

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE MODULATEURS DE KINASES ET DE PROTÉASES À SÉRINE SUR LES ACTIONS
NEUROTROPHIQUES DE LA CÉRULOPLASMINE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

HOUDA SALMI

MARS 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

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

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dre Joanne Paquin, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de faire ma maîtrise en biochimie. Je vous remercie pour votre soutien, votre écoute et votre patience durant mes années de maîtrise, je vous remercie du temps que vous avez investi pour moi, de m'avoir encouragée continuellement et pour votre gentillesse. Je tiens à vous remercier beaucoup pour votre encadrement pendant la rédaction de ce mémoire et aussi pour tous les conseils.

Merci à mes collègues de laboratoire Philippe Ducharme et Frédéric Bouchard de m'avoir formée, conseillée et écoutée, aussi pour l'agréable ambiance qu'ils ont su garder dans le laboratoire. Aussi, je remercie mes stagiaires Anthony François et Lyvia Fourcade.

Je remercie Amira Ouanouki et Dahmane Ouazia de l'équipe du Dr Richard Desrosiers pour les matériels prêtés ainsi pour leurs conseils. Je remercie aussi Julie Poirier pour ses conseils, et les gens de l'équipe de Dr Mircea-Alexandru Mateescu pour les conseils.

Je remercie Dr Ajoy Basak (Institut de recherche de l'hôpital d'Ottawa, Ottawa, Ontario) de nous avoir fourni le peptide 7B2, et le Dr Mircea-Alexandru Mateescu de nous avoir fourni la Sérine₂cuivre.

Je désire aussi remercier mes chers parents de m'avoir toujours encouragée à poursuivre mes études, un merci spécial à mon cher mari Mohamed qui m'a soutenue tout au long de la maîtrise. Je veux aussi remercier mes deux enfants Tarek et Rania pour leur patience et pour avoir apporté de la joie dans la maison.

En terminant, je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) du Canada pour le subventionnement du projet. Merci également à la Fondation de l'UQAM

ainsi qu'à la Faculté des Sciences de l'UQAM pour l'attribution de bourses qui m'ont aidée financièrement.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
RÉSUMÉ.....	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1. Avant propos	2
1.2. Caractéristiques structurales de la CP	2
1.3. Biosynthèse et expression de la CP	5
1.4. Rôles de la CP.....	6
1.4.1. Ferroxidase et régulateur du métabolisme du fer	6
1.4.2. Autres activités oxydasiques	9
1.4.3. Transport du cuivre	10
1.4.4. Protéine de phase aiguë de l'inflammation	11
1.4.5. Propriétés anti-oxydantes	11
1.4.6. Développement du système nerveux.....	12
1.5. Les protéines homologues de la CP	12
1.6. Développement du cerveau et migration neuronale	14
1.6.1. Migration neuronale et reeline	14
1.6.2. La reeline	17
1.6.3. Les protéases à sérine dans le développement du cerveau.....	22
1.6.4. Quelques voies de signalisation impliquées dans le développement et la migration des neurones	23
1.7. Le modèle de carcinome embryonnaire murin P19	24
1.7.1. Origine et caractéristiques générales.....	24

1.7.2. Différenciation neuronale	25
1.7.3. Action trophique de la CP sur les neurones P19	27
1.8. Hypothèse et objectifs de recherche.....	29
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	30
2.1. Purification de la CP.....	31
2.2. Culture cellulaire.....	32
2.2.1. Propagation des cellules P19 indifférenciées.....	32
2.2.2. Différenciation neuronale des cellules P19.....	33
2.2.3. Traitement des neurones P19 avec la CP et autres substances.....	35
2.3. Analyse morphologique des cultures cellulaires et mesure de l'agrégation neuronale	37
2.4. Collecte des milieux de culture et préparation des extraits de protéines cellulaires ..	37
2.5. Dosage de protéines.....	38
2.6. SDS-PAGE	38
2.7. Coloration au bleu de coomassie	39
2.8. Électrotransfert et Immunobuvardage.....	39
2.9. Étude préliminaire: Chromatographie d'affinité sur SBTI-agarose	41
CHAPITRE III	
RÉSULTATS	42
3.1. L'action neuroagrégative de la CP est inhibée par l'activation de la voie AMPc/PKA..	43
3.2. Un prétraitement des neurones avec des inhibiteurs de la signalisation d'ERK1/2 diminue la génération de la reeline 300K stimulée par la CP.....	46
3.3. Effet d'ajouts plus tardifs d'inhibiteurs de la signalisation d'ERK1/2 sur les actions neurotrophiques de la CP	48
3.4. Évaluation de l'effet d'autres modulateurs pharmacologiques de signalisation cellulaire sur les actions neurotrophiques de la CP.....	53
3.5. L'action neuroagrégative des inhibiteurs pharmacologiques H89 et Ly294002, celle du composé Ser ₂ cu et celle de la CP répondent aux mêmes inhibiteurs de protéases	57
3.6. Effets d'inhibiteurs de protéases à serine spécifiques sur la génération de la reeline 300K stimulée par la CP	61
3.7. Étude plus poussée des effets du SBTI et de l'Apro sur les actions neurotrophiques de la CP	63

3.8. Étude préliminaire de chromatographie de milieux de culture sur billes de SBTI-agarose	67
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	70
4.1. Mécanismes pouvant être impliqués dans les actions neuronales de la CP	72
4.1.1. Kinases et neuroagrégation.....	72
4.1.2. Kinases et génération de la reeline 300K	75
4.1.3. Cuivre et neuroagrégation	75
4.2. Protéases à serine.....	76
4.2.1. Protéases à sérine et neuroagrégation	76
4.2.2. Protéases à sérine et génération de la reeline 300K.....	78
4.3. Conclusion	81
4.4. Perspectives.....	82
ANNEXES	83
ANNEXE 1	
Le contact des neurones avec la CP pour une courte période est suffisant pour induire leur agrégation	84
ANNEXE 2	
La Ser ₂ Cu induit l'agrégation des neurones P19 et cette action est inhibable par le SBTI/Apro. Comparaison de la Ser ₂ Cu et de l'His ₂ Cu sur l'agrégation des neurones P19.....	85
ANNEXE 3	
Tests supplémentaires d'inhibiteurs pharmacologiques sur la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K.....	87
ANNEXE 4	
L'Aprotinine augmente la phosphorylation d'ERK1/2 dans les premières 20 min.....	89
RÉFÉRENCES.....	90

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Représentation schématique de la structure de la CP.....	3
1.2 Comparaison des séquences C-terminales de la CP sécrétée et la CP-GPI.....	4
1.3 Régulation du trafic du fer par la CP.....	8
1.4 Oxydation des ions de fer et de cuivre par la CP.....	9
1.5 Comparaison structurale de la CP, du facteur V et du facteur VIII.....	13
1.6 Des exemples d'anomalies dans le développement du cortex.....	16
1.7 Structure de la reeline.....	18
1.8 Signalisation de la reeline.....	22
1.9 Les cellules souches P19.....	27
1.10 Relations possibles entre la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K induites par la CP.....	28
2.1 Génération et traitement des néo-neurones P19.....	34
3.1 L'action neuroagrégative de la CP est inhibée par l'activation de la voie AMPc/PKA.....	45
3.2 Un prétraitement des neurones avec des inhibiteurs d'ERK1/2 diminue la génération de la reeline 300K par la CP.....	47
3.3 Effet d'ajouts plus tardifs d'inhibiteurs d'ERK1/2 sur les actions neurotrophiques de la CP.....	50
3.4 Résumé des effets de l'AMPc et d'inhibiteurs de la voie ERK1/2 sur les actions neurotrophiques de la CP.....	52
3.5 Évaluation de l'effet d'autres modulateurs de signalisation sur les actions neurotrophiques de la CP.....	55
3.6 L'action neuroagrégative des inhibiteurs pharmacologiques H89 et Ly294002, du composé Ser ₂ Cu et de la CP répondent pareillement à une sélection d'inhibiteurs de protéases à sérine.....	59

3.7 Effet d'une sélection d'inhibiteurs de protéases à sérine sur la génération de la reeline 300K en réponse a la CP.	62
3.8 Les inhibiteurs SBTI et Apro inhibent les deux actions neurotrophiques de la CP.....	64
3.9 Effet du temps d'ajout du SBTI et de l'Apro sur les actions neurotrophiques de la CP..	66
3.10 Analyse, par SDS-PAGE, des échantillons obtenus par chromatographie d'affinité sur SBTI-agarose.....	69
4.1 Résumé des effets de modulateurs de kinases et de protéases à sérine sur les actions neurotrophiques de la CP.	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Informations sur les substances autres que la CP utilisées pour traiter les neurones P19	35
2.2 Conditions d'électrophorèse et d'électrotransfert	38
2.3 Anticorps primaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage.	40
2.4 Anticorps secondaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage.....	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aa	acide aminé
ADAMTS	désintégrine/ métalloprotéinase avec motif thrombospondine (<i>α disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>)
ADN	acide désoxyribonucléique
AKT	sérine/thréonine –kinase
AMPC	adénosine-3',5'-monophosphate cyclique (<i>cAMP : cyclic adenosine monophosphate</i>)
ApoER2	récepteur de l'apolipoprotéine E de type 2 (<i>apolipoprotein E receptor 2</i>)
Apro	aprotinine (<i>aprotinin</i>)
ARN	acide ribonucléique
ATP7A	protéine transporteuse de cuivre 7A appartenant à la famille des ATPases
ATP7B	protéine transporteuse de cuivre 7B appartenant à la famille des ATPases
ATPase	adénosine triphosphatase
BDNF	facteur neurotrophique dérivé du cerveau (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
CP	céruloplasmine
C-t	terminaison-C
Cu ⁺	ion cuivreux
Cu ²⁺	ion cuivrique
Dab-1	protéine adaptatrice Disabled-1
db-cAMP	Dibutyryl –AMPC
DMSO	diméthylsulfoxyde
ECM	matrice extracellulaire
EGF	facteur de croissance épidermal (<i>epidermal growth factor</i>)
EPAC	protéine d'échange directement activée par l'AMPC (<i>exchange protein directly activated by cAMP</i>)
ERK	kinases régulées par des signaux extracellulaires (<i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
ERO	espèces réactives oxygénées
FBS	sérum foetal bovin (<i>fetal bovine serum</i>)
Fe ²⁺ , Fe (II)	ion ferreux
Fe ³⁺ , Fe (III)	ion ferrique
GATA-4	facteurs de transcription-4 reconnaissant le motif GATA
GPI	glycosylphosphatidylinositol
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
His ₂ Cu	histidine-2-cuivre
HSF1	facteur-1 de stimulation hépatique

IL-1	interleukine-1
j	jour
KPi	tampon phosphate de potassium
LIMK	LIM -kinase (<i>LIM kinase</i>)
Lis1	protéine lissencéphalie-1
MAP-2	protéine associée aux microtubules-2 (<i>microtubule associated protein-2</i>)
MEM	médium essentiel d'Eagle modifié (<i>modified Eagle Essential Medium</i>)
MeOH	Methanol
MMP	métalloprotéinases de la matrice
NBS	milieu neurobasal supplémenté
NKx-2,5	facteur de transcription NKx- 2,5 (<i>NK2 transcription factor related 5</i>)
NMDA	N -méthyl -D-aspartate
NO	oxyde nitrique
NPXY	Asp-Pro-X-Tyr où X peut être n'importe lequel résidu d'acide aminé
N-t	terminaison-N
Nudel	protéine impliquée dans la dynamique des microtubules (<i>nuclear distribution protein nudE-like</i>)
O ₂ ⁻	radical superoxyde
·OH	radical hydroxyle
PAI	inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène
PBS	tampon phosphate salin (<i>phosphate buffered saline</i>)
PC	plaque corticale
PC2	proprotéine-convertase 2
p-cofiline	phospho-cofiline (<i>phospho-cofilin</i>)
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PKA	protéine kinase A (<i>protein kinase A</i>)
PKB	protéine kinase B
PKG	protéine kinase G (<i>protein kinase G</i>)
PVDF	polyvinylidène difluoré
RE	réticulum endoplasmique
ReLN	gène codant pour la reeline
ROCK	protéine kinase associée à Rho (<i>Rho-associated protein kinase</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	sérine
Ser ₂ Cu	sérine ₂ cuivre
SN	système nerveux
SNC	système nerveux central (<i>CNS : central nervous system</i>)

SOD	superoxyde dismutase
Tau	protéine stabilisatrice des microtubules (<i>tubule-associated unit</i>)
TBS	tampon Tris salin
Tf	transferrine
Thr	thréonine
TNF- α	facteur de nécrose tumoral-alpha (<i>tumor necrosis factor alpha</i>)
tPA	activateur tissulaire du plasminogène (<i>tissue-type plasminogen activator</i>)
Tyr ou Y	tyrosine
UTR	région non traduite (<i>untranslated region</i>)
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>)
ZL	zone laminaire
ZM	zone marginale
ZV	zone ventriculaire
ϵ -ACA	acide ϵ - aminocaproïque

RÉSUMÉ

La céruloplasmine (CP) est une protéine à cuivre qui régule le métabolisme du fer. Elle pourrait aussi avoir un rôle dans le développement du cerveau. En effet, *ex vivo*, la CP induit l'agrégation de neurones P19 et influence l'expression de la reeline, une protéine essentielle au bon positionnement des neurones. Spécifiquement, la CP stimule le clivage de la reeline en son fragment de 300K. L'inhibiteur de trypsine de la fève de soya (SBTI) et l'aprotinine (Apro), deux inhibiteurs extracellulaires de protéases à sérine, inhibent les deux actions neuronales de la CP. Plusieurs molécules de signalisation cellulaire ont été identifiées comme éléments importants dans le développement du cerveau incluant les kinases PKA, PI3K, ERK1/2 et ROCK. Le but du présent travail consistait à déterminer dans quelle mesure les deux actions neuronales de la CP sont indépendantes ou inter reliées ainsi qu'à identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans ces actions. Nous avons analysé l'effet d'agents pharmacologiques reliés aux kinases mentionnées et l'effet d'inhibiteurs de protéases sur l'agrégation des neurones P19 et sur l'expression de la reeline en immunobuvardage. En absence et en présence de la CP, les agents pharmacologiques et les inhibiteurs de protéases ont été ajoutés au milieu de culture à différents temps du traitement avec la CP. Les résultats ont montré que la neuroagrégation, mais pas la génération de la reeline 300K, peut être inhibée par l'activation de la voie AMPc/PKA. Au contraire, la formation de la reeline 300K mais non la neuroagrégation est inhibée par des inhibiteurs de la voie ERK1/2. Les inhibiteurs de protéases SBTI et Apro sont capables d'inhiber les deux actions de la CP qu'ils soient utilisés de façon individuelle ou combinée. De plus, le SBTI et l'Apro inhibent la neuroagrégation seulement lorsqu'ils sont ajoutés dans la première heure de traitement avec la CP mais ils peuvent inhiber la génération de la reeline 300K même s'ils sont ajoutés aussi tard que 8h. Le Rivaroxaban qui inhibe le facteur X de la coagulation sanguine, inhibe les deux actions de la CP, alors que le peptide 7B2 qui inhibe la proprotéine-convertase PC2 et l'acide ϵ -amino caproïque qui inhibe l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) n'inhibent aucune des actions de la CP. D'autre part, le H89 et le Ly294002 qui inhibent respectivement la PKA et la PI3K, et la Ser₂Cu sont capables d'induire l'agrégation des neurones P19 et cette action répond de la même façon que l'action neuroagrégative de la CP aux inhibiteurs de protéases à sérine mentionnés plus haut. En conclusion, l'agrégation des neurones P19 et la production de la reeline 300K stimulées par la CP se produisent indépendamment l'une de l'autre car elles sont modulées distinctement par les voies AMPc/PKA et ERK1/2. Les protéines PC2 et tPA qui ont des rôles dans le développement du cerveau ne seraient pas impliquées dans les actions neuronales de la CP. Par contre, une protéase qui aurait des propriétés similaires à celle du facteur X, pourrait être impliquée dans les actions neuronales de la CP ainsi que dans l'action neuroagrégative du H89, du Ly294002 et de la Ser₂Cu. Les résultats obtenus permettent

d'avoir une première idée des mécanismes d'une action potentielle de la CP dans le développement du cerveau.

Mots clés : Différenciation neuronale, agrégation neuronale, reeline, protéases à sérine, ferroxidase

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Avant propos

La céruloplasmine (CP), ce qui signifie « sky-blue plasma protein », est une protéine extracellulaire qui est synthétisée par le foie pour être sécrétée dans le plasma (Holmberg et Laurell, 1948). Elle est aussi exprimée au niveau des cellules gliales dans le cerveau. La CP est une protéine multifonctionnelle. Son rôle le mieux établi est celui d'important régulateur du métabolisme du fer (Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Les équipes de recherche des Drs J. Paquin et M. A. Matescu ont montré que, *ex vivo*, la CP induit l'agrégation de neurones nouvellement différenciés à partir des cellules-souches P19 et stimule l'expression de la reeline. Comme la reeline est une protéine extracellulaire essentielle pour le bon positionnement des neurones pendant le développement du cerveau, ces résultats suggèrent un rôle potentiel de la CP dans l'organisation spatiale des neurones pendant ce processus. Peu est connu des mécanismes responsables des deux actions neurotrophiques de la CP (neuroagrégation et génération de la reeline 300K), sauf qu'elles impliqueraient une ou des protéases à sérine extracellulaires.

L'introduction de ce mémoire présente la structure, la synthèse et les rôles de la CP. Comme le but du travail a été d'identifier les mécanismes des actions neurotrophiques de la CP, nous abordons aussi la migration neuronale, la reeline, sa structure, sa signalisation, son clivage et ses fonctions, et présentons aussi quelques protéases à sérine et voies kinasiques impliquées dans le développement du cerveau. Nous terminons en présentant le modèle cellulaire P19 utilisé dans nos travaux.

1.2. Caractéristiques structurales de la CP

La CP (EC 1.16.3.1) est une glycoprotéine du groupe des α_2 -globulines qui a une taille moléculaire de 132K et qui fait partie de la famille des métalloprotéines cuivriques (Kono, 2012). La CP est formée d'une chaîne unique de 1046 acides aminés (aa) formant six domaines structuraux (Fig 1.1). Chaque paire séquentielle de ces domaines constitue une

grande unité d'environ 340 résidus d'aa, le domaine A (Fig 1.1). Les domaines A1 (D1+D2), A2 (D3+D4) et A3 (D5+D6) sont homologues entre eux.

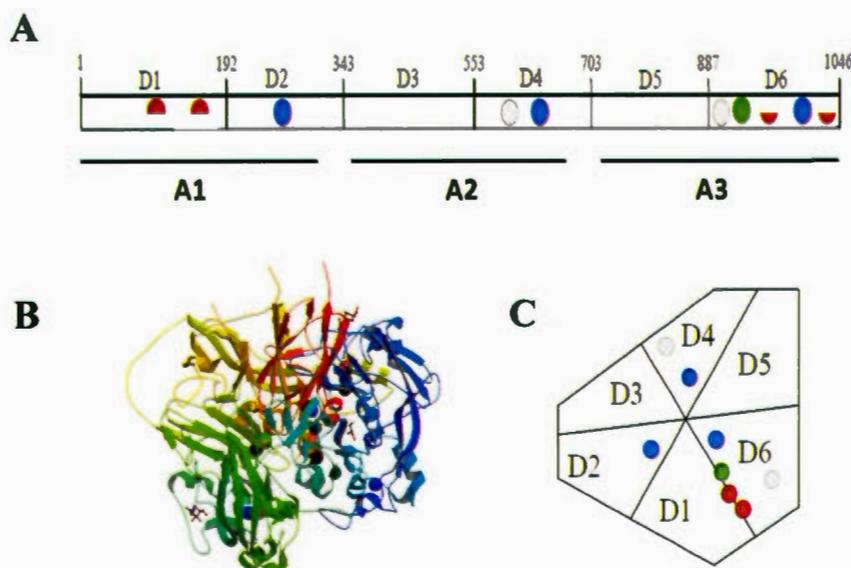


Figure 1.1 Représentation schématique de la structure de la CP. A Relation linéaire des six domaines de la CP (D1-D6) et de leur partage en domaine A (A1-A3). La localisation des atomes de cuivre (type I(bleu), type 2 (vert), type III (rouge) et labile (gris)) est représentée par des cercles. **B** Diffractométrie de rayon X montrant les six domaines de la CP représentés par six couleurs différentes, rouge (D1), bleu (D2), vert (D3), bleu pâle (D4), jaune (D5) et vert pâle (D6). **C** Relation spatiale de la CP montrant le cœur trinuéculaire catalytique de la CP qui est situé à la jonction des domaines D1 et D6. Figure inspirée de Takahashi *et al.*, 1984 et Zaitseva *et al.*, 1996.

(<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2j5w>)

Une étude cristallographique de la structure spatiale de la CP, à une résolution de 3,1 Å, a révélé qu'elle a six atomes de cuivre (fig 1.1). Trois d'entre eux sont répartis dans les domaines pairs de la protéine et confèrent la couleur bleue à la protéine (cercles bleus). Les trois autres atomes de cuivres, à l'interface des domaines 1 et 6, sont importants pour son activité catalytique et forment « le groupe trinuéculaire ». Il y a trois types d'atomes de cuivre

spécifiques. Les atomes de type I sont caractérisés par une forte absorption dans la région visible de la lumière avec un maximum d'absorption à 610 nm et sont responsables de la couleur bleue. Ils sont coordonnés à un résidu de cystéine, un de méthionine et deux d'histidine. Les atomes de type II n'ont pas d'absorption spécifique, et les atomes de type III ont un maximum d'absorption à 330 nm (Kono, 2012; Vachette *et al.*, 2002). La CP possède, en plus de ces six atomes de cuivre "permanents", deux atomes labiles situés au niveau des domaines 4 et 6 qui ne participent pas à son activité oxydasique (Lindley *et al.*, 1997). Il a été démontré qu'une perte des ions de cuivre de type III entraîne une perte irréversible de l'activité catalytique et de la conformation tridimensionnelle de la CP. Une perte des ions de type I n'entraîne pas d'effets structuraux importants dans la CP (Vachette *et al.*, 2002).

La CP existe au niveau du cerveau sous une forme qui lie le glycosylphosphatidylinositol (GPI) par l'épissage alternatif des exons 19 et 20. Cet épissage alternatif résulte en la substitution des cinq aa C-terminaux de la CP par une séquence de 30 acides aminés hydrophobes contenant le site de liaison du groupement GPI (fig 1.2)(Patel *et al.*, 2000). Comme la CP, La CP-GPI régule le transport du fer au niveau du cerveau (Harris *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2002).

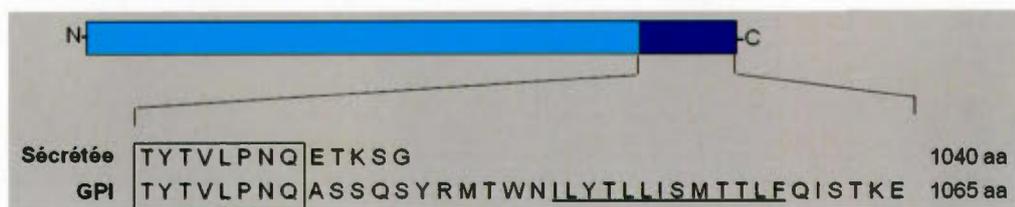


Figure 1.2 Comparaison des séquences C-terminales de la CP sécrétée et la CP-GPI. La figure montre la composition en aa de la partie C-t de la CP sécrétée et de la CP-GPI. Les acides aminés communs sont encadrés. Les 25 acides aminés situés à l'extrémité C-t de la CP permettent sa conjugaison au groupement GPI. Les acides aminés soulignés constituent la séquence reconnue par la machinerie enzymatique de cette conjugaison. Figure inspirée de Patel *et al.* (2000).

1.3. Biosynthèse et expression de la CP

Le gène codant pour la CP est localisé sur le chromosome 3 en 3q23-q24. Il fait 65 kpb (kilo paires de bases) et est composé de 20 exons. Il a deux transcrits de 3,7 et 4,2kpb qui génèrent la chaîne polypeptidique de 1046 acides aminés (Vassiliev *et al.*, 2005; Syed *et al.*, 2002; Trocello *et al.*, 2010)

La CP circulante est initialement synthétisée par les hépatocytes au niveau du réticulum endoplasmique (RE) comme une protéine sans atomes de cuivre. La CP passe par la suite vers le complexe de Golgi où les six atomes de cuivre sont incorporés à l'apoprotéine, ce qui entraîne le changement vers la forme holo-CP. Cette dernière a une demi-vie de plus de 5 jours dans le plasma. Un défaut d'incorporation des atomes de cuivre dans la CP résulte en la sécrétion d'une forme dépourvue d'activité feroxydasique et rapidement dégradée dans le plasma (Healy et Tipton, 2007).

Bien que le foie soit la source prédominante de la CP sérique, l'expression extra-hépatique de la CP a été démontrée dans plusieurs tissus y compris le système nerveux central (Kono, 2012). Dans le cerveau, la CP est exprimée par les astrocytes qui tapissent les microvaisseaux du cerveau. Des études ont montré que la CP-GPI est localisée entre autres sur les cellules leptoméningées, les cellules gliales de Muller dans la rétine, les cellules de Sertoli dans les testicules, les cellules de Schwann et les cellules des nerfs périphériques (Kono, 2012). Le rôle précis de la CP-GPI demeure incomplètement connu, mais cette protéine joue probablement un rôle important dans la mobilisation du fer et des effets antioxydants dans le système nerveux central (SNC) (Kono, 2012).

La disponibilité du cuivre dans les hépatocytes n'a pas d'effet direct sur le taux de CP synthétisé ou sécrété (Kono, 2012; Vachette *et al.*, 2002). Juste avant sa sécrétion dans la circulation systémique, la CP subit des modifications post-traductionnelles (ex : glycosylation) ce qui explique la variation de la taille moléculaire de la CP (Healy et Tipton, 2007).

Plusieurs facteurs agissent sur la synthèse de la CP. Il y a des conditions physiologiques telles que le développement, la grossesse, l'infarctus du myocarde, une déficience en fer (Mukhopadhyay *et al.*, 1997), une hépatopathie chronique, l'hyperthyroïdisme, certains types de cancer, la réponse inflammatoire dans sa phase aiguë et l'exercice, qui augmentent les concentrations de la CP sérique (Cousins, 1985; Healy et Tipton, 2007; Trocetto *et al.*, 2010). Des facteurs moléculaires comme l'adrénaline, les œstrogènes (Evans, 1973; Ganaraja *et al.*, 2004), l'interleukine-1 (IL-1), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et le facteur-1 de stimulation hépatique (HSF1) qui peuvent agir en augmentant la biosynthèse et la sécrétion de la CP (Mackiewicz *et al.*, 1987). Inversement, le niveau de la CP peut être diminué lors d'un syndrome néphrotique ou d'une malnutrition, ou encore effondré dans l'acérolplasminémie (Trocetto *et al.*, 2010).

1.4. Rôles de la CP

1.4.1. Ferroxydase et régulateur du métabolisme du fer

Le rôle biologique le mieux établi de la CP comme de la CP-GPI est celui de régulateur du métabolisme du fer en lien avec son activité de ferroxydase (Harris *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2002). Il a été montré par Cartwright et ses collègues en 1968, dans des expériences utilisant des porcs avec carence en cuivre, que l'épuisement de cuivre entraînait une diminution marquée de la CP sérique circulante en association avec l'anémie associée au manque de fer. Ce genre d'anémie ne pouvait être corrigé que par l'administration du cuivre et l'accumulation de fer dans les tissus du parenchyme, tandis que l'administration exogène de la CP aboutit à la libération et à l'incorporation rapide du fer dans la transferrine (Kono, 2012).

Des études plus récentes ont aussi souligné l'importance de la CP en tant que régulateur du métabolisme du fer. Cette protéine contrôle l'état d'oxydation des ions de fer et le flux de ces ions dans et hors des cellules (Mukhopadhyay *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 1999; Qian et Ke, 2001). La CP oxyde les ions ferreux Fe^{2+} en ions ferriques Fe^{3+} , cette étape est nécessaire

pour l'incorporation du fer dans des protéines et enzymes qui lient seulement la forme ferrique comme la transferrine. Les ions ferreux sont hautement toxiques pour l'organisme (Gutteridge, 1985, Curzon, 1961). Ils s'accumulent dans les tissus et peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène et d'autres molécules oxygénées pour produire des radicaux libres $\cdot\text{OH}$ par la réaction de Fenton (Gutteridge, 1985, Curzon, 1961). L'activité ferroxidasique de la CP protège donc contre le stress oxydatif lié au fer (Mateescu *et al.*, 1995; Atanasiu *et al.*, 1998).

Le fer est un métal essentiel à la vie et presque toutes les cellules l'utilisent comme cofacteur pour les activités biochimiques fondamentales, telles que le transport de l'oxygène, le métabolisme énergétique et la synthèse de l'ADN. Cela est dû à sa chimie de coordination flexible et la réactivité redox, qui lui permettent de s'associer à des protéines, de se lier à l'oxygène, de transférer des électrons ou d'agir comme médiateur de réactions catalytiques (Wang et Pantopoulos, 2011).

Le fer est livré aux tissus par la transferrine, un transporteur qui capte le fer libéré dans le plasma principalement par des entérocytes intestinaux ou par des macrophages réticulo-endothéliaux (Wang et Pantopoulos, 2011).

