

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
(Faculté des sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National- Arrêté du 7 Août 2006)

École Doctorale : **Sciences pour l'Environnement Gay Lussac**
Secteur de recherche : **Biologie Cellulaire et Neurosciences**

Présentée par :
Aurore GELY-PERNOT

Implication des protéines vitamine K-dépendantes dans la régulation de l'activité des cellules souches du cerveau et dans la réparation de la lésion rétinienne chez le rongeur adulte.

Directeur de Thèse :
Pr. OMAR BENZAKOUR

Pour une demande de soutenance le 14 octobre 2009 devant la commission d'Examen composée de :

Mr Yvon Trottier, Directeur de Recherche, Université de Strasbourg ...	Rapporteur
Mr Emmanuel Moyse, Professeur, Université Aix-Marseille 3.....	Rapporteur
Mr Marc Vasse, Professeur, Université de Rouen.....	Examineur
Mr Jean-Claude Jeanny, Directeur de Recherche, Université Paris V	Examineur
Mr Florian Guillou, Directeur de Recherche, INRA	Examineur
Mme Valérie Coronas, Maître de Conférences, Université de Poitiers.....	Examineur
Mr Omar Benzakour, Professeur, Université de Poitiers.....	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr. Omar Benzakour de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir confié un sujet de thèse si passionnant. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa culture scientifique, son ouverture d'esprit et son respect. J'espère sincèrement pouvoir continuer à travailler dans le domaine des protéines vitamine-K dépendantes.

Je remercie le Pr. Frédéric Becq de m'avoir accueillie au sein de l'UMR 6187 et d'avoir été à l'écoute durant ces quelques années.

Je remercie vivement le Dr Arnaud Monvoisin de ses précieux conseils, de son aide et de sa rigueur scientifique. Mes remerciements s'adressent également au Dr Michel Philippe pour ses qualités scientifiques, sa disponibilité et sa gentillesse. J'adresse mes sincères remerciements au Dr Valérie Coronas pour ses conseils sur les cellules souches neurales, sa disponibilité et sa rigueur.

Je remercie également le Dr Yvon Trottier et le Pr Emmanuel Moyse pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Mes remerciements s'adressent également au Pr Marc Vasse, au Dr Jean-Claude Jeanny, au Dr Florian Guillou et au Dr Valérie Coronas d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Jean-Claude Jeanny de son aide pour la réalisation du travail sur la rétine, de ses qualités scientifiques et techniques et de sa grande générosité.

J'adresse mes sincères remerciements à Laëtitia Cousin, Annie-Claire Balandre ainsi qu'à Laurent Jonet pour leur aide technique. J'exprime mes remerciements au Dr Anne Cantereau pour m'avoir enseigné l'art de la microscopie confocale.

Je remercie l'ensemble des enseignants des sections 65 et 66 pour leur confiance et leur soutien. J'exprime également mes remerciements à Catherine Adolphe pour son aide, sa disponibilité, son écoute et son investissement pour les TP de biologie cellulaire.

Mes remerciements s'adressent bien évidemment à tous les membres de l'UMR 6187 et plus particulièrement à l'équipe du Pr Marc Mesnil où j'ai terminé ma thèse dans des conditions favorables à un épanouissement professionnel et personnel. A toute personne s'aventurant à faire le café au troisième étage : il y a un protocole à respecter ! Et merci Arno pour tes qualités de chanteur et de ton caractère breton toujours enjoué.

Je souhaiterais maintenant remercier Camille Nicoleau avant tout pour son amitié, mais aussi pour son aide, sa disponibilité et sa générosité. Cette « rivalité » HGF-warfarine fut un pur bonheur...Au passage un grand merci à Flo pour ces quelques bulles...

Merci à mes amis et particulièrement à Delphine, Coquard, Bonux et Bouchon d'avoir été là durant tout ce temps. Je ne sais pas si y'a du monde au camping cette année, mais y'a sûrement d'la gravelle....

Merci à ma famille et à mes parents pour leur soutien. Un clin d'oeil à mon frère, Alexandre, qui a validé son doctorat d'artisan Pâtissier-chocolatier depuis fort longtemps et à ma sœur Caroline qui devrait prochainement débiter son doctorat de psychologie.

Mes plus grands remerciements vont bien évidemment à mes Amours. Merci à mon mari Thibaut, de m'avoir plus que soutenue au cours de ces neuf années. Un jour, on aura notre élevage de caribou au bord d'un lac...Merci à ma fille Emma, toi alors, on peut dire que tu m'as fait relativiser les choses...

Merci à tous.

Histoire de Warfarine...

Au début des années 1920, le bétail des Etats-Unis et du Canada fut décimé par une maladie méconnue. Les animaux mourraient d'hémorragie suite à des interventions mineures ou de façon spontanée. En 1921, le Dr Schofield, un vétérinaire canadien, détermina l'origine de la maladie comme étant due à l'ingestion d'ensilage moisi fabriqué à partir de mélilot. En 1929, un vétérinaire américain, le Dr Roderick a démontré que l'état pathologique des animaux était dû à un dysfonctionnement d'une protéine procoagulante, la prothrombine.

L'identité de la substance anticoagulante dans le mélilot moisi resta un mystère jusqu'en 1940 lorsqu'un chimiste de l'Université du Wisconsin, le Dr Karl Paul Link en isola le dicoumarol. Le dicoumarol est un métabolite des coumarines, molécules maintenant connues pour être présentes dans de nombreuses plantes. Nous leur devons d'ailleurs l'odeur d'herbe fraîchement coupée ou de foin. Au cours des années qui suivirent, des molécules semblables aux propriétés anticoagulantes ont été découvertes. La première des molécules à avoir été commercialisée fut le dicoumarol qui a été breveté en 1941.



Karl Paul Link dans son laboratoire en 1950

Le Dr Karl Paul Link a ensuite continué à travailler sur le développement de coumarines ayant des actions anticoagulantes plus puissantes qui seront utilisées en premier lieu comme rodenticide, c'est le cas de la warfarine qui apparaît sur le marché en 1948. Le nom de warfarine découle de la société qui a financé les travaux du Dr Link, la Wisconsin Alumni Research Foundation (WARF), la terminaison -arin indiquant son appartenance aux coumarines. En 1951, une intoxication volontaire massive par la warfarine, sans conséquences graves pour les sujets intoxiqués, a suggéré la possibilité de son utilisation en thérapeutique. En 1954, la warfarine fut approuvée pour son usage médical chez l'Homme. Un des premiers bénéficiaires de la warfarine fut le président américain Dwight Eisenhower, à qui a été prescrit de la warfarine après une crise cardiaque en 1955.

Le mécanisme d'action exacte de la warfarine reste inconnu jusqu'à ce qu'il soit démontré, en 1978 par John Stenflo, que la warfarine inhibe l'enzyme époxyde réductase et interfère donc avec le métabolisme de la vitamine K.

SOMMAIRE

Avant-propos	p6
Liste des abréviations.....	p7
1. Introduction	p9
1.1 Les protéines vitamine K-dépendantes	p9
1.1.1 Les protéines intervenant dans la coagulation sanguine	p11
1.1.2 Les protéines de la matrice extracellulaire	p12
1.1.3 Les protéines transmembranaires	p13
1.1.4 Peptides neurotoxiques.....	p14
1.1.5 Autres PVKDs.....	p14
1.2 La γ -carboxylation des PVKDs.....	p15
1.2.1 La γ -carboxylation : une modification post-traductionnelle impliquant la γ -carboxylase et le complexe vitamine K réductase	p15
1.2.2 Interaction des PVKDs avec la membrane plasmique	p23
1.3 La protéine Gas6 et la protéine S	p25
1.3.1 Domaines structuraux.....	p25
1.3.2 Récepteurs membranaires : les récepteurs TAM.....	p26
1.3.3 Liaison des PVKDs à leurs récepteurs membranaires	p39
1.3.4 Implication de la protéine Gas6 et de la protéine S dans la phagocytose	p30
1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires	p37
1.4.1 La neurogenèse.....	p37
1.4.2 La rétinogenèse	p46
1.5 Problématique et objectifs.....	p52
2. Partie expérimentale	p53
2.1 Culture des CSN issues de la SVZ et caractérisations immunocytologiques	p53
2.2 Détermination des effets des PVKDs sur les CSN issues de la SVZ <i>in vitro</i>	p56
2.3 Détermination du rôle des PVKDs sur la SVZ <i>in vivo</i>	p60
2.4 Caractérisation des PVKDs présentent dans les cultures de CSN et de plexus choroïde <i>in vitro</i>	p62
2.5 Détermination du rôle des protéines S et Gas6 dans les CSN issues de la SVZ <i>in vitro</i> .	p65
2.6 Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'effet des PVKDs sur les CSN issues de la SVZ.....	p67
2.7 Activité phagocytaire des CSN issues de la SVZ du cerveau de rats nouveau-nés.....	p69
2.8 Etude du rôle de la protéine Gas6 dans la rétinogenèse	p71
2.9 Analyse des données et tests statistiques.....	p73

3. Résultats et discussions.....	p75
3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	p75
3.1.1 Effet des PVKDs sur la polifération des CSN <i>in vitro</i>	p75
3.1.2 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des cellules progénitrices <i>in vitro</i>	p81
3.1.3 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des cellules de la SVZ <i>in vivo</i>	p83
3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natalS	p86
3.2.1 La protéine Gas6 et la protéine S sont les seules PVKDs produites par les cellules de la SVZ <i>in vitro</i>	p87
3.2.2 La protéine Gas6 et la protéine S sont exprimées <i>in vivo</i> par les cellules de la SVZ	p90
3.2.3 La protéine Gas6 est produite par des cultures de plexus choroïdes <i>in vitro</i> et est présente dans le LCR de rongeurs.....	p91
3.2.4 Expression et activation des récepteurs TAM dans les CSN	p92
3.2.5 La protéine S inhibe la croissance des cellules de la SVZ et réverse l'effet stimulateur de la warfarine <i>in vitro</i>	p95
3.2.6 La protéine Gas6 stimule l'autorenouvellement des cellules de la SVZ <i>in vitro</i>	p96
3.2.7 La protéine Gas6 stimule la prolifération des cellules de type souche <i>in vivo</i>	p97
3.3 Discussion	p98
3.4 Capacité des cellules souches neurales à phagocyter : implication de la protéine S	p104
3.4.1 Les cultures de cellule issues de la SVZ sont capables de phagocytose <i>in vitro</i> ..	p105
3.4.2 La protéine S stimule la phagocytose de billes de latex par les cellules de la SVZ	p107
3.4.3 Discussion	p110
3.5 Implication de la protéine Gas6 dans la rétinogenèse	p114
3.5.1 La protéine Gas6 semble nécessaire à la prolifération des cellules suite à une lésion de la rétine induite par un impact laser.	P114
3.5.2 Effet de la protéine Gas6 sur l'apoptose des cellules suite à une lésion de la rétine induite par impact laser.	P116
3.5.2 Discussion	p117
4. Conclusions et perspectives	p119
5. Bibliographie.....	p123
6. Annexes	p141

AVANT-PROPOS

La coagulation du sang est un processus complexe dont les acteurs majeurs sont les protéines vitamine K-dépendantes (PVKDs). Cette famille de protéines a fait l'objet d'un grand nombre d'études ces dernières années, montrant leur implication, pour certaines d'entre elles, dans une grande variété de processus dont la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires.

La première partie de ma thèse consiste en une étude bibliographique qui porte sur l'ensemble des PVKDs, puis plus spécifiquement sur deux d'entre elles : la protéine Gas6 et la protéine S qui ont la particularité, contrairement aux autres PVKDs, d'activer des récepteurs tyrosine kinase. Lors de cette partie introductive je détaillerai également nos deux modèles d'études, les cellules souches neurales (CSN) issues de la zone sous-ventriculaire (SVZ) du cerveau et la rétine. La SVZ et l'hippocampe sont les deux sites encore dotés de neurogenèse chez les mammifères adultes. L'élucidation des mécanismes régulant la prolifération des CSN de la SVZ est d'une importance capitale aussi bien d'un point de vue fondamental que clinique pour le traitement des maladies neurodégénératives.

Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs. Pour cela, nous avons développé un modèle expérimental basé sur la suppression de la production des PVKDs par l'utilisation de la warfarine. En effet, la warfarine est un antagoniste de la vitamine K qui inhibe la γ -carboxylation et donc la production des PVKDs. La deuxième partie de cette étude porte sur la caractérisation du profil d'expression des PVKDs ainsi que sur leurs effets sur les CSN. Les PVKDs sont également impliquées dans la phagocytose, processus indispensable au développement et à l'intégrité du système nerveux central. C'est pourquoi une partie de ce travail est dédiée au potentiel de phagocytose des CSN et à sa modulation par certaines PVKDs. Enfin, la dernière partie de ce manuscrit concerne l'implication d'une PVKD, la protéine Gas6, dans la physiopathologie rétinienne.

L'ensemble de ces investigations est présenté dans la partie Résultats de ma thèse où elles seront également discutées. Enfin, dans la dernière partie de ce manuscrit, je conclurai cette étude et en exposerai les perspectives potentielles.

ABRÉVIATIONS

ARN : Acide ribonucléique
BDNF : Brain-derived neurotrophic factor
BMP : Bone morphogenic protein
BrdU : Bromodéoxyuridine
CNTF : Ciliary neurotrophic factor
CSN : Cellules souches neurales
Dcx : Doublecortine
DG : Dentate gyrus, gyrus denté de l'hippocampe
EGF : Epithelial growth factor
EPR : Épithélium pigmentaire rétinien
FGF : Fibroblaste growth factor
Gas6 : Growth arrest specific gene 6
Gla : Résidu d'acide γ -carboxyglutamique
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
HEK : Human embryonic kidney
HGF : Hepatocyte growth factor
hPS : Protéine S humaine
ICC : Immunocytochimie
IGF : Insuline-like growth factor
IHC : Immunohistochimie
MFG-E8 : Milk fat globule EGF factor 8
MGP : Matrix Gla protein
NVC : Néovascularisation choroïdienne
PAR : Protease-activated receptor
PBS : Phosphate-buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PDGF : Platelet derived growth factor
PDI : Protein disulfide isomerase
PFA : Paraformaldéhyde
PRGP : Proline-rich Gla protein
PVDF : Polyvinylidene difluoride
PVKD : Protéine vitamine-K dépendante

RCS : Royal College of Surgeons
RMS : Rostral migratory stream
SFM : Serum free medium
Shh: sonic hedgehog
SHBG : Sex Hormone-Binding Globulin
Smo: Patched 1-smoothed
SNC : Système nerveux central
SVZ : Subventricular zone, zone sous-ventriculaire
TAM : Tyro3, Axl, Mer
TBS : Tris buffer saline
TGF- β : Transforming growth factor
TMG : Transmembrane Gla protein
TUNEL : TdT-mediated dUTP Nick End Labelling
VEGF : Vascular endothelial growth factor
VKOR : Vitamine K 2,3-époxide réductase
WB : Western blot
ZPI : protein Z-dependent protease inhibitor

INTRODUCTION

1.1 Les protéines vitamine K-dépendantes

Les protéines vitamine K-dépendantes (PVKDs) constituent une famille de 14 membres qui peuvent être répartis, selon leurs fonctions connues ou supposées, en quatre catégories : (a) plusieurs protéines du système de la coagulation sanguine, la prothrombine (ou facteur II), les facteurs VII, IX, X, la protéine Z, la protéine C, la protéine S; (b) une protéine codée par le gène GAS6 (Growth arrest specific gene 6) découvert par criblage différentiel de banques de c-DNA de cellules NIH3T3 en état d'arrêt de croissance par rapport aux cellules en croissance exponentielle, le suffixe 6 se référant au numéro du clone; (c) deux protéines intervenant dans la calcification, la Gla-protéine de l'os ou ostéocalcine (BGP pour Bone Gla protein) et la Gla-protéine de la matrice (MGP pour Matrix Gla protein); et (d) quatre Gla-protéines transmembranaires (PRGP1, PRGP2, TMG3 et TMG4) dont la fonction est jusqu'à présent inconnue (**Tableau I**).

