activator following synaptic potentiation. *Neuroscience*, 274, 299-307.
- Tsirka, S.E. (2002). Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem Soc Trans*, 30(2), 222-225.
- Ulrich, H. et Majumder, P. (2006). Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications. *Cell Prolif*, 39(4), 281-300.
- Vachette, P., Dainese, E., Vasylijev, 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.
- Vassiliev, V., Harris, Z.L. et Zatta, P. (2005). Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 49(3), 633-640.
- Wang, X.T., 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.
- Wolpert, L. et Beddington, R. (2004). *Biologie du développement : les grands principes*. Paris : Dunod.

- Yu, N.N., Tan, M.S., Yu, J.T., Xie, A.M. et Tan, L. (2015). The Role of Reelin Signaling in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, 1-9.
- 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 Å: nature of the copper centres. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1(1), 15-23.
- Zhao, S. et Frotscher, M. (2010). Go or stop? Divergent roles of Reelin in radial neuronal migration. *Neuroscientist*, 16(4), 421-434.
- Zhu, X. et Lindberg, I. (1995). 7B2 facilitates the maturation of proPC2 in neuroendocrine cells and is required for the expression of enzymatic activity. *J Cell Biol*, 129(6), 1641-1650.