La liaison de la transferrine chargée en fer à son récepteur permet l'endocytose et la livraison du fer à la cellule (Fig 1.3). Le fer internalisé est transporté vers la mitochondrie pour la synthèse de l'hème ou de groupes fer-soufre, qui font partie de plusieurs métalloprotéines, et l'excès de fer est entreposé et désintoxiqué dans la ferritine cytosolique (Wang et Pantopoulos, 2011). Il a été démontré que l'activité ferroxidasique de la CP est importante pour la stabilité de l'expression de la ferroportine, qui est la seule exportatrice de fer vers l'extérieur de la cellule. En absence de la CP, la ferroportine n'est pas capable de transporter le fer et est rapidement dégradée (De Domenico *et al.*, 2007, Siah *et al.*, 2006).

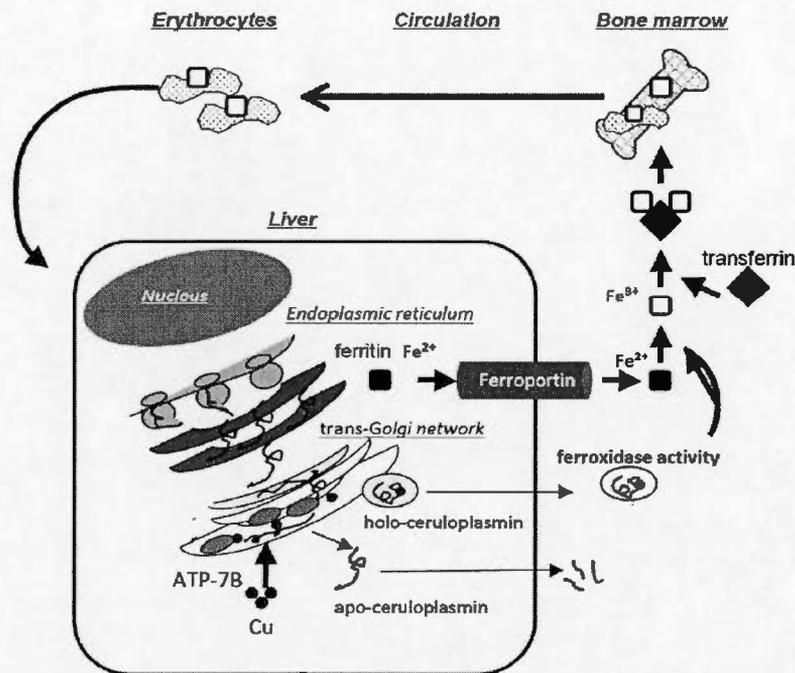


Figure 1.3 Régulation du trafic du fer par la CP. Le fer est recyclé de façon continue entre la moelle osseuse et les hépatocytes. Les ions ferreux sont transférés à l'extérieur de la cellule via la ferroportine. La CP catalyse l'oxydation des ions Fe^{2+} en Fe^{3+} , et permet ainsi leur incorporation dans la transferrine (Tf), un transporteur de fer entre la moelle osseuse et les hépatocytes. La Tf diférique se lie à son récepteur membranaire sur la cellule où elle relâche son contenu en fer. Figure tirée de Kono, 2012.

La CP régule le métabolisme du fer au niveau du cerveau. L'acéruplasminémie, une déficience génétique de la CP fonctionnelle, provoque l'accumulation du fer dans différents organes incluant le cerveau (Goldstein *et al.*, 1982; Aouffen *et al.*, 2001). La réduction de l'effet antioxydant de la CP peut également être liée à diverses pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson et celle d'Alzheimer, qui sont associées à une altération du métabolisme du fer (Berg et Hochstrasser, 2006 ; Kono, 2012). La CP catalyse l'oxydation des ions cuivreux (Cu^+) en ions cuivriques (Cu^{2+}) dans une réaction

qui a des cinétiques similaires à celles de l'oxydation de fer (fig 1.4) (Healy et Timpton, 2007).

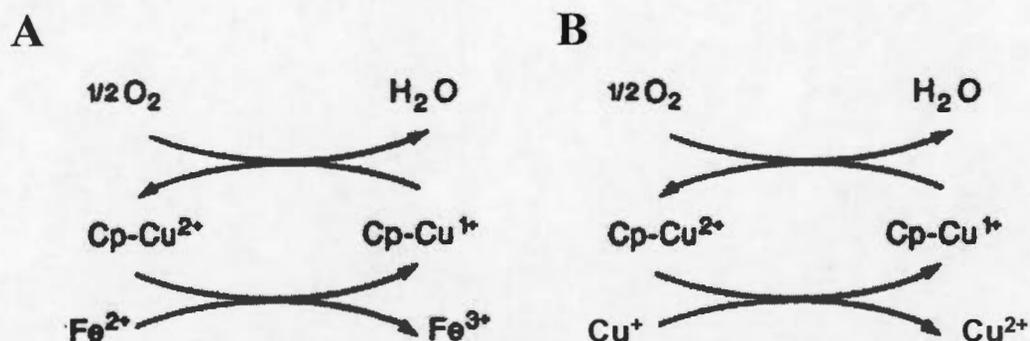


Figure 1.4 Oxydation des ions de fer et de cuivre par la CP. A Oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} . B La CP peut aussi catalyser la réaction d'oxydation d'ions cuivreux (Cu^+) en ions cuivriques (Cu^{2+}). La figure montre que les deux réactions d'oxydation sont similaires et impliquent les ions de cuivre qui font partie de la structure de la CP ($Cp-Cu^{2+}$ et $Cp-Cu^{1+}$). Figure inspirée de Gitlin, 1998.

1.4.2. Autres activités oxydasiques

La CP est une oxydase (EC 1.16.3.1), qui médie la réduction de 4 électrons d'oxygène par le substrat sans relâcher de radicaux superoxyde O_2^- ou de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 comme intermédiaires. Cette activité catalytique de la CP a plusieurs substrats physiologiques. En plus d'oxyder le fer, la CP peut oxyder des amines telles que des catécholamines, la dopamine, la noradrénaline, la sérotonine et le tryptophane (Young et Curzon, 1972; Zaitsev *et al.*, 1999). La CP produit de l'eau au lieu du H_2O_2 , ce qui la distingue des autres amines oxydases. Elle oxyde aussi le p-phénylènediamine (pPD) qui sert de substrat artificiel dans le dosage enzymatique (Osaki, 1966).

1.4.3. Transport du cuivre

Le cuivre est un élément essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques impliquées dans la synthèse de neurotransmetteurs, dans la formation du tissu conjonctif ou dans la chaîne respiratoire. L'excès comme la carence en cuivre est potentiellement délétère, pouvant être responsable des lésions cellulaires dans différents organes et en particulier dans le foie et le cerveau.

Parmi les principaux acteurs qui jouent un rôle important dans le métabolisme du cuivre, il y a l'ATP7A et l'ATP7B qui sont des protéines transporteuses du cuivre appartenant à la famille des ATPases. Aussi on retrouve la CP qui transporte plus de 95% du cuivre circulant. La CP est chargée en cuivre par l'ATP7B lors de son passage dans l'appareil de Golgi avant d'être sécrété dans le sang (fig 1.3). Certains chercheurs pensent que la CP pourrait livrer des ions de cuivre aux tissus de tout l'organisme où il est utilisé par des cuproprotéines effectrices telles que la superoxyde dismutase (SOD), la cytochrome c oxydase, l'héphaestine et la CP elle-même (Trocello *et al.*, 2010).

Il a été observé que la CP ne pénètre pas dans la cellule lors de son interaction pour livrer le cuivre (Vassiliev *et al.*, 2005). La CP se lierait à la membrane des cellules puis livrerait les ions de cuivre suite à une réduction qui faciliterait leur déchargement (Percival et Harris, 1991). Elle se dissocie par la suite de la membrane pour se retrouver dans le milieu extracellulaire (Vassiliev *et al.*, 2005).

Le rôle de la CP comme livreur du cuivre n'est pas encore bien établi. Le métabolisme du cuivre n'est apparemment pas altéré chez les souris acéruoplasminémiques. Ceci pourrait être expliqué par le développement d'un mécanisme compensatoire pour effectuer le transport du cuivre (Trocello *et al.*, 2010), puisque d'autres protéines, comme l'albumine ou la transcupréine, peuvent remplir cette fonction (Trocello *et al.*, 2010). La maladie de Wilson est causée par une mutation au niveau de l'ATP7B. Cette mutation cause une diminution de l'incorporation du cuivre dans la CP ce qui entraîne une accumulation du cuivre dans le cytoplasme des hépatocytes (Vassiliev *et al.*, 2005). La maladie de Menkès, qui résulte d'une

mutation du gène de l'ATP7A, entraîne une carence en cuivre se traduisant par une baisse de la CP et du cuivre circulant (Trocello *et al.*, 2010).

1.4.4. Protéine de phase aiguë de l'inflammation

La CP est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. La concentration de la CP sanguine augmente dans le cas d'une infection ou d'une inflammation (Healy et Timpton, 2007; Cousin, 1985). Comme elle possède six atomes de cuivre et que le cuivre a des propriétés anti-inflammatoires, il se peut que la CP ait des propriétés anti-inflammatoires. Possiblement, elle pourrait capter les espèces oxygénées réactives (ERO) produites par les cellules de la réponse inflammatoire (Berthon, 1993; Jackson *et al.*, 2000).

1.4.5. Propriétés anti-oxydantes

La CP fait partie des antioxydants les plus importants contenus dans le sérum (Goldstein *et al.*, 1979 ; Stocks *et al.*, 1974; Healy et Timpton, 2007). Parmi les mécanismes proposés pour expliquer cette propriété il y a sa compétition avec la réaction de Fenton pour utiliser le Fe^{2+} avec son activité ferroxidase, et sa capacité à piéger les ERO (Gutteridge, 1985). Il a été proposé par Healy et Timpton en 2007 que l'activité oxydasique de la CP sur les ions Cu^+ puisse aussi contribuer à la propriété anti-oxydante de la CP. Des chercheurs ont rapporté une activité prooxydante sur les lipoprotéines de faible densité (LDL). Les revues scientifiques concernant une telle activité dans certains contextes physiologiques ne sont pas claires. La CP peut aussi contribuer à l'évacuation du fer des sites d'infections en transférant le fer à la transférine (Tf) (Mazumder *et al.*, 1997).

1.4.6. Développement du système nerveux

Quelques résultats nous ont amenés à postuler un rôle de la CP dans le développement du SN. Comme cela est encore dans le domaine de l'hypothèse, nous aborderons cet aspect dans les sections 1.7.3 et 1.8.

1.5. Les protéines homologues de la CP

William R. Church *et al.*, 1984 rapportent que la structure de la CP présente des similitudes avec les facteurs V et VIII de la coagulation du sang. Le facteur V et le facteur VIII sont deux grandes glycoprotéines qui fonctionnent comme cofacteurs essentiels pour l'activation protéolytique du facteur X et de la thrombine, respectivement. Ces deux dernières protéines circulent dans le plasma en tant que précurseurs inactifs. Le facteur V et le facteur VIII sont activés par clivage protéolytique pour donner les formes actives Va et VIIIa (Pittman *et al.*, 1994).

La structure primaire du facteur V et du facteur VIII montre qu'ils partagent les mêmes séquences d'aa et ils ont une organisation des domaines conservée (A1-A2-B-A3-C1-C2). Les domaines A1, A2 et A3 de la CP sont retrouvés dans les facteurs V et VIII (fig 1.5), suggérant un rôle dans la liaison des ions métalliques. Les domaines C1 et C2 sont homologues à ceux des protéines de liaison phospholipidique suggérant un rôle dans les interactions phospholipidiques. Des études suggèrent que le domaine B joue un rôle dans la régulation de l'expression et l'activation des facteurs V et VIII (Pittman *et al.*, 1994).

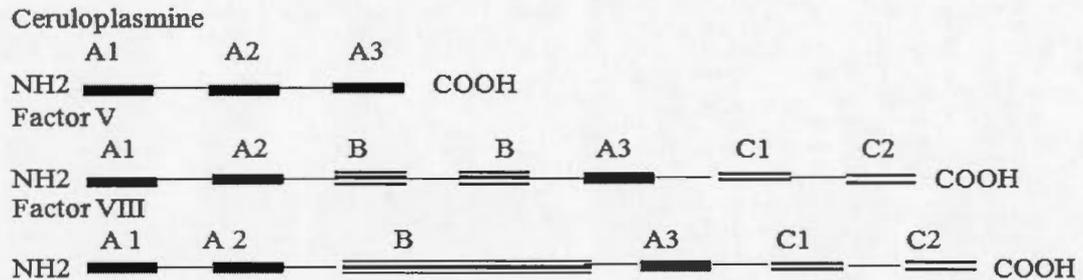


Figure 1.5 Comparaison structurale de la CP, du facteur V et du facteur VIII. Les séquences homologues correspondant aux domaines A1, A2 et A3 de la CP sont indiquées par des rectangles noirs. La figure montre la localisation de ces domaines retrouvés dans la structure de la CP, du facteur V et du facteur VIII. Figure inspirée de Pittman *et al.*, 1994.

La CP présente des homologies de structure et de fonction avec l'héphaestine, une protéine impliquée dans l'homéostasie du fer. L'héphaestine fait partie de la famille des oxydases à cuivre qui inclut la CP, les transporteurs de fer fet3 et fet5 de la levure, l'ascorbate oxydase bactérienne et les laccases. Contrairement à la CP qui est soluble, l'héphaestine a un segment transmembranaire C-t (Syed *et al.*, 2002)

Les membres de la famille des oxydases à cuivre forment un lien entre le métabolisme du fer et celui du cuivre chez la levure et les métazoaires. Par exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la fet3 est une composante nécessaire pour le transport du fer chez la levure (De Silva *et al.*, 1997).

Contrairement à la CP qui est soluble, l'héphaestine a un segment transmembranaire en C-t (Syed *et al.*, 2002). Le gène de l'héphaestine fait 100 kpb et comme celui de la CP, il est composé de 20 exons. Les premières 45pb de l'extrémité 3'UTR du gène de l'héphaestine ont 15% de similitude avec le gène de la CP humaine. Il a été suggéré que l'extrémité 3'UTR

de l'ARNm qui code pour des protéines homologues structurellement peut être conservée parmi les espèces (Qian *et al.*, 2007).

La structure de l'héphaestine comprend trois domaines qui ont 35% à 40% d'homologie avec ceux de la CP, du facteur V et du facteur VIII. Des éléments structuraux importants pour la fonction de la CP sont conservés dans l'héphaestine incluant les résidus d'histidine impliqués dans la liaison des atomes de cuivre, et les résidus de cystéines impliqués dans la formation des ponts disulfures (Qian *et al.*, 2007).

L'héphaestine est principalement exprimée à la membrane basale des cellules de la paroi gastro-intestinale (Petrak et Vyoral, 2005). Il a été démontré qu'elle est aussi exprimée dans certaines régions du SNC comme l'hippocampe et le cortex (Qian *et al.*, 2007). L'héphaestine est une ferroxidase importante dans le transport du fer alimentaire à partir des cellules de l'intestin vers le sang (Fuqua *et al.*, 2014).

1.6. Développement du cerveau et migration neuronale

À cause de l'action de la CP sur la reeline (section 4), nous nous sommes intéressés à la migration neuronale lors du développement du cerveau.

1.6.1. Migration neuronale et reeline

Pendant le développement du cerveau, les neurones post-mitotiques migrent de la zone proliférative vers leur destination finale. Ce processus conduit à la formation d'une structure laminaire bien organisée. Une telle structure se retrouve au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe et du cervelet (Diaz-Ruiz *et al.*, 2008).

Dans le cortex, par exemple, les neuroblastes prolifèrent dans la zone ventriculaire (VZ) donnant naissance à des neurones post-mitotiques qui migrent vers la zone marginale (ZM) tout au long des fibres gliales, c'est ce qu'on appelle la migration radiale (fig 1.6). Les neurones se détachent des fibres radiales une fois qu'ils atteignent leur position appropriée

au sein de la plaque corticale (PC). La position des neurones dépend de leur temps de naissance. Les premiers neurones nés s'arrêtent au niveau de la sous-plaque (SP) tandis que les neurones qui naissent après doivent traverser la SP corticale pour former des couches supplémentaires de l'intérieur vers l'extérieur. Les neurones migrent aussi de façon tangentielle à travers ces couches neuronales. Les neurones qui forment la même couche ont à peu près le même âge (Montanaro et Carbonetto, 2003; Honda et Kobayashi, 2011).

Un défaut de la migration neuronale peut affecter le développement du système nerveux (SN), causer des malformations et engendrer des déficits de fonction dans le SN adulte (fig 1.6). Les mouvements de migration sont contrôlés par la reeline sécrétée par les cellules de Kajal-Retzius situées dans la ZM (fig 1.6). Chez les souris *reeler*, qui n'expriment pas la reeline, on peut observer une désorganisation des neurones au niveau du cerveau, du cervelet et de l'hippocampe, une absence complète de la ZM et une inversion des couches neuronales. Le modèle de souris *reeler* a été largement utilisé pour comprendre les mécanismes de la formation de la structure cérébrale (Honda et Kobayashi, 2011). Un défaut de migration au niveau du cortex cérébral humain a été relié à plusieurs maladies neurologiques comme la schizophrénie, l'autisme et l'épilepsie (Forester, 2014).

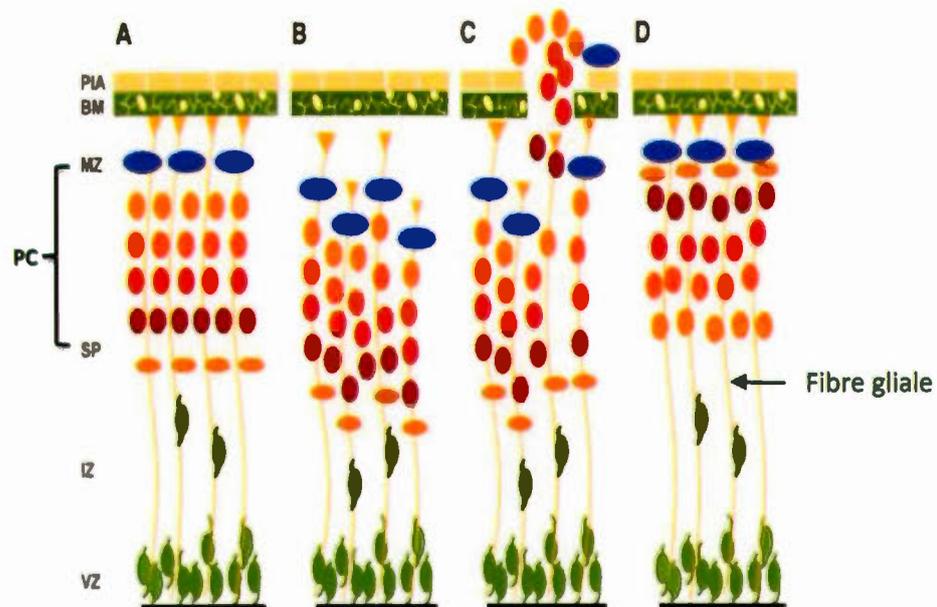


Figure 1.6 Des exemples d'anomalies dans le développement du cortex. **A** Durant le développement cortical normal, des neuroblastes migrent tout au long des fibres gliales de la zone ventriculaire (VZ) vers la plaque corticale (PC) pour former les diverses couches neuronales. Les couches neuronales qui forment la PC se forment de l'intérieur vers l'extérieur du cortex en développement. Les neurones post-mitotiques traversent la sous-plaque (SP) et se détachent des fibres gliales une fois arrivés à leur position au niveau de la PC. Leur position est régulée par leur temps de naissance et aussi par la reeline localisée au niveau de la zone marginale (MZ). **B** Si les fibres gliales ne s'attachent pas à la membrane basale (BM), les couches neuronales ne sont pas alignées. Ce genre d'anomalie est relevé chez les souris déficiente en $\beta 1$ -intégrine. **C** Des perturbations de la BM permettent aux cellules de Cajal-Retzius et aux neurones de migrer dans les espaces adjacents. **D** Les neurones ne répondent pas correctement à leur signal d'arrêt. Chez les souris *reeler*, les neurones ne migrent pas à travers la SP (d'abord appelée pré-plaque), ils s'empilent de manière inversée dans la PC, ils sont mal-orientés. Figure tirée de Montanaro et Carbonetto, 2003.

En plus de la reeline, d'autres protéines sécrétées par les neurones jouent un rôle très important dans le contrôle de plusieurs événements durant le développement du cerveau, incluant la différenciation, la migration, la morphologie et la plasticité neuronales (Koeie et al., 2014). On compte entre autres, des protéases et des voies kinasiques.

Dans les prochaines sections, des informations supplémentaires sur la reeline sont données, ainsi que sur des protéases et des kinases pouvant être reliées au développement du SN.

1.6.2. La reeline

1.6.2.1. Structure de la reeline

La reeline est une glycoprotéine codée par le gène *RELN*. Ce gène contient 65 exons couvrant approximativement 450 kb de l'ADN génomique. La structure du gène de la reeline est hautement conservée chez la souris et chez l'humain. Chez l'humain, le gène est localisé sur le chromosome 7q22, chez la souris, il est localisé sur le chromosome 5 (Knuesel, 2010). La reeline est une protéine extracellulaire hautement conservée qui joue un rôle crucial dans l'évolution du cortex cérébral chez les mammifères. La reeline est non seulement essentielle pendant le développement mais a aussi des rôles dans le cerveau adulte où elle module la plasticité synaptique favorable à la mémoire et à l'apprentissage (Krstic *et al.*, 2012).

La reeline de souris contient 3461 aa. Elle a une masse relative de 400 kDa (Forster, 2014, Kang *et al.*, 2010). La reeline contient une région N-terminale (N-t), huit répétitions d'un même domaine RR (*reelin repeat*) composé de 350-390 aa et d'un motif du facteur de croissance épidermale (EGF), et une région C-t (fig 1.7). La région N-t, qui comprend une séquence qui ressemble beaucoup à celle de la F-spondine, est nécessaire pour la multimérisation nécessaire à l'activité biologique de la reeline. La région centrale (RRIII à RRVI) est essentielle pour la liaison de la reeline à ses récepteurs, le récepteur de l'apolipoprotéine E de type 2 (ApoER2) et le récepteur de lipoprotéines de très faible densité (VLDLR). La région C-t est hautement basique et participe à l'activation en aval de la signalisation cellulaire (Koie *et al.*, 2014, Kohno *et al.*, 2009).

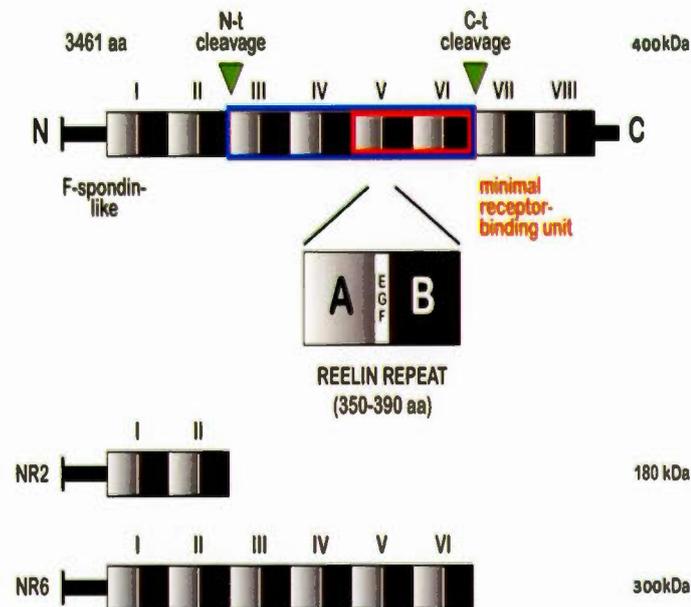


Figure 1.7 Structure de la reeline. La reeline fait environ 400kDa et comporte 3461 aa. Sa structure comporte un domaine F-spondine suivi de huit domaines répétés (I à VIII) contenant un motif retrouvé dans le facteur de croissance épithéliale (EGF). Elle a deux sites de clivage préférentiels en N-t et en C-t, localisés après les domaines II et VI respectivement. Le clivage en N-t donne le fragment 180K et le clivage en C-t donne le fragment 300K reconnu par l'anticorps G10. Figure inspirée de Knuesel, 2010.

1.6.2.2. Rôle de la reeline

La reeline contrôle plusieurs étapes essentielles du développement du cerveau. C'est un élément essentiel pour la bonne formation et le positionnement des couches neuronales au niveau de la PC. Elle est aussi nécessaire pour la migration et le positionnement des cellules de Purkinje pendant le développement du cervelet (Knuesel., 2010).

La reeline a des effets pléiotropiques sur l'organisation des neurones, possiblement, par la formation de gradients de concentration. Elle peut agir comme un chimioattractant stimulant la migration des neurones le long des cellules de fibres gliales mais aussi comme un signal d'arrêt pour immobiliser les neurones sur les fibres ou pour causer leur

détachement. Les mécanismes impliqués dans ces effets ne sont pas complètement compris. Des chercheurs ont rapporté que la reeline aurait une activité de protéase à sérine qui demeure controversée (D'Arcangelo *et al.*, 1995; Quattrocchi *et al.*, 2002; Scotti and Herrmann, 2002).

La reeline est aussi impliquée dans le développement des dendrites et la plasticité synaptique (Koie *et al.*, 2014). Plusieurs études ont montré qu'une diminution ou une insuffisance de l'activité de la reeline cause et/ou aggrave un certain nombre de maladies neuropsychiatriques telles que l'Alzheimer et la schizophrénie. Une augmentation de l'activité de la reeline représente une option thérapeutique pour ces maladies (Koie *et al.*, 2014). Cependant, comme les mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité de la reeline ne sont pas encore connus, la seule option existante pour augmenter l'activité de la reeline est l'injection de la protéine purifiée (Koie *et al.*, 2014).

Dans le cerveau adulte, la reeline aurait un rôle dans le contrôle du cytosquelette d'actine et de microtubules ainsi que dans la formation de synapses et de la moelle épinière par ses cascades de signalisation (Knuesel, 2010).

1.6.2.3. Clivage de la reeline

In vivo, la reeline est clivée spécifiquement à deux sites, N-t et C-t (fig 1.7). Dans le cerveau le clivage se produit principalement au site N-t pour former un fragment de 180K. Les chercheurs ont souvent rapporté ce clivage entre RRII et RRIII. Le clivage au site C-t se produit entre RRVI et RRVII et génère le fragment 300K (fig 1.7) (Koie *et al.*, 2014; Ducharme *et al.*, 2010; Jossin *et al.*, 2011).

L'identité de la protéase responsable du clivage en N-t demeure inconnue mais cette enzyme nécessite des ions de zinc pour son activité catalytique, requiert l'activité d'une proprotéine convertase comme la furine pour son activation, et a beaucoup d'affinité pour l'héparine. L'identification de cette protéase a une grande importance thérapeutique, parce

que son inhibition pourrait conduire à la régulation de l'activité de la reeline et l'amélioration de désordres neuropsychiatriques (Hisanaga *et al.*, 2012).

Des études ont montré que la métalloprotéine ADAMTS-4 est capable de cliver la reeline en N-t et en C-t bien que sa contribution dans le métabolisme de la reeline *in vivo* demeure incertaine (Koie *et al.*, 2014; Krstic *et al.*, 2012).

L'équipe de Krstic *et al.*, 2012 a montré que l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est capable de cliver la reeline en C-t et l'équipe de Kohno *et al.* (2009) rapporte qu'une convertase, peut-être la PC2, serait impliquée dans la génération de la reeline 180K.

1.6.2.4. Signalisation de la reeline

La reeline exerce ses fonctions en se liant aux récepteurs ApoER2 et VLDLr, ce qui active Src et Fyn, qui appartiennent à la famille des tyrosine kinases, et induit la phosphorylation de la tyrosine de la protéine adaptatrice Disabled-1 (Dab-1)(fig 1.8). Ceci cause des modifications au niveau du cytosquelette ainsi que des changements de l'expression génique dans les neurones cibles. La phosphorylation de Dab-1 est une étape essentielle de la signalisation de la reeline (Koie *et al.*, 2014; Forster, 2014; Young Kang *et al.*, 2010; Knuesel., 2010). Les récepteurs ApoER2 et VLDLr ont une queue cytoplasmique qui contient un motif (NPxY) contenant une tyrosine (Tyr) non-phosphorylable et qui permet d'interagir avec le domaine PIPTB contenu dans la région N-t de Dab-1 (fig 1.8) (Jossin *et al.*, 2011).

Les souris mutantes déficientes en ApoER2 et VLDLr ou Dab-1 ont un défaut au niveau de l'organisation corticale, ressemblant à celui retrouvé chez les souris reeler. Chez les souris mutantes qui expriment seulement un des deux récepteurs de la reeline, les défauts d'organisation sont moins sévères que chez les souris reeler mais pas les mêmes. Chaque récepteur active donc un ensemble différent de signaux intracellulaires et exerce différents effets sur la dynamique intracellulaire pendant le développement cortical (Forster, 2014).