Protéines vitamine K-dépendantes avec activité protéolytique				
Protéine	Lieu de synthèse	Fonction dans la coagulation du sang	Récepteurs cellulaires	Références
Prothrombine ou facteur II	Foie	Zymogène du FIIa procoagulant, la thrombine active le FVIII	PAR ₁ PAR ₃ PAR ₄	(Leger et al., 2006; Preissner et al., 2000)
Facteur VII	Foie	Zymogène du FVIIa procoagulant activé par FIIa. Active les FIX et X.	PAR ₂	(Carmeliet, 2001; Feistritzer et al., 2005)
Facteur IX	Foie	Zymogène du FIXa procoagulant activé par le FVIIa. Active le FX.	Inconnu	(Yang and Walsh, 2005)
Facteur X	Foie	Zymogène du FXa procoagulant activé par FVIIa et IXa. Active le facteur II.	PAR ₁ PAR ₂	(Feistritzer et al., 2005)
Protéine C	Foie	Zymogène de la protéine C activée anticoagulante. Inactive les FVa et VIIIa.	EPCR, PAR ₁ , PAR ₃	(Domotor et al., 2003; Guo et al., 2004)

Protéines vitamine K-dépendantes sans activité protéolytique			
Protéine	Lieu de synthèse	Fonctions et effets cellulaires	Références
Protéine Z	Foie	Absence d'effet cellulaire, cofacteur de la protéine ZPI inhibant le FXa.	(Broze, 2001)
protéine S	Foie, cerveau, cœur, ovaires, placenta, rate, reins, cellules endothéliales, mégakaryocytes, ostéoblastes, cellules du système nerveux, cellules vasculaires lisses et cellules de Leydig.	Cofacteur de la protéine C; Stimule la résorption osseuse. Participe à la phagocytose des cellules apoptotiques et au « shedding » des photorécepteurs.	(Anderson et al., 2003; Hafizi and Dahlback, 2006b; Hall et al., 2005; He et al., 1995; Jamison et al., 1995; Maillard et al., 1992; Nakamura et al., 1998b)
Gas6	Cœur, cerveau, poumons, estomac, rein, intestin, rétine, testicules (cellules de Leydig et cellules de Sertoli), pancréas, os (ostéoclastes et ostéoblastes) et cellules endothéliales.	Stimule la survie, la prolifération, la migration, l'adhérence cellulaire ainsi que la résorption osseuse; Participe à la reconnaissance et à la phagocytose des cellules apoptotique et au « shedding ».	(Hafizi and Dahlback, 2006b; Hall et al., 2005; Manfioletti et al., 1993; Nakamura et al., 1998b; Wu et al., 2006)
MGP	Cellules vasculaires du muscle lisse et chondrocytes	Inhibiteur de la calcification de la matrice extracellulaire	(Murshed et al., 2004)
BGP/ Ostéocalcine	Ostéoblastes et odontoblastes	Inhibiteur de la formation osseuse	(Ducy et al., 1996)
TMG3 et TMG4	Chez l'Homme adulte, ARNm fortement exprimé au niveau du cerveau et du cœur pour TMG3 et des reins et du pancréas pour TMG4	inconnu	(Kulman et al., 2001)
PRGP1 et PRGP2	Chez l'Homme adulte, ARNm fortement exprimé dans le placenta et le pancréas pour PRGP1 et PRGP2 et au niveau des reins pour PRGP2.	inconnu	(Kulman et al., 1997)

Tableau I : Protéines Vitamine K-dépendantes avec ou sans activité protéolytique

Les PVKDs sont caractérisées par la présence dans leur structure d'un domaine riche en acide glutamique. Ces résidus sont la cible d'une modification post-traductionnelle, la γ -carboxylation, qui est catalysée par une enzyme, la γ -carboxylase et est inhibée par un agent pharmacologique, la warfarine. Cette réaction induit la transformation des résidus d'acide glutamique en résidus d'acide γ -carboxyglutamique (ou résidus Gla). L'ensemble des ces

résidus forme alors un domaine nécessaire à la fonction des PVKDs nommé communément domaine Gla. La réaction de γ -carboxylation ainsi que sa régulation feront l'objet de la partie 1.2 de cette introduction.

1.1.1 Les protéines intervenant dans la coagulation sanguine

Hormis la protéine S, Gas6 et la protéine Z, les protéines vitamine K-dépendantes de la cascade de la coagulation du sang sont des sérine protéases activées par protéolyse par des sérine protéases (**Tableau I et Figure 1**) (Carmeliet, 2001; Preissner et al., 2000).

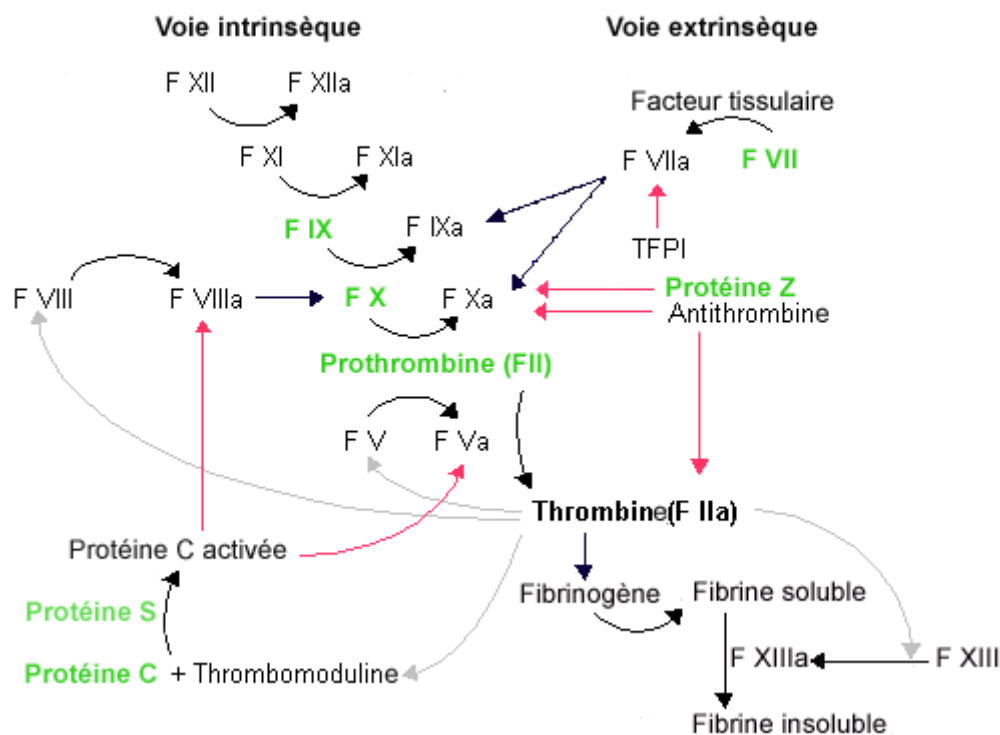


Figure 1 : PVKDs intervenant dans la cascade de coagulation du sang (Modifié d'après <http://kuwaitmd.hsc.edu.kw>). Certaines PVKDs (en vert) interviennent dans la cascade de coagulation du sang qui met en jeu deux voies, une voie intrinsèque composée de facteurs présents dans la circulation et une voie extrinsèque comportant des facteurs tissulaires non présents normalement dans la circulation sanguine et libérés lors d'une lésion vasculaire. Les voies stimulatrices de la coagulation sont figurées en noir, les voies inhibitrices en rouge et les voies de rétrocontrôle par la thrombine en gris.

Le rôle de la protéine Z dans la coagulation du sang n'est pas entièrement élucidé et elle n'est pas connue pour activer des récepteurs membranaires (Vasse, 2008). La thrombine ainsi que le facteur Xa, le facteur VIIa et la protéine C activée, activent des membres de la

famille des récepteurs couplés aux protéines G activables par protéolyse, «les PARs» (Carmeliet, 2001; Leger et al., 2006; Preissner et al., 2000).

1.1.2 Les protéines de la matrice extracellulaire

Gla protéine de la matrice ou Matrix Gla protein (MGP)

La protéine MGP est une protéine de 79 résidus exprimée dans l'os, les dents et le cartilage. Elle contient cinq résidus Gla et possède 20% d'homologie avec l'ostéocalcine ou BGP (Price et al., 1987). La γ -carboxylation de cette protéine lui confère une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite, principal cristal minéral présent dans les matrices extracellulaires.

La minéralisation de la matrice extracellulaire est un processus physiologique présent au niveau des dents, de l'os et du cartilage hypertrophique. Les souris déficientes pour la MGP présentent une calcification prématurée de l'os ainsi qu'une calcification de la trachée et des vaisseaux qui mènent à une mort prématurée (Luo et al., 1997). Les études menées chez les souris déficientes en MGP ont permis d'identifier cette protéine comme inhibiteur de la calcification du cartilage et du système vasculaire. Elle agit localement et non de façon systématique pour prévenir la minéralisation de la matrice extracellulaire (Murshed et al., 2004; Proudfoot et al., 1998). Murshed et collaborateurs ont étudié la minéralisation osseuse chez des souris exprimant une forme mutée de la MGP au niveau de ses résidus Gla par rapport à des souris contrôles et ont mis en évidence que les résidus Gla étaient nécessaires à la fonction antiminéralisante de la protéine MGP (Murshed et al., 2004). La protéine MGP a la capacité de se lier à la protéine BMP-2 (Bone morphogenic protein 2) (Wallin et al., 2000) et d'inhiber ses propriétés de stimulateur de la formation osseuse (Bostrom et al., 2001). La protéine BMP-2 est une protéine appartenant à la superfamille des facteurs de croissance TGF- β (Zebboudj et al., 2002). Des expériences d'immunohistochimie ont montré que des lésions calcifiées dans la paroi aortique de rats âgés présentent une concentration en MGP faiblement γ -carboxylée et ne liant pas la BMP-2 (Sweatt et al., 2003). La calcification des artères liée à l'âge pourrait donc être une conséquence d'une faible γ -carboxylation de la protéine MGP qui ne s'opposerait plus à l'activité de la BMP-2. La protéine MGP γ -carboxylée inhibe la différenciation cellulaire induite par BMP-2 en se fixant à cette protéine et en stimulant son association aux composants de la matrice. L'interaction entre la MGP et la BMP-2 interfère dans la liaison de BMP-2 à son récepteur et dans l'activation de Smad1, molécule intervenant dans la signalisation de la protéine BMP (Zebboudj et al., 2002).

Ostéocalcine ou Bone Gla protein (BGP)

L'ostéocalcine est une protéine de 49 acides aminés comportant trois résidus Gla. Elle est essentiellement synthétisée par les ostéoblastes, cellules responsables de la formation de l'os. Tout comme pour la protéine MGP, seule la forme γ -carboxylée de la protéine BGP a la capacité de se fixer aux cristaux d'hydroxyapatite de la matrice osseuse. Le taux de protéine BGP décarboxylée dans le sérum est d'ailleurs un indicateur de la sévérité de l'ostéoporose chez les femmes après la ménopause (Szulc et al., 1996). Des souris déficientes en protéine BGP ne présentent pas de défaut de minéralisation de la matrice extracellulaire de l'os mais une augmentation de la masse osseuse. La fonction majeure de la BGP se limite à la formation osseuse sans altérer la résorption de l'os ni sa minéralisation (Ducy et al., 1996).

1.1.3 Les protéines transmembranaires

Kulman et al ont découvert en 1997 l'existence de deux nouvelles PVKDs transmembranaires (Kulman et al., 1997) dont la fonction n'est pour le moment pas élucidée. Ces protéines possèdent un domaine intracellulaire riche en prolines, ainsi que des séquences PPXY (P pour la proline, X pour un acide aminé aléatoire et Y pour la tyrosine; motif de liaison aux domaines WW) et PPXP (domaine de liaison au domaine SH3) impliqués dans une multitude de voies de signalisation. Ces deux protéines de 23 et 17 kDa ont été appelées PRGP1 et PRGP2 pour «proline-rich γ -carboxyglutamic acid protein». Elles sont exprimées dans une variété de tissus extra-hépatiques, PRGP1 étant majoritairement exprimée dans la moelle épinière et PRGP2 dans la thyroïde.

Ce même groupe a découvert par la suite deux autres protéines Gla transmembranaires, nommées TMG3 et TMG4 pour «transmembrane Gla protein» (Kulman et al., 2001). L'analyse de leurs séquences a montré que ces protéines possédaient, tout comme les protéines PRGPs, un motif PPXY. Seule la protéine TMG4 possède un motif PPXP. Le domaine de γ -carboxylation de ces protéines se trouve au niveau extracellulaire. Les protéines TMG3 et TMG4, dont la fonction est actuellement inconnue, sont généralement exprimées de façon importante et variable dans les tissus adultes et fœtaux sans qu'aucune spécificité tissulaire ne soit clairement démontrée (Kulman et al., 2001).

1.1.4 Peptides neurotoxiques

Des peptides neurotoxiques γ -carboxylés, appelés conotoxines ont été isolés pour la première fois à partir d'escargots marins nommé *Conus geographus* (McIntosh et al., 1984). Ces peptides de 10 à 30 acides aminés sont utilisés par ces mollusques pour immobiliser leur proie. Ces peptides agissent sur différentes cibles. La conotoxine α cible les récepteurs nicotiniques des nerfs et des muscles, la conotoxine δ inhibe l'inactivation des canaux sodiques voltage-dépendants, la conotoxine K inhibe les canaux potassium, la conotoxine μ inhibe l'inactivation des canaux sodiques voltage-dépendants dans le muscle, la conotoxine ω inhibe les canaux calcium voltage-dépendants de type N (effet analgésique) (Brown et al., 2005; Janes, 2005). La majorité de ces peptides agissent sur des canaux ioniques ou encore sur des récepteurs ionotropiques.

Ces peptides, en vertu de leur capacité à inhiber certains récepteurs nicotiniques, pourraient être utilisés dans le traitement symptomatique de certaines maladies neurodégénératives du système nerveux telle que la maladie d'Alzheimer (Tuppo and Arias, 2005). Conjugués à un marqueur approprié (rhodamine), ils permettent également de marquer des canaux sodiques neuronaux au niveau des cellules et d'en étudier la distribution.

1.1.5 Autres PVKDs

La famille des protéines vitamine K-dépendantes regroupe peu de protéines mais s'agrandit de jour en jour. Des travaux récents montrent que certaines connexines, protéines structurales des jonctions communicantes, sont γ -carboxylées (Abdelmohsen et al., 2005; Locke et al., 2006). Pour le moment, aucune fonction n'est associée à cette modification. D'autres protéines vitamine K-dépendantes ont également été découvertes ces dernières années, c'est le cas de la périostine. Cette protéine, associée à la matrice extracellulaire et dont l'expression varie au cours du développement, serait notamment impliquée dans la physiologie de l'os, du cœur et lors de l'ontogenèse (Rios et al., 2005). Une étude montre qu'elle est γ -carboxylée, produite par des cellules mésenchymateuses dérivées de l'os et qu'elle est retrouvée dans des nodules osseux minéralisés *in vitro* (Coutu et al., 2008).

1.2 La γ -carboxylation des PVKDs

Les modifications post-traductionnelles des protéines consistent en leur modification par des enzymes du réticulum endoplasmique. Elles régulent la «machinerie cellulaire» en modulant par exemple leur adressage à un compartiment cellulaire, leur activité enzymatique, leur dégradation ou encore leur intégration à une cascade de signalisation. Les modifications post-traductionnelles sont donc d'une importance capitale. Certaines d'entre elles sont très fréquentes et concernent un grand nombre de protéines, c'est le cas de la phosphorylation. D'autres se limitent à un nombre restreint de protéines, c'est le cas de la γ -carboxylation.

1.2.1 La γ -carboxylation : une modification post-traductionnelle impliquant la γ -carboxylase et le complexe vitamine K réductase

1.2.1.1 La réaction de γ -carboxylation

La γ -carboxylation consiste en la substitution, au niveau du carbone γ d'un acide glutamique, d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle, le modifiant ainsi en acide γ -carboxyglutamique (résidu Gla) (Wajih et al., 2004). Cette réaction a lieu dans le réticulum endoplasmique. Elle est catalysée par la γ -carboxylase qui nécessite la vitamine K sous forme réduite comme cofacteur. La réaction enzymatique, qui sera plus amplement détaillée dans la partie 1.2.1.2 de l'introduction, génère la forme oxydée de la vitamine K qui est recyclée sous une forme réduite par la vitamine K 2,3,-epoxide réductase ou VKOR (**Figure 2**). La vitamine K réduite sera alors transférée de la VKOR à la γ -carboxylase par un mécanisme jusqu'alors inconnu.

C'est ainsi que les protéines γ -carboxylées, dont la modification post-traductionnelle dépend de la vitamine K, sont couramment appelées protéines vitamine K-dépendantes (PVKDs).

La VKOR et la γ -carboxylase sont localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique et fonctionnent comme un assemblage supra moléculaire de protéines (**Figure 2**). La warfarine (qui fait l'objet de la partie 1.2.1.3 de l'introduction) a la propriété de se fixer à la VKOR et d'inhiber son activité. La Caluménine, protéine chaperone, est liée à cet assemblage protéique. Elle lie physiquement la γ -carboxylase et inhibe son activité (Wajih et al., 2004). Elle affecte également l'activité de la VKOR ainsi que sa sensibilité à la warfarine (Wallin and Hutson, 2004; Wallin et al., 2001).

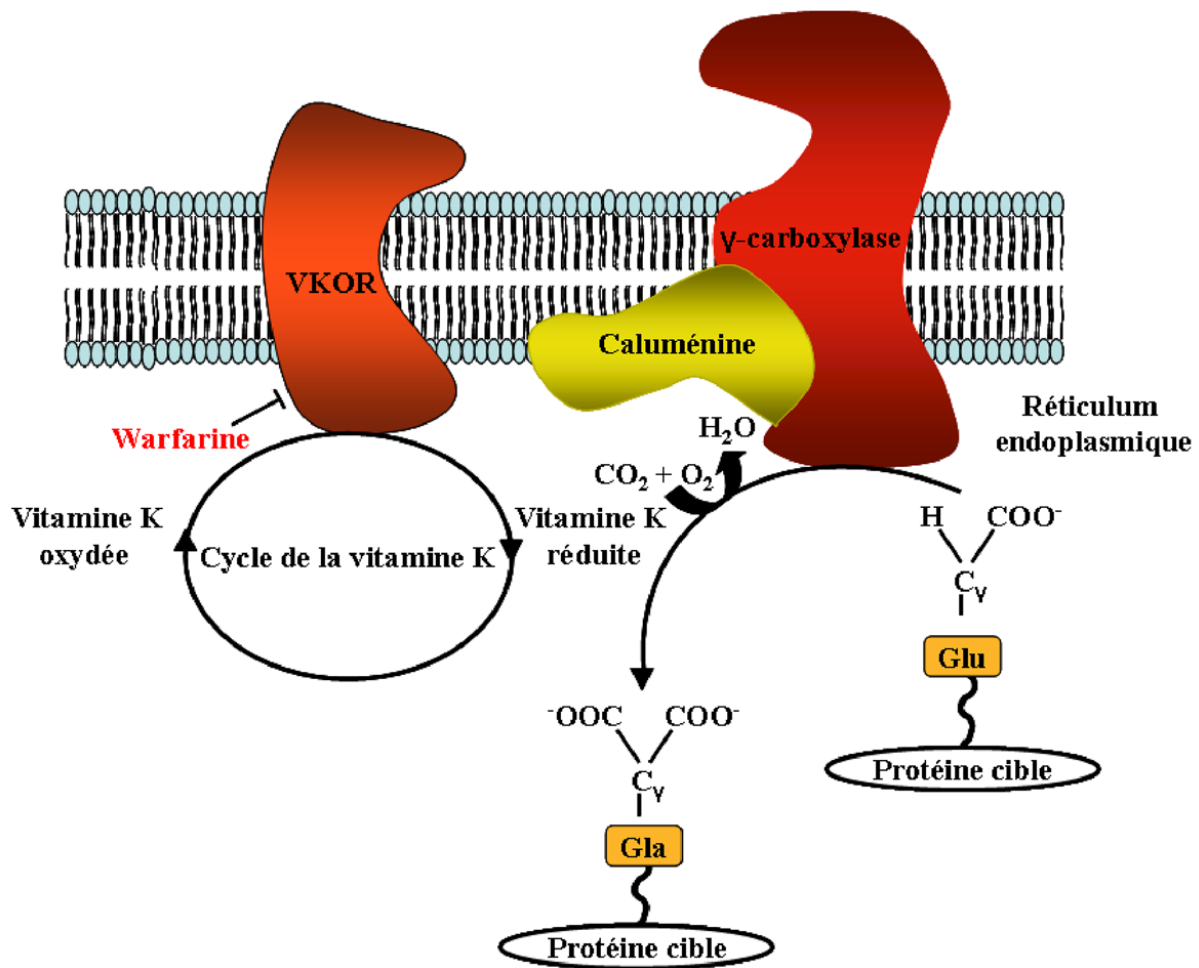


Figure 2 : Couplage entre la réaction de γ -carboxylation et le cycle de la vitamine K au niveau du réticulum endoplasmique (Modifiée d'après (Benzakour et al., 2007)). La γ -carboxylation du glutamate (Glu) en γ -carboxyglutamate (Gla) de précurseurs protéiques est couplée à l'oxydation de la vitamine K. La vitamine K 2,3-époxyde réductase ou VKOR recycle la vitamine K oxydée. La caluménine est liée à la γ -carboxylase et régule son activité ainsi que celle de la VKOR. La warfarine inhibe le recyclage de la vitamine K oxydée par l'époxyde réductase (VKOR).

1.2.1.2 La vitamine K

La vitamine K (K pour Koagulation en allemand) a été identifiée par les lauréats du prix Nobel de médecine et physiologie en 1943, Karl Dam et Edwards Doisy, comme nutriment essentiel à la coagulation du sang. La coagulation sanguine est régulée par une succession de clivages protéolytiques de facteurs plasmatiques sécrétés par le foie dont certains ne peuvent être produits sous forme active qu'en présence de vitamine K (Mann et al., 1990).

Les vitamines K

Les vitamines K constituent une famille de vitamines liposolubles ayant une structure similaire. Cette famille inclut la vitamine K1 ou phyloquinone, les vitamines K2 ou ménaquinones et la vitamine K3 ou ménadione (Newman and Shearer, 1998; Plaza and Lamson, 2005). Les différences de structure entre ces vitamines K se trouvent au niveau du groupe de substitution R (**Figure 3**).

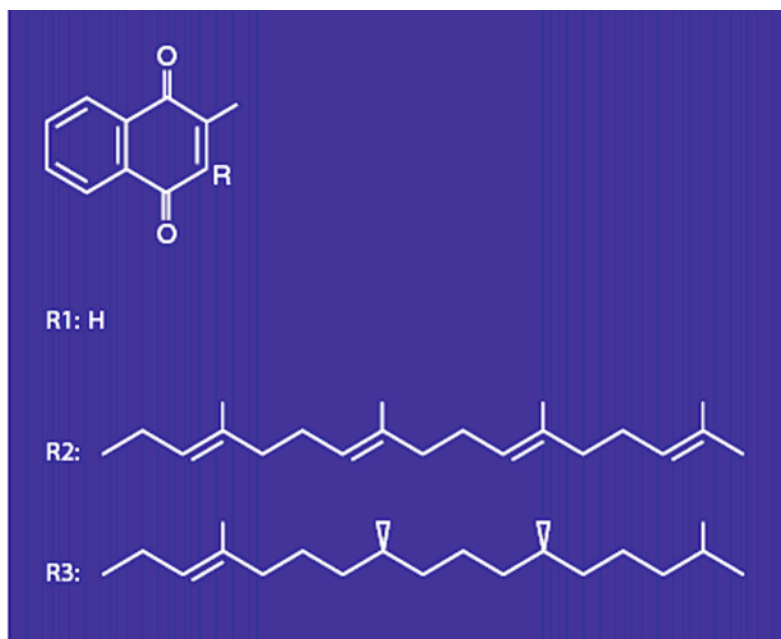


Figure 3 : Les différentes formes de vitamine K (D'après (Plaza and Lamson, 2005)) : R1 : ménadione ou vitamine K3; R2, ménaquinone-4 ou vitamine K2 (MK-4); R3: phyloquinone ou vitamine K1.

La source alimentaire majeure de vitamine K est la vitamine K1 provenant des végétaux chlorophylliens. Cette vitamine K est également présente de façon significative dans des végétaux non chlorophylliens, dans certaines huiles végétales ainsi que dans les fruits et les graines. Une étude réalisée sur des populations britanniques et américaines montre que nous consommons en moyenne 70 à 80 μg de vitamine K1 par jour (Bolton-Smith et al., 2000). La source alimentaire la plus riche de vitamine K2 correspond aux préparations alimentaires impliquant la fermentation bactérienne représentées typiquement par le fromage. Elle est également produite chez l'Homme par des bactéries résidentes du gros intestin. Il existe plusieurs vitamines K2 ou ménaquinones. Leur nomenclature est basée sur le nombre de résidus isoprène présents sur leur chaîne latérale, ainsi elle débute avec la ménaquinone-4 ou MK4 et s'achève avec la ménaquinone-14 ou MK14. La vitamine K3 n'est pas une vitamine « naturelle », mais un analogue synthétique de vitamine K.

Le transport de la vitamine K à l'intérieur de la cellule est permis grâce à son interaction avec des apolipoprotéines, qui interagissent à leur tour avec des récepteurs membranaires, permettant ainsi l'entrée intracellulaire de particules contenant de la vitamine K (Cooper, 1997).

La vitamine K est majoritairement stockée par le foie qui est également le site de synthèse de la majorité des PVKDs. Le stock de vitamine K hépatique est minoritairement constitué de vitamine K1 et majoritairement de vitamine K2. De faibles taux de vitamine K1 et des taux particulièrement importants de MK-4 sont également présents de façon ubiquitaire dans les tissus extrahépatiques tels que le cerveau, le pancréas et les poumons (Thijssen and Drittij-Reijnders, 1996). Contrairement à d'autres vitamines telles que la vitamine A, D ou E, la vitamine K est faiblement présente dans les tissus et son taux sanguin relativement faible. En effet 60 à 70% de la vitamine K ingérée sont excrétés dans la bile ou l'urine et, en relation avec notre travail, le métabolisme de la vitamine K dans la rétine et le cerveau est très peu connu (Pour revue (Shearer and Newman, 2008)).

La vitamine K : cofacteur de la réaction de γ -carboxylation

La réaction de γ -carboxylation est accompagnée de la conversion de la vitamine K réduite nommée également hydroquinone ou K1H2 en vitamine K oxydée ou vitamine K 2,3-époxyde. Le recyclage de la vitamine K nécessite deux réactions enzymatiques où l'époxyde est dans un premier temps réduite en vitamine K quinone et par la suite en vitamine K hydroquinone. Ces deux réactions sont catalysées par la VKOR dont l'activité dépend d'un cofacteur dithiol servant de donneur d'électron, ce que je détaillerai dans la partie 1.2.1.3 de l'introduction. Ces deux étapes sont inhibées par la warfarine ainsi que par ses dérivés (Wajih et al., 2004).

L'apport de vitamine K par l'alimentation se fait sous une forme oxydée, vitamine K quinone, qui doit être réduite en vitamine K hydroquinone afin de rendre possible son utilisation comme cofacteur de la γ -carboxylase (**Figure 4**). De plus, l'apport de vitamine K par l'alimentation étant très faible par rapport à son utilisation pour la production des protéines γ -carboxylées, la vitamine K époxyde doit donc être recyclée en permanence en vitamine K hydroquinone.

La forme majeure de vitamine K utilisée comme cofacteur de la γ -carboxylation est la vitamine K1, néanmoins certaines ménaquinones peuvent remplir ce rôle (Suttie, 1995).

Une autre enzyme NADH-dépendante, la DT-Diaphorase, a la capacité de réduire la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone mais pas la vitamine K époxyde en vitamine K quinone (**Figure 4**). Cette enzyme, qui utilise exclusivement la vitamine K quinone provenant

de l'alimentation comme cofacteur, présente la particularité de ne pas être sensible à la warfarine et serait donc responsable de certains cas de résistance à la warfarine, ce qui sera détaillé plus loin (Greaves et al., 1973).

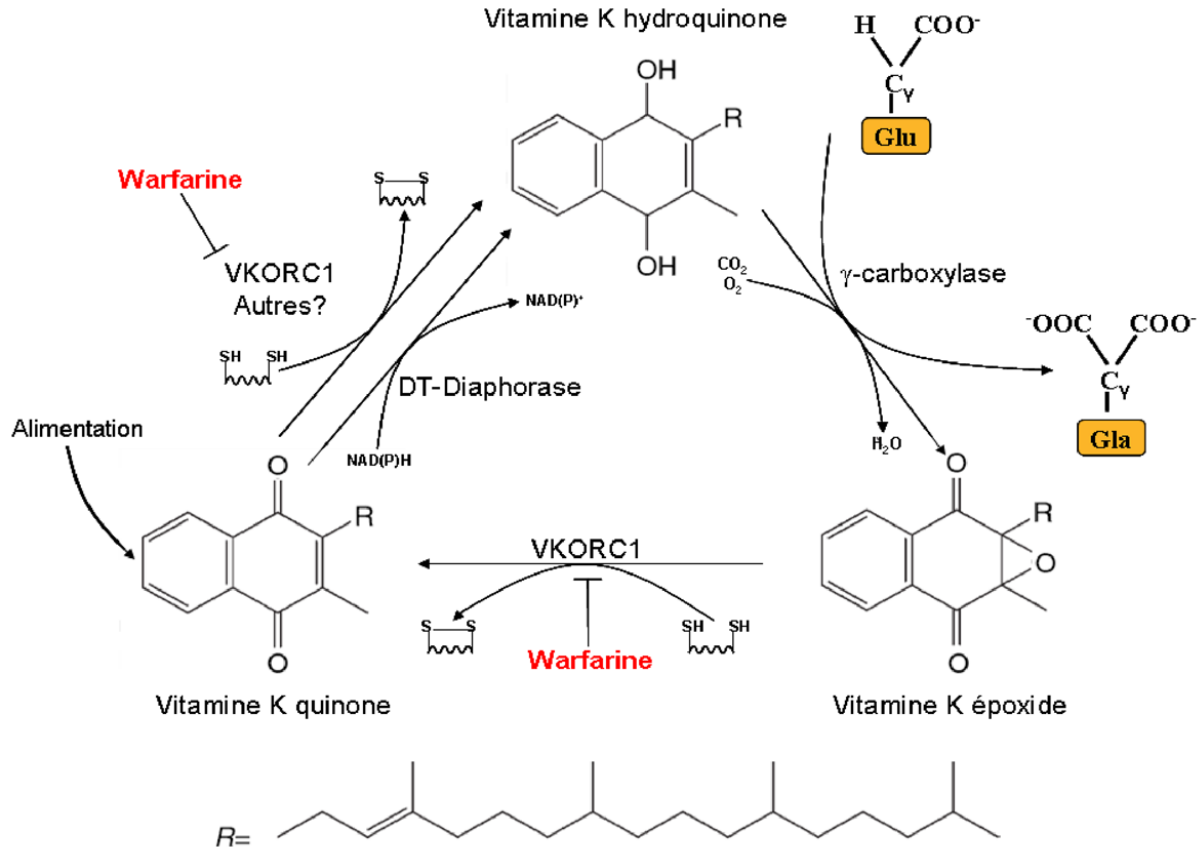


Figure 4 : Cycle de la vitamine K et réaction de γ -carboxylation. La vitamine K hydroquinone est nécessaire à la γ -carboxylation des protéines comme cofacteur de la γ -carboxylase. Elle est oxydée au cours de la réaction en vitamine K époxyde. La vitamine K époxyde est recyclée grâce à l'activité d'une sous-unité de la VKOR nommée VKORC1 en vitamine K quinone puis hydroquinone. Ces deux étapes nécessitent un donneur d'électron, (groupe dithiol SH-SH) et sont inhibées par la warfarine. La DT-Diaphorase peut également assurer la formation de vitamine K hydroquinone à partir de vitamine K quinone.

Autres fonctions de la vitamine K

Un grand nombre d'études montre que la vitamine K a des effets spécifiques indépendants de la réaction de γ -carboxylation. La MK-4 a été la première à avoir été identifiée dans les années 1990 comme ayant une importance capitale pour le bon fonctionnement de l'os. Une étude montre que la MK-4 inhibe la synthèse de prostaglandines E_2 , un agent inducteur de résorption osseuse dans les cultures d'ostéoblastes (Koshihara et al.,

1993). La MK-4 inhibe également la formation de cellules ostéoclastiques dans des cultures dérivées de moelle osseuse (Hara et al., 1995). D'autres études montrent que la MK-4 inhibe la croissance de certains types de cellules cancéreuses. Une étude a notamment montré pour des patients atteints de carcinomes hépatocellulaires, qu'une dose journalière de MK-4 de 45 mg induit une baisse significative de la probabilité de réapparition de la tumeur primaire après exérèse (Mizuta et al., 2006). Ceci s'expliquerait par une action directe de cette vitamine K sur certaines protéines du cycle cellulaire (Kuriyama et al., 2005).

Un faible nombre d'étude montre également une relation inverse entre le taux de vitamine K et la réponse inflammatoire (Reddi et al., 1995). La vitamine K est également impliquée dans la prévention de dommages oxydatifs (Li et al., 2003), dans la synthèse des sphingolipides (Lev and Milford, 1972) ainsi que dans l'activité exocrine du pancréas (Thomas et al., 2004).

1.2.1.3 La VKOR

VKOR et centre rédox

La VKOR, enzyme qui catalyse la conversion de la vitamine K oxydée en vitamine K réduite, est un complexe protéique de la membrane du réticulum endoplasmique. Ce complexe contient notamment une protéine de 18 kDa, protéine intégralement hydrophobe contenant trois domaines transmembranaires potentiels (Wajih et al., 2005) nommée VKORC1. Cette sous-unité de la VKOR, possède un centre rédox CXXC « thioredoxine-like », essentiel à la réduction de la vitamine K. Ce centre rédox, riche en cystéine, constitue la cible de la warfarine (Rost et al., 2005). Des travaux récents montrent que la protéine PDI (Protein disulfide isomerase) serait le donneur d'électron pour le centre rédox de la VKORC1 (Wajih et al., 2007) (**Figure 5**). Cette dernière est la protéine majeure du réticulum endoplasmique impliquée dans les réactions d'échange entre groupements dithiol (Wilkinson and Gilbert, 2004).

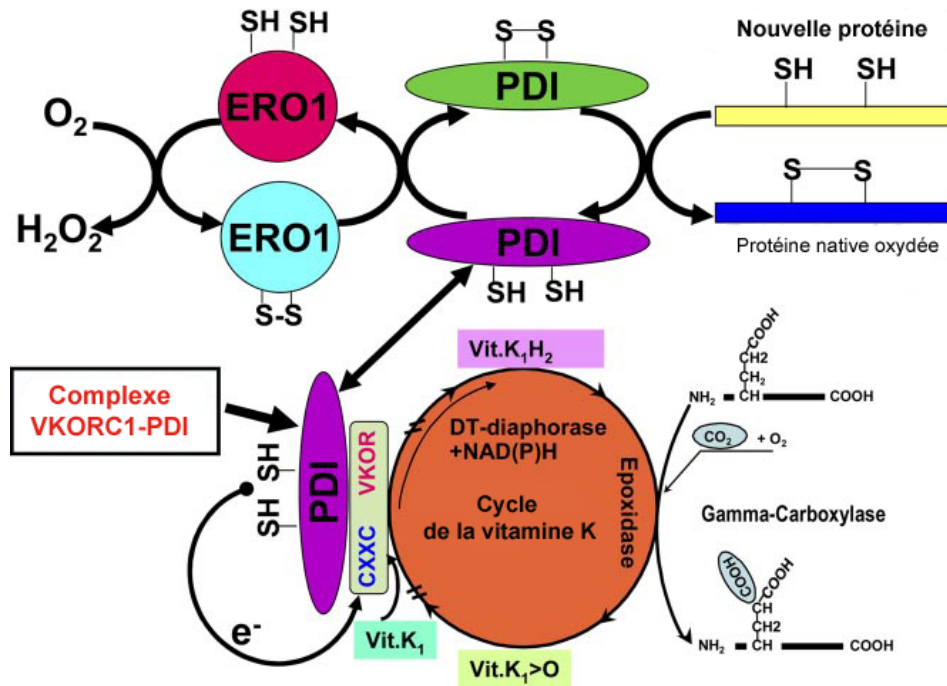


Figure 5 : La γ -carboxylation des protéines est liée à l'oxydation de la protéine PDI dans le réticulum endoplasmique (Modifiée d'après (Wajih et al., 2007)). Les centres redox CGHC (S-S) de la protéine PDI sont réduits (SH-SH) lorsque la protéine PDI catalyse l'oxydation d'une nouvelle protéine dans le réticulum endoplasmique. La réoxydation des centres redox de la PDI par la protéine ERO1 (endoplasmic réticulum oxidase 1) lui permet de continuer son action. La protéine PDI forme un complexe stable avec la protéine VKORC1 dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elle fournirait les électrons au centre redox CXXC de la VKORC1 nécessaire à la réduction de vitamine K oxydée ($\text{Vit.K}_1 > \text{O}$) en vitamine K réduite ($\text{Vit.K}_1 \text{H}_2$).