En aval de DAB-1, la liaison de la reeline à l'ApoER2 active la séquence signalisatrice phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), sérine/thréonine kinase (Akt) et protéine kinase B (PKB), conduisant à l'inactivation de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et à la suppression de l'hyperphosphorylation de Tau, une protéine stabilisatrice des microtubules (Krstic *et al.*, 2012, Knuesel, 2010). La liaison de la reeline à l'ApoER2 active aussi la LIM kinase-1(LIMK1), laquelle médie la phosphorylation de la n-cofiline, une protéine qui contrôle la polymérisation de l'actine. La liaison de la reeline au VLDLR active une cascade différente de signalisation. Le domaine intracellulaire du VLDLR lie la protéine lissencephaline-1 (Lis1) qui interagit avec Nudel, une protéine clé dans la dynamique des microtubules, la migration des neurones et la lamination du cortex (Forster, 2014; Knuesel, 2010).

Il a été proposé que la multimérisation de la reeline soit nécessaire pour la liaison et l'activation de différents récepteurs de la reeline, incluant l'ApoER2 et le VLDLr (Knuesel, 2010). Il y a d'autres récepteurs potentiels pour la reeline : le récepteur neuronal relié à la cadhérine (CNR) et l'intégrine $\alpha 3\beta 4$ (Knuesel, 2010). Des études récentes ont montré que l'intégrine $\alpha 3\beta 4$ n'est pas essentielle pour la signalisation de la reeline et la guidance des cellules gliales pendant la migration des neurones (Knuesel, 2010). Il a déjà été démontré que le clivage en N-t abolit complètement la capacité de la reeline à induire la phosphorylation de Dab-1 (Koe *et al.*, 2014; Hisanaga *et al.*, 2012).

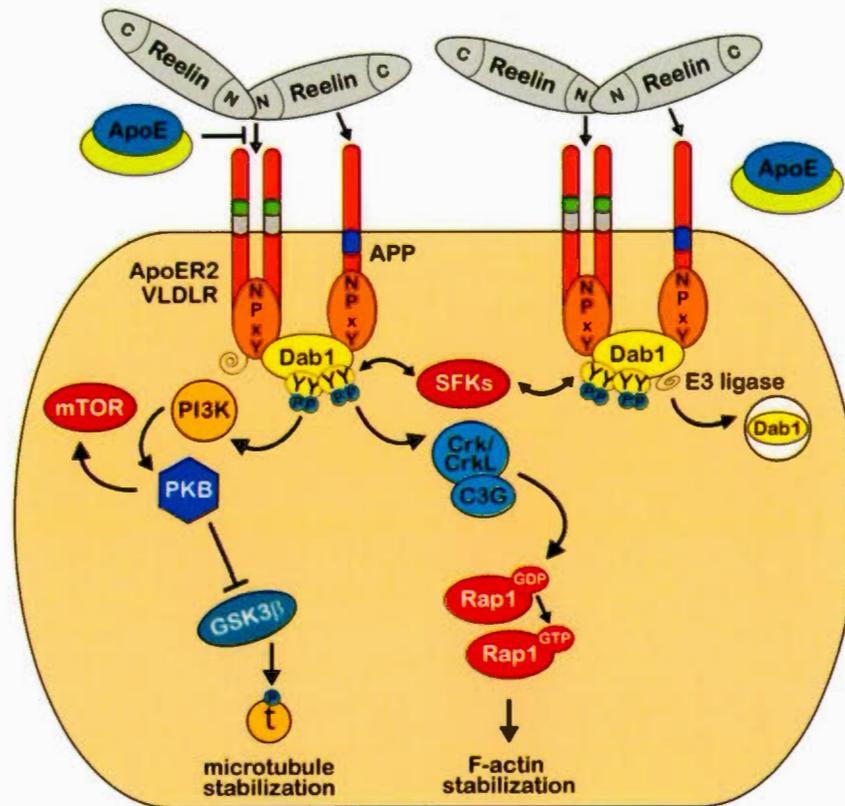


Figure 1.8 Signalisation de la reeline. La reeline multimérique peut lier les récepteurs de l'apolipoprotéine E de type 2 (ApoER2) et le récepteur lipoprotéique de très faible densité (VLDLR). Ces récepteurs possèdent une séquence NxPY qui permet leur interaction avec la protéine adaptatrice Dab-1. Dab-1 possède six sites de phosphorylation distincts. Selon la combinaison des résidus phosphorylés, phospho-Dab-1 active diverses cascades de signalisation intracellulaires qui agiront sur l'organisation des neurones. Figure inspirée de Doehner et Knuesel, 2010.

1.6.3. Les protéases à sérine dans le développement du cerveau

Des études ont montré que les protéases à sérine ont plusieurs fonctions physiologiques dans le SNC. Par exemple, la spinepsine/TMPRSS5 est une protéase à sérine transmembranaire dont la distribution pré-synaptique sur les neurones moteurs de la moelle épinière suggère qu'elle est importante pour la plasticité neuronale (Mitsui *et al.*, 2008). La motopsine/PRSS12 est une protéase mosaïque dont la perte de fonction provoque

un retard mental. Des études indiquent l'importance de cette protéase dans la fonction cognitive (Mitsui *et al.*, 2008).

Les activateurs du plasminogène ont aussi des fonctions dans le SNC (Mitsui *et al.*, 2008). L'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA) est impliqué dans le remodelage et la migration cellulaire neuronale (Ho-Tin-Noé *et al.*, 2009). Le tPA est abondamment exprimé dans le SN, et est impliqué dans les fonctions de l'hippocampe, la croissance des neurites et la plasticité neuronale, aussi il cause l'agrégation des neurones *in vitro* (Ho-Tin-Noé *et al.*, 2009). Durant le développement du cervelet, le tPA favorise la migration cellulaire. Chez les souris qui n'expriment pas le tPA, les neurones migrent à une vitesse de 50% moindre que chez les souris de type sauvage (Mitsui *et al.*, 2008).

Outre les protéases à sérine, les métalloprotéases de la matrice extracellulaire ont aussi un rôle dans la migration neuronale et le développement du SN par leur action dans le remodelage de cette matrice (Hisanaga *et al.*, 2012; Krstic *et al.*, 2012). Elles peuvent être activées par des protéases à sérine telles que les convertases de type furine.

1.6.4. Quelques voies de signalisation impliquées dans le développement et la migration des neurones

D'autres molécules que la reeline et les protéases à sérine ont un rôle dans le développement du SN. En voici quelques exemples. Le système AMPc/PKA favorise la croissance et la régulation neuritiques, ainsi que la régénération des axones dans le SNC (Aglah *et al.*, 2008; Bogoch et Linial, 2008; Tegenge *et al.*, 2011). De plus des études récentes ont montré que la voie PI3K/AKT n'affecte pas seulement la prolifération mais aussi la migration cellulaire (Peng *et al.*, 2009). Des travaux de Zhang *et al.* (2011) montrent que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) stimule le facteur de croissance épidermale (EGF) qui, lui, induit la prolifération et la migration des cellules souches/progénitrices neuronales (NSPC) via la signalisation de la PI3K/AKT.

ROCK, une kinase des Rho-GTPases très impliquées dans l'assemblage de l'actine, a un rôle dans diverses fonctions cellulaires y compris la contraction de la cellule, la mobilité et la migration (Duan *et al.*, 2014; Murata *et al.*, 2014).

Enfin, des études récentes ont montré que la phosphorylation d'ERK1/2 favorise la croissance axonale et la migration des neurones de la moelle épinière embryonnaire (Yang *et al.*, 2012).

1.7. Le modèle de carcinome embryonnaire murin P19

1.7.1. Origine et caractéristiques générales

Les cellules P19 sont des cellules-souches de carcinome embryonnaire isolées d'un tératocarcinome qui a été formé par la transplantation d'un embryon de souris sur le testicule d'une souris adulte. Cette transplantation a été faite au jour j 7,5 du développement embryonnaire, avant l'initiation de la différenciation cellulaire. Ce modèle cellulaire a été développé par le Dr McBurney à l'Université d'Ottawa (McBurney, 1993). Les cellules P19 non différenciées prolifèrent rapidement et indéfiniment. Elles ont un caryotype euploïde mâle normal donc elles sont génétiquement très stables (McBurney, 1993). Elles sont dites pluripotentes parce qu'elles ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires entre autres en neurones lorsqu'elles sont mises en présence d'acide rétinoïque (AR) (Mc Burney, 1993). Les cellules P19 représentent un excellent modèle de différenciation des cellules, car elles se différencient en dérivées cellulaires des trois feuilletts embryonnaires et ce, par les mêmes mécanismes que ceux utilisés par les cellules-souches embryonnaires normales (Mc Burney, 1993).

En présence du diméthylsulfoxyde (DMSO), un solvant non physiologique, ou encore de l'ocytocine, une hormone peptidique, plusieurs facteurs de transcription cardiogéniques sont activés chez les cellules P19, tels que GATA-4 et Nkx-2.5, et conduisent à la génération de cellules cardiaques (Mc Burney, 1993, Bogdan *et al.*, 2002, Bouchard et Paquin, 2009). En

présence de concentrations élevées d'AR (10^{-6} M), les cellules P19 se différencient en neurones et en astrocytes, des cellules neuro-ectodermiques (fig 1.9) (Chiu *et al.*, 1995; Mc Burney, 1993; Solari *et al.*, 2010). Les cellules P19 expriment les récepteurs de l'AR, les RARs (*retinoic acid receptors*), et les récepteurs de rétinoïdes-X, les RXRs (*retinoid-X receptors*) (Zile, 2001).

1.7.2. Différenciation neuronale

Le modèle P19 est très utile, pour étudier la différenciation neuronale puis la maturation des nouveaux neurones en neurones fonctionnels. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence une action de la CP sur les neurones nouvellement différenciés donc similaires à des neurones naissants (section 1.7.3)

Les cellules P19 et leurs dérivées neuronales expriment la reeline (Ducharme *et al.*, 2010) offrent un modèle utile pour étudier les mécanismes régulateurs de l'expression de la reeline.

Les cellules P19 non différenciées sont faciles à cultiver et leur différenciation en neurones est relativement rapide (4 jours) et efficace. Les neurones ainsi obtenus expriment la reeline, ses récepteurs ApoER2 et VLDLR, et Dab-1 (Bogoch et Linial, 2008; Ducharme *et al.*, 2010). Elles expriment aussi la convertase neuronale PC2 et son régulateur, le peptide 7B2. (Jeannotte *et al.*, 1997; Petit-Turcotte et Paquin, 2000).

Pour induire la différenciation neuronale, les cellules P19 sont cultivées en sphéroïdes flottants (corps embryoïdes) en présence de l'AR pendant 4 jours. À j4, les cellules sont transférées sur une surface de culture cellulaire où elles étendent des neurites dans les 24h qui suivent et continuent à mûrir comme des neurones qui ressemblent à ceux du SNC (Maltais *et al.*, 2003; Jeannotte *et al.*, 1997; MacPherson *et al.*, 1997; Parnas et Linial, 1997; Cadet et Paquin, 2000). De j4 à environ j9, 95% des cellules sont des neurones (Laplante *et al.*, 2004; Poirier *et al.*, 2006). Les neurones obtenus expriment un bon nombre de

marqueurs neuronaux tels que l'énolase spécifique aux neurones, la BIII-tubuline, les neurofilaments, la protéine associée aux microtubules-2 (MAP-2), GAP-43, NeuN, HNK-1, la protéine tau de même que plusieurs autres antigènes spécifiques (Jeannotte *et al.*, 1997, Laplante *et al.*, 2004; Poirier *et al.*, 2006, McBurney, 1993). Les neurones P19 produisent des neurotransmetteur (ex : GABA) et des neuropeptides retrouvés dans le néocortex, l'hippocampe et le striatum (Jeannotte *et al.*; 1997; McBurney, 1993 ; MacPherson *et al.*, 1997).

Les cellules-souches sont très prometteuses pour les thérapies de remplacement cellulaire car elles peuvent générer de nombreux types cellulaires de l'organisme. Les cellules P19 de souris ne pourront pas être transplantées dans des humains, par contre elles peuvent donner des informations sur les conditions et les mécanismes de différenciation potentiellement transposables à des cellules humaines. Il existe au moins une contrepartie humaine aux cellules P19, les cellules NT2 (S.J. Pleasure *et al.*, 1992). Leur différenciation en neurones prend autour de deux mois comparativement à une semaine pour les cellules P19, un désavantage expérimental par rapport au modèle P19.

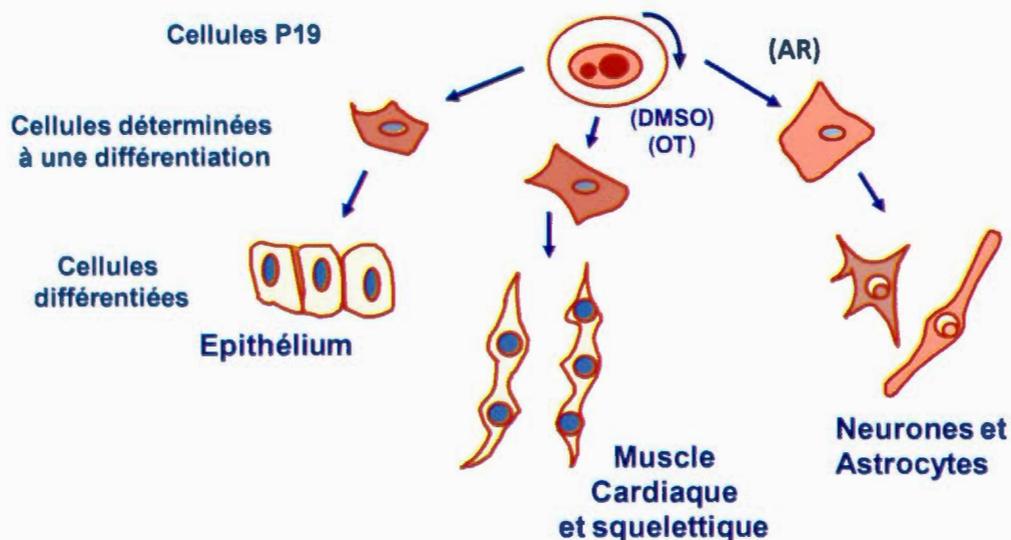


Figure 1.9 Les cellules souches P19. Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 ressemblent beaucoup aux cellules-souches embryonnaires. Elles sont indifférenciées, prolifèrent continuellement, et sont pluripotentes. Les cellules souches P19 peuvent se différencier en dérivés cellulaires des trois feuillets germinatifs *in vivo* et *in vitro*. Schéma adapté de Rudnicki et McBurney (1987). AR, acide rétinoïque; DMSO, diméthylsulfoxyde; OT, ocytocine.

1.7.3. Action trophique de la CP sur les neurones P19

La CP induit l'agrégation des neurones P19 *in vitro* (Maltais *et al.*, 2003; Ducharme *et al.*; 2010). Cette action pourrait faire intervenir des protéines de liaison à la surface des neurones. En effet, la CP marquée à la digoxygénine se lie aux neurones, alors qu'elle ne se lie pas aux cellules P19 indifférenciées (Maltais *et al.*, 2003). Il a aussi été rapporté que l'agrégation des neurones est dépendante de la concentration en CP et est saturable au-delà de 3,8 μM . D'un point de vue morphologique, les neurones non traités s'étalent en monocouches et forment de longs neurites pour établir des connections entre eux, tandis qu'en présence de la CP, les neurones se rassemblent en petits groupes pour former des agrégats adhérents à la surface de culture et il y a peu de longues neurites entre les agrégats. Cette action neuroagrégative de la CP a soulevé la possibilité d'un rôle dans l'organisation des neurones pendant le développement du cerveau (Maltais *et al.*, 2003).

Le phénomène de neuroagrégation est bien observé 24 à 48h après le traitement avec la CP, soit de j5 à j6 de la différenciation neuronale. Le processus de la neuroagrégation est enclenché au bout de 8h de traitement avec la CP. En effet, il se réalise même si on enlève la CP à 8h (fig A.1).

La reeline 400K et la reeline 180K sont déjà produites par les neurones P19. La présence de la CP dans le milieu stimule la génération de la reeline 300K qui commence à l'accumuler au bout de 24h suivant le traitement avec la CP (Ducharme *et al.*, 2010). La neuroagrégation et la génération de la reeline 300K sont inhibées en présence de SBTI et Apro (Ducharme *et al.*, 2010).

Nos résultats nous ont amenés à proposer deux modèles d'action pour la CP sur les neurones P19 et sur la génération de la reeline 300K: un modèle d'actions séquentielles (modèle A) et un modèle d'actions indépendantes (modèle B) (fig 1.10) (Ducharme *et al.*, 2010).

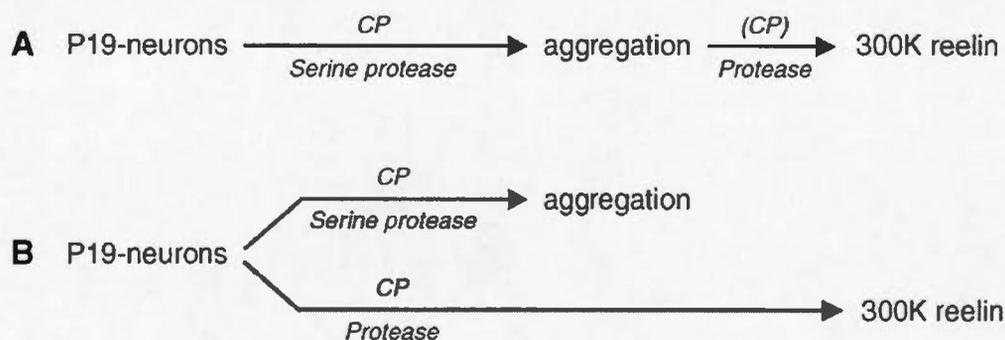


Figure 1.10 Relations possibles entre la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K induites par la CP. A Le clivage de la reeline peut être une conséquence de l'agrégation. B Les deux actions de la CP se produisent de façon indépendante l'une de l'autre mais chacune nécessite la présence de la CP. La ou les protéases impliquées dans les deux actions ne sont pas encore connues. Figure tirée de Ducharme *et al.*, 2010.

1.8. Hypothèse et objectifs de recherche

Nous postulons que la CP pourrait avoir un rôle dans l'organisation des neurones pendant le développement du cerveau à cause de ses deux actions particulières sur des neurones P19 nouvellement différenciés: la CP induit l'agrégation de ces neurones et stimule la génération du fragment 300K de la reeline. Nous connaissons peu les mécanismes à la base de ces deux actions mais savons qu'ils dépendent d'une protéase à sérine extracellulaire. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes à la base de ces deux actions de la CP sur les neurones P19, le présent travail avait pour objectifs de déterminer la relation existant entre neuroagrégation et clivage de la reeline en fragment de 300K (modèle séquentiel ou indépendant selon la fig 1.10), et d'identifier les mécanismes d'action.

Deux stratégies ont été utilisées :

- a) traiter les neurones P19 avec des agents pharmacologiques de différentes voies de signalisation.
- b) traiter les neurones P19 avec le SBTI et l'Apro, ainsi que d'autres inhibiteurs de protéases à sérine plus spécifiques.

L'impact de chaque stratégie a été évalué en analysant la morphologie des neurones P19 et en suivant le profil d'expression de la reeline et son clivage par immunobuvardage.

Nous verrons que les résultats indiquent une indépendance des actions neuronales de la CP, neuroagrégation et clivage de la reeline, et offrent quelques informations sur des aspects moléculaires de ces actions.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Purification de la CP

La CP a été purifiée selon la méthode déjà décrite (Wang *et al.*, 1994; Mateescu *et al.*, 1999; Maltais *et al.*, 2003; Ducharme *et al.*, 2010) et ce à partir de 10 L de sang de bœuf, collecté à la boucherie-abattoir Tarte Enr., Marieville, Québec, Canada. Un litre de citrate de sodium 2.5% a été ajouté immédiatement aux 10L de sang pour éviter la coagulation. Le transport ainsi que toutes les manipulations ont été faites à 4°C. Après deux séries de centrifugation à 8000g pendant 20 min à 4°C (centrifugeuse Beckmann B-20) le plasma récupéré a été incubé avec du sulfate d'ammonium jusqu'à une concentration de saturation de 35% (p/v) pendant 2h à 4°C sous agitation. La solution a été par la suite centrifugée à 10000g pendant 20 min à 4°C, le surnageant a été amené à 55% de saturation en sulfate d'ammonium puis incubé pendant 1h à 4°C sous agitation. La solution a été centrifugée à 10000g pendant 20 min à 4°C. Le culot obtenu a été resuspendu dans environ 800ml de tampon de phosphate de potassium (KPi) 10mM, pH 7,2. La solution a été par la suite dialysée pendant 34 heures dans du tampon KPi 10mM, pH 7,2 (trois bains de 20L chaque fois). Une fois la dialyse terminée la solution a été centrifugée à 10000g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant obtenu a été déposé sur une colonne faite de 50mL d' aminoéthyl-agarose préalablement équilibrée avec du tampon KPi 10 mM, pH 7.2 et réglée a un débit de 2mL/min à l'aide d'une pompe péristaltique Watson-Marlow 202 (Watson-Marlow limited, Falmouth, Cornwall, Angleterre). L' aminoéthyl-agarose a été synthétisé par Josianne Gagné (mémoire de maîtrise), selon une adaptation de la méthode originale (Mateescu *et al.*, 1999). Après dépôt de l'échantillon, la colonne a été lavée avec dix volumes de tampon KPi, pH 7,2 20mM. À cette étape la CP adsorbée sur les billes était visible par sa couleur bleue. La CP a été éluée avec du tampon KPi 200mM, pH 7,2. Des fractions chromatographiques de 2mL ont été recueillies à l'aide d'un collecteur Pharmacia LKB-Redi-100 (Amersham Pharmacia Biosciences. Oakville, Ontario, Canada). La pureté des fractions de CP a été évaluée par la mesure du rapport de densité optique (D.O.) à 610_{nm}/D.O. à 280_{nm}. Les fractions de CP ayant des valeurs du rapport égales ou supérieures à 0.04 ont été combinées.

La solution de CP résultante a été par la suite analysée par dosage de protéines. Sa pureté a été confirmée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) combinée à une coloration au bleu de coomassie et au nitrate d'argent ainsi qu'à un immunobuvardage utilisant un anticorps anti-CP (Dako, Mississauga, Ontario Canada) 1/2000. La solution de CP a été ensuite concentrée par centrifugation au moyen de tubes Amicon Ultra-15 munis d'un filtre d'une porosité limite de 5000 Da (EMD-Millipore, Billerica, MA, USA), tout en diluant deux fois dans l'eau nanopure afin de diminuer la concentration en potassium (une concentration élevée en potassium est un signal sécrétagogue pour les neurones). La solution finale avait une concentration d'environ 30mg/mL dans 100 mM KPi, pH 7.2. Cette solution a été ensuite stérilisée par passage sur un filtre de 0.2µm, et environ 250 mg de CP pure ont été obtenus à partir de 10L de sang.

Assumant une concentration d'environ 200 µg CP/mL dans le plasma de bœuf comme dans le plasma humain (Healy et Tipton, 2007) et un volume d'environ 500 mL de plasma par L de sang, le rendement en CP du protocole de purification est d'environ 25%. Les travaux de ce mémoire ont été réalisés avec 5 préparations différentes de CP.

2.2. Culture cellulaire

2.2.1. Propagation des cellules P19 indifférenciées

Les cellules de carcinome embryonnaires P19, originalement obtenues du Dr M. W. McBurney (Université d'Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada), ont été cultivées en monocouches selon le protocole déjà décrit (Maltais *et al.*, 2003; Ducharme *et al.*, 2010). Les cellules ont été cultivées dans un milieu complet fait de milieu minimal essentiel d'Eagle avec la modification alpha (*α-Modified Eagle's Essential Minimum*, α-MEM; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplémenté de 10% v/v de sérum fœtal bovin (FBS : Wisent Ino, St-Bruno, Qc, Canada), de 50U/mL de pénicilline et de 50µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) et ce, à 37°C et sous atmosphère humide de 5% CO₂. Les cellules ont été passées aux deux jours pour les maintenir dans un état non

différencié. Le milieu de culture a été alors aspiré et les cellules ont été rincés deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS : NaCl 0,8% p/v, KCl 0,02% p/v, KH_2PO_4 0,02%, Na_2HPO_4 0,115% p/v, pH 7,3). Pour faire décoller les cellules une solution de trypsine 0,025% p/v (Sigma-Aldrich) contenant 1mM EDTA (Sigma-Aldrich) a été utilisée. L'action de la trypsine a été arrêtée par l'addition d'un égal volume de milieu complet. Les cellules ont été transférées dans un tube à centrifuger de 15mL (Starsted) et individualisées par pipettages. Les cellules ont été observées sous microscope inversé TE (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), comptées à l'aide d'un hémacytomètre (Ficher Scientific, Montréal, Québec, Canada), et réensemencées à raison d'un million de cellules par pétri de grade tissulaire Corning de 100mm de diamètre (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) contenant 10ml de milieu complet.

2.2.2. Différenciation neuronale des cellules P19

Le protocole de différenciation neuronale des cellules P19 s'échelonne sur six jours dont 4 jours de différenciation en présence d'AR et 2 jours pour l'adhésion au support de culture et l'étalement des neurites (Maltais *et al.*, 2003; Ducharme *et al.*, 2010). Au jour du passage cellulaire, qui devenait le jour (j) 0 de la différenciation, 1,5 million de cellules ont été ensemencées dans un pétri de grade bactériologique (Sarsted) de 100mm de diamètre contenant 10ml de milieu de différenciation : α -MEM supplémenté de FBS (5% v/v) et de sérum de bœuf donneur (Donor Bovine Serum, DBS; 5%) (PAA Laboratories, Rexdale, ON, Canada), d'antibiotiques (50U/ml de pénicilline et 50U/ml de streptomycine) et de 0,5 μ M d'AR (Sigma Aldrich). Le milieu de différenciation a été remplacé à j2 par une nouvelle provision du même milieu et les cellules réincubées jusqu'à j4. Durant ces quatre jours, les cellules forment des sphéroïdes flottants souvent appelés corps embryoïdes. À j4 les sphéroïdes contenant les néo-neurones ont été transféré dans un tube de 15ml (Sarstedt), rincés deux fois avec du PBS et dissociés à l'aide d'une solution contenant 0,025% p/v de trypsine et 1mM d'EDTA. La réaction a été arrêtée par ajout d'un même volume de milieu complet. Les néo-neurones ont été lavés avec du PBS, resuspendus dans du milieu

Neurobasal supplémenté (NBS : milieu Neurobasal contenant 2% v/v du supplément B27 (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), 0.5 mM de L-glutamine, 50 U/ml de pénicilline et 50 U/ml de streptomycine). Les cellules ont ensuite étéensemencées à une densité de 800 cellules/mm² dans des pétris de grade tissulaire Corning de 60 mm de diamètre, préalablement gélatinisés avec une solution de 0,1% de gélatine (Sigma Aldrich) dans l'eau nanopure stérile puis rincées à l'eau nanopure stérile. Généralement, dans les expérimentations, le j4 de la différenciation correspond au temps 0 pour les traitements subséquents avec la CP et les autres agents (fig 2.1).

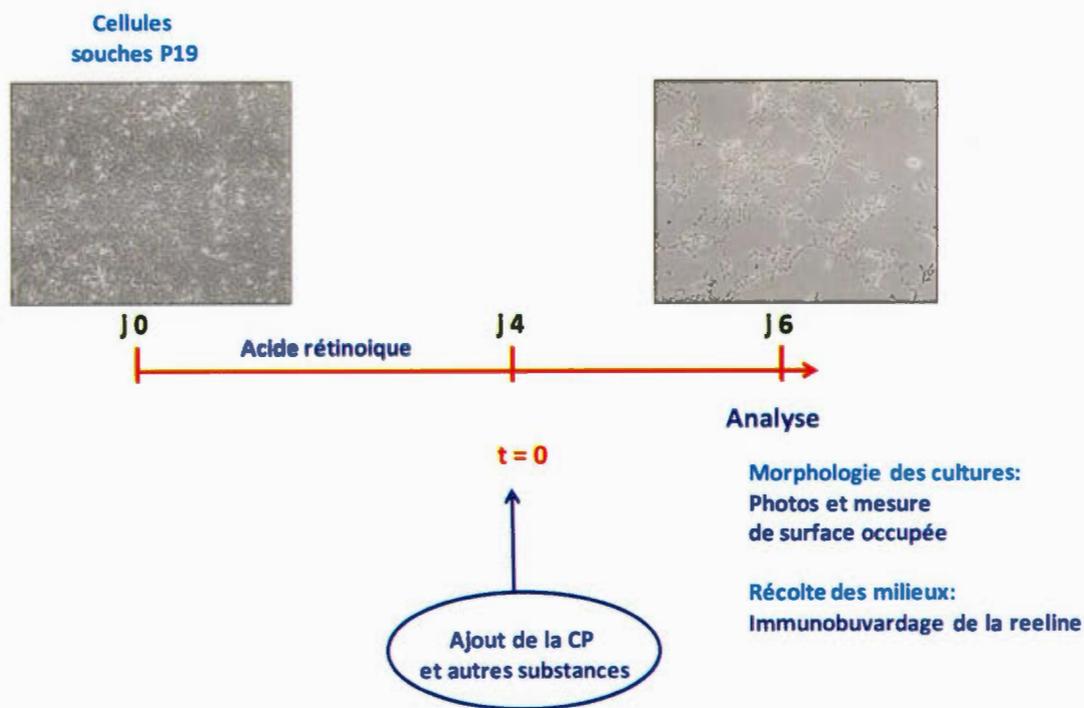


Figure 2.1 Génération et traitement des néo-neurones P19. Le protocole de différenciation neuronale des cellules P19 s'échelonne sur six jours dont 4 jours de différenciation en sphéroïdes flottants en présence de l'acide rétinoïque et 2 jours pour l'adhésion au support de culture et l'étalement des neurites. La CP ainsi que les autres substances ont été ajoutées dans le milieu à j4 de la différenciation neuronale. À j6 les cultures sont analysées.