La warfarine

La warfarine, ou 3-[α -acétonyl-benzyl]-4-hydroxycoumarin], est une molécule dérivée des coumarines qui lie et inhibe l'activité de la VKOR et par conséquent bloque le cycle de la vitamine K et inhibe la réaction de γ -carboxylation (**Figure 2**)(Wallin and Hutson, 2004). Cette propriété de la warfarine en fait une des molécules les plus couramment utilisées en thérapie antithrombotique (Wallin and Hutson, 2004).

La warfarine est un mélange racémique de deux isomères, la forme S et la forme R, chacune de ces formes ayant un métabolisme spécifique dans les hépatocytes (Gage and Milligan, 2005). La forme S est métabolisée par le Cytochrome P450 (CYP) 2C9 (CYP2C9 : Cytochrome P450, sous-famille IIC, polypeptide 9), enzyme catalysant son hydroxylation, alors que la forme R est métabolisée par les enzymes CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A4.

La demie-vie moyenne de la warfarine avoisine 36 heures. Bien que la R-warfarine ait une demie-vie plus longue que la S-warfarine, cette dernière est biologiquement 3 à 5 fois plus efficace (Gage and Milligan, 2005). Une étude montre que les deux énantiomères de la warfarine induisent une augmentation significative du temps de coagulation du plasma sanguin, mais cette augmentation est plus élevée dans le cas de la S-warfarine ($1,8 \pm 0,8s$) que dans le cas de la R-warfarine ($1,0 \pm 0,3s$) (Choonara et al., 1986). La formation de vitamine K oxydée, indicateur du degré d'inhibition de l'époxide réductase, est aussi significativement plus élevée en présence de l'énantiomère S (Choonara et al., 1986). L'ensemble de ces données suggère que la S-warfarine aurait un potentiel anticoagulant plus important que la R-warfarine. C'est pourquoi dans notre étude, la majorité des expérimentations *in vitro* visant à supprimer la sécrétion et/ou l'activité des PVKDs est réalisée en présence de S-warfarine.

VKOR et résistance à la warfarine

La résistance à la warfarine peut être d'ordre pharmacologique, nutritionnel, ou génétique. Le turn-over rapide des drogues dans le foie ou une trop grande consommation de vitamine K1 peuvent être la cause de résistance à la warfarine observée. Lorsque la concentration de vitamine K1 est trop élevée dans le foie, la vitamine K1 peut être réduite par la DT-diaphorase, comme nous l'avons mentionné précédemment. Cette voie alternative permet à la réaction de γ -carboxylation d'avoir lieu même en présence de warfarine (Greaves et al., 1973) (**Figure 4**).

Une résistance à la warfarine associée à une faible activité de la VKOR dans le foie a également été constatée. Rost et collaborateurs ont montré que deux maladies humaines héréditaires étaient dues à des mutations alléliques dans le gène codant pour la protéine VKORC1 (Rost et al., 2004). Ces deux maladies sont la VKCFD2 (combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors type 2) ou déficience en facteur de coagulation vitamine K-dépendant de type 2 et la WR (warfarin resistance) ou résistance aux drogues anticoagulantes de type coumarine. Ces pathologies autosomales récessives sont caractérisées par une déficience de tous les facteurs de coagulation vitamine K-dépendants. Les symptômes cliniques de ces pathologies varient en fonction du taux de facteur de coagulation circulant mais se manifestent généralement par des hémorragies (Rost et al., 2004) (pour revue (Zhang and Ginsburg, 2004)).

De plus, le promoteur du gène codant pour la VKORC1 présente un polymorphisme A>G en position -1639. Les patients sensibles à la warfarine sont homozygotes AA en position -1639, alors que les patients résistants à la warfarine sont hétérozygotes AG ou homozygotes GG. Le fait que les individus ayant un génotype -1639 GG nécessitent des doses

plus importantes de warfarine peut être expliqué par une augmentation de l'activité du promoteur du gène codant pour la protéine VKORC1 et donc par une augmentation de la synthèse de cette protéine (Yuan et al., 2005). Une autre forme de résistance à la warfarine est associée à la surexpression de la Caluménine chez le rat (**Figure 2**) (Wallin et al., 2001).

La γ -carboxylation des protéines est donc un mécanisme complexe nécessitant la présence d'un certain nombre d'enzymes et de cofacteurs. L'utilisation de la warfarine nous permettra d'inhiber l'activité et la sécrétion des PVKDs et donc d'en étudier les effets.

1.2.2 Interaction des PVKDs avec la membrane plasmique

L'ensemble des résidus d'acide γ -carboxyglutamique (résidus Gla) des protéines vitamine K-dépendantes forment un domaine appelé communément domaine Gla. La γ -carboxylation des résidus de ce domaine est directement liée à l'activité de ces protéines et leur confère la capacité de lier les phosphatidylsérines membranaires (Huang et al., 2003)

Les premières études sur le mécanisme d'interaction des protéines γ -carboxylées avec la membrane plasmique ont été réalisées sur la prothrombine en 1986 et par la suite sur le facteur de coagulation IX en 1996 par l'équipe de Bruce Furie (Borowski et al., 1986; Freedman et al., 1996). L'ensemble de ces études a permis d'identifier une région spécifique nécessaire à la liaison des protéines γ -carboxylées aux phospholipides membranaires. Cette région correspond aux résidus 1 à 11 de la région NH2 terminale du domaine Gla de la protéine concernée. La région NH2 terminale du domaine Gla subit deux changements de conformation successifs. Le premier changement de conformation est induit par la fixation de cations divalents tels que le Ca^{2+} , le Mg^{2+} ou le Mn^{2+} (**Figure 6, étape 1**). Le deuxième est spécifiquement induit par les ions Ca^{2+} . Il est associé à la formation d'une large boucle amino-terminale hydrophobe correspondant aux résidus 6 à 10 du domaine Gla (**Figure 6, étape 2**) appelée ϵ -loop. Ce domaine hydrophobe va s'insérer dans la bicouche lipidique, permettant aux protéines γ -carboxylées d'interagir avec la membrane plasmique (**Figure 6, étape 3**).

La liaison de Ca^{2+} au domaine Gla induit donc un changement de conformation lui permettant de lier la membrane plasmique contenant des phosphatidylsérines (Huang et al., 2003). La présence des ions Ca^{2+} est donc d'une importance capitale pour l'activité de certaines PVKDs. Par exemple, la liaison de la prothrombine à la membrane plasmique des plaquettes lui permet d'être à proximité du complexe prothrombinase dont elle est le substrat.

Cette liaison permet la conversion par protéolyse de la prothrombine en thrombine active. La thrombine transforme alors le fibrinogène soluble en fibrine qui se polymérise et aboutit à la formation d'un caillot sanguin (Gitel et al., 1973; Mann et al., 1982).

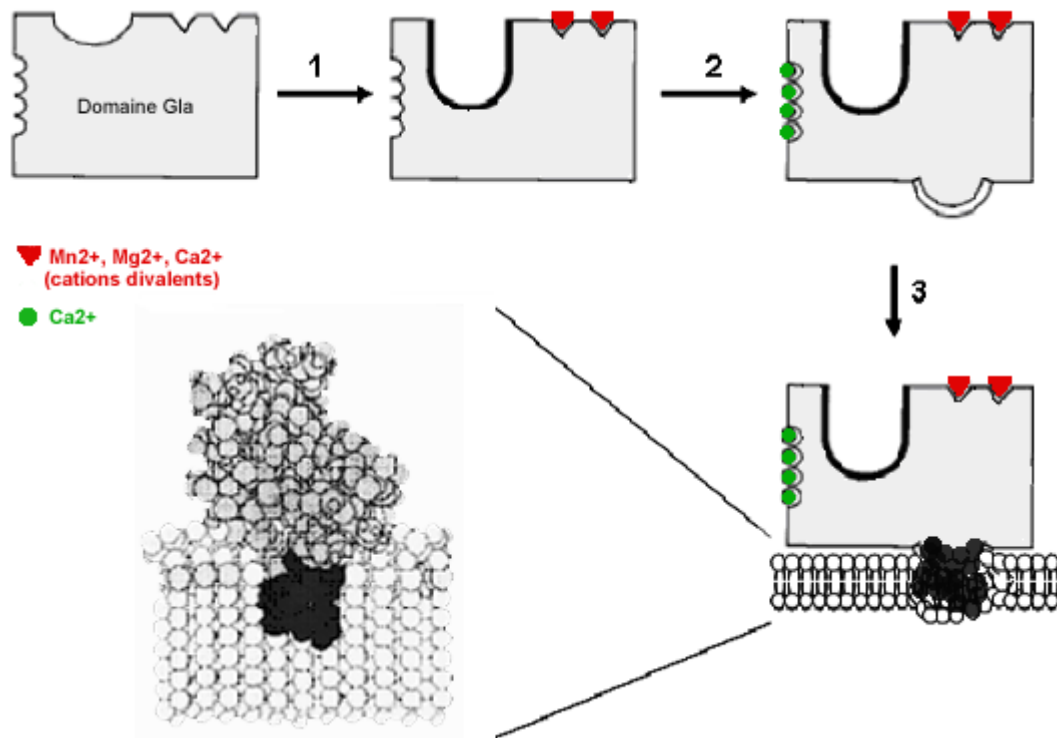


Figure 6 : Changement conformationnel du domaine Gla aboutissant à son interaction avec la membrane plasmique (Modifiée à partir de (Freedman et al., 1996)). 1, premier changement de conformation (demi-cercle ombré) induit par la fixation de cations divalents (rouge). 2, deuxième changement de conformation aboutissant à la formation d'une boucle hydrophobe (ϵ -loop) induit par les ions Ca^{2+} (vert). 3, insertion du domaine hydrophobe de l' ϵ -loop (en noir) dans la membrane plasmique.

Les différences d'affinités entre les différentes protéines γ -carboxylées et les phosphatidylsérines dépendent de résidus non conservés du domaine Gla. De plus, la liaison du domaine Gla de la prothrombine aux phosphatidylsérines contenues dans les membranes est également permise par d'autres types d'interactions telles que les interactions ioniques, hydrophobes, ou de van der Waals. La suppression de l'une de ces interactions peut induire la perte de l'interaction membrane-protéines et donc, dans le cas de la prothrombine, à un défaut de coagulation sanguine (Huang et al., 2003).

1.3 La protéine S et la protéine Gas6

Dans la famille des protéines vitamine K-dépendantes, seules les protéines S et Gas6 ont la propriété d'activer des récepteurs tyrosine kinase et d'exercer des effets cellulaires multiples. C'est ainsi que notre étude s'intéresse plus particulièrement à ces deux PVKDs qui font l'objet de ce chapitre.

1.3.1 Domaines structuraux

La protéine S (S pour Seattle) et son homologue structural Gas6 (growth arrest-specific gene 6) sont des glycoprotéines sécrétées de 69 et 75 kDa respectivement. La protéine Gas6 possède 44% d'homologie de séquence avec la protéine S et ces deux protéines présentent une identité presque complète de leurs domaines structuraux.

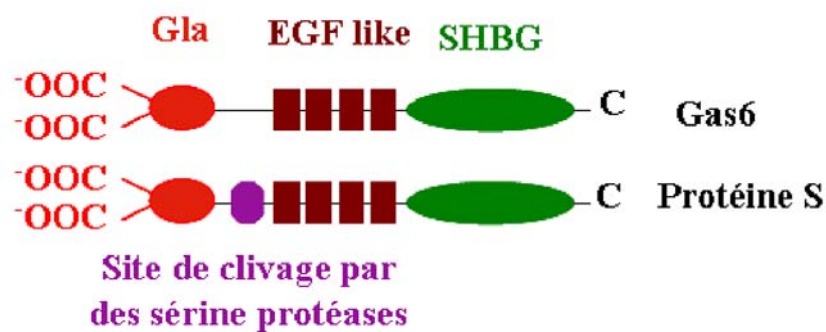


Figure 7 : Domaines structuraux de la protéine Gas6 et de la protéine S (Modifiée d'après (Benzakour et al., 2007)). La protéine Gas6 et la protéine S possèdent un domaine Gla N-terminal riche en résidus acide glutamiques pouvant être γ -carboxylés, une répétition de quatre domaines EGF-like et un domaine SHBG. La protéine S possède également un site de clivage par des sérine protéases.

En effet, à part le site de clivage putatif par des sérine protéases, propre à la protéine S, Gas6 et la protéine S présentent un domaine Gla N-terminal, une répétition de quatre domaines EGF-like et un domaine SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) (Manfioletti et al., 1993) (**Figure 7**). C'est par leur domaine SHBG que Gas6 et la protéine S interagissent avec leurs récepteurs membranaires (**Figure 8**). A la différence des autres protéines du système de la coagulation du sang dont l'expression est limitée au foie, la protéine S et la

protéine Gas6 sont produites par une grande variété de tissus et de types cellulaires (**Tableau I**) (He et al., 1995; Manfioletti et al., 1993).

1.3.2 Récepteurs membranaires : les récepteurs TAM

La protéine Gas6 et la protéine S sont les deux seuls ligands connus de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase TAM (pour «Tyro3 Axl Mer ») dont les membres sont Axl (nommé également Ufo et Ark), Tyro3 (nommé également Rse, Brt, Sky, Tif, DTK) et Mer (nommé également c-Eyk) (**Figure 8**) (Hafizi and Dahlback, 2006b; Prasad et al., 2006b). Les récepteurs TAM possèdent deux motifs immunoglobulin-like (domaine Ig), deux motifs fibronectine de type III (domaine FNIII) extracellulaires ainsi qu'un domaine tyrosine kinase intracellulaire (Figure 8a) (Hafizi and Dahlback, 2006a).

La spécificité de la protéine Gas6 et de la protéine S pour les récepteurs TAM est différente et varie d'une espèce à l'autre (Pour revue (Hafizi and Dahlback, 2006a)). La protéine Gas6 fut décrite la première comme liant et activant ces trois récepteurs tyrosine kinase avec des affinités différentes (Nagata et al., 1996; Stitt et al., 1995). Les constantes de dissociation de Gas6 pour ses récepteurs Axl, Tyro3 et Mer sont de 0,4, 2,7 et 29 nM (Nagata et al., 1996). La protéine Gas6 humaine lie les récepteurs Axl et Tyro3 avec une affinité semblable et le récepteur Mer avec une affinité 3 à 10 fois inférieure (Chen et al., 1997). Alors qu'un grand nombre de travaux montre que Gas6 lie et active les trois récepteurs TAM, la validité de la protéine S comme ligand des ces récepteurs reste toutefois plus ambiguë (Chen et al., 1997; Godowski et al., 1995; Mark et al., 1996; Nagata et al., 1996). Des études récentes montrent en effet que la protéine S recombinante de souris active les récepteurs Mer et Tyro3 de la même espèce (Prasad et al., 2006a), alors que la protéine S humaine n'active pas les récepteurs Mer (Chen et al., 1997) et Tyro3 humains ((Godowski et al., 1995; Heiring et al., 2004; Ohashi et al., 1995) pour revue (Hafizi et dalback 2006)). Aucune étude n'a permis d'établir l'activation d'Axl par la protéine S.

Les récepteurs TAM sont exprimés dans divers organes et tissus cibles (Figure 8b), et leur activation par Gas6 et la protéine S intervient dans divers processus cellulaires, ce que je détaille dans les parties suivantes pour chacun des récepteurs.