2.2.3. Traitement des neurones P19 avec la CP et autres substances

À moins d'indication contraire, la CP ainsi que les autres substances de traitement ont été ajoutés dans le milieu NBS à j4 de la différenciation, au moment même de l'ensemencement des neurones dans les pétris tissulaires gélatinisés. Les neurones ainsi ensemencés et leurs témoins (sans traitement) ont été incubés pendant 48h (donc jusqu'à j6). La provenance et la concentration finale des substances ajoutées ainsi que les informations sur leur action reconnue sont indiquées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 Informations sur les substances autres que la CP utilisées pour traiter les neurones P19

Nom de la substance	Abréviation	Source	Action	Concentration finale
<i>soybean trypsin inhibitor</i>	SBTI	Sigma-Aldrich	Inhibiteur de protéase à sérine à large spectre	100 µg/ml
Aprotinine	Apro	Roche Diagnostics, Laval, QC	Inhibiteur de protéase à sérine à large spectre	30 µg/ml
<i>dibutryl-adenosine-3',5'-cyclic monophosphate</i>	db-cAMP		Activateur de la PKA	1 mM
<i>N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide</i>	H89		Inhibiteur de la PKA	10 µM
<i>8-(4-chlorophenylthio)-2'-O-methyladenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>	8-pCPT-Me-cAMP		Activateur d'EPAC	100 µM
<i>2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one</i>	PD98059	Cedarlane Labs, Burlington, ON	Inhibiteur de ERK1/2	10 µM
<i>2,3-bis[amino[(2-aminophenyl)thio]methylene]butanedinitrile</i>	U0126		Inhibiteur de ERK1/2	1 µM
<i>2-morpholin-4-yl-8-</i>	Ly294002	Cell Signaling	Inhibiteur de la	1 µM

<i>phenylchromen-4-one</i>		Technology	PI3K	
sérine ₂ cuivre	Ser ₂ Cu	Dr M.A. Mateescu, UQAM, Montréal, QC	Composé à cuivre	200 µM
histidine ₂ cuivre	His ₂ Cu	Préparé selon Maltais <i>et al.</i> , 2003	Composé à cuivre	200 µM
(E)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-6+1H-inden-1-one	BCI	Sigma-Aldrich	Activateur de ERK1/2	0.1 et 0.5 µM
chelerytrine	Chelerytrine	Sigma-Aldrich	Inhibiteur de la PKC	100nM
phorbol myristate acetate	PMA	Sigma-Aldrich	Activateur de la PKC	100 et 400nM
Rivaroxaban	Rivaroxaban	Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada	Inhibiteur du facteur X de coagulation sanguine	10 µM
peptide 7B2	7B2	Dr A. Basak, Institut de recherche de l'Hôpital d'Ottawa, Ottawa, ON	Inhibiteur de la convertase PC2	10 µM
acide ε-amino caproïque	ε-ACA		Inhibiteur du tPA	24mM

Dans certaines expériences, qui seront identifiées dans la section Résultats, les substances de traitement ont été ajoutées à différents temps entre j4 et j6 ou même 1 heure avant l'ajout de la CP à j4.

À la fin des traitements, les cultures ont été photographiées sous microscope pour évaluer l'agrégation neuronale. Les milieux de cultures ont été récoltés pour l'analyse de la reeline par SDS-PAGE et immunobuvardage, et les cellules ont été recueillies, soumises à l'extraction des protéines totales, et analysées pour diverses protéines cellulaires par SDS-PAGE et immunobuvardage.

2.3. Analyse morphologique des cultures cellulaires et mesure de l'agrégation neuronale

L'analyse morphologique des cultures a été effectuée à l'aide d'un microscope inversé TE (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), muni d'un objectif Ph1 DL (Nikon Canada, Mississauga, ON, Canada), équipé avec une caméra Nikon Digital Sight (DS)-U2 et contrôlé par le logiciel NIS-Elements Advanced Research 3.0. La surface occupée par les cellules a été utilisée pour évaluer l'agrégation des neurones. Les photos de cellules prises en microscopie ont été ajustées à 16.5 cm x 22 cm et placées sous une grille transparente de 638 carrés de 56 mm² chacun. Les carrés occupés par les neurones sont comptés sachant que l'agrégation diminue la surface occupée par les cellules. Chaque résultat pour un pétri donné est la moyenne de trois photos. Les résultats ont été exprimés en pourcentage du nombre de carrés occupés dans la condition contrôle de la même expérience (le 100%).

2.4. Collecte des milieux de culture et préparation des extraits de protéines cellulaires

À j6 de la différenciation neuronale, des concentrations finales de 1 mM d'orthovanadate, 1 mM de NaF et 1x d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Cocktail 1, 300x, Sigma-Aldrich) ont été ajoutées dans les milieux de culture. Par la suite, les milieux ont été prélevés et clarifiés par centrifugation et entreposés à -20°C jusqu'à l'analyse de la reeline par immunobuvardage. Les neurones adhérents à la surface du pétri ont été grattés et transférés dans des tubes Sarsted de 15ml et centrifugés à 1000g pendant 1 min à température ambiante. Les culots ont été suspendus dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6, 1% v/v Nonidet P-40, 0.5% v/v desoxycholate, 0.1% v/v SDS (tous de Sigma-Aldrich)), supplémenté avec 1 mM orthovanadate, 1 mM NaF et 1x du cocktail-1 d'inhibiteurs de protéases. Les suspensions obtenues ont été incubées à 4°C pendant 30 min tout en vortexant tous les 5 min puis centrifugées à 10 000g pendant 10 min à l'aide d'une microcentrifugeuse à eppendorf 5415C. Les surnageants (extraits de protéines cellulaires totales) ont été dosés pour leur contenu en protéines.

2.5. Dosage de protéines

Le dosage a été fait selon une micro-méthode avec de l'acide bicinchonique (BCA) (Pierce Chemical, Rockford, Illinois, USA). Le réactif a été préparé selon les recommandations du fabricant. Une microplaque de 96 puits a été utilisée pour le dosage. Dans chaque puits, 150 μ l d'échantillon ont été ajoutées à 150 μ l de réactif microBCA, et la microplaque a été incubée pendant 2h à 37°C puis lue à 562nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU-6 (Beckman, Mississauga, Ontario, Canada). Des solutions de 0 à 40 μ g/ml d'albumine sérique bovine (BSA) préparées dans l'eau distillée ont été utilisées pour faire la courbe d'étalonnage.

2.6. SDS-PAGE

La SDS-PAGE a été faite selon des procédures déjà publiées (Ducharme et al., 2010), et les conditions sont détaillées dans le tableau 2.2. Les échantillons ont été préparés dans du tampon échantillon (Tris-HCl 0,31M pH 6,8, 1,25% v/v 2-mercaptoéthanol, 0,5% p/v SDS, 1,56% p/v bleu de bromophénol, 1,25%v/v glycérol). Chauffés, puis chargés sur le gel.

Tableau 2.2 Conditions d'électrophorèse et d'électrotransfert

Protéines	% PA : Gel entassement Gel séparation	Chauffage des échantillons	Quantité d'échantillon	Electrophorèse	Electro- transfert
CP	5 10	100°C 5 min	0.02- 0.2 ug	100V x 15 min + 150V jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol	20V x 35 min
Reeline	4 6	100°C 3 min	25uL milieu de culture	75V x 30 min + 150V x 1h	0,08A/gel x 2h
Lysats cellulaires	5 12	100°C 5 min	20 ug protéine	100V x 15 min + 150V jusqu'à la sortie du bleu	20V x 35 min

PA, polyacrylamide

L'appareil d'électrophorèse utilisé est un MiniProtean TetraCell (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA). Un mélange de marqueurs de poids moléculaire Broad Range (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a aussi été déposé sur gel. Les gels ont ensuite été colorés au bleu de Coomassie, ou soumis à l'électrotransfert et immunobuvardage.

2.7. Coloration au bleu de coomassie

Les gels ont été incubés dans une solution de bleu de Coomassie (40% de méthanol, 10% acide acétique et 0.1% de bleu brillant de Coomassie) pendant 2 h sous agitation, puis lavés deux fois pendant 15 min avec la solution de décoloration (40% de méthanol, 10% acide acétique), transférés sur cellophane par séchage durant 48h, et numérisés à l'aide du scanner Canon PIXMA MP480.

2.8. Électrotransfert et Immunobuvardage

L'électrotransfert a été fait sur des membranes de polyvinylidène difluoré (PVDF) (Boehringer-Mannheim, Montréal, QC, Canada) préalablement activées pendant 1 min dans du méthanol (MeOH), lavées dans l'eau nanopure et équilibrées pendant 15 min au minimum dans le tampon de transfert (10mM Tris, 96mM glycine, 20% MeOH et 0.01% SDS). Les gels ont été équilibrés pendant 25 min dans le tampon de transfert, et les ensembles gel :PVDF ont été utilisés dans un système d'électrotransfert semi-humide de la compagnie W.E.P (The W.E.P. Company, Seattle, Washington, USA) pour la reeline, et dans un système Trans-blot SD de Bio-Rad (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) pour la CP et les autres protéines. Les conditions d'électrotransfert sont indiquées dans le tableau 2.2.

À la fin du transfert, les membranes de PVDF ont été mises 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% lait écrémé en poudre, pendant la nuit, à 4°C, sous agitation douce.

Les membranes ont été lavées avec du TBS-Tw quatre fois pendant 15 min puis incubées pendant 1h avec l'anticorps primaire désiré, sous agitation. Les membranes ont été lavées quatre fois pendant 15 min avec du TBS-Tw puis incubées pendant 1h à température ambiante et sous agitation avec l'anticorps secondaire approprié conjugué à la peroxydase du raifort (HRP). Après 1h l'anticorps secondaire a été retiré et les membranes ont été relavées quatre fois pendant 15 min avec du TBS-Tw. Le réactif utilisé pour la détection des complexes anticorps-antigènes a été l'Immobilon Western Chemiluminescence HRP Substrate (Millipore, Nepean, ON, Canada). Un mL du substrat a été mis sur les membranes pendant 1 min, puis les membranes ont été exposées à un film HyBlot CL (Denville Scientific Inc., Toronto, ON, Canada). Les films ont été numérisés à l'aide d'un scanner Canon PIXMA MP480. La liste des anticorps primaires et secondaires se trouve dans les tableaux 2.3 et 2.4. L'analyse densitométrique a été faite avec Image J 1.43u Analysis Software (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

Tableau 2.3 Anticorps primaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage.

Anticorps	Dilution	Temps d'incubation	Animal hôte	Fournisseur (no de catalogue)
Anti-CP humaine	1/1000 TBS-Tw 3% BSA 0.01% NaN ₃	1h à température ambiante	Lapin (IgG)	Dako, Mississauga, Ontario, Canada (A0031)
Anti-reeline (G10)	1/1000 Signal boost 1% sérum de chèvre	1h à température ambiante	Souris Monoclonal (IgG1)	Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA (553731)
anti-ERK1/2	1/1 000 TBS-Tw 3% BSA 0.01% NaN ₃	Toute la nuit à 4°C	Lapin (IgG)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA (9102)
anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	1/1000 TBS-Tw 3% BSA 0.01% NaN ₃	Toute la nuit à 4°C	Lapin (IgG)	Cell Signaling Technology (9101)
anti-β-actin	1/1 0000 TBS-Tw 3% BSA 0.01% NaN ₃	Toute la nuit à 4°C	Mouse (IgG)	Sigma-Aldrich (A5441)

Tableau 2.4 Anticorps secondaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage.

Anticorps	Dilution	Temps d'incubation	Animal hôte	Fournisseur (no de catalogue)
POD-anti-IgG de souris	1/2500 TBS-Tw 3% lait	1h à température ambiante	Chèvre (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Mississauga, Ontario, Canada (115-035-062)
POD-anti-IgG de lapin	1/10000 TBS-Tw 3% lait	1h à température ambiante	Dindon (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., (711-035-152)
POD-anti-IgG de souris	1/2500 Signal boost	1h à température ambiante	Chèvre (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., (115-035-062)

2.9. Étude préliminaire: Chromatographie d'affinité sur SBTI-agarose

Une mini-colonne contenant 400 µL de SBTI-agarose a été préparée, puis a été équilibrée avec dix volumes de milieu Neurobasal (Invitrogen), et chargée avec 3mL de milieu de culture de neurones de contrôle ou traités avec la CP, obtenus au j4 de la différenciation neuronale. Par la suite, la colonne a été lavée avec dix volumes de milieu Neurobasal pour se débarrasser des molécules non adsorbées et l'élution a été faite par l'ajout de 132 µL de tampon échantillon 4x. L'éluat recueilli a été centrifugé et le surnageant résultant a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du β-mercaptoéthanol (SDS-PAGE). Les gels ont été colorés au bleu de coomassie.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. L'action neuroagrégative de la CP est inhibée par l'activation de la voie AMPc/PKA

Les cellules P19 ont la capacité de se différencier en neurones lorsqu'elles sont cultivées en sphéroïdes en présence de 0,5 μ M d'AR pendant 4 jours (Rudnicki et McBurney, 1989). À j4, les sphéroïdes sont trypsinisés et les neurones ainsi individualisés sont transférés dans des pétris tissulaires. À j6, les neurones contrôles forment des monocouches de cellules bien étalées qui projettent de longs neurites (fig. 3.1A). Si les néo-neurones sont traités avec de la CP depuis j4 jusqu'à j6, ils forment des agrégats au lieu de s'étaler, occupant ainsi moins de surface de culture, et présentent beaucoup moins de longs neurites (figs 3.1 A et B). En plus de son action neuroagrégative, la CP stimule la génération de la reeline 300K dans les cultures de neurones P19 qui expriment déjà les formes 400K et le 180K (figs 3.1C et D; comparer contrôle et CP). Ces deux actions neurotrophiques de la CP ont déjà été rapportées (Maltais *et al.*, 2003; Ducharme *et al.*, 2010).

Dans le but de comprendre les mécanismes à la base de ces deux actions, ainsi que leur interrelation, nous avons analysé l'effet de différents modulateurs de signalisation cellulaire.

Les résultats des figures 3.1 A et B montrent que le traitement des neurones P19 avec du db-AMPC, une forme de l'AMPC qui traverse les membranes cellulaires, a inhibé la neuroagrégation induite par la CP. Il est connu que l'AMPC active deux voies : la voie de la protéine kinase A (PKA) et la voie de la protéine d'échange directement activée par l'AMPC (EPAC). Pour savoir laquelle est impliquée dans le phénomène d'inhibition de la neuroagrégation par le db-AMPC, un activateur de la voie EPAC a été utilisé et il n'a pas empêché l'action neuroagrégative de la CP de se produire. Cela indiquerait que c'est le couple AMPc-PKA plutôt que le couple AMPc-EPAC qui est responsable de l'inhibition de la neuroagrégation.

L'analyse du profil protéique de la reeline présenté dans les figures 3.1 C et D montre que l'AMPC et l'activateur d'EPAC ne peuvent pas induire eux-mêmes la génération de la reeline 300K, et leur combinaison avec de la CP (CP + AMPc et CP + EPACa) n'a eu que peu d'effet

sur le niveau de production de la reeline 300K observé avec la CP seule. On note peut-être une légère tendance de l'AMPC à diminuer le niveau de cette forme de reeline mais loin de la très forte inhibition exercée sur la neuroagrégation.

Notons que lorsque l'AMPC est ajouté 8h après la CP, elle est encore capable d'inhiber la neuroagrégation sans affecter la génération de la reeline lorsqu'il est ajouté 8h après la CP (Ducharme, 2013).

En résumé, l'action neuroagrégative de la CP est inhibée par l'activation de la voie AMPC/PKA et non par celle d'AMPC/EPAC. L'activation de l'une ou l'autre de ces voies n'a eu aucun effet sur la génération de la reeline 300K. Fait intéressant, le clivage de la reeline se produit même si l'agrégation est inhibée. Parmi les deux modèles proposés par Ducharme *et al.*(2010)(fig 1.10), les résultats présents appuieraient un modèle d'action indépendante de la CP plutôt qu'un modèle d'actions séquentielles.

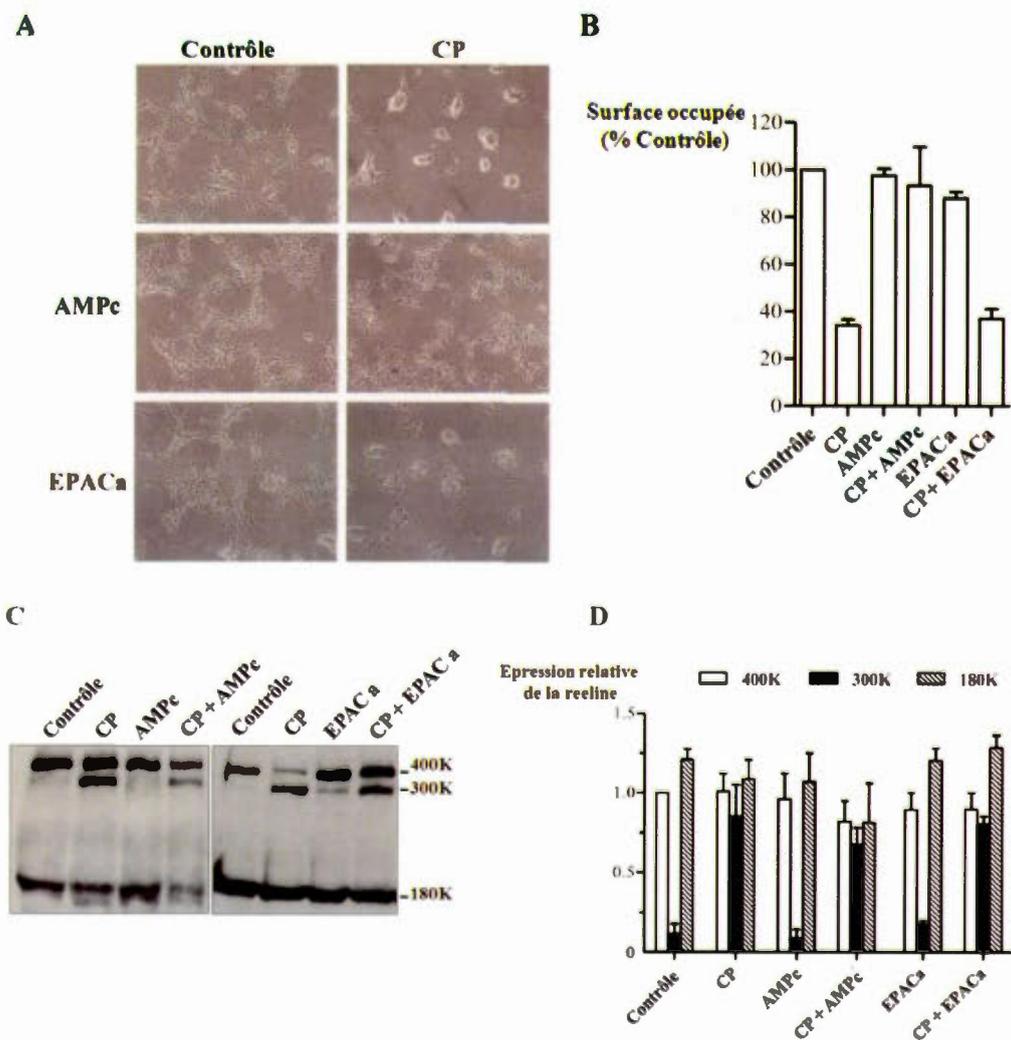


Figure 3.1 L'action neuroagréative de la CP est inhibée par l'activation de la voie AMPc/PKA. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL), de db-AMPe (1mM), un activateur de PKA et d'EPAC, ou de 8-PCPT-Me-AMPe (EPACa ; 100µM), un activateur d'EPAC. (A) Photographies (100x) des cultures cellulaires et (B) évaluation de la surface occupée par les cellules, au j6. Les résultats sont exprimés en pourcentage du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes. (C) un immunobuvard représentatif de l'expression de la reeline dans les milieux de culture et (D) analyse densitométrique de différents immunobuvars de reeline. Les résultats sont exprimés par rapport à la reeline 400K du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes.

3.2. Un prétraitement des neurones avec des inhibiteurs de la signalisation d'ERK1/2 diminue la génération de la reeline 300K stimulée par la CP

L'impact de la signalisation d'ERK1/2 a aussi été investiguée vu le rôle connu d'ERK1/2 dans les signalisations neuronales. Des neurones P19 ont été traités avec PD98059 (PD) et U0126 (U), deux agents pharmacologiques qui inhibent la signalisation d'ERK1/2. Ces deux inhibiteurs inhibent la kinase MKK1 qui phosphoryle et active ERK1/2 (Davies *et al.*, 2000). Pour assurer une inhibition efficace d'ERK1/2, les inhibiteurs ont été ajoutés dans le milieu de culture 1h avant la CP. Cela donne plus de temps aux inhibiteurs de s'introduire dans les neurones et d'agir. La CP a été ensuite ajoutée seule (PD/+CP et U/+CP) ou en combinaison avec de l'AMPc (PD/+CP+AMPc et U/+CP+AMPc).

Les résultats des figures 3.2 A et B montrent que PD et U n'ont pas empêché l'action neuroagréative de la CP et n'ont pas empêché non plus l'action inhibitrice de l'AMPc sur la neuroagréation induite par la CP.

Par contre, le traitement des neurones avec ces deux inhibiteurs d'ERK1/2 a diminué la génération de la reeline 300K induite par la CP, suggérant que la signalisation d'ERK1/2 est impliquée seulement dans l'action de la CP sur la production de la reeline 300K. La présence d'AMPc (PD/+CP+AMPc et U/+CP+AMPc) a amplifié l'action inhibitrice de PD98059 et U0126 sur le clivage de la reeline que nous donnerons plus loin.

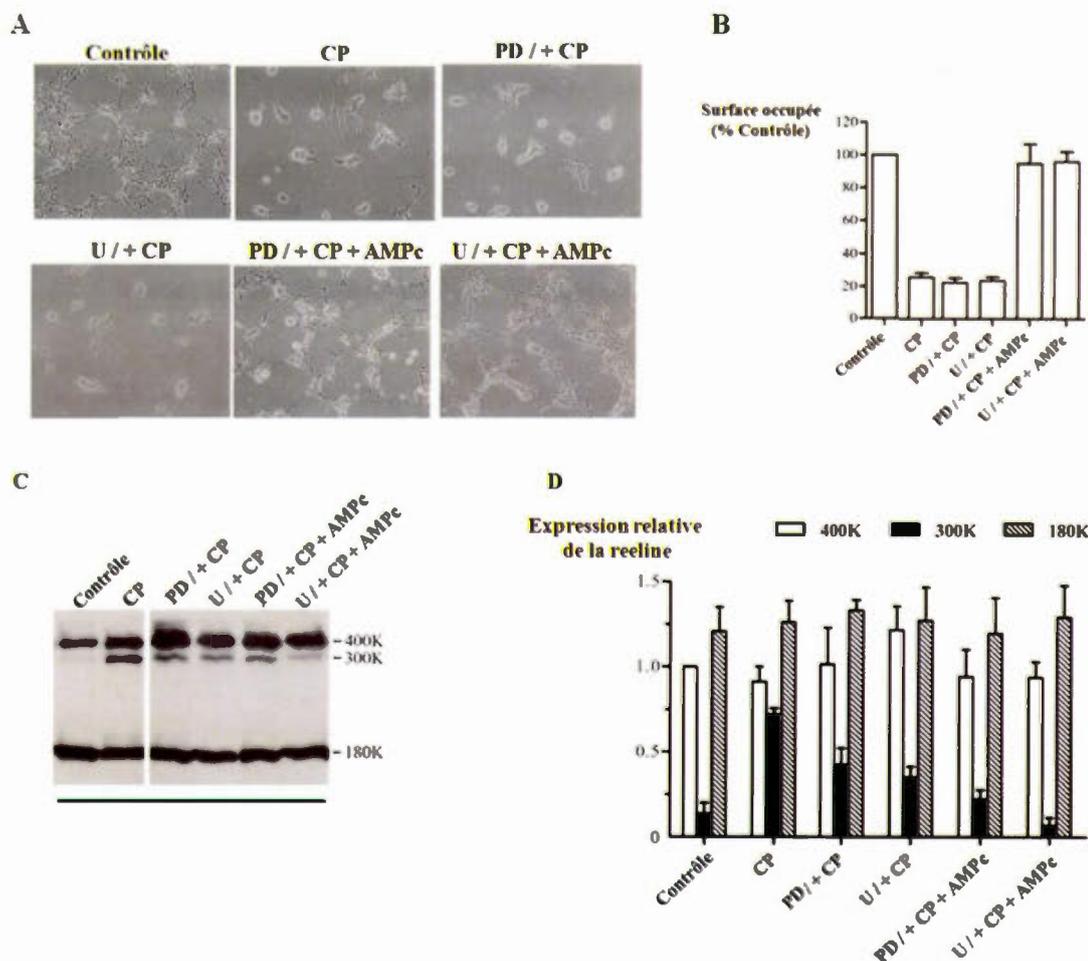


Figure 3.2 Un prétraitement des neurones avec des inhibiteurs d'ERK1/2 diminue la génération de la reeline 300K par la CP. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL) ou CP+AMPc (1 mM). Les inhibiteurs d'ERK1/2, le PD98059 (PD, 10 μ M) et le U0126 (U ; 1 μ M) ont été ajoutés 1 h avant la CP (PD/+CP ou U/+CP) ou bien 1 h avant la CP + AMPc (PD/+CP+AMPc ou U/+CP+AMPc). (A) Photographies (100x) des cultures cellulaires au j6 et (B) évaluation de la surface occupée par les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes. (C) un immunobuvard représentatif de la reeline dans les milieux de culture, les deux portions proviennent du même gel, et (D) analyse densitométrique des différents immunobuvards de la reeline. Les résultats sont exprimés par rapport à la reeline 400K du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes.

3.3. Effet d'ajouts plus tardifs d'inhibiteurs de la signalisation d'ERK1/2 sur les actions neurotrophiques de la CP

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons testé l'effet des inhibiteurs PD98059 et U0126 sur les actions neuronales de la CP lorsque ces inhibiteurs sont ajoutés en même temps que la CP (CP + PD et CP + U). Dans ce cas, comme dans le cas du prétraitement, les inhibiteurs n'ont pas empêché l'action neuroagrégitrice de la CP (Figs 3.3A et B). Cependant, contrairement à ce qui a été observé dans le prétraitement, il n'y a pas eu cette fois une inhibition de la génération de la reeline 300K (Figs 3.3 C et D).

Dans une troisième série d'expériences, nous avons testé l'effet des inhibiteurs lorsqu'ils sont ajoutés 8h après la CP. Le temps de 8h a été choisi parce que l'action neuroagrégitrice de la CP commence à être visible environ à ce moment-là (Ducharme, 2013). Nous avons pensé qu'un ajout trop précoce des inhibiteurs PD et U pouvait nous avoir fait manquer une possible action sur la neuroagrégitricité parce que les niveaux d'activité d'ERK1/2 auraient eu le temps de revenir au niveau initial avant une étape cruciale. Comme l'ajout à temps zéro (en même temps que la CP), l'ajout tardif (t=8h) des inhibiteurs (CP // + PD et CP // + U) n'a ni empêché l'agrégation des neurones P19 (Figs 3.3A et B), ni affecté les niveaux de production de la reeline 300K (Figs 3.3 C et D).

Les inhibiteurs d'ERK1/2 ont aussi été ajoutés à 8h en combinaison avec de l'AMPC (CP//+PD+AMPC et CP//+U+AMPC). La présence de l'AMPC dans le milieu a eu pour effet d'inhiber l'agrégation des neurones, un résultat attendu. Ce qui n'était pas attendu a été de voir une forte réduction de la production de la reeline 300K par la CP lorsque PD+AMPC ou U+AMPC ont été ajoutés à 8h (Fig 3.3C et D), alors que ni PD, ni U et ni AMPC n'a eu individuellement un effet sur la reeline 300K lorsqu'ajouté à 8h. Ainsi, si l'inhibition d'ERK1/2 peut diminuer la production de la reeline 300K en présence d'une neuroagrégitricité, cette inhibition est augmentée lorsqu'il n'y a pas de neuroagrégitricité.

Dans une quatrième série d'expériences, les inhibiteurs d'ERK1/2 ont été ajoutés à deux reprises, 1h avant la CP et 8h après la CP (PD/+CP//+PD et U/+CP//+U). Là encore, ces traitements n'ont pas empêché la neuroagrégation induite par la CP (Figs 3.3A et B). Un résultat inattendu de ce traitement combiné est une inhibition presque complète de la génération de la reeline 300K (Figs 3.3C et D). Il y a donc un apparent effet synergique, puisque PD ou U ajouté 1h avant la CP inhibe partiellement la production de la reeline 300K, et PD ou U ajouté 8h après la CP n'a aucun effet inhibiteur sur cette production.