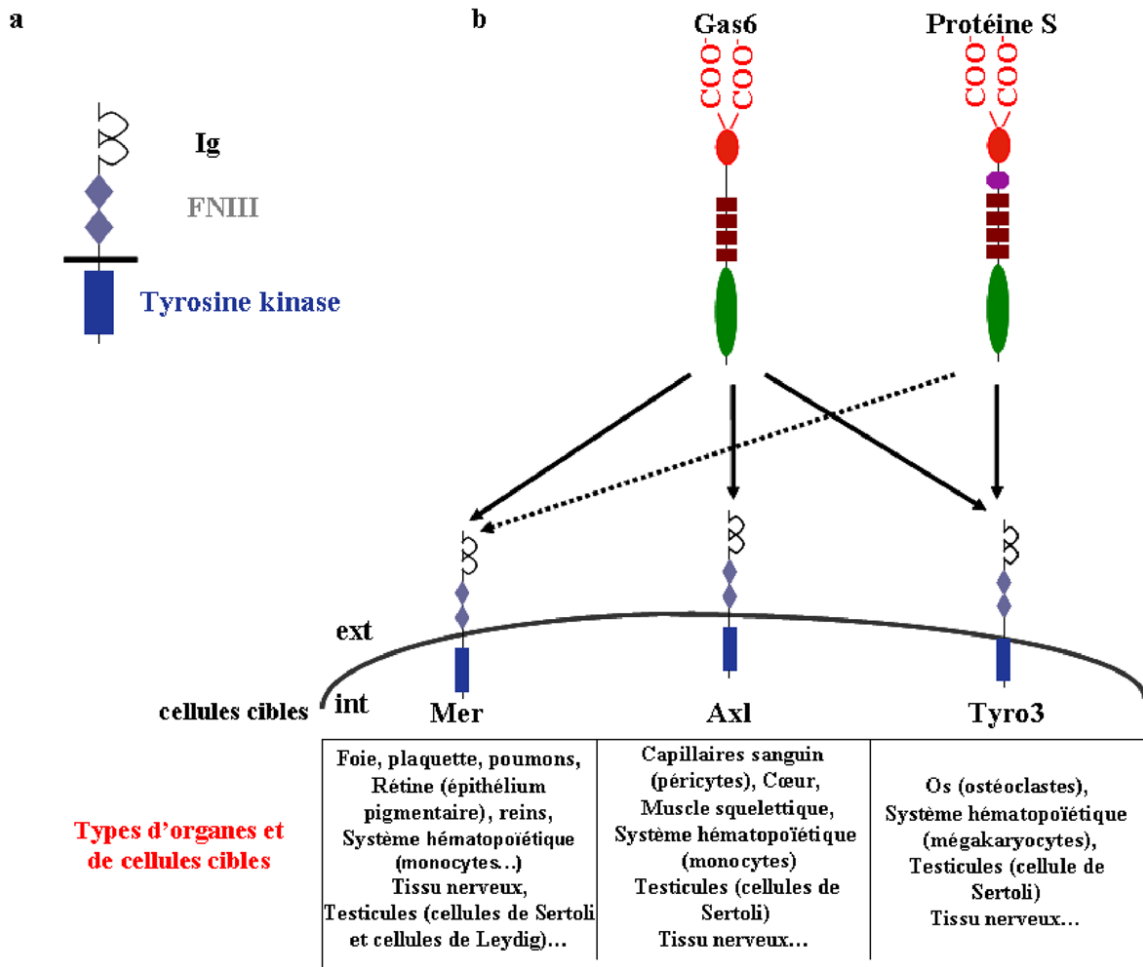


Figure 8 : Les récepteurs de la protéine Gas6 et de la protéine S : les récepteurs TAM (Modifiée d'après (Benzakour et al., 2007)). (a) Structure des récepteurs de la famille TAM comportant dans leur région extracellulaire des motifs immunoglobulin-like et fibronectine de type III et un domaine tyrosine kinase intracellulaire. (b) Interaction de Gas6 et de la protéine S avec les récepteurs de la famille TAM (Tyro3, Axl et Mer).

1.3.2.1 Le récepteur Tyro3

Le récepteur Tyro3 est le récepteur TAM le plus abondamment exprimé dans le système nerveux (**Figure 8b**) (Ohashi et al., 1995). On le trouve également dans les ovaires, les testicules, le cœur, les poumons, les reins, les ostéoclastes, la rétine ainsi que dans certaines cellules hématopoïétiques (Angelillo-Scherrer et al., 2005; Katagiri et al., 2001; Lai and Lemke, 1991; Prasad et al., 2006a).

Gas6 et la protéine S, via l'activation du récepteur Tyro3, stimulent l'activité des ostéoclastes (Katagiri et al., 2001; Nakamura et al., 1998b) dont le rôle dans l'ostéogenèse est

l'élimination de petites surfaces osseuses (résorption osseuse). Des anomalies au niveau de l'ostéogenèse n'ont pour le moment pas été décrites pour les souris Gas6^{-/-} ou pour les souris dont les gènes codant pour les récepteurs TAM ont été invalidés. Cependant, chez l'Homme, une déficience congénitale de la protéine S a été associée à une baisse de la densité minérale osseuse ainsi qu'à de l'ostéonécrose (Pierre-Jacques et al., 1997).

Prasad et collaborateurs ont également démontré l'activation du récepteur Tyro3 par la protéine S dans l'épithélium pigmentaire rétinien, ce dont nous reparlerons plus loin (Prasad et al., 2006b).

1.3.2.2 Le récepteur Axl

Le récepteur Axl est exprimé de façon ubiquitaire (O'Bryan et al., 1991) avec un niveau d'expression élevé dans l'hippocampe et le cervelet (Bellosta et al., 1995) tout comme dans les macrophages, les plaquettes, les cellules endothéliales, les muscles squelettiques, le cœur, le foie, le pancréas et les testicules (**Figure 8**) (Angelillo-Scherrer et al., 2001; Graham et al., 1995; Neubauer et al., 1994). Beaucoup d'études montrent que Gas6, via Axl stimule la survie (Melaragno et al., 2004; van Ginkel et al., 2004) et la prolifération (Sainaghi et al., 2005; Stenhoff et al., 2004) de divers types cellulaires dont les cellules vasculaires du muscle lisse (Melaragno et al., 2004), les cellules de mélanome oculaire (van Ginkel et al., 2004), les fibroblastes cardiaques (Stenhoff et al., 2004) ou encore d'une lignée cellulaire de carcinome prostatique (Sainaghi et al., 2005). La signalisation Gas6/Axl stimule également l'adhérence intercellulaire (McCloskey et al., 1997), la migration cellulaire (Fridell et al., 1998) et régule la néovascularisation et la croissance tumorale (Holland et al., 2005).

1.3.2.3 Le récepteur Mer

Le récepteur Mer est exprimé dans les cellules de lignage hématopoïétique telles que les monocytes et les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les mégacaryocytes et les plaquettes (**Figure 8**) (Angelillo-Scherrer et al., 2001; Behrens et al., 2003; Graham et al., 1995). Un fort niveau d'expression est également détecté dans les ovaires, la prostate, les testicules, les poumons, la rétine et le pancréas et un faible niveau dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques (Graham et al., 1994; Prasad et al., 2006a). Bien que la protéine S fut initialement décrite comme agoniste spécifique du récepteur Tyro3, de récentes études montrent qu'elle serait aussi un agoniste du récepteur

Mer. La protéine S et la protéine Gas6, par activation du récepteur Mer, induisent la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien (Anderson et al., 2003; Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006b). En outre, l'activation du récepteur Mer par la protéine Gas6 stimule la phagocytose de cellules apoptotiques et de débris cellulaires par les cellules de Sertoli (Xiong et al., 2008).

1.3.3 Liaison des PVKDs à leurs récepteurs membranaires

Il a clairement été démontré que le domaine SHBG de la protéine Gas6 et de la protéine S est responsable de leur interaction avec leurs récepteurs membranaires (Sasaki et al., 2006; Tanabe et al., 1997; Villoutreix et al., 1997). D'autres études montrent que l'état de γ -carboxylation du domaine Gla est également impliqué dans cette interaction.

Il a été prouvé que la protéine Gas6, dont les résidus d'acide glutamique du domaine Gla ne sont pas γ -carboxylés, n'est ni capable de lier ses récepteurs ni d'avoir une activité biologique. La protéine Gas6 se retrouve alors dans une conformation inactive (**Figure 9, Gas6 (-Gla)**). Le domaine Gla non γ -carboxylé masquerait probablement le site de liaison au récepteur. Lorsque le domaine Gla est γ -carboxylé le changement de conformation de la protéine conduit à l'exposition du domaine de liaison SHBG ce qui permet alors à Gas6 sous sa forme active d'interagir avec ses récepteurs membranaires (Tanabe et al., 1997).

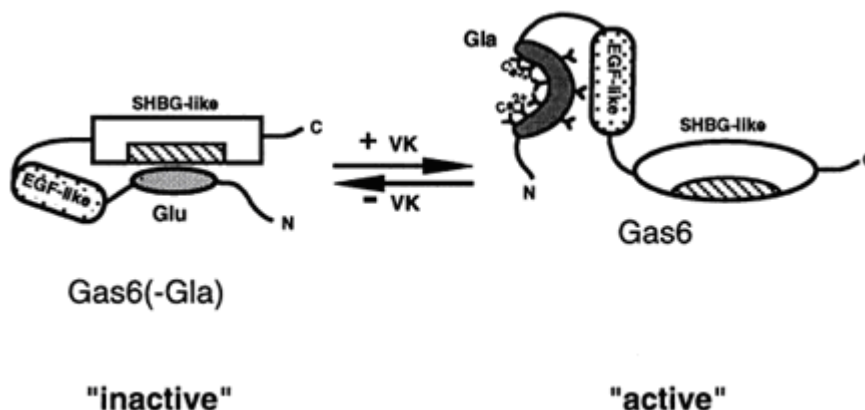


Figure 9: Modèle de régulation de l'activité biologique de la protéine Gas6 par son domaine Gla (D'après (Tanabe et al., 1997)). En absence de vitamine K (-VK), lorsque la protéine Gas6 n'est pas γ -carboxylée, elle se trouve sous une forme inactive incapable d'interagir avec son récepteur. Suite à sa γ -carboxylation en présence de vitamine K (+VK), son domaine SHBG exposé lui permet cette interaction.

La γ -carboxylation du domaine Gla participe donc à l'activité même des protéines vitamine K-dépendantes.

1.3.4 Implication de la protéine Gas6 et de la protéine S dans la phagocytose

La phagocytose consiste en l'ingestion de particules dont la taille est supérieure à 0,5 μm par des cellules spécialisées appelées phagocytes. Il existe deux types de phagocytes : des phagocytes dits « professionnels » et des phagocytes dits « non-professionnels ». Les phagocytes professionnels sont des cellules du système immunitaire tels que les granulocytes neutrophiles, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules de la microglie. Ces cellules s'accumulent rapidement sur les sites d'inflammation, d'infection ou de dommage tissulaire. En plus de leur rôle de phagocyte, ces cellules ont également la capacité de sécréter une grande variété de molécules incluant des cytokines. Les phagocytes non-professionnels sont de nature très variable, on les retrouve notamment dans des zones inaccessibles aux phagocytes professionnels protégées entre-autre par des barrières hémato-tissulaires (Rabinovitch, 1995). C'est par exemple le cas des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien dans la rétine et des cellules de Sertoli dans les testicules, organes protégés respectivement par la barrière hémato-rétinienne et hémato-testiculaire.

La phagocytose est un événement important pour plusieurs fonctions physiologiques telles que l'immunité, la spermatogenèse, la rétinogenèse ou encore la neurogenèse. La phagocytose est impliquée notamment dans l'élimination de débris de cellules nécrotiques ou apoptotiques nécessaire lors du développement du système nerveux central (SNC). Une partie de ce manuscrit porte sur l'étude de la phagocytose par les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire du cerveau de rats nouveau-nés *in vitro* et sur l'influence des protéines S et Gas6 sur ce processus. Pour cela nous avons mis au point un test de phagocytose qui sera détaillé dans la partie 2.7 de la partie expérimentale.

1.3.4.1 Phagocytose et système nerveux central

Au sein du SNC, les débris issus de cellules nécrotiques ou apoptotiques sont majoritairement éliminés par des macrophages dérivés de la microglie (Garden and Moller, 2006). Ces cellules ont une importance capitale dans la régulation de la réponse immunitaire.

Elles sont, entre autres, responsables de la phagocytose des lymphocytes T apoptotiques ce qui a pour conséquence la fin de la réponse inflammatoire (Magnus et al., 2002). En plus de leur capacité d'élimination des cellules apoptotiques et des débris cellulaires, elles sont capables de phagocyter des bactéries ainsi que des protéines pathologiques (Garden and Moller, 2006).

Les cellules de la microglie sont les principaux phagocytes du SNC, mais il semble que d'autres cellules telles que les astrocytes et les oligodendrocytes aient également la capacité d'éliminer des cellules apoptotiques (Pender and Rist, 2001). Alors que les neurones sont connus pour leur capacité d'endocytose et de pinocytose, de récents travaux montrent qu'ils ont également la capacité de phagocyter (Bowen et al., 2007). L'inclusion de corps intraneuronaux a été visualisée dans plusieurs situations notamment dans le cas de certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (corps de Lewy) (Josephs et al., 2003).

1.3.4.2 Phénotypes associés à l'invalidation des gènes codant pour les récepteurs TAM ou pour la protéine Gas6

Alors que les souris déficientes pour l'un des trois récepteurs TAM sont viables, fertiles et ne présentent pas de défauts anatomiques importants, les souris dont les 3 gènes codant pour les récepteurs TAM sont inactivés présentent de multiples défauts touchant des organes majeurs, des anomalies neurologiques ainsi que des déficits physiologiques (**Tableau II**) (Lu and Lemke, 2001). De plus, ces souris présentent de sévères désordres lymphoprolifératifs et d'auto-immunité (Lu and Lemke, 2001). La rate de ces animaux est envahie de cellules apoptotiques ce qui aboutit à une homéostasie aberrante des populations lymphoïdes qui expriment les récepteurs TAM. Ceci induit une dérégulation du système immunitaire indiquant que l'activation des récepteurs TAM est d'une importance capitale pour le maintien du ce système. De plus, les macrophages dérivés de souris Mer^{-/-} sont capables de lier les cellules apoptotiques mais pas de les éliminer (Scott et al., 2001).

L'invalidation de ces 3 gènes codant pour les récepteurs TAM conduit également à une cécité postnatale consécutive à une dégénérescence des photorécepteurs (**Tableau II**) (Lu et al., 1999). Le même phénotype rétinien est observé chez des rats possédant une mutation nulle du gène Mer (D'Cruz et al., 2000) ou chez des souris dont le gène codant pour ce récepteur a été invalidé (Duncan et al., 2003) (**Tableau II**). L'ensemble de ces données sera explicité plus en détail dans la partie 1.4.2.2 de l'introduction.

Gène invalidé	Gas6	Axl	Tyro3	Mer	Axl/Tyro3/Mer (triple KO)	Mer (mutation héréditaire)
Système nerveux	Augmentation de la mort oligodendrocytaire après dommage du SNC (Binder et al., 2008)	Défaut d'élimination des oligodendrocytes apoptotiques et des débris de myéline après dommage du SNC (Hoehn et al., 2008)	Non exploré	Non exploré	- Anomalies neurologiques (Lu et al., 1999) : augmentation de l'apoptose, dégénérescence cellulaire dans le cerveau adulte.	Non exploré
Système immunitaire	Protection contre des lésions rénales induites (Yanagita et al., 2002)	Elévation du taux d'autoanticorps (Lu et al., 1999; Lu and Lemke, 2001)		- Défaut de phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages et les monocytes (Lu and Lemke, 2001). Augmentation de la taille de la rate Déficit de la réponse des monocytes aux endotoxines.	- Désordres auto-immuns (Lu and Lemke, 2001) : augmentation de la taille de la rate -Aberrations homéostatiques de la population lymphoïde. -Elévation du taux d'anticorps circulant contre des antigènes intracellulaires. -Hyperactivation des cellules présentatrices d'antigènes (APC). - Augmentation de l'apoptose. Dégénérescence cellulaire dans l'épithélium de la prostate, le parenchyme du foie, et la paroi vasculaire. -Thromboses et hémorragies dans divers tissus.	Non exploré
Coagulation , Agrégation plaquettaire	- Défaut d'agrégation plaquettaire (Angelillo-Scherrer et al., 2005). -Diminution des risques de thromboembolismes. -Pas de saignement spontané.				Non exploré	Non exploré
Spermato-genèse	-Animaux fertiles, pas de problème apparent (Lu et al., 1999).				- Défaut de spermatogenèse (Lu et al., 1999) , pas de sperme mature. -Diminution de la taille des testicules au tiers de ceux des mâles sauvages. -Désorganisation de la structure cellulaire des tubes séminifères. Augmentation de l'apoptose des cellules germinales sans diminution de leur prolifération.	Non exploré
Système visuel	Rétine normale (Hall et al., 2005)	Non exploré	Non exploré	Défaut de la phagocytose des photorécepteurs, dégénérescence rétinienne (D'Cruz et al., 2000; Duncan et al., 2003; Lu et al., 1999).		

Tableau II : **Phénotypes associés à l'invalidation génique des récepteurs TAM chez la souris et à la mutation nulle du récepteur Mer chez le rat RCS.**

Enfin, les souris mâles dont les trois gènes codant pour les récepteurs TAM ont été invalidés présentent une infertilité consécutive à l'obturation des tubes séminifères par des cellules apoptotiques et des corps résiduels. Ceci s'explique par le fait que le processus de spermatogenèse génère des cellules apoptotiques et des corps résiduels qui sont normalement phagocytés par les cellules de Sertoli (**Figure 10**). Cette fonction de phagocytose par les cellules de Sertoli est défectueuse chez les souris dont les trois gènes codant pour les récepteurs TAM ont été invalidés (Allen et al., 1999; Lu et al., 1999).