Dans la fig 3.4, nous proposons un modèle qui rend compte des effets de l'AMPC et des inhibiteurs d'ERK1/2 sur les actions neurotrophiques de la CP. En présence de la CP, l'agrégation des neurones P19 (chemin 1) se produirait de façon indépendante de la génération de la reeline 300K (chemin 2). L'AMPc inhibe seulement l'agrégation des neurones P19 qui demeurent capables de produire la reeline 300K. L'inhibition très précoce d'ERK1/2 diminue de façon importante la génération de la reeline 300K sans affecter l'agrégation. Il reste encore une certaine production de la reeline 300K. Il est possible qu'un peu de reeline 300K puisse être produite grâce à l'agrégation cellulaire. Lorsque la voie ERK1/2 et l'agrégation sont bloquées, la production de la reeline 300K est complètement inhibée. Cette inhibition complète est aussi observée si on ajoute l'inhibiteur d'ERK1/2 à deux moments, très tôt (-1h) et tardivement (+8h) : ce traitement à deux additions n'affecte pas la neuroagrégation.

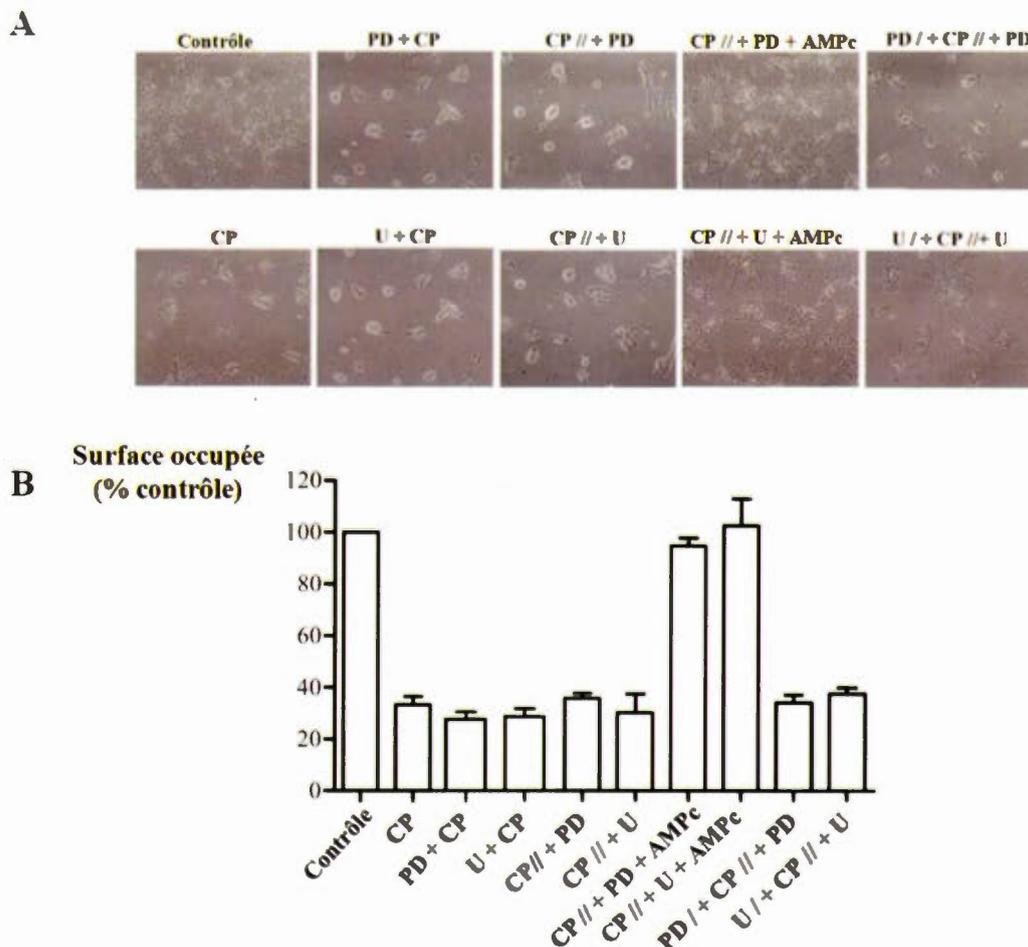


Figure 3.3 Effet d'ajouts plus tardifs d'inhibiteurs d'ERK1/2 sur les actions neurotrophiques de la CP. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP. Dans certaines cultures, le PD98059 (PD) et le U0126 (U) ont été ajoutées en même temps que la CP (PD+CP et U+CP), ou 8 h après la CP, soit seul (CP // + PD ou CP // + U) ou bien en combinaison avec du db-AMPC (CP // + PD + AMPc ou CP // + U + AMPc). Certaines cultures ont reçu deux fois PD ou U, soit 1 h avant la CP et 8 h après la CP (PD / + CP // + PD ou U / + CP // + U). (A) Photographies (100x) des cultures cellulaires au j6 et (B) évaluation de la surface occupée par les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes. (Suite page suivante).

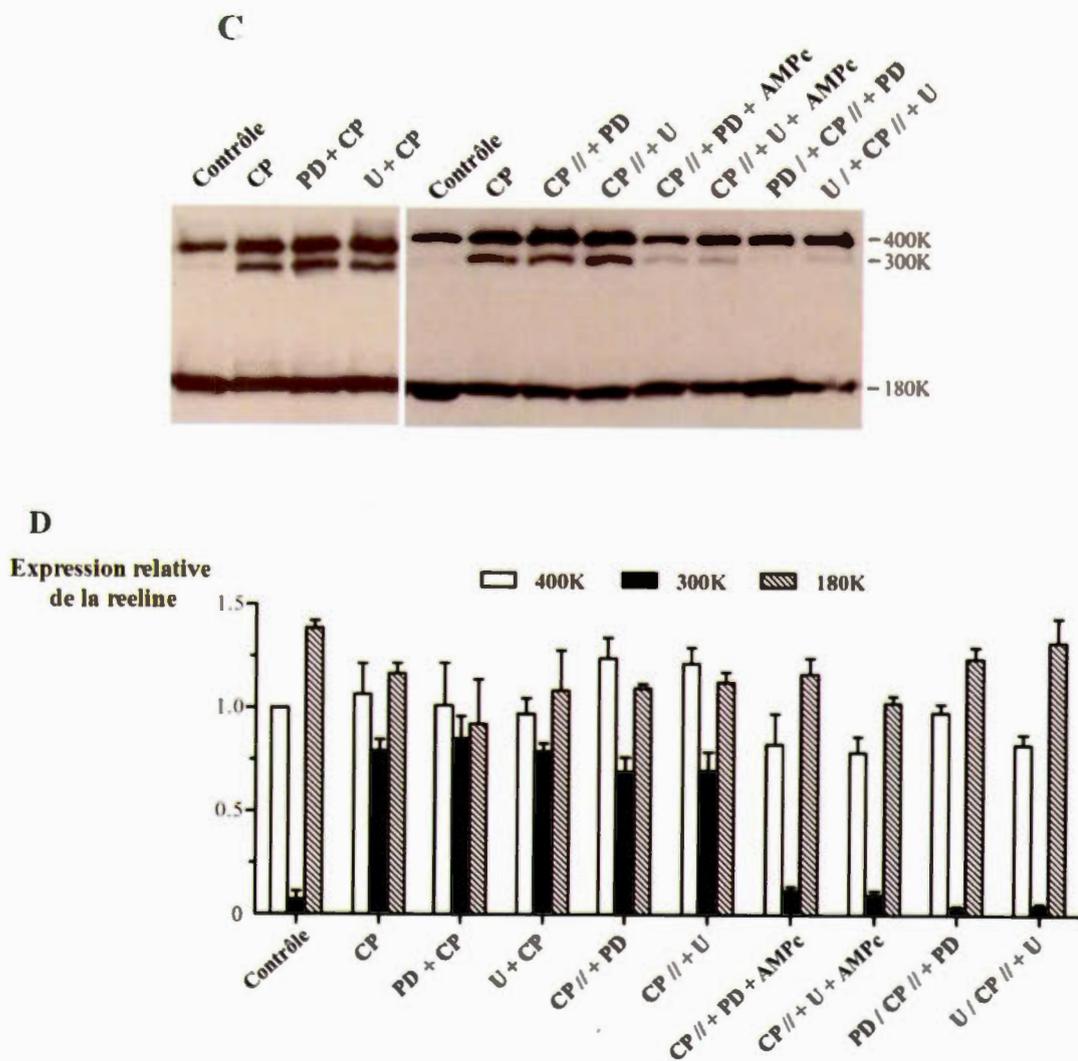


Figure 3.3 (Suite) : (C) Deux immunobuvards représentatifs de la reeline dans les milieux de culture et (D) analyse densitométrique de différents immunobuvards de la reeline. Les résultats sont exprimés par rapport à la reeline 400K du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes.

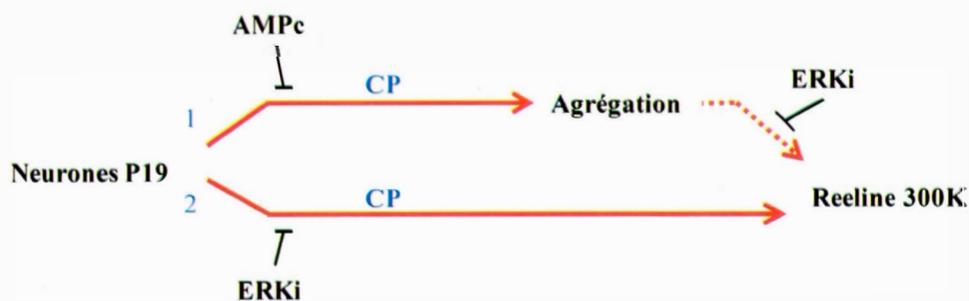


Figure 3.4 Résumé des effets de l'AMPc et d'inhibiteurs de la voie ERK1/2 sur les actions neurotrophiques de la CP. En présence de la CP, l'agrégation des neurones P19 (chemin 1) se produirait de façon indépendante de la génération de la reeline 300K (chemin 2). En effet, l'AMPc inhibe seulement l'agrégation des neurones qui demeurent capables de produire la reeline 300K, et l'inhibition très précoce d'ERK1/2 diminue grandement la génération de la reeline 300K sans affecter l'agrégation. Cependant, dans le cas de l'inhibition précoce d'ERK1/2, il reste encore une certaine production de la reeline 300K. Il est possible que de la reeline 300K puisse être produite grâce à l'agrégation cellulaire. Lorsque la voie ERK1/2 et l'agrégation sont bloquées, la production de la reeline 300K est complètement inhibée. Cette inhibition complète est aussi observée en inhibant ERK1/2 à la fois très précocement (à -1h) ainsi que tardivement (à +8h) et cela sans affecter la neuroagrégation.

3.4. Évaluation de l'effet d'autres modulateurs pharmacologiques de signalisation cellulaire sur les actions neurotrophiques de la CP

Outre l'AMPC, l'activateur d'EPAC et les deux inhibiteurs d'ERK1/2, d'autres agents pharmacologiques ont été utilisés en vue d'identifier d'autres voies signalétiques pouvant possiblement affecter les actions neuronales de la CP. Les molécules qui ont été testées sont un activateur de la PKC, le PMA (100nM et 400nM), un inhibiteur de la PKC, la chélérytrine (100nM), un inhibiteur de la PKA, le H89 (10µM), un inhibiteur de la PI3K, le Ly294002 (10µM), et un activateur d'ERK1/2, le BCI (0.1 et 0.5µM).

L'activation ou l'inhibition de la PKC n'empêche pas l'étalement normal des neurones dans la condition Contrôle ni l'action neuroagrégitrice de la CP (figures 3.5A et B). L'analyse de la reeline montre que l'activation de la voie PKC (CP+ PMA 100nM et CP+ PMA 400nM) donne des résultats inégaux mais la moyenne montre qu'il n'inhibe pas la génération de la reeline 300K induite par la CP. Cependant, l'inhibition de la voie PKC par la chelerytrine (CP+Chélérytrine, figs 3.5C et D) a diminué un peu les niveaux de reeline 300K en présence de CP. Plus précisément, dans deux études sur trois, la chélérytrine a inhibé la génération de la reeline 300K. Possiblement l'action de la chélérytrine pourrait être retestée.

Fait intéressant, les neurones incubés avec l'inhibiteur de PKA, le H89, en absence de la CP, se sont agrégés (figs 3.5A et B). Cet agent n'a pas inhibé l'action neuroagrégitrice de la CP. Les résultats obtenus avec H89 sont en accord avec ceux de la fig 3.1 obtenus avec l'AMPC. Ainsi, lorsque la voie PKA est inhibée par le H89, une neuroagrégitrice se produit, lorsqu'elle est activée par l'AMPC, l'agrégitrice induite par la CP est inhibée et les neurones montrent un étalement normal. Ceci soulève la possibilité que l'action neuroagrégitrice de la CP pourrait impliquer une inhibition de la voie AMPc/PKA. Comme le H89, le Ly 294002, un inhibiteur de la PI3K, induit lui-même une agrégation similaire à celle induite par la CP, et n'inhibe pas l'action neuroagrégitrice de la CP. Les observations faites à différents moments entre J4 et J6, ont montré que l'agrégitrice induite par la CP est installée au bout de 8h (annexe 1), tandis que l'agrégitrice induite par le H89 et le Ly294002 se produit après 24h de traitement.

L'effet des traitements pharmacologiques sur la génération de la reeline 300K a été analysé par immunobuvardage (fig 3.5 C et D). Aucun des deux agents pharmacologiques neuroagrégatifs, le H89 et le Ly294002, n'a stimulé la génération de la reeline 300K. Ils n'ont pas empêché non plus la production de la reeline 300K induite par la CP. Sur cet aspect, ils se distinguent donc de la CP.

Nous avons vu dans la section 3.2 que l'inhibition précoce d'ERK1/2 inhibe la production de la reeline 300K et nous avons voulu tester si un activateur d'ERK1/2 était capable d'induire le clivage de la reeline 300K en absence de la CP.

Le BCI à 0.1 ou à 0.5 μM n'a pas induit l'agrégation des neurones P19, ni empêché l'agrégation induite par la CP (fig 3.5A et B). Le BCI à 0.1 μM n'a pas augmenté la production de la reeline 300K par la CP. Contrairement à ce qu'on attendait, le BCI à 0.5 μM a empêché cette action. La raison de cela n'est pas claire, mais cette concentration du BCI pourrait avoir affecté plus largement les neurones parce que les niveaux totaux de reeline sont diminués (figs 3.5C et D).

D'après l'ensemble de ces résultats, trois voies semblent intéressantes pour étudier les deux actions de la CP: la voie AMPc/PKA qui est possiblement impliquée dans la neuroagrégation, et les voies ERK1/2 et peut-être PKC qui peuvent moduler le profil de la reeline.

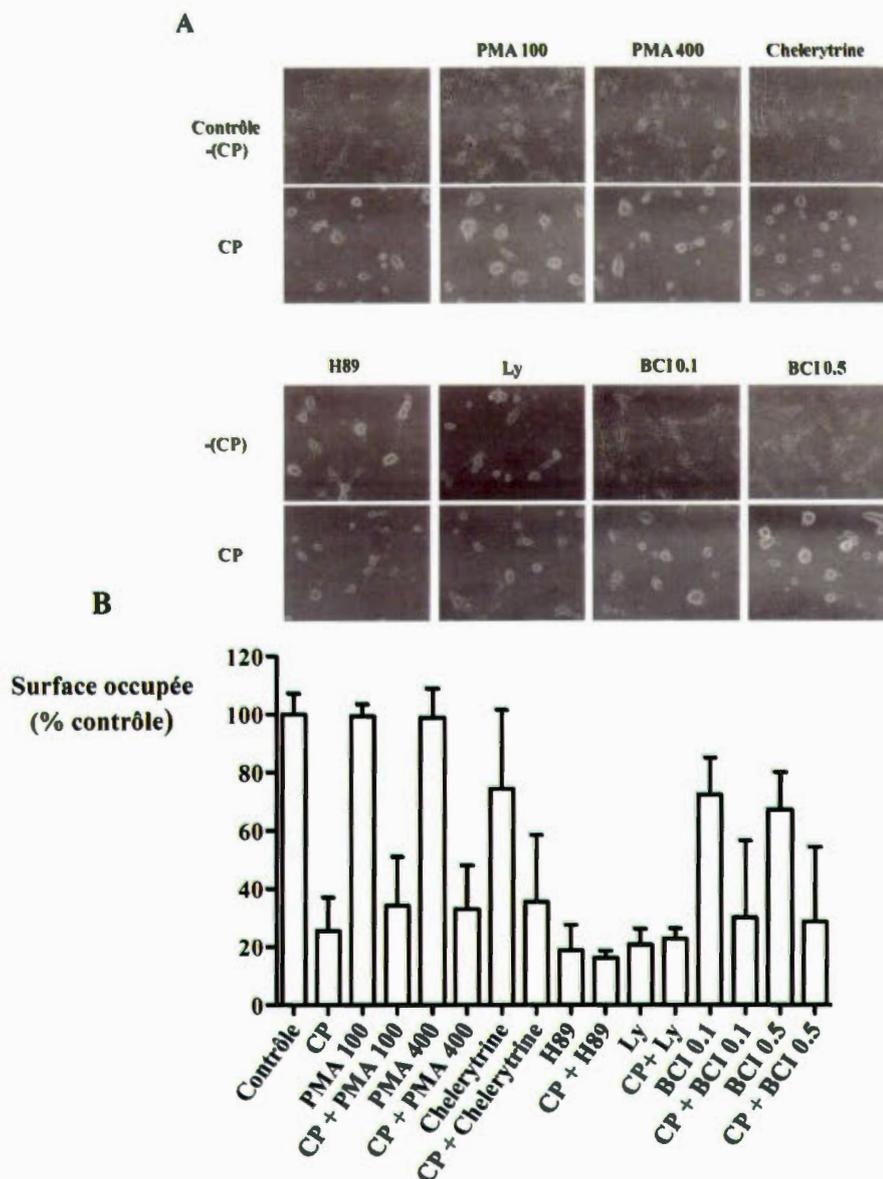


Figure 3.5 Évaluation de l'effet d'autres modulateurs de signalisation sur les actions neurotrophiques de la CP. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL), PMA (100 ou 400 nM), chélerytine (100nM), H89 (10 μ M), Ly294002 (Ly, 10 μ M), ou BCI (0.1 ou 0.5 μ M). (A) Photographie (100x) des cultures cellulaires au j6 et (B) évaluation de la surface occupée par les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes. (Suite à la page suivante).

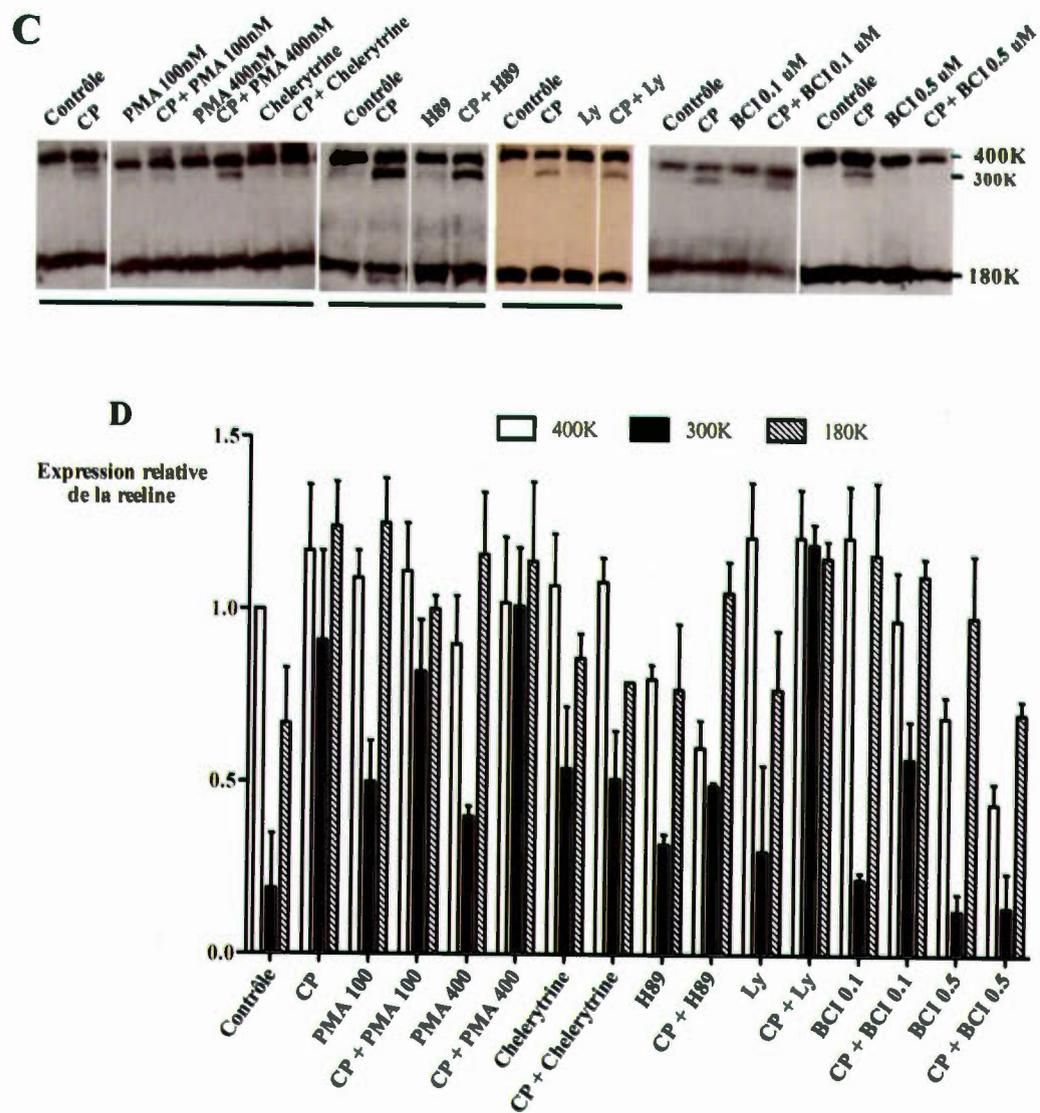


Figure 3.5 (suite) : (C) Des immunobuvards représentatifs de la reeline dans les milieux de culture (les panneaux qui proviennent d'un même gel sont réunis par un trait horizontal) et (D) analyse densitométrique des différentes immunobuvards de reeline. Les résultats sont exprimés par rapport à la reeline 400K du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes.

3.5. L'action neuroagrégative des inhibiteurs pharmacologiques H89 et Ly294002, celle du composé Ser₂cu et celle de la CP répondent aux mêmes inhibiteurs de protéases

La CP, le H89 et le Ly294002 peuvent, chacun, induire l'agrégation des neurones P19. Il est très pertinent de comparer la réponse de ces 3 molécules à divers inhibiteurs de protéases. D'une part, des réponses identiques peuvent éclairer sur les mécanismes des actions de la CP. D'autre part, considérant que les préparations de CP pourraient contenir des traces de protéases plasmatiques alors que cela n'est pas le cas des autres composés, des réponses de la CP qui ressemblent à celles du H89 et du Ly294002 vis-à-vis divers inhibiteurs de protéases valideraient les actions neuronales de la CP.

Les travaux de Ducharme *et al.* (2010) ont montré que l'action neuroagrégative de la CP est inhibée par le SBTI et l'Apro. Nous avons utilisé ces inhibiteurs pour caractériser l'action neuroagrégative du H89 et du Ly294002. Comme pour la CP, l'action neuroagrégative de ces deux composés a été inhibée par la combinaison SBTI+Apro (Fig 3.6)

Le SBTI et l'Apro inhibent un large spectre de protéases à sérine, ils agissent à peu près sur les mêmes protéases avec des affinités un peu différentes. Nous avons donc testé des inhibiteurs plus spécifiques. Deux protéases à sérine connues pour leur expression dans les neurones ou pour leur implication dans le développement du cerveau ont été ciblées et leurs inhibiteurs respectifs ont été testés. Le peptide 7B2 est un inhibiteur naturel de la convertase PC2, une protéase à sérine extracellulaire exprimée par les neurones P19. Le composé ϵ -ACA est un inhibiteur chimique du tPA, il empêche la liaison de cette protéase à sérine à la surface cellulaire et donc son action à ce site. Aussi, nous nous sommes intéressés au Rivaroxaban, un inhibiteur apparemment spécifique du facteur X de la coagulation sanguine. Nous nous sommes intéressés au facteur X à cause des homologies de séquence entre la CP et les facteurs V et VIII, et les interactions de ces deux facteurs avec le facteur X. Lorsqu'il est activé, le facteur X forme un complexe avec le facteur V pour cliver la thrombine (Pittman *et al.*, 1994). Les facteurs V et VIII n'ont pas d'activité protéasique mais le facteur X, oui. Le rôle du facteur VIIIa est d'augmenter l'efficacité du facteur IXa à activer le facteur X (Fang *et al.*, 2005).

Les résultats de la fig.3.6 montrent que l'action neuroagréative de la CP ainsi que celles du H89 et du Ly294002 sont inhibées par le Rivaroxaban mais seulement partiellement par le 7B2 et pas du tout par l' ϵ -ACA (figs 3.6A et B).

La CP comporte 6 atomes de cuivre dans sa structure qui sont importants pour ses diverses fonctions. Ils pourraient être importants pour la neuroagréation et le clivage de la reeline. La Ser_2Cu , un composé à cuivre, a été testée sur les neurones P19 et a été capable d'induire leur agrégation sans toutefois être capable de stimuler la génération de la reeline 300K (annexe 2). Le SBTI/Apro et le rivaroxaban inhibent l'agréation induite par Ser_2Cu , le 7B2 le fait partiellement et l' ϵ -ACA pas du tout.

Tout comme la CP, le Ly29400 et le H89, la Ser_2Cu répondent de la même façon aux différents inhibiteurs de protéases testés. Selon les résultats, le tPA et la convertase PC2 seraient peu ou pas impliqués dans le phénomène de la neuroagréation induite par la CP, le H89, le Ly294002 et la Ser_2Cu , alors qu'une protéase ayant des caractéristiques similaires à celles du facteur X, ou alors le facteur X lui-même, pourrait être impliquée.

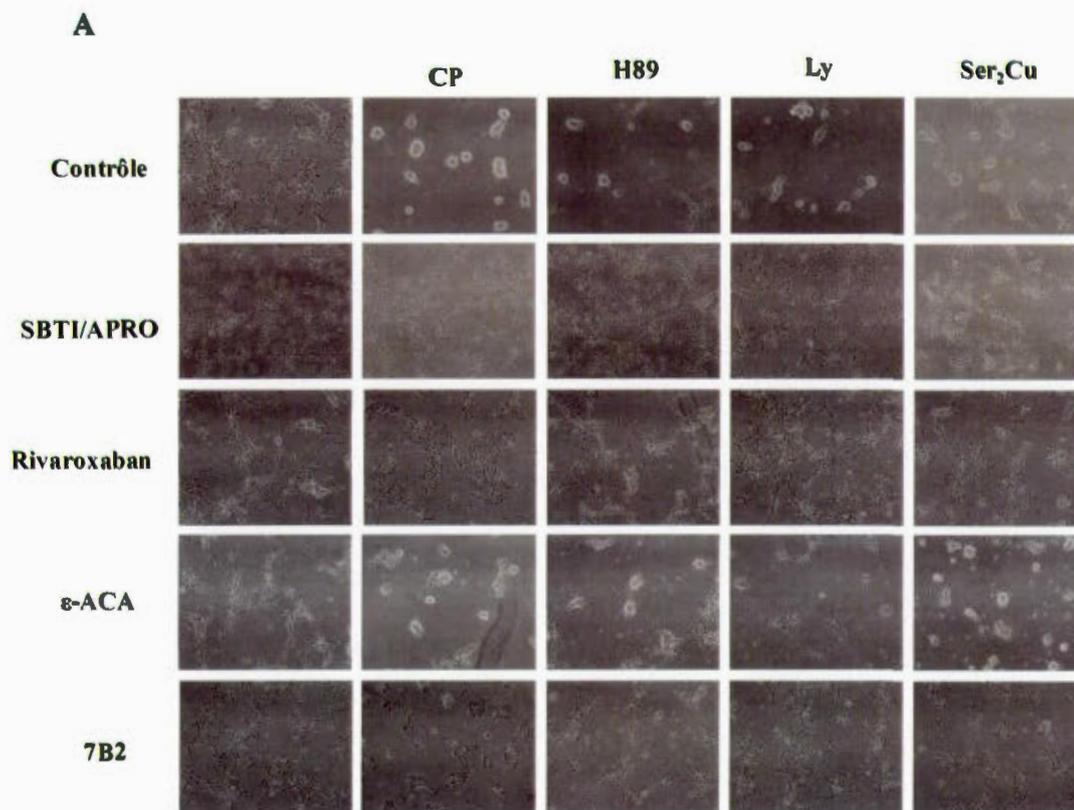


Figure 3.6 L'action neuroagréative des inhibiteurs pharmacologiques H89 et Ly294002, du composé Ser₂Cu et de la CP répondent pareillement à une sélection d'inhibiteurs de protéases à sérine. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL), H89 (10µM), Ly294002 (Ly, 10µM), Ser₂Cu (100µM), SBTI/ Apro (100µM/30µM), Rivaroxaban, (10µM), ε-ACA (24mM) et le polypeptide 7B2 (10µM). (A) Photographie (100x) des cultures cellulaires au j6. (suite page suivante).