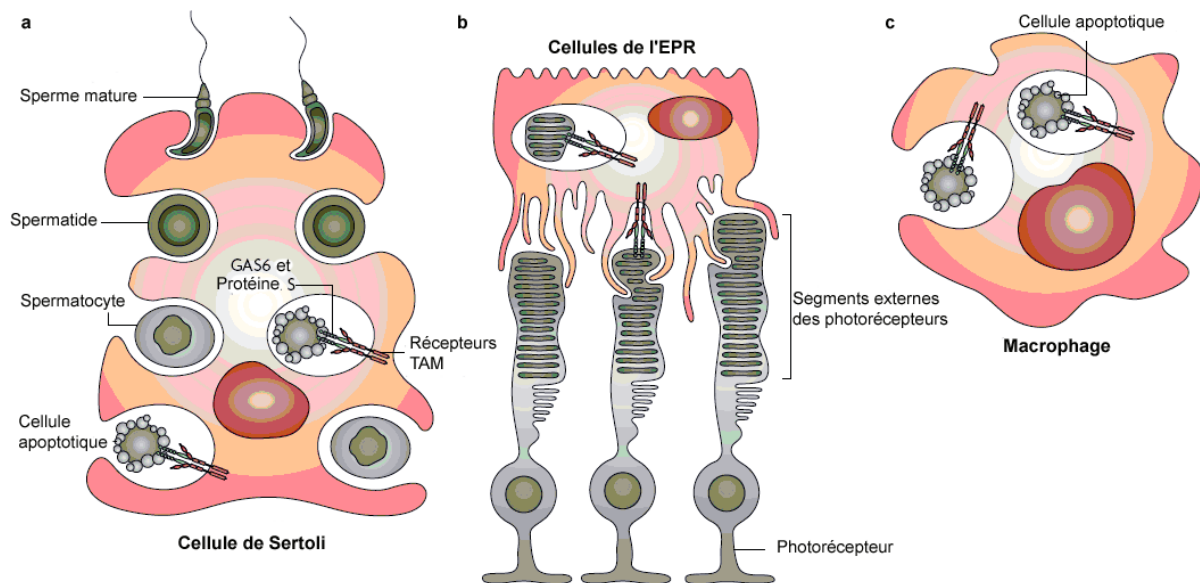


Figure 10 : La signalisation des récepteurs TAM et la « phagocytose homéostatique » des cellules apoptotiques et des membranes (Modifiée de (Lemke and Lu, 2003)). La signalisation via les récepteurs TAM est nécessaire à l'élimination des cellules apoptotiques dans un grand nombre de tissus et organes adultes qui requièrent un renouvellement ou un remodelage constant. Ceci inclut (a) les testicules, où les cellules de Sertoli éliminent un nombre important de cellules apoptotiques générées pendant la spermatogenèse; (b) la rétine, où les cellules de l'EPR ingèrent les segments externes des photorécepteurs et (c) les organes lymphoïdes, où les macrophages et les cellules dendritiques éliminent les cellules apoptotiques générées par des infections.

L'ensemble de ces désordres touchant l'immunité, la spermatogenèse et la vision sont la conséquence d'un défaut d'élimination de débris membranaires et de cellules apoptotiques, processus dépendant des récepteurs TAM (**Figure 10**). L'inactivation des gènes codant pour

les récepteurs TAM conduit donc dans la majorité des cas à une dérégulation du processus de phagocytose entraînant des anomalies fonctionnelles (**Tableau II**). Il en découle que la régulation de la phagocytose serait le dénominateur commun par lequel la protéine Gas6 et la protéine S réguleraient un grand nombre de processus physiologiques.

Différentes méthodes existent pour étudier la phagocytose. La méthode la plus employée consiste à visualiser le substrat ingéré par microscopie. Le type de substrat varie considérablement en fonction du système étudié. L'étude de la phagocytose par les cellules de Sertoli est réalisée grâce à l'utilisation de cellules germinales apoptotiques (Xiong et al., 2008). Une autre méthode permet de quantifier spécifiquement la phagocytose par les cellules de Sertoli. En effet la phagocytose des corps résiduels ainsi que des cellules germinales apoptotiques induit la formation de gouttelettes lipidiques dans les cellules de Sertoli. Ces gouttelettes pourront être marquées et quantifiées. Leur abondance sera directement proportionnelle à la capacité de phagocytose de ces cellules (Xiong et al., 2008). Des débris de neurones en dégénérescence, ou des neurones apoptotiques sont utilisés dans le cas de l'étude de la phagocytose au sein du SNC (Bowen et al., 2007).

Certains substrats ne sont pas spécifiques d'un système donné, c'est le cas des billes de latex. Ces dernières sont le plus souvent couplées à un fluorochrome. Leur visualisation se fait alors par microscopie confocale. D'autres substrats tels que des segments externes de photorécepteurs marqués au FITC pourront être visualisés par ce type de microscopie (Hall et al., 2005). L'internalisation des substrats non fluorescents sera visualisée par microscopie à transmission classique ou encore par microscopie électronique (Bowen et al., 2007). L'utilisation de substrats fluorescents permet de quantifier la phagocytose par deux méthodes. La première consiste à compter sous microscope le nombre de cellules ayant internalisé une particule fluorescente et ceci grâce à une contre-coloration du noyau (Hall et al., 2005). La seconde méthode consiste à quantifier cette fluorescence par cytométrie en flux (Seitz et al., 2007).

1.3.4.3 Gas6 et Protéine S : opsonines des cellules apoptotiques

L'apoptose est la modalité la plus commune de mort cellulaire programmée, qui est un phénomène actif de destruction intrinsèque, naturel, permettant l'élimination de cellules endommagées, néfastes ou inutiles.

C'est un processus physiologique essentiel et nécessaire au développement et au maintien de l'homéostasie des tissus ainsi qu'à l'intégrité de notre système immunitaire (Desagher and Martinou, 2000). Un déficit du processus d'apoptose exercerait un rôle majeur dans les pathologies cancéreuses, les syndrômes de déficience immunitaire, les maladies auto-immunes et les phénomènes de neurodégénérescence ((Fuller and Van Eldik, 2008; Lu et al., 1999; Magnus et al., 2002) pour revue (Linger et al., 2008)). La compréhension moléculaire de ce mécanisme est donc d'un intérêt crucial.

L'élimination des cellules apoptotiques comporte une phase de reconnaissance et de liaison puis une phase d'internalisation (Scott et al., 2001). Lors de l'entrée des cellules en apoptose, le cytochrome c libéré par les mitochondries dans le cytosol catalyse l'oxydation des phosphatidylsérines, entraînant leur translocation à la surface externe de la membrane plasmique (Jiang et al., 2004) (**Figure 11**). La localisation des résidus phosphatidylsérines oxydés à la surface externe de la membrane plasmique constitue un signal de reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes appelé aussi opsonine ou signal « mangez-moi ». Un récepteur spécifique des phosphatidylsérines oxydées a récemment été identifié dans les macrophages (Fadok et al., 2000). Les principales opsonines connues des phosphatidylsérines oxydées sont la protéine MFG-E8 (Milk fat globule EGF factor 8) dont les récepteurs sont les intégrines $\alpha\beta3/\alpha\beta5$ et la protéine Gas6 dont les récepteurs sont les TAM. En effet, l'inhibition de l'interaction de MFG-E8 ou de Gas6 avec leurs récepteurs respectifs résulte en un défaut d'élimination de cellules apoptotiques *in vivo* (Cohen et al., 2002; Hanayama et al., 2004). La protéine Gas6 interagit avec les phosphatidylsérines oxydées par son domaine Gla et avec ses récepteurs TAM, présents à la surface des macrophages, par son domaine SHBG (Nakano et al., 1997). Ceci favoriserait l'interaction cellule apoptotique/phagocyte (Neubauer et al., 1994) (**Figure 11**). Par ailleurs, le fractionnement du sérum a révélé que la protéine S est le principal facteur sérique capable de lier les phosphatidylsérines et de stimuler la phagocytose des cellules lymphoïdes en apoptose par les macrophages (Anderson et al., 2003).

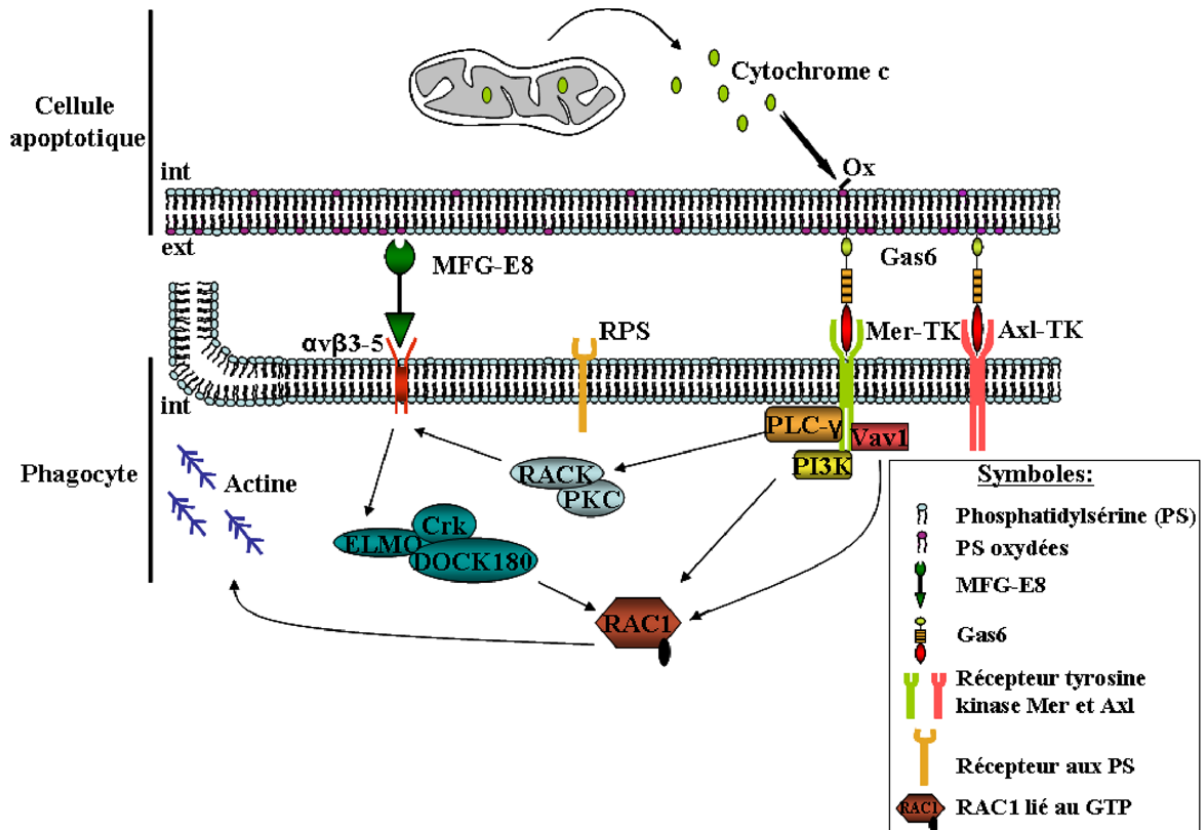


Figure 11 : Implications des récepteurs TAM dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Benzakour et al., 2007). La voie de signalisation Gas6/ Mer est la voie majeure impliquée dans la phagocytose. La liaison de Gas6 à son récepteur Mer active la kinase Phosphatidylinositol 3'-OH Kinase (PI3K). Cette voie est impliquée dans l'activation de Rac1 et de la phospholipase Cγ (PLC-γ) et module ainsi la signalisation par les intégrines $\alpha v \beta 3-5$ via le complexe RACK/PKC. L'activation du récepteur Mer conduit également à la phosphorylation du facteur d'échange Vav1. Le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à l'internalisation de la cellule apoptotique par le phagocyte est médié par les intégrines qui stimulent la formation du complexe Crk/ELMO/DOCK180 responsable de l'activation de Rac1. La voie de signalisation Gas6/ Axl pourrait stimuler l'adhérence entre les cellules apoptotiques et les macrophages.

La cascade de signalisation Rho-GTPase/ Rac1 régule la polymérisation des filaments d'actine permettant un changement de la morphologie du macrophage et l'internalisation de la cellule apoptotique. Suite à l'activation des intégrines par leur ligand MFG-E8, les protéines cytosoliques Crk, DOCK180 et ELMO forment un complexe trimérique sous-membranaire capable d'activer Rac1 (Chimini and Chavrier, 2000; Ravichandran, 2003) (**Figure 11**). Le complexe ELMO-DOCK180 ainsi que la protéine Vav1 constituent des facteurs d'échange (GEF) de Rac1 (Brugnera et al., 2002) et participent à son activation

(Mahajan and Earp, 2003). L'activation du récepteur Mer par Gas6 conduit au recrutement de la PI3K et de la phospholipase $C\gamma$, et à la phosphorylation de Vav1 activant de ce fait la cascade de signalisation Rho-GTPase/ Rac1 et favorisant ainsi la phagocytose des cellules apoptotiques (Todt et al., 2004).

La protéine S et la protéine Gas6 sont deux PVKDs qui ont la capacité d'activer trois récepteurs tyrosine kinase. L'activation de ces récepteurs est impliquée dans une variété d'événements cellulaires nécessaires à l'intégrité et à la fonctionnalité d'un grand nombre de tissus et d'organes. Lors de cette étude, nous chercherons à élucider le rôle des PVKDs et plus particulièrement de Gas6 et de la protéine S dans diverses fonctions cellulaires des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire du cerveau et de la rétine. Ces deux modèles d'étude feront l'objet des prochains chapitres.

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

1.4.1 La neurogenèse

Le cerveau de mammifère adulte a longtemps été considéré comme une structure dépourvue de capacité de régénérescence. On pensait communément que le cerveau était constitué à la naissance d'un stock défini de neurones qui s'épuisait au cours du vieillissement. Aujourd'hui, il est clairement établi que le cerveau, tout comme de nombreux tissus non nerveux tels que l'épiderme et les cryptes de l'épithélium intestinal, a la capacité de se régénérer.

1.4.1.1 La neurogenèse dans le cerveau adulte de mammifère

Chez les mammifères adultes, de nouveaux neurones sont continuellement ajoutés dans certaines régions du cerveau. Ils sont produits à partir de cellules souches localisées dans deux foyers germinatifs : la zone sous-ventriculaire (ou SVZ) des ventricules latéraux et le gyrus denté de l'hippocampe (Abrous et al., 2005) (**Figure 12**).

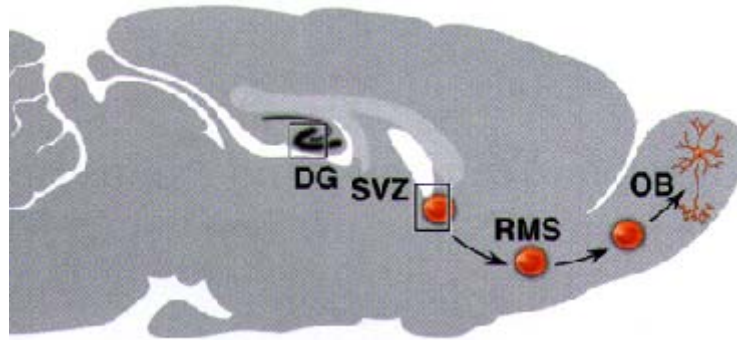


Figure 12 : Localisation de la neurogenèse dans le cerveau de mammifères adultes. (Modifiée d'après (Taupin and Gage, 2002)). L'addition de nouveaux neurones a lieu dans 2 sites : le gyrus denté (DG) de l'hippocampe et le bulbe olfactif (OB). Les neurones du bulbe olfactif sont générés au niveau de la zone sous-ventriculaire (SVZ) et rejoignent le bulbe olfactif en empruntant le flux rostral migratoire (RMS).

Dans l'hippocampe, des progéniteurs locaux assurent la production de neurones granulaires (Palmer et al., 1997; Seaberg and van der Kooy, 2002). Dans la zone sous-ventriculaire, les cellules souches prolifèrent et génèrent des cellules gliales et des neuroblastes (Lois and Alvarez-Buylla, 1993). Les neuroblastes entourés de cellules gliales migrent sur une longue distance (quelques millimètres chez la souris) le long d'un trajet appelé « flux rostral migratoire » en direction du bulbe olfactif où ils s'intègrent en tant qu'interneurones, aux circuits neuronaux existants (Carleton et al., 2003; Lois and Alvarez-Buylla, 1994).

Cette région, vingt fois plus proliférative que l'hippocampe, est une réserve de cellules souches qui peuvent être cultivées *in vitro* en présence de facteurs de croissance tel que l'EGF (Epithelium growth factor) (Reynolds and Weiss, 1992).

1.4.1.2 Les cellules souches de la SVZ

Caractéristiques générales

Les cellules souches de la SVZ, ainsi que toutes les cellules souches de l'organisme répondent à certaines caractéristiques. Ce sont des cellules qui ont la capacité de :

- proliférer et rester mitotiquement actives tout au long de la vie de l'organisme.
- s'auto-renouveler c'est-à-dire maintenir un stock de cellules tout au long de la vie.
- générer par division asymétrique des progéniteurs capables de proliférer transitoirement et de donner tous les phénotypes cellulaires de leur tissu-hôte.

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

C'est pour la première fois en 1992, que Brent A. Reynolds et Samuel Weiss ont mis en évidence la présence de cellules souches dans la SVZ de souris adultes. Ils ont réalisé des cultures primaires à partir de SVZ de souris adultes en présence d'EGF. Après 6 à 8 jours de culture, ils obtinrent des amas de cellules organisés en sphères. Ces sphères clonales, appelées neurosphères, dérivent chacune d'une cellule souche cultivée *in vitro*. Suite à la dissociation de ces neurosphères primaires, une cellule souche pourra redonner une neurosphère secondaire et ce, dans 67% des cas (Reynolds and Weiss, 1992).

In vitro, ces neurosphères sont constituées de différents types cellulaires que l'on retrouve organisés de façon spécifique *in vivo*.

L'organisation de la SVZ : les différents types cellulaires

Séparée du ventricule latéral par une monocouche de cellules épendymaires multiciliées, la SVZ est constituée de trois types cellulaires distincts A, B et C (**Figure 13**). Les cellules de Type A ou neuroblastes (neurones immatures) se multiplient et migrent vers le bulbe olfactif (Carlen et al., 2002; Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Menezes et al., 1995) sous forme de chaînes emballées dans des cellules gliales qui correspondent à des astrocytes à division lente ou cellules de type B (Morshead et al., 1998; Morshead et al., 1994). Les cellules de type A expriment la β III-tubuline, une protéine du cytosquelette spécifique des neurones (Memberg and Hall, 1995) ainsi que les protéines membranaires PSA-NCAM et mcD24 (Kiss and Rougon, 1997; Seki and Arai, 1993). Les cellules de type B expriment la GFAP (glial fibrillary acidic protéin), protéine spécifique des cellules gliales ainsi que la nestine, protéine des filaments intermédiaires présente dans les cellules immatures (Frederiksen and McKay, 1988; Lendahl et al., 1990). Les cellules de type C sont des précurseurs immatures à division rapide qui expriment la nestine. Ils s'organisent en petits groupes isolés le long de la chaîne de neuroblastes du flux rostral migratoire (Peretto et al., 1997). Les cellules de type A et C sont donc contenues dans un manchon cellulaire formé par les cellules de type B (Doetsch, 2003). Dans le bulbe olfactif, les cellules de type A ou neuroblastes se différencieront en interneurones dopaminergiques et GABAergiques (Betarbet et al., 1996).

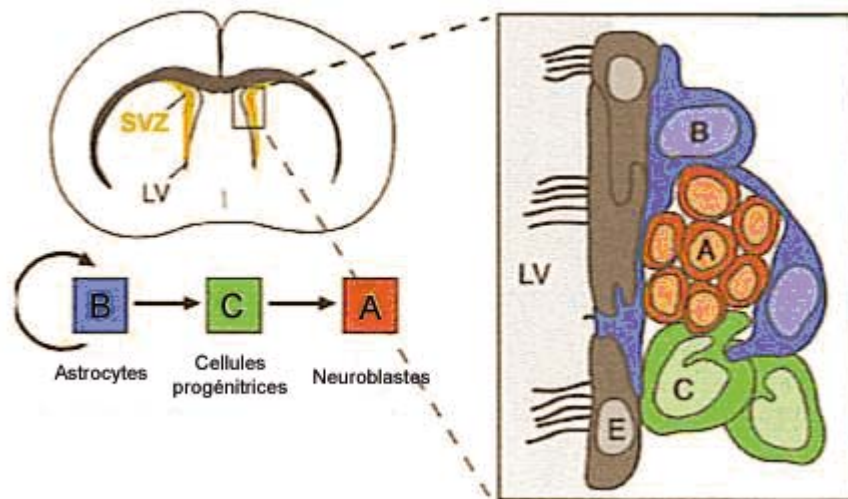


Figure 13 : Organisation et types cellulaires de la SVZ chez l'adulte (Modifiée d'après (Alvarez-Buylla et al., 2002)). Schéma d'une coupe frontale de cerveau de souris adulte montrant la SVZ (orange), les ventricules latéraux (VL) et les types cellulaires de la SVZ : E, cellules épendymaires multiciliées (grises); A, chaîne de neuroblastes (rouge) ; B, tunnel formé par les astrocytes (bleu); C, cellules à division rapide (vert).

Identité de la cellule souche de la SVZ

Il n'existe aujourd'hui aucun marqueur fiable et spécifique des cellules souches neurales. De nombreuses études *in vivo* ont néanmoins identifié la cellule souche comme étant un astrocyte. Ces études se sont d'abord basées sur les différences de vitesse de prolifération des cellules composant la SVZ, les cellules souches étant des cellules à prolifération lente activées en cas de lésion. Chez la souris, après un traitement à l'Ara-C, un antimétabolite qui détruit les cellules de type A et de type C à prolifération rapide, les cellules de type B sont capables de régénérer l'ensemble des cellules de la SVZ en 10 jours (**Figure 14**) (Doetsch et al., 1999). Les cellules de type C sont tout d'abord régénérées à partir des cellules de type B puis les cellules de type C régénèrent à leur tour les cellules de type A (**Figure 13**). Cette étude indique donc que les cellules de type B, astrocytes capables de régénérer la SVZ suite à une lésion, sont les cellules souches neurales. L'identité astrocytaire de la cellule souche fut confirmée par la suite grâce à l'utilisation de techniques permettant le marquage génétique des astrocytes et de leurs descendances. Elles montrèrent que les neuroblastes qui intègrent le bulbe olfactif sont issus des cellules exprimant la GFAP dans la SVZ (Doetsch et al., 1999). De plus, chez la souris, après élimination spécifique *in vivo* des astrocytes de la SVZ, les cellules de la SVZ mises en culture sont incapables de générer des neurosphères (Imura et al., 2003) et le nombre de neurones dans le bulbe olfactif diminue (Garcia et al., 2004).

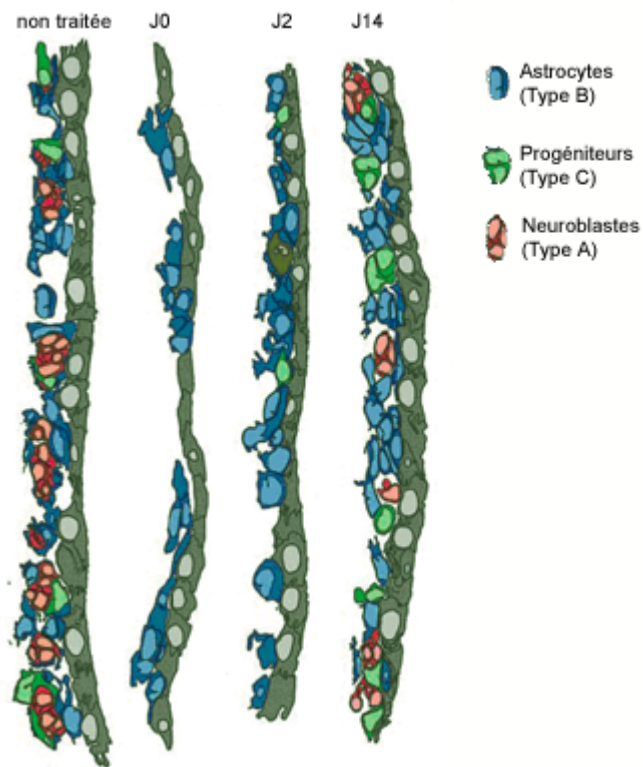


Figure 14: Identi   de la cellule souche de la SVZ (Modifiée d'après Doetsch et al., 1999b).

Illustration de la reconstruction de la SVZ suite à une analyse par microscopie électronique chez des souris non traitées ou 0, 2 et 14 jours après le début du traitement à l'ARA-C. Au temps 0 après traitement à l'ARA-C, la majorité des cellules correspondent aux cellules de type B ou astrocytes (bleue) et épendymaires (grises) avec un faible nombre d'autres types cellulaires. Les cellules de types C ou progéniteurs (vertes) apparaissent entre les jours 2 et 14, alors que les cellules de type A ou neuroblastes (rouges) ne sont régénérées qu'à partir du jour 6.

Seules les cellules de type B présentent donc les capacités de prolifération, d'auto-renouvellement et de multipotence des cellules souches.

Les astrocytes représentent 20% des cellules de la SVZ alors que les cellules souches n'en représentent que 0,2   0,4% (Doetsch et al., 1997). Cela signifie que seule une sous-population d'astrocytes a des propriétés de cellules souches. Outre la GFAP, les « astrocytes souches » expriment le récepteur à l'EGF, dont l'activation stimule leur prolifération, la nestine ainsi que le trisaccharide LeX/SSEA1. Toutefois, aucun de ces marqueurs n'a son expression restreinte aux seules cellules souches et de ce fait ne permet leur identification ou isolement (Capela and Temple, 2002).

Bien qu'il soit actuellement admis que les cellules de type B sont les cellules souches de la SVZ, de récents travaux montrent que les cellules épendymaires pourraient constituer une deuxième population de cellules souches au sein de la SVZ (Coskun et al., 2008; Doetsch et al., 1999).

1.4.1.3 Mécanismes de régulation des cellules souches neurales de la SVZ par des facteurs solubles

L'activité des cellules souches neurales est régulée par un grand nombre de facteurs solubles extracellulaires (**Tableau III**). Parmi ces facteurs on retrouve les facteurs de croissance et notamment l'EGF et le FGF-2 (fibroblast growth factor) identifiés comme stimulateurs de la prolifération des CSN par Reynolds et Weiss dans les années 1990 (Reynolds and Weiss, 1992; Weiss et al., 1996). De nombreux autres facteurs de croissance présents localement dans la niche neurogène régulent la neurogenèse adulte. Cette régulation fait, entre autres, intervenir les cytokines LIF (leukaemia inhibitory factor) et CNTF (ciliary neurotrophic factor) dont les récepteurs sont formés de la protéine gp130 et d'une protéine spécifique à chaque cytokine (Burdon et al., 2002; Reynolds and Weiss, 1992; Satoh and Yoshida, 1997).

		Facteurs solubles	Expression du facteur (F) ou de son récepteur (R) dans les cellules de la SVZ	Effets cellulaires sur les NCS de la SVZ	Références
Facteurs de croissance	EGF		EGRFR dans les cellules de type B et C	Stimule la prolifération	(Doetsch et al., 2002; Seroogy et al., 1995; Weiss et al., 1996)
	FGF-2		FGFR1 exprimé	Stimule la prolifération	(Gritti et al., 1995; Gritti et al., 1999)
	VEGF		VEGF et VEGFR exprimés	Stimule la prolifération	(Jin et al., 2002; Maurer et al., 2003)
	IGF-I		Exprimé dans la SVZ	Régule leur différenciation	(Bartlett et al., 1992; Brooker et al., 2000)
	HGF		Exprimé dans la SVZ, R c-met exprimé également	Stimule leur prolifération et leur autorenouveaulement	(Nicoleau et al., 2009)
	PDGF		PDGFR α exprimé par les astrocytes	Influence la différenciation oligodendrocytaire	(Ishii et al., 2008; Jackson et al., 2006)
			PDGFR β exprimé par les astrocytes et dans les cellules immatures	Impliqué dans la survie cellulaire	(Ishii et al., 2008; Jackson et al., 2006)
Cytokines	BDNF		R trkB et p75 exprimés	Stimule la neurogenèse dans le bulbe olfactif	(Benraiss et al., 2001; Young et al., 2007; Zigova et al., 1998)
	CNTF		CNTF et gp130 exprimés	Régulateur de neurogenèse	(Emsley and Hagg, 2003; Ip et al., 1993; Yang et al., 2008)
	LIF		LIF et gp130 exprimés	Rôle dans l'autorenouveaulement des CSN	(Covey and Levison, 2007; Shimazaki et al., 2001)
Morphogènes	BMP		BMP2, BMP4 et BMPR exprimés	Inhibe la neurogenèse	(Lim et al., 2000)
	Shh		Récepteur Smo exprimé	Stimule la prolifération des CSN	(Balordi and Fishell, 2007; Ruiz i Altaba et al., 2002)
Neurotrans-metteurs	Dopamine		Afférences dopaminergiques de la substance noire R D1 et D2 exprimés	Stimule la prolifération des cellules de la SVZ	(Agasse et al., 2004; Coronas et al., 1997; Hoglinger et al., 2004; Shimazaki et al., 2001; Van Kampen et al., 2004)
	Sérotonine		Innervation sérotoninergique issue des noyaux du raphé R de type 5-HT1 et 5-HT2 exprimés	Stimule la prolifération des cellules de la SVZ	(Banasr et al., 2004; Hitoshi et al., 2007)
	Acétyl-choline		Afférences cholinergiques identifiées près de la SVZ. R exprimé dans certaines cellules de la SVZ	Stimule la neurogenèse en augmentant la survie des neurones matures dans le bulbe olfactif	(Cooper-Kuhn et al., 2004; Kaneko et al., 2006)
	GABA		R GABA $_A$ sur les cellules GFAP positives de la SVZ et dans le FRM	Inhibe la prolifération des progéniteurs et la migration des neuroblastes	(Bolteus and Bordey, 2004; Carleton et al., 2003; Li et al., 2003; Liu et al., 2005)
	Glutamate		F libéré localement dans la SVZ. R mGlu5 et mGlu1 exprimés	Stimule la prolifération des cellules de la SVZ	(Castiglione et al., 2008; Di Giorgi Gerevini et al., 2004; Platel et al., 2007)
			Produit et libéré par les cellules	Inhibe la prolifération des	(Packer et al., 2003;

Tableau III : Facteurs solubles régulant l'activité des CSN de la SVZ

Les morphogènes régulent aussi l'activité des CSN, positivement dans le cas de sonic hedgehog ou négativement dans le cas des BMPs (bone morphogenic proteins). La neurogenèse est également modulée par les hormones présentes de façon endocrine au niveau de la SVZ mais aussi au niveau de l'hippocampe. C'est notamment le cas des hormones thyroïdiennes qui inhibent la neurogenèse dans la SVZ de rat adulte (Giardino et al., 2000).

Les neurotransmetteurs modulent aussi la neurogenèse. Par exemple, la stimulation de récepteurs par la dopamine induit une prolifération au sein de la SVZ (Coronas et al., 2004; Hoglinger et al., 2004).

La neurogenèse est également affectée par le vieillissement, une baisse du nombre de cellules souches et de progéniteurs nerveux étant observée dans la SVZ chez la souris âgée (Maslov et al., 2004; Tropepe et al., 1997). Cette diminution est due à une réduction des capacités d'auto-renouvellement des CSN engendrée par une augmentation de l'expression de régulateurs négatifs du cycle cellulaire au cours du vieillissement (Kippin et al., 2005; Molofsky et al., 2006). Le maintien du stock de CSN dépend également de facteurs extrinsèques sécrétés dans le microenvironnement par les cellules de la niche, notamment par les cellules endothéliales (Shen et al., 2004; Shen et al., 2008), les neuroblastes (Liu et al., 2005) ou les astrocytes (Song et al., 2002). L'environnement cellulaire et moléculaire permet de sélectionner, au sein du répertoire des phénotypes possibles, le devenir des cellules souches.

L'activité des cellules souches neurales est donc régulée par un ensemble complexe de facteurs solubles. Une partie de ce travail porte sur l'effet des PVKDs sur l'activité des CSN issues de la SVZ. Un certain nombre d'études portant sur le rôle des PVKDs au sein du système nerveux central font l'objet du prochain chapitre.

1.4.1.4 Protéines vitamine K-dépendantes et système nerveux central

Les protéines S et Gas6, tout comme leurs récepteurs TAM, sont exprimées dans le système nerveux central (Funakoshi et al., 2002; Prieto et al., 2000; Prieto et al., 1999). En outre, la γ -carboxylase est fortement exprimée dans le neuroépithélium périventriculaire du SNC lors du développement et son expression persiste à l'âge adulte dans le cerveau (Romero

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

et al., 1998). Ceci suggère que la protéine Gas6 et la protéine S produites localement seraient γ -carboxylées et donc capables d'activer leurs récepteurs TAM de manière autocrine ou paracrine (Romero et al., 1998). Les souris dont les trois gènes codant pour les récepteurs TAM ont été invalidés présentent des anomalies neurologiques caractérisées par une augmentation de la dégénérescence cellulaire et du nombre de cellules en apoptose au niveau du cervelet, de l'hippocampe et du néocortex (Lu et al., 1999) (**Tableau II**). Des anomalies neurologiques, et notamment une hydroencéphalie, chez le fœtus de femmes enceintes traitées à la warfarine ont également été constatées (Chan et al., 2003). La warfarine a un effet tératogène direct sur la formation du système nerveux central. Une absence de formation du corps calleux (Kaplan, 1985), une dilatation des ventricules cérébraux, une microencéphalie et des retards mentaux (Pati and Helmbrecht, 1994) ont également été décrits. L'ensemble de ces données suggère un rôle des PVKDs dans la neurogenèse.

L'une des premières équipes à s'être intéressée aux PVKDs dans le SNC fut celle d'Anne Prieto qui y étudia l'expression de l'ARNm de la protéine Gas6 (Prieto et al., 1999). Son ARNm est largement exprimé dans le SNC. On le retrouve notamment dans le troisième ventricule, les plexus choroïdes, ou encore dans le cortex cérébral (Prieto et al., 1999). L'ARNm de la protéine Gas6 et de son récepteur Tyro3 sont également fortement exprimés dans l'hippocampe de rat adulte et sont régulés de façon similaire au cours du développement, ce qui n'est pas le cas de l'ARNm de la protéine S (Funakoshi et al., 2002). Au cours du développement, le récepteur Tyro3 est le plus fortement exprimé dans le SNC. Les récepteurs Axl et Mer ne sont exprimés que dans un nombre limité de sites chez l'adulte (Prieto et al., 2000). L'ARNm de la protéine S est fortement exprimé dans les bulbes olfactifs et l'hypothalamus (Funakoshi et al., 2002).

D'un point de vue fonctionnel, la protéine S, tout comme la protéine Gas6 (Yagami et al., 2003), protège de l'apoptose des neurones corticaux après une lésion induite par une ischémie cérébrale (Liu et al., 2003). De plus, la protéine Gas6 stimule la survie des neurones à GnRH (Allen et al., 1999; Pierce et al., 2008) et protège de l'apoptose les oligodendrocytes de façon Axl-dépendante (Shankar et al., 2003; Shankar et al., 2006).

Une étude montre également que la signalisation Gas6/Tyro3 a un rôle neurotrophique pour les neurones de l'hippocampe (Prieto et al., 2007) et que la protéine Gas6 via ses récepteurs Axl et Tyro3 est un facteur de croissance pour les cellules de Schwann (Li et al., 1996). Enfin, la protéine Gas6 est également impliquée dans la migration des neurones à GnRH (Allen et al., 2002; Pierce et al., 2008).

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

Les travaux décrits précédemment montrent l'implication des protéines S et Gas6 dans la régulation du SNC mais aucune étude n'a pour le moment été réalisée sur l'effet des PVKDs sur l'activité des cellules souches neurales issues de la SVZ.