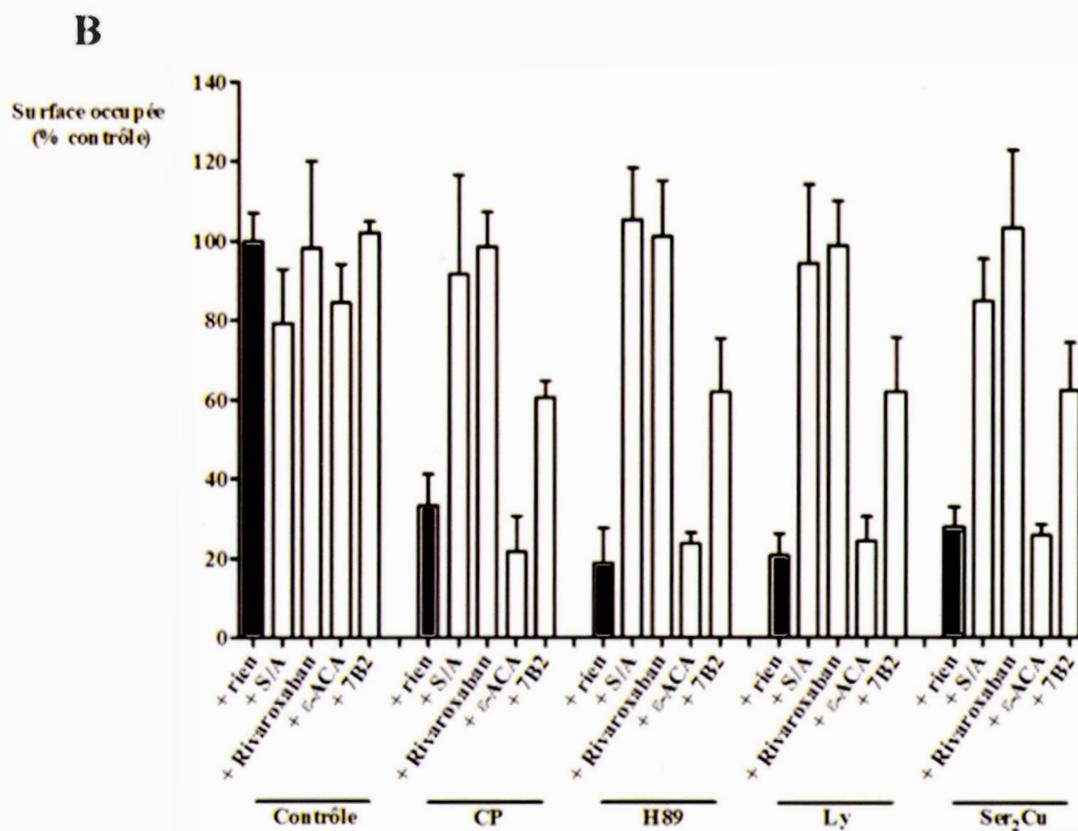


Figure 3.6 (suite) (B) Évaluation de la surface occupée par les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes.

3.6. Effets d'inhibiteurs de protéases à serine spécifiques sur la génération de la reeline 300K stimulée par la CP

Nous venons de voir qu'en plus du SBTI/Apro, le Rivaroxaban inhibe la neuroagrégation induite par la CP, alors que des inhibiteurs du tPA et de la PC2 le font peu ou pas. Nous avons testé ensuite l'effet de ces inhibiteurs sur l'action de la CP sur la reeline. Nous rappelons ici que le H89, le Ly et la Ser₂Cu n'ont pas d'influence sur le profil de la reeline et n'ont donc pas été étudiés dans cette série d'expériences.

L'analyse de la reeline par immunobuvardage (figs 3.7A et B) montre que le Rivaroxaban, qui a inhibé l'agrégation induite par la CP, inhibe aussi la génération du fragment 300K de la reeline. Les niveaux de 400K reeline sont légèrement plus petits en présence de 10µM 7B2 que dans la condition contrôle. Un test avec des concentrations plus élevées de 30 et 60 µM de 7B2 a baissé encore davantage les niveaux de 400K et de 180K (résultats non montrés). À 60 µM, les neurones étaient aussi bien étalés et bien adhérents que les neurones contrôles ce qui suggère qu'il n'y a pas de toxicité. En présence de la CP et du 7B2 10 µM, les niveaux de 300K étaient légèrement plus faibles comparativement à la condition CP seule. Cela peut être dû à des niveaux plus faibles de reeline totale qu'à une réduction du clivage C-t de la reeline.

Le ε-ACA, qui n'a pas eu d'effet sur l'agrégation, a peu d'effet sur la génération de la reeline 300K (fig. 3.7). En conclusion, le SBTI/Apro et le Rivaroxaban inhibent les deux actions neurotrophiques de la CP, tandis que le peptide 7B2 et le ε-ACA n'ont pas ou ont peu d'effet sur ces deux actions.

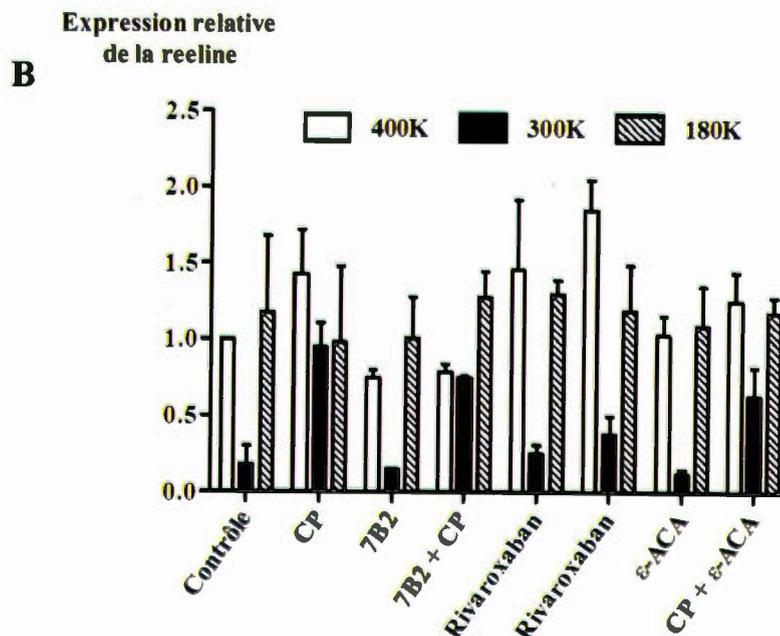
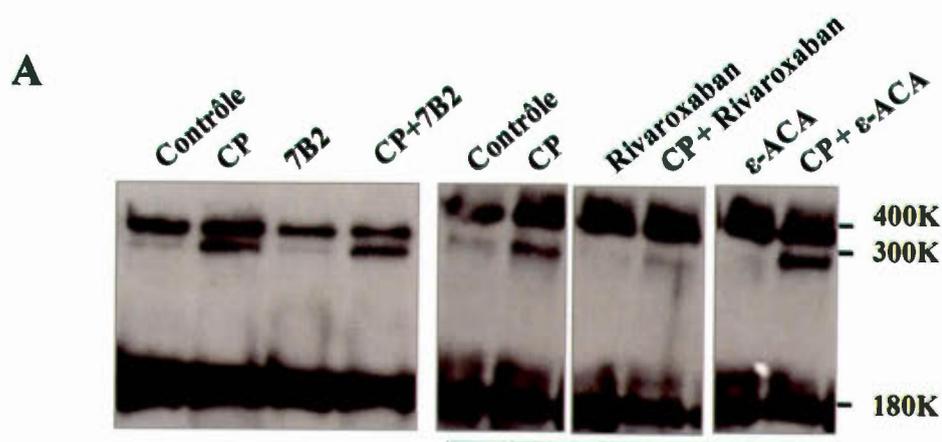


Figure 3.7 Effet d'une sélection d'inhibiteurs de protéases à sérine sur la génération de la reeline 300K en réponse à la CP. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL), du polypeptide 7B2 (10 μ M), de Rivaroxaban, (10 μ M) ou d' ϵ -ACA (24mM). (A) Des immunobuvards représentatifs de la reeline dans les milieux de culture et (B) analyse densitométrique des différentes immunobuvards de la reeline. Les panneaux, qui proviennent d'un même gel sont réunis par un trait horizontal. Les résultats sont exprimés par rapport à la reeline 400K du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes.

3.7. Étude plus poussée des effets du SBTI et de l'Apro sur les actions neurotrophiques de la CP

Nous avons évalué les capacités individuelles du SBTI et de l'Apro à inhiber les actions de la CP. Les résultats de la fig 3.8 montrent que c'est effectivement le cas, aussi bien pour la neuroagrégation (Figs 3.8A et B) que pour la génération de la reeline (Figs 3.8 C et D). L'effet inhibiteur de la combinaison SBTI/APRO a été tout aussi efficace lorsque leur concentration était diluée de 5 fois. Dans ces expériences le SBTI et l'Apro ont été ajoutés à t=0.

Pour pouvoir déterminer la fenêtre du temps d'action de la ou des protéases à sérine responsables des actions neurotrophiques de la CP, la combinaison SBTI/APRO a été ajoutée à différents moments, depuis 1h jusqu'à 8h après l'addition de la CP dans le milieu de culture. Les effets sur la neuroagrégation et sur le profil de la reeline ont été évalués à 48h (fig. 3.9). L'ajout du SBTI/Apro 1h après celui de la CP a empêché la neuroagrégation, les neurones étaient aussi bien étalés que dans les cultures n'ayant pas reçu de CP (Contrôle)(Panneau A). Par contre, l'ajout de S/A à des moments plus tardifs (2h et plus) n'a pas empêché plus l'action neuroagrégative de la CP. Ceci veut dire que la protéase responsable de la neuroagrégation est active dans la première ou les deux premières heures d'incubation. L'analyse du profil de la reeline dans les milieux de culture (panneau B) montre que la CP stimule la génération de la reeline 300K et que l'ajout des inhibiteurs SBTI et Apro entre 0h et 8h inhibe toujours ce clivage de la reeline.

Ces résultats suggèrent l'implication d'au moins deux protéases dans les actions de la CP. L'une, responsable de la neuroagrégation, serait active dans les deux premières heures suivant l'ajout de la CP aux neurones et l'autre, responsable du clivage de la reeline en fragment de 300K, aurait une activité plus tardive. Remarquons encore une fois que la reeline 300K est produite même si la neuroagrégation est inhibée.

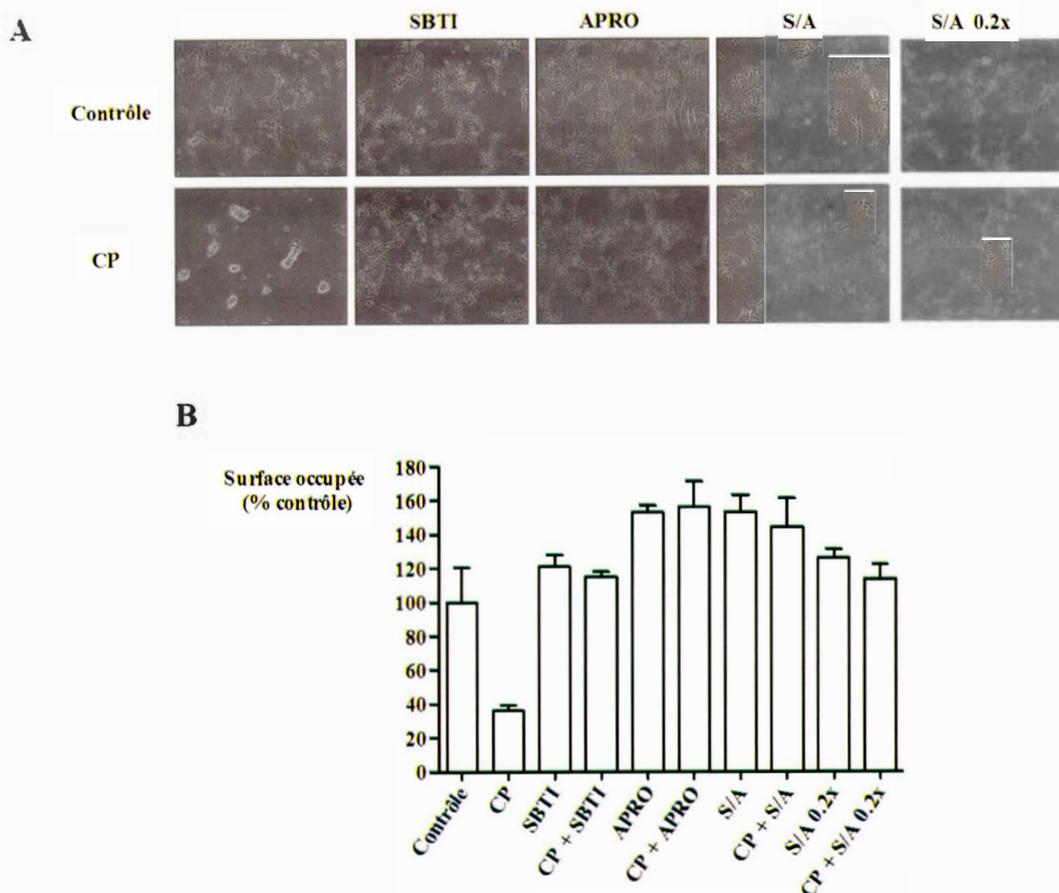
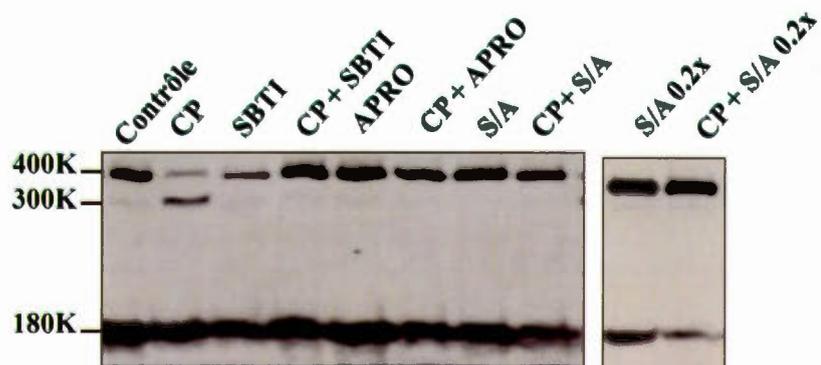


Figure 3.8 Les inhibiteurs SBTI et Apro inhibent les deux actions neurotrophiques de la CP.

Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL), SBTI (1x=100 µg/mL) et Apro (1x=30 µg/mL) (1x), les inhibiteurs de protéases ont aussi été utilisés de façon combinée (S/A) et avec une concentration de 0.2x. (A) Photographies (100x) des cultures cellulaires au j6 et (B) évaluation de la surface occupée par les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage du Contrôle et rapportés comme moyennes ± SEM d'au moins trois études indépendantes. (suite page suivante).

C



D

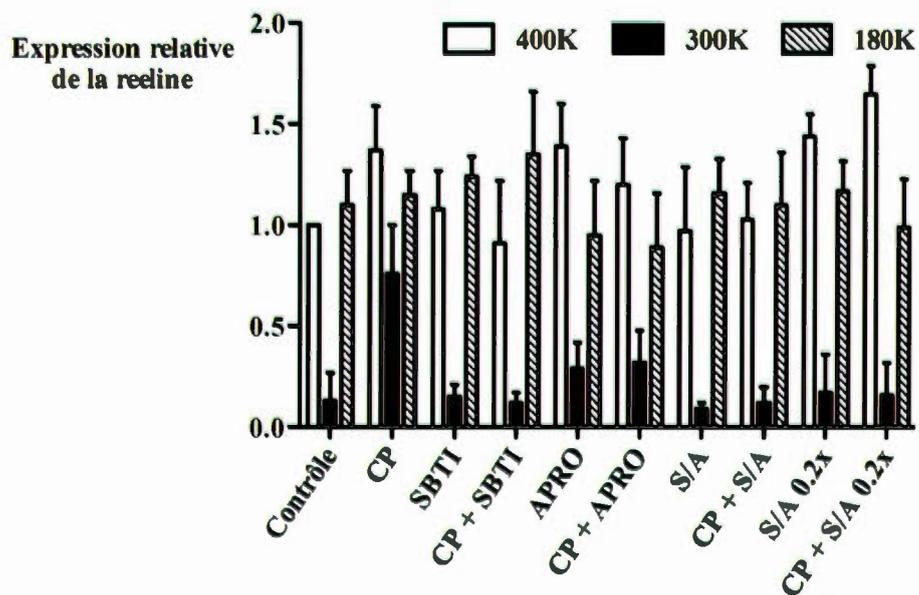


Figure 3.8 (Suite) (C) Immunobuvard représentatif de la reeline dans les milieux de culture et (D) analyse densitométrique des différents immunobuvards de reeline. Les résultats sont exprimés par rapport à la reeline 400K du Contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes.

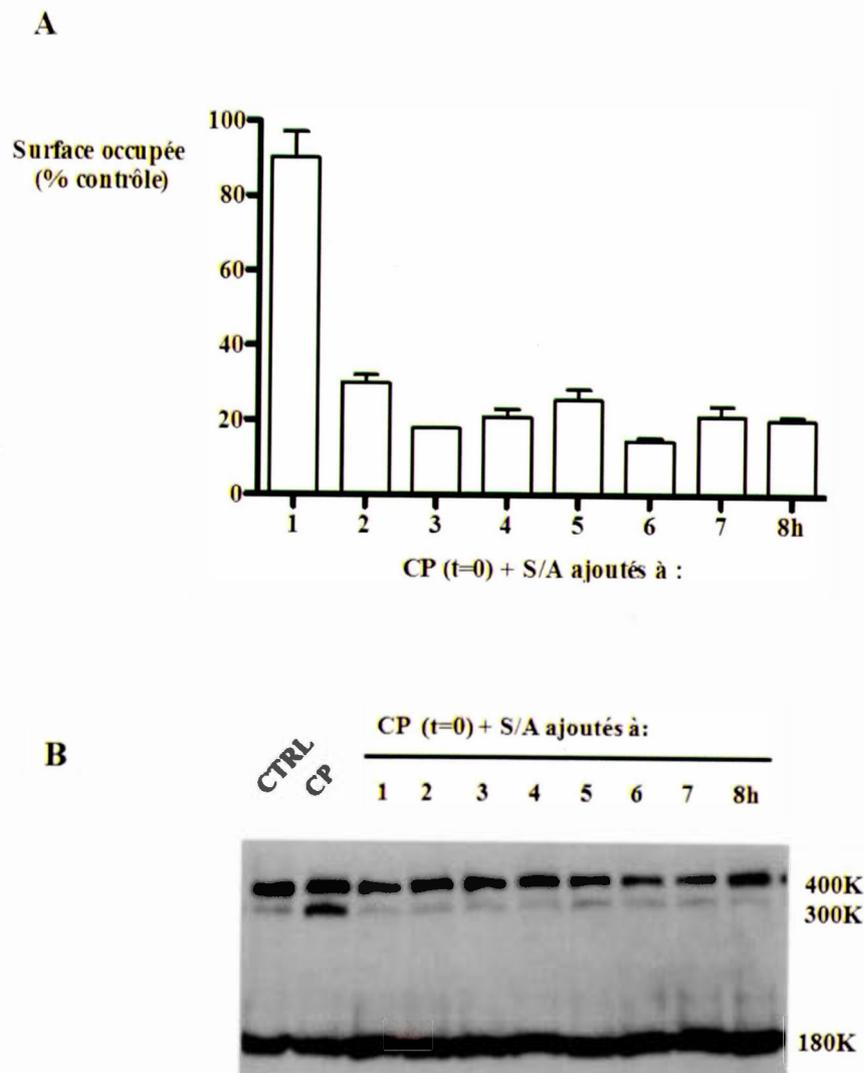


Figure 3.9 Effet du temps d'ajout du SBTI et de l'Apro sur les actions neurotrophiques de la CP. Les neurones P19 de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL). Les inhibiteurs de protéases SBTI et Aprotinine ont été ajoutés à différents moment (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h et 8h) aux milieux de culture de neurones P19 traités au temps 0 avec la CP. (A) évaluation de la surface occupée par les neurones au j6. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM de deux études indépendantes. (B) un immunobuvard représentatif de la reeline dans les milieux de culture (n=2).

3.8. Étude préliminaire de chromatographie de milieux de culture sur billes de SBTI-agarose

Il a déjà été montré que les deux actions de la CP sont inhibées par les inhibiteurs de protéases SBTI et aprotinine. Ces inhibiteurs agissent de façon extracellulaire, ce qui soulève différentes possibilités concernant la localisation cellulaire de la ou des protéases impliquées. Ces enzymes pourraient être associées à la membrane plasmique et présenter un site catalytique extracellulaire (une ecto-protéase) ou bien elles pourraient être solubles dans le milieu de culture (une protéase sécrétée ou, encore, une ecto-protéase qui aurait été détachée de la cellule).

D'autre part, les résultats de la figure 3.9 montrent que l'activité protéase importante pour la neuroagrégation a une fenêtre temporelle d'action bien précise : en dessous de 2h ou, plus sûrement, durant l'heure suivant l'addition de la CP. Cela suggère que l'on pourrait utiliser les milieux de culture de la première heure pour purifier la protéase à sérine responsable de la neuroagrégation afin de la caractériser et l'identifier, si cette protéase est soluble. Aussi, les milieux de culture de neurones témoins et traités avec la CP ont été récoltés au bout d'une heure et analysés par chromatographie sur SBTI-agarose.

Sur une mini-colonne de SBTI-agarose équilibrée avec du milieu Neurobasal, des échantillons de 3mL du milieu de culture de neurones contrôle ou de neurones traités avec la CP pendant une heure ont été déposés. Après un lavage avec du milieu Neurobasal, l'éluat a été fait avec du tampon échantillon 4x. L'éluat recueilli a été centrifugé, et le surnageant analysé par SDS-PAGE. Le gel coloré au bleu de Coomassie et numérisé est montré dans la fig 3.10.

La CP, le milieu Neurobasal et le supplément B27 purs avaient été déposés sur ce gel pour servir de référence, ces éléments étant déjà présents dans les milieux de culture à analyser. Dans la piste 1, la CP pure existe sous la forme majoritaire de 132K. Si des molécules de SBTI étaient décrochées des billes d'agarose durant la chromatographie, elles donneraient une bande à 21k comme le SBTI pur (pistes 2, 10 et 11). Le supplément B27 donne une bande à 66K qui correspondrait à l'albumine fortement présente dans ce supplément (piste 8), et le

milieu Neurobasal (sans le supplément B27) ne donne pas de bande en accord avec le fait qu'il ne contient pas de protéines.

Les milieux sont susceptibles de contenir diverses protéases. Les échantillons de milieu contrôle ont été analysés avec et sans ajout d'inhibiteurs de protéases (cocktail I de Sigma Aldrich) et ce, pour voir s'il y a une différence sur le gel entre les pistes 3 et 4 (duplicata sans inhibiteurs) et la piste 5 (avec inhibiteurs). Les inhibiteurs de protéases peuvent occuper le site catalytique de la protéase et l'empêcher ainsi de se lier aux billes de SBTI-agarose. On peut ainsi déterminer la spécificité de la liaison d'une protéine au SBTI immobilisé sur l'agarose. Il y a peu ou pas de différence entre les pistes 3,4 et 5.

Pour repérer la protéase candidate impliquée dans les actions neurotrophiques de la CP, on peut comparer le profil de protéines retenues sur SBTI-agarose des milieux de culture contrôles et ceux traités avec la CP. Une protéase activée par la CP se lierait sur les billes de SBTI-agarose et donnerait une bande sur gel qui ne serait pas présente dans le cas des milieux contrôle. Par contre, la protéase pourrait déjà être active; dans ce cas, son signal électrophorétique ne serait pas différent entre les deux conditions.

La piste 5 et la piste 6 contiennent respectivement des milieux de culture contrôle et CP chacune sans inhibiteurs de protéases. Dans la piste 6, il y a une bande foncée à 132K qui correspondrait à la CP. Deux bandes identifiées avec des flèches rouges sont présentes davantage dans les milieux de culture traités avec de la CP, elles pourraient correspondre à des protéases. Leur poids moléculaire est d'environ 32K et 39K.

L'extraction de protéines des membranes plasmiques des neurones P19 a aussi été faite en utilisant une trousse (Plasma membrane extraction kit, BioVision, California, USA), et l'extrait protéique obtenu a été analysé par chromatographie sur SBTI-agarose mais les résultats n'ont pas été concluants à cause de la trop faible quantité de protéines obtenue.

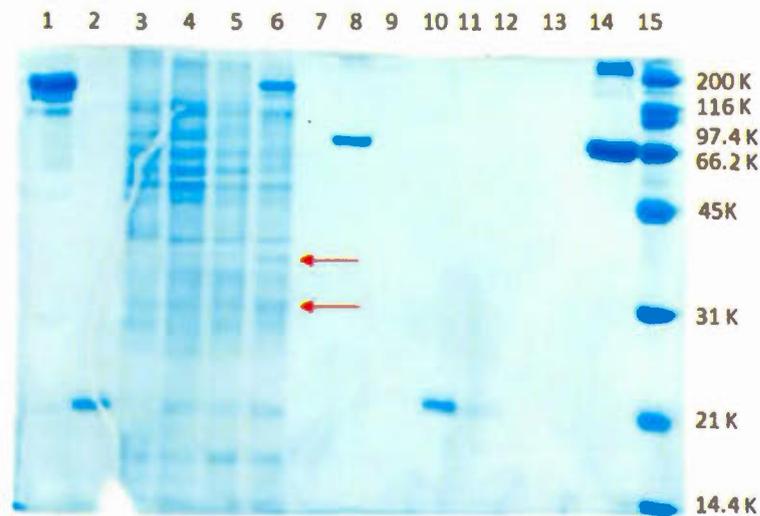


Figure 3.10 Analyse, par SDS-PAGE, des échantillons obtenus par chromatographie d'affinité sur SBTI-agarose. Photos d'un gel de 10% polyacrylamide obtenu par SDS-PAGE et coloré au bleu de Coomassie. Les pistes contenaient 1: la CP pure 2ug , 2: le SBTI 2ug, 3 et 4: 20µl Milieu neuroconditionné CTRL du j4 récolté à 1h et conservé avec des inhibiteurs de protéases, 5: 20µl Milieu neuroconditionné CTRL du j4 récolté à 1h, conservé sans inhibiteurs de protéases, 6: 20µl Milieu neuroconditionné CP du j4 récolté à 1h, conservé sans inhibiteurs de protéases, 7: vide, 8: 20µl du supplément B27 dilué 1:10000, 9: 20µl de milieu Neurobasal, 10: SBTI 2ug, 11: SBTI 0.2ug, 12: vide, 13: vide, 14: 20 µl du supplément B27 dilué 1:1000, 15: Etalons de PM Broad Range (PM donnés en Da à droite du gel). Tous les échantillons contenaient du β -mercaptoéthanol. Le gel a été séché puis numérisé. Les deux flèches rouges indiquent deux bandes un peu plus foncées par rapport à la condition contrôle, elles peuvent être dues à des protéases.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les travaux de ce mémoire ont été réalisés en utilisant des cellules-souches de type embryonnaire P19, qui ont la capacité de se différencier en neurones sous l'effet de l'AR. Les neurones obtenus ressemblent beaucoup à ceux du SNC (Jeannotte *et al.*, 1997; MacPherson *et al.*, 1997; Parnas et Linial, 1997; Cadet et Paquin, 2000) ce qui rend les cellules P19 très intéressantes pour étudier le rôle de la CP dans un contexte de développement du cerveau.

Nos travaux antérieurs ont montré que les neurones P19 nouvellement différenciés se regroupent en agrégats en présence de la CP, ce qui nous a suggéré que cette présence pourrait avoir un rôle organisationnel dans le développement du cerveau (Ducharme *et al.*, 2010).

En plus de son rôle de ferroxidase régulatrice du métabolisme du fer et de son effet neuroagrégatif, la CP a affecté le profil protéique de la reeline, une protéine très importante pour la migration et la lamination des neurones dans le cerveau (Jossin *et al.*, 2011). Nous avons observé déjà que les neurones P19 expriment les formes 400K et 180K de la reeline, et la CP stimule la génération de la forme 300K par ces neurones.

Avant d'entreprendre le présent travail, nous ne savions pas comment les deux actions de la CP, neuroagrégation et modulation de la reeline étaient reliées. Deux modèles de relation ont été proposés. **A** : un modèle d'actions séquentielles dans lequel la CP doit induire l'agrégation des neurones P19 pour que la génération de la reeline 300K soit stimulée. La génération de la reeline 300K serait alors une conséquence de l'agrégation. **B** : un modèle d'actions indépendantes (Ducharme *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus avec l'AMPC et deux inhibiteurs de la phosphorylation d'ERK appuient le modèle d'actions indépendantes (Fig 4.1). Par contre, les deux actions impliquent une protéase à sérine commune ou deux protéases à sérine similaires i.e. qui répondent à SBTI, Apro et Rivaroxaban.

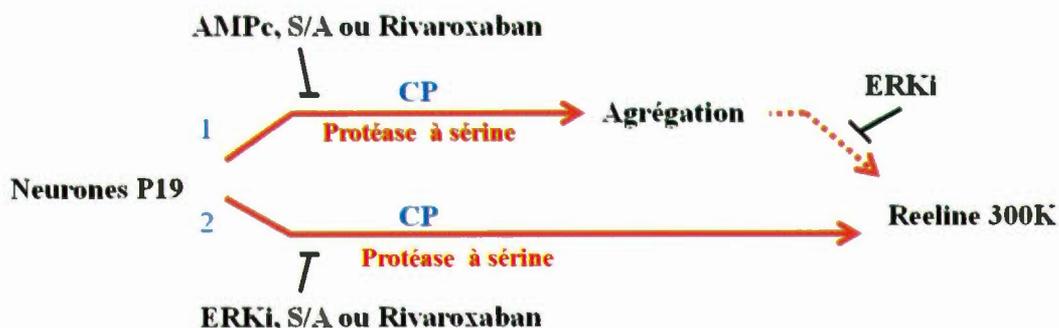


Figure 4.1 Résumé des effets de modulateurs de kinases et de protéases à sérine sur les actions neurotrophiques de la CP. Les deux actions de la CP, soient l'induction de la neuroagrégation et la stimulation de la génération de la reeline 300K, sont indépendantes. L'AMPC, un activateur de PKA, inhibe la première action alors que des inhibiteurs de la voie ERK1/2 inhibent la seconde. Par contre, les deux actions dépendent d'une ou de protéases à sérine sensible aux inhibiteurs SBTI/Apro et Rivaroxaban. Ce pourrait être une protéase commune aux deux actions ou spécifique à chacune d'elles. Dans chaque cas, la protéase pourrait être unique ou membre d'une cascade protéolytique.

4.1. Mécanismes pouvant être impliqués dans les actions neuronales de la CP

4.1.1. Kinases et neuroagrégation

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'action neuroagrégative de la CP sur les neurones P19, nous avons investigué quelques voies de signalisation connues pour intervenir dans le développement du SN.

❖ AMPC

Il a déjà été rapporté que la voie AMPC/PKA a un rôle-clé dans la régulation et la croissance neuritiques, et permet la régénération des axones dans le SNC (Aglah *et al.*, 2008 et par

Bogoch et Linial, 2008). Une autre étude faite par Tegenge *et al.* (2011) montre que l'activation de la voie PKA favorise la croissance neuritique obtenue de cellules embryonnaires humaines NT2.

Les résultats de la fig 3.1 montrent que la voie AMPc/PKA affecte l'action neuroagrégative de la CP parce que l'ajout de l'AMPc en même temps ou après un traitement avec la CP défait les agrégats et redonne aux neurones leur forme bien étalée. Cette forme étalée est probablement favorable à l'extension de neurites.

L'AMPc peut agir de deux façons : soit il n'est pas impliqué dans l'action de la CP et il inhibe la signalisation de la CP via une autre voie de signalisation, soit il est impliqué et on peut alors proposer que la CP diminue les niveaux d'AMPc dans la cellule. Pour distinguer ces deux possibilités, on pourrait mesurer les taux d'AMPc dans les neurones P19 suite à un traitement avec la CP.

Pour confirmer les résultats obtenus avec l'AMPc, nous avons utilisé un inhibiteur de la voie AMPc/PKA, le H89. En absence de CP, le H89 induit une agrégation des neurones P19 similaire à celle induite par la CP. De plus l'action agrégative de la CP et celle du H89 dépendent d'une protéase à sérine qui est affectée par le SBTI, l'Apro et le Rivaroxaban, ce qui ajoute à la ressemblance des deux actions neuroagrégatives. Pour le moment, on ne sait pas si la CP et le H89 partagent une même protéase à sérine.

On sait que l'AMPc active deux voies : la voie PKA et la voie EPAC. Nous avons testé un activateur d'EPAC sur les neurones P19 et il n'a inhibé ni la neuroagrégation ni la génération de la reeline 300K. Ceci suggère que la voie AMPc/EPAC n'est pas impliquée dans les actions trophiques de la CP.

Il faut souligner que l'AMPc inhibe la neuroagrégation induite par la CP même s'il est ajouté 8h après le traitement avec la CP mais la reeline 300K est toujours produite par les neurones P19 (Ducharme *et al.*, 2010). Donc, la production de la reeline 300K ne dépend pas de la neuroagrégation.

❖ PI3K

Nous nous sommes inspirés des mécanismes de signalisation de la reeline pour choisir d'autres agents pharmacologiques. Une des voies signalisatrices de la reeline, celle de la PI3K/AKT, peut affecter la prolifération et la migration cellulaires (Peng *et al.*, 2009). Cette voie est aussi impliquée dans l'action stimulatrice du BDNF sur la prolifération et la migration de cellules progénitrices de neurones (Zhang *et al.*, 2011).

Le Ly294002, un inhibiteur de la PI3K, n'inhibe pas la neuroagrégation induite par la CP ni le clivage de la reeline 300K (fig 3.5) et cela, même quand il a été utilisé 1h avant l'ajout de la CP (résultats non montrés). Par contre, le Ly294002 est capable d'induire lui-même l'agrégation des neurones P19 en absence de la CP. L'action neuroagrégative de la CP pourrait peut-être dépendre d'une inactivation de la signalisation de la PI3K.

❖ Autres kinases

ROCK phosphoryle et active certaines Rho-GTPases importantes dans l'assemblage de l'actine. ROCK est impliquée dans diverses fonctions cellulaires y compris la contraction, la migration, la mobilité et l'invasion cellulaires (Duan *et al.*, 2014; Murata *et al.*, 2014).

Nous avons testé l'effet d'un inhibiteur de ROCK, le Y27632, sur la neuroagrégation (annexe 3). Ce composé n'a pas empêché l'agrégation induite par la CP. Il induit lui-même l'agrégation des neurones P19 mais cette agrégation diffère de celle induite par CP. Les agrégats formés suite à l'inhibition de ROCK et de la CP se regroupent ensemble et flottent contrairement à ceux formés en présence de la CP qui sont adhérents à la surface du pétri. La voie de signalisation ROCK demande à être explorée davantage. L'inhibiteur de ROCK n'a pas inhibé la génération de la reeline 300K induite par la CP (annexe 3)

4.1.2. Kinases et génération de la reeline 300K

❖ ERK1/2

La phosphorylation d'ERK1/2 favorise la croissance axonale et la migration des neurones de la moelle épinière embryonnaire (Yang *et al.*, 2012). Des résultats obtenus avec deux inhibiteurs de la phosphorylation d'ERK1/2, le PD98059 et le U0126, nous permettent de postuler que la phosphorylation rapide d'ERK est importante pour la production de la reeline 300K, mais qu'elle n'a pas d'effet sur la neuroagrégation induite par la CP.

En accord avec l'importance d'ERK dans les actions de la CP, les travaux réalisés par mon collègue, Dr. Philippe Ducharme, et mes travaux ont montré que la phosphorylation d'ERK1/2 augmente dans les premières 20 min du traitement avec la CP (Ducharme, 2013).

Un lien pourrait exister entre l'activation d'ERK1/2 et une protéase à sérine responsable du clivage de la reeline 300K. Le tPA cause l'activation d'ERK1/2 dans un modèle de neurones en culture, de plus, il a été démontré que le tPA mène à l'activation du système AMPc/PKA (Mitsui *et al.*, 2008).

Un test préliminaire (annexe 4) montre que l'Apro, un inhibiteur de protéase à sérine augmente beaucoup la phosphorylation d'ERK dans les premières 20 min, tandis que le SBTI n'a pas cet effet. Il se peut que ces deux inhibiteurs de protéases n'agissent probablement pas via ERK.

4.1.3. Cuivre et neuroagrégation

Une autre molécule s'est révélée capable d'imiter l'action neuroagrégative de la CP, la Ser₂Cu. Nous savons que la CP contient 6 atomes de cuivre qui sont importants pour son activité catalytique. Les résultats suggèrent que le cuivre est important dans l'action neuroagrégative de la CP, ceci s'accorde avec le fait que la CP dépourvue de cuivre ne peut pas induire l'agrégation des neurones P19 (Maltais *et al.*, 2003). Cependant, la Ser₂Cu n'est pas capable d'induire la génération de la reeline 300K (annexe 2). L'action neuroagrégative de la Ser₂Cu est inhibable par SBTI et Apro. Nous avons testé un autre composé à cuivre,

l'His₂Cu, qui lui n'est pas capable d'induire l'agrégation. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la Ser₂Cu et l'His₂Cu n'ont pas la même stabilité ou la même disposition à libérer le cuivre.

4.2. Protéases à sérine

4.2.1. Protéases à sérine et neuroagrégation

Les inhibiteurs de protéases à sérine SBTI et Apro, utilisés de façon individuelle ou combinée, sont capables d'inhiber le phénomène de la neuroagrégation induit par la CP. De plus ils sont capables d'inhiber la génération de la reeline 300K.

Ces résultats nous permettent de dire qu'il y a au moins une protéase à sérine impliquée dans les deux actions de la CP. On ne sait pas si c'est la même protéase qui est impliquée dans les deux phénomènes ou bien si ce sont des protéases différentes, parce que le SBTI et l'Apro agissent sur un large spectre de protéases à sérine. Entre autres, le SBTI inhibe la trypsine, la chymotrypsine, des protéases avec le même mécanisme d'action que la trypsine, les kallikréines et le facteur Xa, et l'Apro inhibe la chymotrypsine, le chymotrypsinogène, l'élastase, les kalikréines, la plasmine, l'activateur du plasminogène, la trypsine, le trypsinogène, la tryptase et l'urokinase (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t9003?lang=fr®ion=CA>). Les deux inhibiteurs agissent donc sur plusieurs mêmes protéases avec des affinités différentes. D'autre part, vu leur poids moléculaire élevé (21.5K pour le SBTI et 6.5K l'Apro), ces inhibiteurs ne peuvent pas pénétrer à l'intérieur des cellules, donc la protéase recherchée serait soit extracellulaire (une protéase sécrétée ou bien une ectoprotéase membranaire présentant un site actif extracellulaire). Ceci est le cas des protéases cibles du SBTI et de l'Apro énumérées ci-dessous.

Il ne nous sera pas facile d'identifier la/les protéases à sérine impliquées dans les deux actions neurotrophiques de la CP parce qu'il en a plus d'une centaine connue (Ducharme, 2013). Cependant, nous savons que la protéase impliquée dans la neuroagrégation agit tôt, soit entre le temps zéro et 2h du traitement avec la CP, comme l'ont révélé les tests où à différents temps le SBTI et l'Apro ont été ajoutés (fig 3.9). Ceci pourrait être expliqué par une inactivation rapide de la protéase impliquée dans le phénomène de la neuroagrégation. Cependant, il se pourrait que la durée d'action de la protéase associée à la neuroagrégation ne soit pas due à une inactivation de cette protéase mais à d'autres raisons. Par exemple, le substrat pourrait être épuisé au bout de 2h ou converti en des quantités suffisantes de produit pour continuer les étapes menant à la neuroagrégation.

On peut se demander si les deux actions neurotrophiques de la CP sont bien dues à la CP et non pas des protéases contaminantes plasmatiques dans les préparations de CP. Le fait que trois molécules pharmacologiques pures, le H89, le Ly294003 et la Ser₂Cu sont capables d'induire la neuroagrégation d'une façon qui dépend d'une protéase à sérine répondant aux mêmes inhibiteurs que l'action de la CP laisse penser que l'action de la CP n'est peut-être pas due à des contaminants. Leurs actions neuroagrégatives sont inhibées par le SBTI/Apro, et par le Rivaroxaban, un inhibiteur du facteur X, mais ne sont pas ou peu inhibées par le 7B2, un inhibiteur de la PC2, et le ϵ -ACA, un inhibiteur du tPA.

Les résultats avec le Rivaroxaban soulèvent la possibilité de la présence du facteur X dans nos préparations. Il serait important de faire analyser nos préparations. Longtemps, le facteur X était connu comme un facteur de coagulation du sang présent dans plusieurs types de cellules. Récemment, des études de Shikamoto et Morita en 1999 ont rapporté la présence de l'ARNm du facteur X dans le cerveau de rat et dans plusieurs lignées de cellules dérivées du SNC. Ils montrent qu'il est activé par la plasmine, ce qui suggère que la plasmine régule la fonction du facteur X. Donc, dans le cerveau le facteur X peut participer à la fibrinolyse comme il peut avoir d'autres fonctions (Shikamoto et Morita, 1999).

Fait intéressant, des études ont montré que le facteur X protège les neurones de l'hippocampe d'une cytotoxicité induite par le glutamate (Gorbacheva *et al.*, 2006). Le

facteur X active la prothrombine en thrombine lors de la coagulation du sang. Notons que la thrombine n'est pas une cible du SBTI ou de l'Apro (Barett et MacDonald, 1980), tandis que les deux actions neurotrophiques de la CP sont inhibées par le SBTI et l'Apro. On pourrait tester un inhibiteur de la thrombine avec la CP.

4.2.2. Protéases à sérine et génération de la reeline 300K

La reeline est une protéine indispensable pour la migration neuronale et la lamination corticale pendant le développement du cerveau (Forster, 2014; Hisanaga *et al.*, 2012). La reeline subit un clivage protéolytique à deux sites (voir fig 1.6) pour générer deux fragments qui contiennent la portion N-t originale : un fragment 300K et un fragment 180K. Le rôle physiologique de ces fragments n'est pas encore connu. Des études suggèrent que la portion N-t de la reeline est nécessaire pour l'homodimérisation et l'efficacité de la signalisation. L'équipe de Kohno *et al.* (2009) a rapporté que la partie N-t de la reeline est nécessaire pour sa signalisation et le clivage en N-t réduit son activité signalétique. La partie centrale, très acide, présente dans la reeline 400K et 300K mais non 180K, lie les récepteurs ApoER2 et VLDLR, est impliquée dans l'oligomérisation de ces récepteurs et dans leur interaction avec le précurseur de la protéine amyloïde (Kohno *et al.*, 2009). Les travaux de Jossin *et al.* (2004) ont montré que la partie centrale de la reeline est suffisante pour assurer son rôle pendant le développement du cerveau. Ils ont aussi montré que le fragment 300K peut lier ces récepteurs et induire la phosphorylation de Dab-1. Et, enfin, la portion C-t, présente dans la reeline 400K mais non 300K et 180K, est nécessaire au repliement de la protéine et à l'efficacité de son activité signalétique (Krstic *et al.*, 2012; Kohno *et al.*, 2009). L'équipe de Kohno *et al.* (2009) ont montré que la reeline complètement clivée a peu d'activité signalétique tandis que la reeline non clivée induit une forte phosphorylation de Dab-1.

La CP pourrait activer une ou des protéases à sérine responsable du clivage de la reeline, ceci génère des niveaux élevés de reeline 300K. Il a déjà été montré par Kohno *et al.* (2009) que le clivage en C-t de la reeline réduit son activité. Donc, la reeline 300K pourrait être

moins active comme elle pourrait avoir d'autres fonctions que la reeline non clivée et ce en activant d'autres voies de signalisations que la reeline non clivée.

L'identité de la protéase responsable du clivage de la reeline n'est pas très bien connue. Plusieurs chercheurs ont tenté d'identifier la protéase responsable du clivage de la reeline et nous présentons ici quelques protéases candidates qui pourraient être impliquées dans le clivage de la reeline :

- ❖ Le tPA, une protéase à sérine qu'on trouve dans les cellules endothéliales, les astrocytes et les neurones (An *et al.*, 2013). Elle joue un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire et la migration neuronale dans le cerveau (Ho-Tin-Noé *et al.*, 2009). Des travaux récents publiés par Krstic *et al.* (2012) ont montré que le tPA clive la reeline au site C-t ce qui donne le fragment 300K. Nous avons testé l'effet de l' ϵ -ACA, un inhibiteur du tPA, sur les actions de la CP. Le ϵ -ACA n'a pas inhibé l'action agrégative de la CP ni la génération de la reeline 300K. Un autre inhibiteur du tPA a été testé par mon collègue Dr. Philippe Ducharme, c'est le PAI-I qui inhibe au niveau du site catalytique. Le PAI-I n'a pas inhibé l'action neuroagrégative de la CP ni la génération de la reeline 300K. Ceci suggère que le tPA n'est pas impliqué dans les deux actions de la CP sur les neurones P19. Il faut souligner que l'équipe de Krstic *et al.* (2012) a travaillé avec des cellules non neuronales, des cellules HeLa transfectées avec un plasmide de la reeline recombinante. De plus, cette équipe montre que le SBTI/Apro n'inhibe pas l'action du tPA. Le fait que nous n'avons pas utilisé le même type de cellules expliquerait pourquoi nous n'avons pas eu les mêmes résultats.

- ❖ Les désintégrines de la famille des métalloprotéases les ADAMTS, sont des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire avec un motif thrombospondine. ADAMTS-4 est exprimée dans le cerveau en développement et est capable de cliver la reeline au niveau des sites N-t et C-t *in vitro*. De plus, ADAMTS-5 est non seulement capable de cliver la reeline au niveau de ces deux sites mais aussi est capable de dégrader le domaine N-t de la reeline *in vitro* (Krstic *et al.*, 2012; Hisanaga *et al.*, 2012).

L'équipe de Hisanaga *et al.* (2012) montre que la protéase sécrétée à partir des cultures des neurones corticaux cérébraux et qui semblait capable de cliver la reeline n'est pas ADAMTS-4. De plus, la capacité qu'a ADAMTS-4 de cliver la reeline et sa présence au niveau de la plaque corticale mais pas au niveau de la zone marginale suggère qu'ADAMTS-4 peut être impliquée dans la diffusion limitée de la reeline *in vivo*. Il serait très intéressant de tester des inhibiteurs des ADAMTS sur les neurones P19 en présence de la CP pour voir si les ADAMTS sont impliquées dans les actions neuronales de la CP.

- ❖ Une métalloprotéase, encore non identifiée, serait impliquée dans le clivage N-t (Jossin *et al.*, 2007). Des travaux de Lambert de Rouvroit *et al.*, (1999) rapportent que le clivage de la reeline est inhibé par des chélateurs de zinc connus comme inhibiteurs de métalloprotéases mais non par divers inhibiteurs de protéases à sérine, à cystéine ou à aspartate. De plus le clivage de la reeline était insensible à des inhibiteurs de matrixines, neprilysines, méprines, et peptidyl dipeptidase A. Des études récentes ont montré que le clivage de la reeline est inhibé par des concentrations élevées d'inhibiteurs de MMP3 mais l'inhibiteur des MMP-2/MMP-9 n'a pas donné d'effet. Mais la MMP9 active les ADAMTS-4 (Krstic *et al.*, 2012), et les ADAMTS-4 clivent la reeline au niveau de ses extrémités N-t et C-t, donc, la MMP9 pourrait être indirectement impliquée dans le clivage de la reeline (Krstic *et al.*, 2012). Des expériences faites par mon coéquipier Dr. Philippe Ducharme (Ducharme, 2013) montre que le GM6001, un inhibiteur général des métalloprotéases, inhibe la génération des fragments 180K et 300K, donc il inhibe le clivage en N-t et on peut aussi suggérer qu'une métalloprotéase est impliquée dans le clivage en C-t.
- ❖ Nos résultats montrent aussi une possibilité d'implication du facteur X, ou d'une protéase qui lui ressemble, dans la génération de reeline 300K parce que l'inhibiteur du facteur X diminue les niveaux de reeline 300K. L'étude de chromatographie à la figure 3.10 montre une bande plus foncée de 32K dans la piste 6 qui pourrait correspondre au

facteur X, sachant que le facteur X est composé de deux chaînes de 31k et de 16k retenues par un pont disulfure (Venkateswarlu *et al.*, 2002).

- ❖ L'équipe de Kohno *et al.* (2009) rapporte qu'un inhibiteur de la convertase furine, le Fi-1, inhibe la génération de la reeline 180K. L'inhibiteur Fi-2 de la furine n'inhibe pas la formation de reeline 180K. Comme le Fi-2 est spécifique à la furine alors que le Fi-1 peut agir sur d'autres convertases et plus particulièrement la convertase PC2, les auteurs ont proposé qu'une convertase autre que la furine serait impliquée dans la génération de la reeline 180K. Des résultats ont montré une induction de l'expression de la PC2 à partir du j 5 dans les neurones P19 (Jeannotte *et al.*, 1997). Les traitements des neurones P19 avec le 7B2, un inhibiteur peptidique naturel de la PC2, n'ont peu ou pas eu d'effet sur le profil de la reeline ni même sur l'action agrégative de la CP. Cela suggère que PC2 ne serait pas une protéase candidate dans les actions de la CP sur les neurones P19. Une autre proprotéine convertase exprimée dans les neurones P19, la NARC-1/PCSK9, est impliquée dans le développement du système nerveux et pourrait être évaluée comme candidate potentielle (Poirier *et al.*, 2006).

Une étude faite par mon collègue Dr. Philippe Ducharme montre que la CP peut influencer le profil protéolytique de la reeline *in vivo*. Ainsi, il y a moins de reeline 300K dans le cerveau de fœtus de souris $CP^{-/-}$ que dans celui de souris de type sauvage. Ces résultats viennent appuyer l'idée que la CP peut avoir un rôle dans le développement du cerveau et appuie les résultats obtenus avec les cellules P19.

4.3. Conclusion

Considérant la présence de la CP dans le cerveau ainsi que ses deux actions particulières sur des neurones P19 nouvellement différenciés: induction de l'agrégation de ces neurones et modification du profil d'expression de la reeline en stimulant la génération du fragment de

300K, nous avons émis l'hypothèse que la CP pourrait avoir un rôle sur l'organisation des neurones pendant le développement du cerveau. Le présent travail avait pour objectif de déterminer la relation existant entre neuroagrégation et clivage de la reeline en fragment de 300K. Nous avons trouvé que la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K sont deux actions indépendantes de la CP, que l'agrégation est modulée par activation de la voie AMPc/PKA et que la génération de la reeline 300K est modulée par inhibition de la voie ERK. Nous pouvons dire aussi que la neuroagrégation pourrait partiellement favoriser la formation de la reeline 300K si la voie ERK est inhibée. Nous avons obtenu quelques autres informations concernant les mécanismes des actions neuronales de la CP *ex vivo* : une implication possible de la PI3K, l'intervention possible du cuivre présent dans la CP, l'implication d'une ou de protéases sensibles au Rivaroxaban en plus de la sensibilité au SBTI et à l'Apro. Mais la signification biologique de ces deux actions demeure encore inconnue.

4.4. Perspectives

Dans le futur, nous pouvons approfondir la signalisation cellulaire impliquée dans les actions de la CP en utilisant d'autres agents pharmacologiques. Nous voulons aussi déterminer si une cadhérine ou une intégrine peuvent être des cibles de la/des protéases. Les intégrines sont important a considérées parce qu'elles agissent comme des récepteurs potentiels pour la reeline. Les cadhérines sont des protéines exprimés à la surface cellulaire et elles jouent un rôle important dans l'adhésion cellulaire. Dans l'étude des protéases impliquées, on peut refaire la chromatographie sur SBTI-agarose en utilisant des milieux de culture et des protéines de surface marquées à la biotine ainsi qu'en améliorant la méthode d'élution. Nous pouvons faire un marquage avec une sonde d'affinité couplée à la biotine (Pierce, Rockford, USA), faire un SDS-PAGE et un buvardage avec streptavidine peroxydase.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Le contact des neurones avec la CP pour une courte période est suffisant pour induire leur agrégation

Dans cette expérience, nous avons voulu avoir plus de détails sur la durée de contact nécessaire des neurones avec la CP pour avoir l'agrégation. La CP induit l'agrégation des neurones P19 quand elle est ajoutée au temps 0h et qu'elle demeure dans le milieu pendant 48h (CP)(fig A.1, test 0h). Si la CP est ajoutée à $t = 8h$ (contrôle+CP), elle est encore capable d'induire l'agrégation des neurones. L'agrégation a été observée à 48h. Si nous changeons les milieux de culture à 8h, en remplaçant le milieu contrôle par un milieu contenant la CP (contrôle→CP) ou bien en remplaçant le milieu déjà traité avec la CP par un milieu contrôle (CP→contrôle)) nous obtenons toujours une belle agrégation des neurones à 48h. On peut dire qu'un contact, d'au moins 8h, des neurones P19 avec la CP est suffisant pour induire leur agrégation.

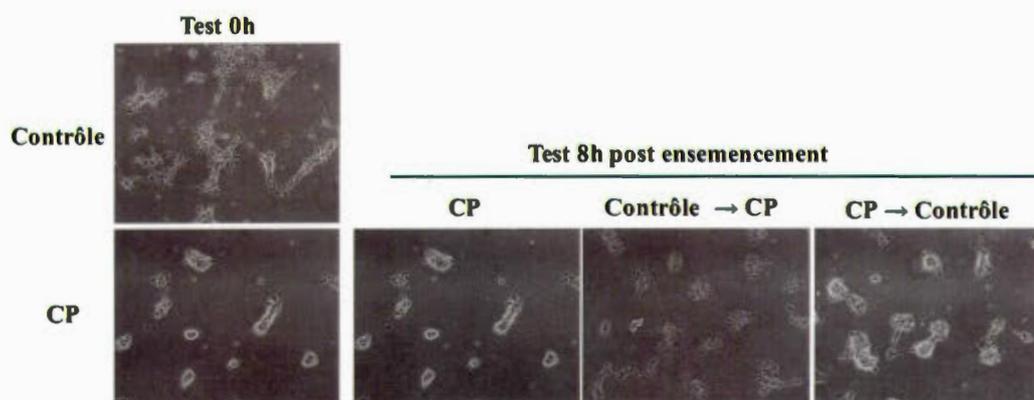


Figure A .1 Effet du temps d'exposition à la CP sur l'agrégation des neurones P19. Les neurones de j4 ont été incubés de 0h à 48h (test 0h) en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL). La CP a été ajoutée au milieu de culture à $t=8h$ (Contrôle + CP), le milieu de culture contrôle a été remplacé à $t=8h$ par un milieu contenant la CP (Contrôle →CP), et le milieu de culture traité avec la CP à $t=0h$ a été remplacé par un milieu contrôle à $t=8h$ (CP → contrôle). Photographies (100x) des cultures cellulaires au j6. $n=3$.

ANNEXE 2 : La Ser₂Cu induit l'agrégation des neurones P19 et cette action est inhibable par le SBTI/Apro. Comparaison de la Ser₂Cu et de l'His₂Cu sur l'agrégation des neurones P19.

Comme nous l'avons vu dans la section 3.5, la Ser₂Cu à 100µM et à 200 µM est capable d'induire seule l'agrégation des neurones P19. Cette action neuroagrégative est inhibable par le SBTI/Apro. Par contre, l'His₂Cu, elle n'est pas capable d'induire l'agrégation seule (figs A.2 A et B). Comme la Ser₂Cu, l'His₂Cu n'a pas d'effet sur la reeline 300K (fig A.2 C).

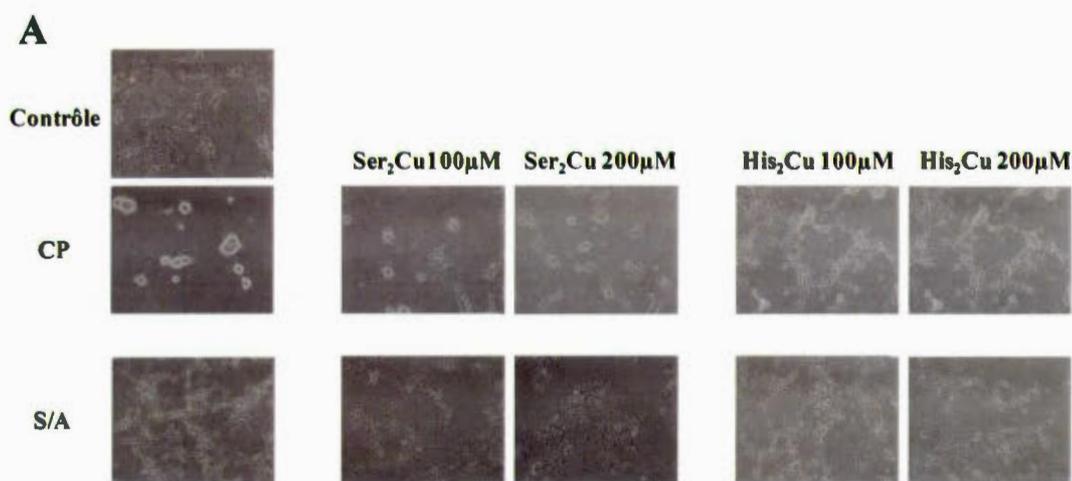


Figure A .2 Test de composés à cuivre sur l'agrégation des neurones et le clivage de la reeline. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL), de S/A (SBTI 100 µM et Apro 30µM), de Ser₂Cu (100µM ou 200 µM), d'His₂Cu (100µM ou 200 µM), de Ser₂Cu+S/A et d'His₂Cu+S/A. (A) Photographie (100x) des cultures cellulaires au j6. (suite à la page suivante)

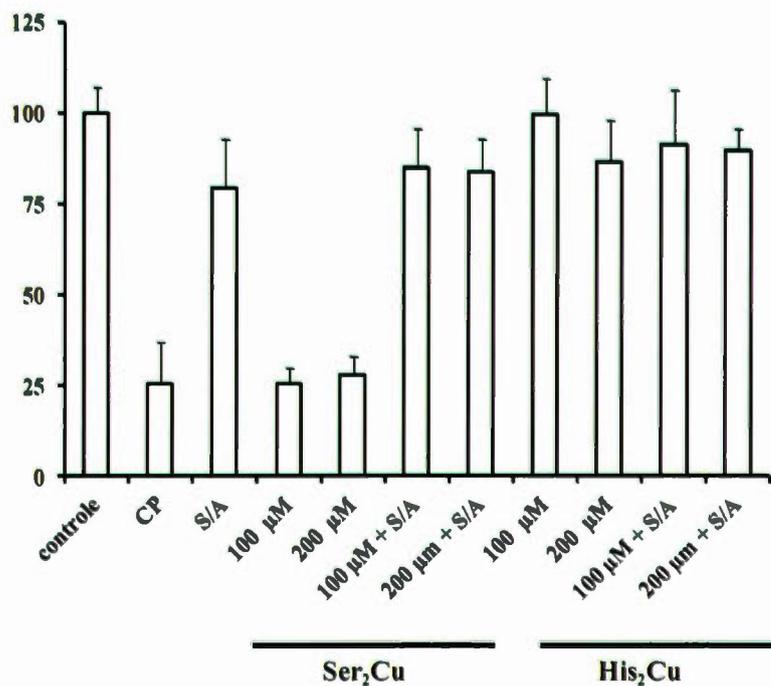
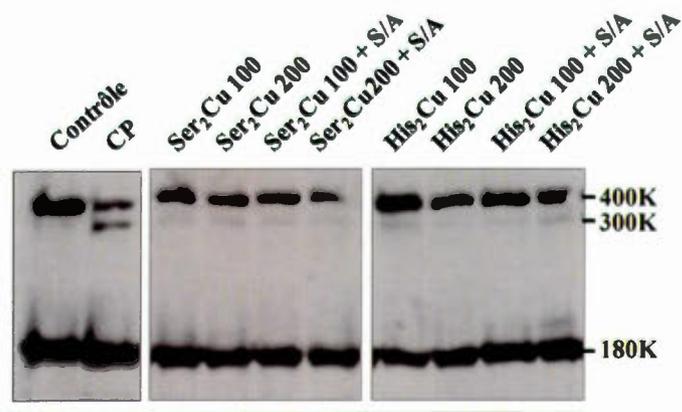
B**C**

Figure A.2 (suite) (B) Évaluation de la surface occupée par les cellules. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle et rapportés comme moyennes \pm SEM d'au moins trois études indépendantes. (C) un immunobuvard représentatif de la reeline dans les milieux de culture (n=4).

ANNEXE 3: Tests supplémentaires d'inhibiteurs pharmacologiques sur la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K.

Nous avons testé l'effet d'un inhibiteur de la MAP-kinase P38, le SB203580, et d'un inhibiteur de la kinase ROCK, l'Y 27632, sur la neuroagrégation et le profil de la reeline (fig A.3).

Le SB203580 n'induit pas l'agrégation des neurones et n'inhibe pas l'agrégation induite par la CP. L'Y 27632 semble induire une agrégation des neurones P19 mais qui est différente de celle de la CP : les regroupements de cellules sont plus étalés sur la surface de culture. La combinaison de l'inhibiteur de ROCK avec la CP donne un effet bizarre, les neurones s'agrègent et se regroupent ensemble à un seul endroit.

Aucun de ces deux inhibiteurs n'a stimulé ni inhibé la génération de la reeline 300K.

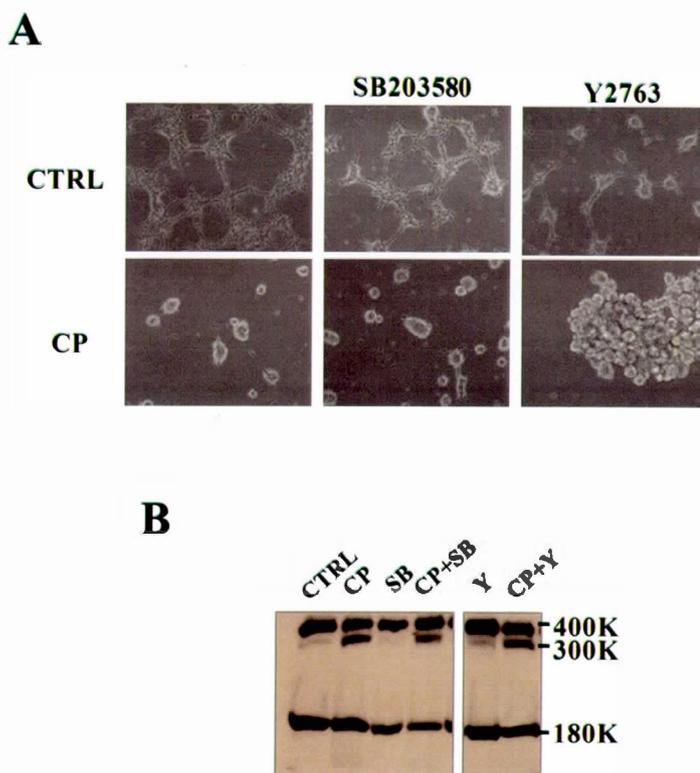


Figure A.3 Test des inhibiteurs SB203580 et Y2763 sur la neuroagrégation et la génération de la reeline 300K. Les neurones de j4 ont été incubés pendant 48h en absence (Contrôle) ou en présence de CP (0.5mg/mL), de SB203580 (SB; 10 μ M), et de Y27632 (Y; 25 μ M). (A) Photographies (100x) des cultures cellulaires au j6 (n=2) et (B) un immunobuvard représentatif de la reeline dans les milieux de culture (n=2).

ANNEXE 4: L'Aprotinine augmente la phosphorylation d'ERK1/2 dans les premières 20 min

La CP induit la phosphorylation d'ERK1/2 (Ducharme, 2013) et une inhibition d'ERK1/2 inhibe la génération de la reeline 300K par la CP (section 3.2 et 3.3). Nous avons testé l'effet des inhibiteurs de protéases à sérine sur la phosphorylation d'ERK1/2. Alors, nous avons récolté délicatement les milieux de cultures de neurones P19 contrôle, traités à t=0h avec la CP, le SBTI, l'Apro, la CP+SBTI, la CP+Apro et la CP+S/A. Les milieux ont été recueillis à 20 min suivant les traitements.

Les résultats indiquent que comme la CP, le SBTI augmente un peu la phosphorylation d'ERK1/2 tandis que l'Apro l'augmente grandement. Les deux inhibiteurs ont donc un effet distinctif sur ERK et pour le moment, on ne trouve pas de relation entre l'effet sur ERK et l'inhibition des actions de la CP.

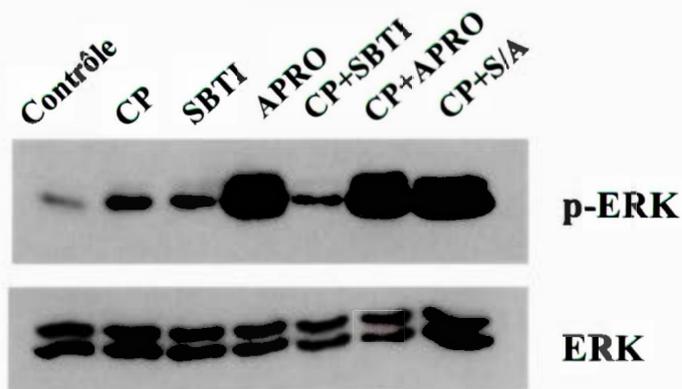


Figure A.2 Effet du SBTI et de l'Apro sur la phosphorylation d'ERK1/2. Un immunobuvard représentatif de phospho-ERK1/2 (p-ERK) et d'ERK1/2 totale. Des milieux de cultures de j4 recueillis à 20 min sans traitement (contrôle) ou traités avec la CP (0.5mg/mL), le SBTI (100 μ M), l'Apro (30 μ M), la CP+SBTI, la CP+Apro et la CP+S/A (n=1).

RÉFÉRENCES

- Aglah, C., T. Gordon et E.I. Posse de Chaves. 2008. «cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons». *Neuropharmacology*, vol. 55, no 1, p. 8-17.
- An, J., W.B. Haile, F. Wu, E. Torre et M. Yepes. 2014. «Tissue-type plasminogen activator mediates neuroglial coupling in the central nervous system». *Neuroscience*, vol. 257, p. 41-48.
- Aouffen, M., J. Paquin, E. De Grandpre, R. Nadeau et M.A. Mateescu. 2001. «Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuronprotective properties». *Biochem Cell Biol.* vol. 79, p. 489-497.
- Atanasiu, R.L., D. Stea, M.A. Mateescu, C. Vergely, F. Dalloz, F. Briot, V. Maupoil, R. Nadeau et L. Rochette. 1998. «Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties». *Mol Cell Biochem.* vol. 189, p. 127-35.
- Barrett, A.J. et J.K. MacDonald. 1980. «Mammalian proteases: A glossary and Bibliography». Volume 1. Endopeptidases. *Academic Press Inc.*, London, England, p. 85.
- Basharut, A.S., N.J. Beaumont, A. Patel, C.E. Naylor, H.K. Bayele, C.L. Joannou, P.S.N. Rowe, R.W. Evans et S.K.S. Srai. 2002. «Analysis of human hephaestin gene and protein: comparative modelling of the N-terminus ecto-domain based upon ceruloplasmin». *Prot Eng*, vol. 15, no 3, p. 205-214.
- Ber, D. et H. Hochstrasser. 2006. «Iron metabolism in Parkinsonian syndromes». *Mov Disord*, vol. 21, no 9, p. 1299-1310.
- Berthon, G. 1993. «Is copper pro- or anti-inflammatory? A reconciling view and a novel approach for the use of copper in the control of inflammation». *Agents Act*, vol. 39, no 3-4, p. 210-217.
- Bogoch, Y. et M. Linial. 2008. «Coordinated expression of cytoskeleton regulating genes in the accelerated neurite outgrowth of P19 embryonic carcinoma cells». *Exp Cell Res*, vol. 314, no 4, p. 677-690.
- Bouchard, F. et J. Paquin. 2009. «Skeletal and Cardiac Myogenesis Accompany Adipogenesis in P19 Embryonal Stem Cells». *Stem Cells Dev*, vol. 18, no 7, p. 1023-1032.
- Cadet, N. et J. Paquin. 2000. «Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons». *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 120, no 2, p. 211-221.

- Chiang, W.S., J. Ombiga, L.A. Adams, D. Trinder et J.K. Olynyk. 2006. « Normal Iron Metabolism and the Pathophysiology of Iron Overload Disorders ». *Clin Biochem Rev*, vol. 27, p. 5-16.
- Chiu, F.C., L. Feng, S.O. Chan, C. Padin et J.H. Federoff. 1995. «Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells». *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 30, no 1, p. 77-86.
- Church, W.R., R.L. Jernigan, J. Toole, R.M. Ewick, J. Knof, G.J. Knuston, M.E. Nesheim, K.G. Mann et D.N. Fass. 1984. « Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 81, p. 6934-6937.
- Cousins, R.J. 1985. «Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin». *Physiol Rev*, vol. 65, no 2, p. 238-309. 232.
- Curzon, G. 1961. «Some properties of coupled iron-caeruloplasmin oxidation system». *Biochem J*, vol. 79, p. 656-663.
- Curzon, G. et S.N. Young. 1972. «The ascorbate oxidase activity of caeruloplasmin». *Biochim Biophys Acta*, vol. 268, no 1, p.41-48.
- D'Arcangelo, G., G.G. Miao, S.C. Chen, H.D. Soares, J.I. Morgan et Curran T. 1995. «A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler». *Nature*, vol. 374, p. 719-723.
- De Domenico, I., D.M. Ward, M.C. di Patti, S.Y. Jeong, S. David, G. Musci et J. Kaplan. 2007. «Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin». *Embo J*, vol. 26, no 12, p. 2823-2831.
- De Silva, D., S. Davis-Kaplan, J. Fergestad et J. Kaplan. 1997. «Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin». *J Biol Chem*, vol. 272, no 22, p. 14208-14213.
- Díaz-Ruiz, C., R. Parlato, F. Aguado, J.M. Ureña, F. Burgaya, A. Martínez, M.A. Carmona, G. Kreiner, S. Bleckmann, J.A. del Río, G. Schütz et E. Soriano. 2008. «Regulation of neural migration by the CREB/CREM transcription factors and altered Dab1 levels in CREB/CREM mutants». *Mol Cell Neurosci*. vol. 39, no 4, p. 519-528.
- Doehner, J. et I. Knuesel. 2010. «Reelin-mediated Signaling during Normal and Pathological Forms of Aging». *Aging Dis*, vol. 1, no 1, p.12-29.
- Duan, X., K. Chen, Y. Zhang, X. Cui, N. Kim et S. Sun. 2014. «ROCK inhibition prevents early mouse embryo development». *Histochem Cell Biol*, vol. 142, no 2, p.227-233.
- Ducharme, P. 2013. Rôle potentiel de la céruloplasmine dans le développement du cerveau. Thèse de doctorat. Université du Québec à Montréal, Montréal. 261 pages.

- Ducharme, P., D. Maltais, D. Desroches, M.A. Mateescu et J. Paquin. 2010. «Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage». *Neuroscience*, vol. 167, no 3, p. 633-643.
- Evans, G.W. 1973. «Copper homeostasis in the mammalian system». *Physiol Rev*, vol. 53, no 3, p. 535-570.
- Fang, H., L. Wang et H. Wang. 2005. «The protein structure and effect of factor VIII». *Thrombo Res*. vol. 119, p. 1-13.
- Förster, E. 2014. «Reelin, neuronal polarity and process orientation of cortical neurons». *Neuroscience*, vol. 3, no 4.
- Fuqua, B.K., L. Yan, D. Darshan, D.M. Frazer, S.J. Wilkins, N. Wolkow, A.G. Bell, J. Hsu, C.C. Yu, H. Chen, J.L. Dunaief, G.J. Anderson et C.D. Vulpe. 2014. «The Multicopper Ferroxidase Hephaestin Enhances Intestinal Iron Absorption in Mice ». *PlosOne*, vol. 9, no 6, p. 1-13.
- Ganaraja, B., P. Pavithran et S. Ghosh. 2004. «Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress». *Indian J Med Sci*, vol. 58, no 4, p. 150-154.
- Gitlin, J.D. 1998. « Aceruloplasminemia ». *Pediatric Res*, vol. 41, p. 271-276.
- Goldstein, I.M., H.B. Kaplan, H.S. Edelson et G. Weissmann. 1979. «A new function for ceruloplasmin as an acute-phase reactant in inflammation: a scavenger of superoxide anion radicals». *Trans Assoc Am Physicians*, vol. 92, p. 360-369.
- Goldstein, I.M., H.B. Kaplan, H.S. Edelson et G. Weissmann. 1982. «Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals». *Annals of the N Y Acad of Sci*, vol. 389, p.368-379.
- Gutteridge, J.M. 1985. «Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities». *Chem Biol Interact*, vol. 56, no 1, p. 113-120.
- Harris, Z.L., A.P. Durley, T.K. Man et J.D. Gitlin. 1999. « Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux ». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, p. 10812-10817.
- Harris, Z.L., Y. Takahashi, H. Miyajima, M. Serizawa, R.T. MacGillivray et J.D. Gitlin.. 1995. «Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism». *Proc Natl Acad Sci*, vol. 92, no 7, p. 2539-2543.
- Healy, J. et K. Tipton. 2007. «Ceruloplasmin and what it might do». *J Neur Trans*, vol. 114, no 6, p777-781.

- Hisanaga, A., S. Morishita, K. Suzuki, K. Sasaki, M. Koie, T. Kohno et M. Hattori. 2012. «A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 (ADAMTS-4) cleaves Reelin in an isoform-dependent manner». *FEBS Lett*, vol. 586, no 19, p. 3349-3353.
- Holmberg, C.G. et C.B. Laurell. 1948. «Investigations in serum copper II. Isolation of the copper containing protein, and description of its properties.». *Acta Chem Scand*, vol. 2, p. 550-556.
- Honda, T., K. Kobayashi, K. Mikoshiba et K. Nakajima. 2011. «Regulation of Cortical Neuron Migration by the Reelin Signaling Pathway». *Neurochem Res*, vol. 36, no 7, p. 1270-1279.
- Ho-Tin-Noe, B., H. Enslin, L. Doeuvre, J.M.J. Cors, H.R. Lijnen et E. Angles-Cano. 2009. «Role of plasminogen activation in neuronal organization and survival». *Mol Cell Neurosci*, vol. 42, no 4, p. 288-295.
- Jackson, G.E., L. Mkhonta-Gama, A. Voye et M. Kelly. 2000. «Design of copper-based anti-inflammatory drugs». *J Inorg Biochem*, vol. 79, no 1-4, p. 147-152.
- Jeannotte, R., J. Paquin, C. Petit-Turcotte et R. Day. 1997. «Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells». *DNA Cell Biol*, vol. 16, no 10, p. 1175-1187.
- Jossin et Jonathan, A. Cooper. 2011. «Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex». *J Neurosci*, vol. 14, no 6, p.697-704.
- Jossin, Y., I. Bar, N. Ignatova, F. Tissir, C.L. De Rouvroit et A.M. Goffinet. 2003. «The Reelin Signaling Pathway: Some Recent Developments». *Cereb Cortex*, vol. 13, no 6, p. 627-633.
- Jossin, Y., L. Gui et A.M. Goffinet. 2007. « Processing of Reelin by embryonic neurons is important for function in tissue but not in dissociated cultured neurons». *J Neurosci*, vol. 27, p.4243-4252.
- Jossin, Y., N. Ignatova, T. Hiesberger, J. Herz, C. Lambert de Rouvroit et A.M. Goffinet. 2004. «The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development». *J Neurosci*, vol. 24, no 2, p. 514-521.
- Kang, W., S. Kim, S. Cho, S. Kim, H. Suh-Kim et Y. Lee. 2010. «Migratory defect of mesencephalic dopaminergic neurons in developing reeler mice». *Anat Cell Biol*, vol. 43, no 3, p. 241-251.
- Knuesel, I. 2010. «Reelin-mediated signaling in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases». *Prog Neurobiol*, vol. 91, no 4, p. 257-274.
- Kohno, S., T. Kohno, Y. Nakano, K. Suzuki, M. Ishii, H. Tagami, A. Baba et M. Hattori. 2009. «Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 380, no 1, p. 93-97.

- Koie, M., K. Okumura, A. Hisanaga, T. Kameji, K. Sasaki, M. Deng, A. Baba, T. Kohno et M. Hattori. 2014. « Cleavage within Reelin Repeat 3 Regulates the Duration and Range of the Signaling Activity of Reelin Protein ». *J Biol Chem*, vol. 289, no 18, p.12922-12930.
- Kono, S. 2012. «Aceruloplasminemia». *Current Drug Targets*, vol. 13, no 9, p. 1389-4501.
- Krstic, D., M. Rodriguez et I. Knuesel. 2012. «Regulated Proteolytic Processing of Reelin through Interplay of Tissue Plasminogen Activator (tPA), ADAMTS-4, ADAMTS-5, and Their Modulators». *PlosOne*, vol. 7, no 10, p. 47793-47804.
- Lambert de Rouvroit, C., V. de Bergeyck, C. Cortvrindt, I. Bar, Y. Eeckhout et A.M. Goffinet. 1999. «Reelin, the extracellular matrix protein deficient in reeler mutant mice, is processed by a metalloproteinase». *Exp Neurol*, vol. 156, no 1, p. 214-217.
- Laplante, I., R. Béliveau et J. Paquin. 2004. «RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells». *J Neurobiol*, vol. 60, no 3, p. 289-307.
- Lindley, P.F., G. Card, I. Zaitzeva, V. Zatischev, B. Reinhammar, E. Selin-lindgren et K. Yoshida. 1997. «An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity». *J Biol Inorg Chem*, vol. 2, p. 454-463.
- Mackiewicz, A., M.K. Ganapathi, D. Schultz et I. Kushner. 1987. «Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins». *J Exp Med*, vol. 166, no 1, p. 253-258. 245.
- MacPherson, P.A., S. Jones, P.A. Pawson, K.C. Marshall et M.W. McBurney. 1997. «P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro». *Neuroscience*, vol. 80, no 2, p. 487-499.
- Maltais, D., D. Desroches, M. Aouffen, M.A. Mateescu, R. Wang et J. Paquin. 2003. «The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization». *Neuroscience*, vol. 121, no 1, p. 73-82.
- Mateescu, M.A., R. Chahine, S. Roger, R. Atanasiu, N. Yamaguchi, G. Lalumiere et R. Nadeau. 1995. «Protection of myocardial tissue against deleterious effects of oxygen free radicals by ceruloplasmin». *Arzneimittel-Forsch Drug Res*, vol. 45, p. 476-480.
- Mazumder, B., C.K. Mukhopadhyay, A. Prok, M.K. Cathcart et P.L. Fox. 1997. «Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells». *J Immunol*, vol. 159, no 4, p. 1938-1944.
- McBurney, M.W. 1993. «P19 embryonal carcinoma cells». *Int J Dev Biol*, vol. 37, no 1, p. 135-140.
- Mitsui, S., Y. Watanabe Y, T. Yamaguchi et N. Yamaguchi. 2008. «Mosaic serine proteases in the mammalian central nervous system». *Front Biosci*, vol. 13, p. 1999-2000.

- Mittal, B., M.M. Doroudchi, S.Y. Jeong, B.N. Patel et S. David. 2003. «Expression of a membrane-bound form of the ferroxidase ceruloplasmin by leptomeningeal cells». *Glia*, vol. 41, no 4, p. 337-346.
- Miyajima, H., Y. Nishimura, K. Mizoguchi, M. Sakamoto, T. Shimizu et N. Honda. 1987. «Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration». *Neurology*, vol. 37, no 5, p. 761-767.
- Montanaro, F. et S. Carbonetto. 2003. «Targeting dystroglycan in the brain». *Neuron*, vol. 37, p. 193-196.
- Mukhopadhyay, C.K., B. Mazumder, P.F. Lindley et P.L. Fox. 1997. «Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 94, no 21, p. 11546-11551.
- Mukhopadhyay, C.K., Z.K. Attieh et P.L. Fox. 1998. «Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake». *Science*, vol. 27, no 9, p. 714-717.
- Murata, K., S. Noda, T. Oike, A. Takahashi, Y. Yoshida, Y. Suzuki, T. Ohno, T. Funayama, Y. Kobayashi, T. Takahashi et T. Nakano. 2014. «Increase in cell motility by carbon ion irradiation via the Rho signaling pathway and its inhibition by the ROCK inhibitor Y-27632 in lung adenocarcinoma A549 cells». *J Rad Res*, vol. 10, no 2, p. 1-7.
- Osaki, S., D.A. Johnson et E. Frieden. 1966. «The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum». *J Biol Chem*, vol. 241, no 12, p. 2746-2751.
- Paquin, J., B.A. Danalache, M. Jankowski, S.M. McCann et J. Gutkowska. 2002. «Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 99, no 14, p. 9550-9555.
- Paradis, M., J. Gagne, M.A. Mateescu et J. Paquin. 2010. «The effects of nitric oxide-oxidase and putative glutathione-peroxidase activities of ceruloplasmin on the viability of cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide». *Free Radic Biol Med*, vol. 49, no 12, p. 2019-2027.
- Parnas, D. et M. Linial. 1997. «Acceleration of neuronal maturation of P19 cells by increasing culture density». *Brain Res Dev Brain Res*, vol. 101, no 1-2, p. 115-124.
- Patel, B.N., R.J. Dunn et S. David. 2000. «Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain». *J Biol Chem*, vol. 275, no 6, p. 4305-4310.
- Patel, B.N., R.J. Dunn, S.Y. Jeong, Q. Zhu, J.P. Julien et S. David. 2002. «Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury». *J Neurosci*, vol. 22, no 15, p. 6578-6586.

- Peng, W.Y., M. Cui, NP. Whitney, Y. Huang et J.C. Zheng. «CXCL12 increases human neural progenitor cell proliferation through Akt-1/FOXO3a signaling pathway». 2009. *J Neurochem*, vol. 109, no4, p. 1157-1167.
- Percival, S.S. et E.D. Harris. 1991. «Regulation of Cu,Zn superoxide dismutase with copper. Ceruloplasmin maintains levels of functional enzyme activity during differentiation of K562 cells». *Biochem J*, vol. 274, no 1, p. 153-158.
- Petit-Turcotte, C. et J. Paquin. 2000. «Coordinate regulation of neuroendocrine convertase PC2 and peptide 7B2 in P19 neurons». *Peptides*, vol. 21, no 3, p. 365-372.
- Petrak, J. et D. Vyoral. 2005. «Hephaestin--a ferroxidase of cellular iron export». *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 37, no 6, p. 1173-1178.
- Pittman, D.D., K.A. Marquette et R.J. Kaufman. 1994. «Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function». *Blood*. vol. 84, no 12, p. 4214-4225.
- Pleasure, S.J., C. Page et V.M.Y. Lee. 1992. «Pure, Postmitotic, Polarized Human Neurons Derived from NTERA 2 Cells Provide a System for Expressing Exogenous Proteins in Terminally Differentiated Neurons ». *J Neurosci*, vol. 12, no 5, p. 1802-1815.
- Poirier, S., A. Prat, E. Marcinkiewicz, J. Paquin, B.P. Chitramuthu, D. Baranowski, B. Cadieux, H.P. Bennett et N.G. Seidah. 2006. «Implication of the proprotein convertase NARC-1/PCSK9 in the development of the nervous system». *J Neurochem*, vol. 98, no 3, p. 838-850.
- Qian, Z.M. et Y. Ke. 200. «Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism». *Brain Res Rev*, vol. 35, p. 287-294.
- Qian, Z.M., Y.Z. Chang, L. Zhu, L. Yang, J.R. Du, K.P. Ho, Q. Wang, L.Z. Li, C.Y. Wang, X. Ge, N.L. Jing, L. Li et Y. Ke. 2007. «Development and iron-dependent expression of hephaestin in different brain regions of rats». *J Cell Biochem*, vol. 102, no 5, p. 1225-1233.
- Quattrocchi, C.C., F. Wannenes, A.M. Persico, S.A. Ciafre, G. D'Arcangelo, M.G. Farace et F. Keller. 2002. «Reelin is a serine protease of the extracellular matrix». *J Biol Chem*, vol. 277, no 1, p. 303-309.
- Rudnicki, M.A., et M.W. Mc Burney. 1987. «Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines». *Dans Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, vol. (E.J. Robertson). Oxford, IRL Press: 19-49.
- Scotti, A.L. et G. Herrmann. 2002. «Reelin immunoreactivity in dissociated cultures of the postnatal hippocampus». *Brain Res*, vol. 924, no 2, p. 209-218.
- Shikamoto, Y. et T. Morita. 1999. «Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system». *FEBS Lett*, vol. 463, no 3, p. 387-389.

- Solari, M., J. Paquin, P. Ducharme et M. Boily. 2010. «P19 Neuronal Differentiation and Retinoic Acid Metabolism as Criteria to Investigate Atrazine, Nitrite, and Nitrate Developmental Toxicity». *Toxicol Sci*, vol. 113, no 1, p. 116-126.
- Stocks, J., J.M. Gutteridge, R.J. Sharp et T.L. Dormandy. 1974. «The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and alpha-tocopherol». *Clin Sci Mol Med*, vol. 47, no 3, p. 223-233.
- Takahashi, N., T.L. Ortel et F.W. Putnam. 1984. «Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 81, no 2, p. 390-394.
- Tegenge, M.A., F. Roloff et G. Bicker. 2011. «Rapid differentiation of human embryonal carcinoma stem cells (NT2) into neurons for neurite outgrowth analysis». *Cell Mol Neurobiol*, vol. 31, no 4, p. 635-643.
- Trocello, J.M., P. Chappuis, S. El Balkhi, J. Poupon, A. Leyendecker, P. Chaine et F. Woimant. 2010. «Abnormal copper metabolism in adult». *Revue Med Int*, vol. 31, no 11, p. 750-756.
- Vachette, P., E. Dainese, V.B. Vasyliiev, P.D. Muro, M. Beltramini, D.I. Svergun, V. De Filippis et B. Salvato. 2002. «A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin». *J Biol Chem*, vol. 277, no 43, p. 40823-40831.
- Vassiliev, V., Z.L. Harris et P. Zatta. 2005. «Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases». *Brain Res Brain Res Rev*, vol. 49, no 3, p. 633-640.
- Wang, J. et K. Pantopoulos. 2011. «Regulation of cellular iron metabolism». *Biochem J*, vol. 343, no 3, p. 365-381.
- Yang, K., F. Cao, A.M. Sheikh, M. Malik, G. Wen, H. Wei, W. Ted Brown et X. Li. 2012. «Up-regulation of Ras/Raf/ERK1/2 signaling impairs cultured neuronal cell migration, neurogenesis, synapse formation, and dendritic spine development». *Brain Struct Funct*. vol. 218, no 3, p.669-682.
- Zaitsev, V.N., I. Zaitseva, M. Papiz et P.F. Lindley. 1999. «An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma». *J Biol Inorg Chem*, vol. 4, no 5, p. 579-587.
- Zaitseva, I., V.N. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph et P.F. Lindley. 1996. «The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centers». *J Natl Cancer Inst*, vol. 69, p. 475-482.
- Zhang, Q.I., G. Liu, Y. Wu, H. Sha, P. Zhang et J. Jia. 2011. «BDNF Promotes EGF-Induced Proliferation and Migration of Human Fetal Neural Stem/Progenitor Cells via the PI3K/Akt Pathway». *Molecules*, vol. 16, p. 10146-10156.

Zile, M.H. 2001. «Function of vitamin A in vertebrate embryonic development». *J. Nutr.* vol. 131, p. 705-708.