1.4.2 La Rétinogenèse

1.4.2.1 Anatomie de la rétine

L'enveloppe oculaire est constituée en avant par la cornée qui est un tissu transparent et en arrière par trois tuniques :

- la sclère, tunique la plus externe. Elle est inextensible, blanche, avasculaire et confère au globe oculaire sa résistance ;
- la choroïde, tunique intermédiaire très vascularisée ;
- la rétine, tunique la plus interne. Elle transmet le message visuel par l'intermédiaire du nerf optique au cortex (**Figure 15**).

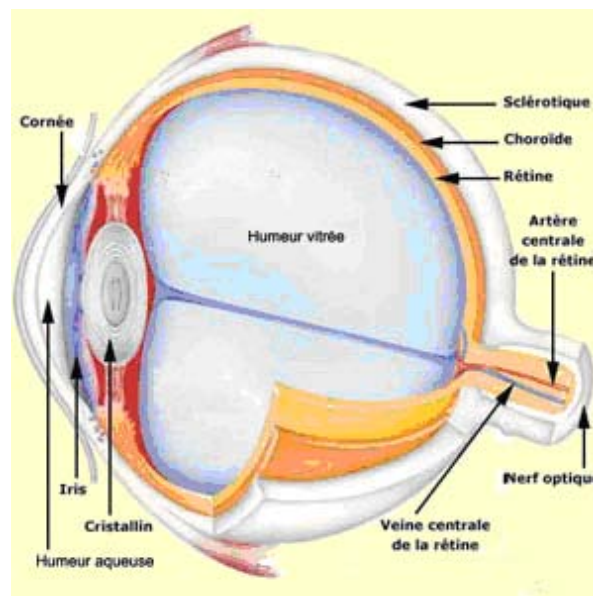


Figure 15 : Anatomie de l'œil humain (Modifié d'après <http://lecerveau.mcgill.ca>). L'œil est subdivisé en deux parties anatomo-fonctionnelles distinctes, une partie antérieure formée de la cornée, l'humeur aqueuse, l'iris et le cristallin, et d'une partie postérieure constituée de l'humeur vitrée, la rétine, la choroïde et la sclérotide ou sclérotique.

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

La rétine est un neuro-épithélium pluristratifié constitué de 9 couches qui appartient au SNC (**Figure 16**). On distingue de l'intérieur vers l'extérieur :

- la membrane limitante interne ;
- la couche des fibres optiques correspondant aux axones des cellules ganglionnaires qui formeront le nerf optique ;
- la couche contenant les noyaux des cellules ganglionnaires ;
- la couche plexiforme interne où se fait le contact synaptique entre les cellules bipolaires, les cellules amacrines et cellules ganglionnaires ;
- la couche nucléaire interne contenant les noyaux des cellules amacrines, bipolaires, horizontales et des cellules de Müller. Les cellules gliales de Müller ne sont pas représentées sur la figure. Elles ont la particularité de traverser une partie de la rétine. Leurs pieds externes font jonction avec les segments internes des photorécepteurs au niveau d'une zone appelée la membrane limitante externe ;
- la couche plexiforme externe, lieu de contact synaptique entre les photorécepteurs et les cellules horizontales et bipolaires ;
- la couche nucléaire externe composée des noyaux des photorécepteurs (cônes et bâtonnets).
- la couche des segments internes et des segments externes des photorécepteurs ;
- l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) qui est la partie la plus externe de la rétine. Les microvillosités apicales de cet épithélium sont en contact direct avec les photorécepteurs.

L'EPR adhère également fortement à la membrane de Bruch sous-jacente, la membrane basale de l'EPR en constituant la couche la plus interne. La membrane de Bruch permet la diffusion de l'oxygène ainsi que le passage de néovascularisation choroïdienne observée en conditions pathologiques.

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

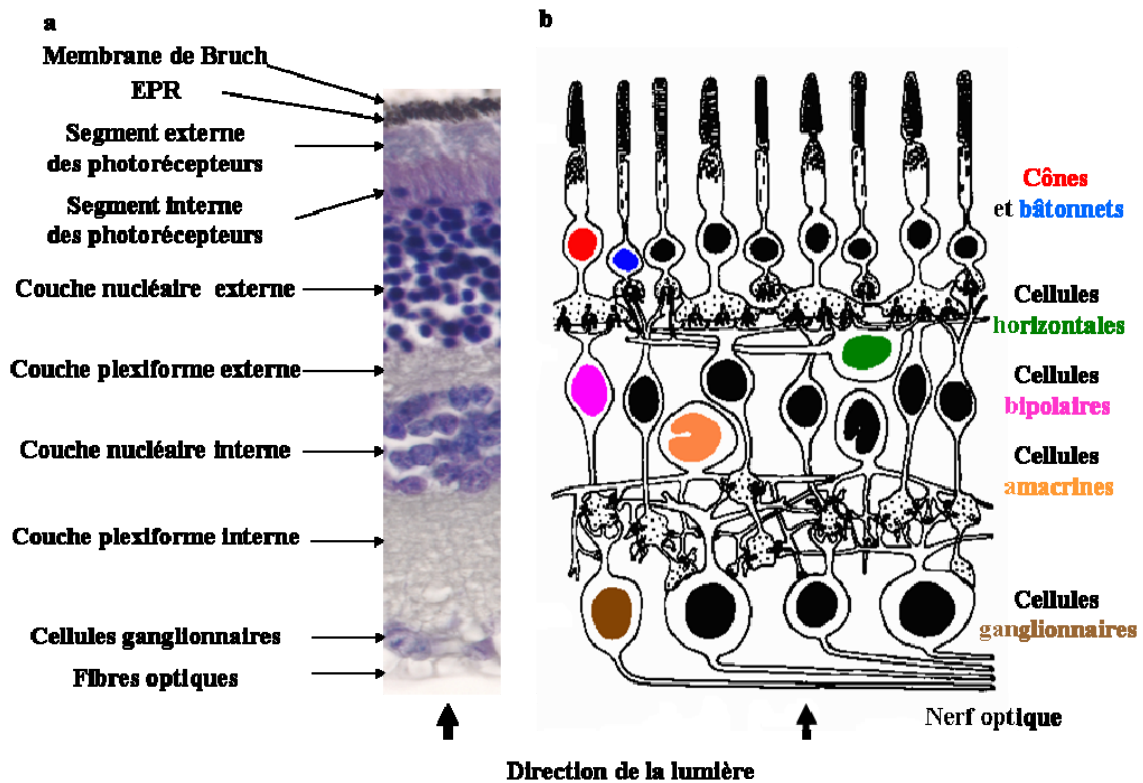


Figure 16 : Les différentes couches de la rétine (Modifié d'après <http://webvision.med.utah.edu/>). a, coupe de rétine de souris adulte colorée au violet de crésyl montrant les différentes couches cellulaires de la rétine. b, types cellulaires retrouvés dans les différentes couches de la rétine.

Les photorécepteurs de la rétine sont constitués d'un empilement de disques qui renferment les pigments visuels sensibles à la lumière. Ces disques sont renouvelés tout au long de la vie. Les nouveaux disques sont ajoutés au niveau de la partie la plus interne du segment externe des photorécepteurs. Les anciens disques au niveau des segments externes des photorécepteurs sont alors phagocytés par l'épithélium pigmentaire rétinien adjacent, ce processus nommé « shedding », est indispensable au maintien de la vision (Young and Bok, 1969). Lorsqu'il est non fonctionnel, l'accumulation des débris cellulaires conduit à une dégénérescence rétinienne.

1.4.2.2 Protéines vitamine K-dépendantes et physiologie rétinienne

L'inactivation des 3 gènes codant pour les récepteurs TAM conduit à une cécité consécutive à une dégénérescence des photorécepteurs (**Tableau II**) (Lu et al., 1999). Le même phénotype rétinien est observé chez une souche de rats RCS (Royal College of Surgeons) qui présente une dégénérescence rétinienne caractérisée par un défaut de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs (D'Cruz et al., 2000). Les études de

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

clonage positionnel menées chez les rats RCS, ont permis de lier cette dégénérescence rétinienne à une mutation nulle du gène Mer. L'invalidation du gène Mer chez la souris entraîne un phénotype dystrophique similaire à celui des rats RCS (Duncan et al., 2003). L'ensemble de ces études montre que les récepteurs TAM jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement normal de la rétine. En outre, les souris déficientes pour la protéine Gas6 ne présentent pas de phénotype rétinien dystrophique (Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006b). Ceci suggère que dans des conditions physiologiques, la protéine S suffirait à compenser l'absence de protéine Gas6. Des travaux *in vitro* ont confirmé que Gas6 et la protéine S stimulent la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien (Hall et al., 2001, 2003, 2005; Prasad et al., 2006b). Ce phénomène appelé «shedding» permet le renouvellement des segments externes des photorécepteurs (**Figure 10**). Son dysfonctionnement entraîne une dégénérescence de la rétine et conduit à la cécité (Lu et al., 1999; Nguyen-Legros and Hicks, 2000).

Par leurs domaines Gla chargés négativement, la protéine S et la protéine Gas6 interagissent indirectement avec les résidus phosphatidylsérines chargés négativement à la surface des segments externes des photorécepteurs (**Figure 17**). Ces interactions sont possibles grâce à la présence de charges positives apportées par des ions Ca^{2+} entre les PVKDs et la membrane du segment externe du photorécepteur. Par leurs domaines SHBG, ces deux PVKDs interagissent avec les récepteurs Mer situés à la surface de l'EPR. La protéine Gas6 et la protéine S jouent un véritable rôle de « pont protéique » entre l'EPR et les segments externes des photorécepteurs et favorisent ainsi la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien (Hall et al., 2001, 2003, 2005; Prasad et al., 2006b).

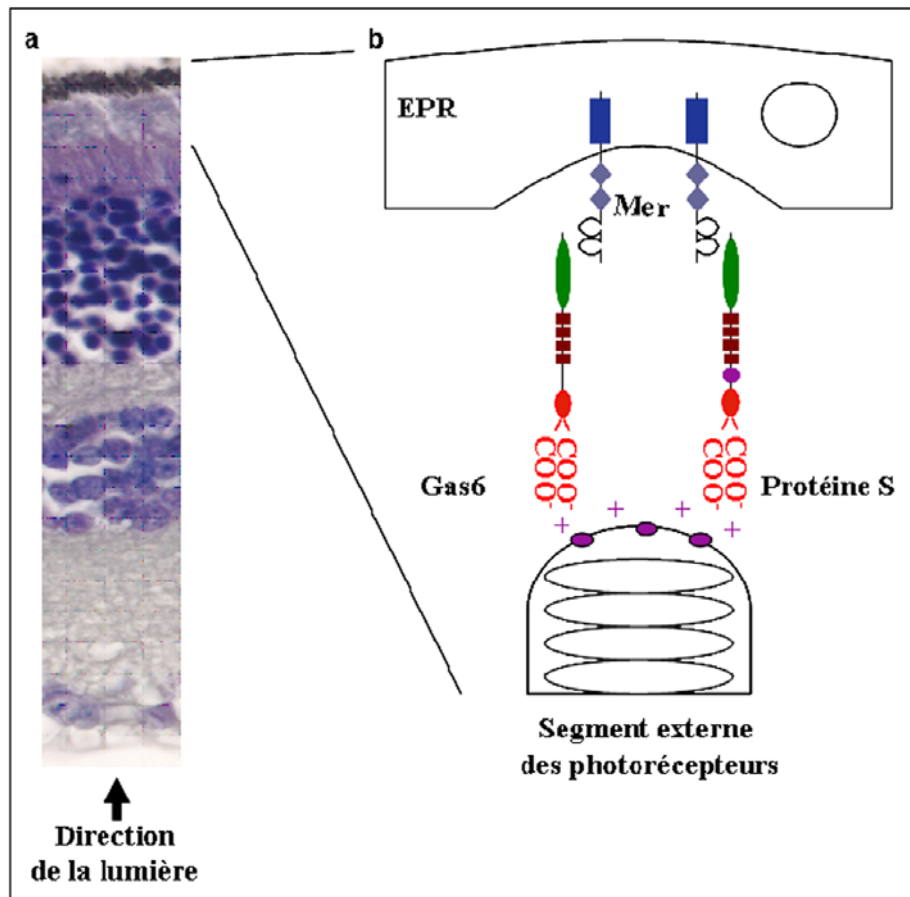


Figure 17 : Modèle de phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien médiée par les protéines S et Gas6. a, coupe de rétine de souris adulte colorée au violet de cresyl. **b,** schéma des interactions protéiques permettant la phagocytose des segments externes des photorécepteurs de la rétine par l'EPR.

1.4.2.3 Modèle expérimental de lésion rétinienne induite par photocoagulation laser : modèle d'angiogenèse choroïdienne traumatique

Vascularisation rétinienne et choroïdienne

Chez l'Homme, la vascularisation rétinienne est assurée par le réseau rétinien pour la partie interne et par la choriocapillaire pour la partie externe.

Les artères rétiniennes et leurs efférences assurent la vascularisation des couches internes de la rétine. Les capillaires sont organisés en deux couches superposées localisées au niveau des deux couches plexiformes. Ils sont constitués de cellules endothéliales jointives par des jonctions serrées qui forment la barrière hémato-rétinienne interne.

Alors que ce système capillaire apporte 30 à 40% de l'oxygène indispensable au métabolisme rétinien, l'apport principal en oxygène est assuré par un second système vasculaire, à savoir la choriocapillaire issue des artères ciliaires, issues elles-même de l'artère

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

ophtalmique. La choriocapillaire présente la vascularisation la plus riche du corps humain. Elle assure la vascularisation de la choroïde et de la rétine externe formée par l'EPR et les photorécepteurs. Cette vascularisation est permise grâce au caractère fenestré des capillaires choroïdiens et grâce à la présence d'une barrière de diffusion nommée la membrane de Bruch. Les jonctions serrées de l'EPR constituent la barrière hémato-rétinienne externe.

Mécanismes de survenue de la néovascularisation choroïdienne (NVC)

Une modification de la vascularisation rétinienne ou choroïdienne correspondant au développement de néovaisseaux infiltrant l'espace sous-rétinien peut être à l'origine de pathologies oculaires (Pour revue (Fauser et al., 2003)).

La néovascularisation choroïdienne peut être stimulée de différentes façons et notamment en condition hypoxique. L'hypoxie induit l'expression d'un grand nombre de gènes dont le VEGF, protéine clé de l'angiogenèse (Shweiki et al., 1992). Ce processus peut également être modulé par des molécules du système immunitaire. Les macrophages, en dégradant la couche externe du collagène où la membrane de Bruch est amincie, facilitent le passage de néovaisseaux choroïdiens vers et sous l'épithélium pigmentaire qui s'insinuent ensuite sous les segments externes des photorécepteurs.(Penfold et al., 2001).

Enfin, en plus de l'inflammation et de l'hypoxie, une altération du complexe formé entre la membrane de Bruch et l'EPR contribue de façon primordiale au développement de néovaisseaux choroïdiens (Oshima et al., 2004; Schwesinger et al., 2001). Cette altération est présente cliniquement dans la majorité des pathologies associées à une néovascularisation choroïdienne et peut être expérimentalement induite chez le rongeur dans le modèle d'impact laser argon surdosé.

Modèle de NVC induite par photocoagulation laser

Le mode d'induction de NVC le plus souvent utilisé fait intervenir la photocoagulation laser qui entraîne une rupture physique de la membrane de Bruch. Ce modèle a initialement été mis en oeuvre chez le singe puis adapté chez le lapin, le rat et la souris (Tobe et al., 1998). Il constitue le modèle de référence pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la néovascularisation choroïdienne et sera utilisé au cours de notre étude afin de vérifier l'effet de l'absence de la protéine Gas6 sur le processus de réparation rétinienne. Chez la souris, ce modèle consiste à induire une rupture de la membrane de Bruch par l'application d'impacts de laser. Les paramètres du laser doivent répondre aux caractéristiques suivantes :

- une durée courte d'exposition ;

1.4 Modèles utilisés pour l'étude de l'effet des PVKDs sur la prolifération et la différenciation cellulaires

- un faible diamètre d'impact ;
- une puissance élevée.

Ceci donne lieu à un impact de haute énergie dit « explosif ». Des bourgeons néovasculaires apparaissent dès le 3^{ème} jour après photocoagulation laser et s'étendent ensuite dans l'espace sous-rétinien.

Une partie de cette introduction est parue dans la revue Médecine Sciences (Annexe 1).

Benzakour O., Gely A., Lara R., Coronas V. **Gas-6 and protein S : vitamin K-dependent factors and ligands for the TAM tyrosine kinase receptors family.** Medecine Sciences, Review.2007; 23:826-33.

1.5 Problématique et objectifs

Mon travail de thèse a eu pour objectif majeur de comprendre l'effet des protéines vitamine K-dépendantes (PVKDs) sur l'activité des cellules souches neurales (CSN) de la zone sous-ventriculaire du cerveau *in vitro* et *in vivo* chez le rongeur nouveau-né et adulte.

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence l'effet de l'inhibition de la sécrétion de l'ensemble des PVKDs sur la prolifération, l'autorenouvellement et la différenciation des CSN de la zone sous-ventriculaire *in vitro*. Pour cela, les CSN ont été traitées avec de la warfarine, molécule inhibant la production des PVKDs, ainsi qu'avec des milieux conditionnés déplétés ou enrichis en protéines vitamine K-dépendantes. Puis, nous avons analysé *in vivo* le rôle des PVKDs en réalisant des injections intra-cérébroventriculaires de warfarine dans le ventricule latéral chez la souris et en observant les cellules de la SVZ en prolifération. Dans la deuxième partie de cette étude nous avons cherché le profil d'expression des PVKDs dans les CSN, dans les cultures de plexus choroïdes ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien. Ces résultats obtenus nous ont permis de focaliser notre étude sur deux protéines vitamine-K dépendantes, à savoir la protéine Gas6 et la protéine S. Nous avons alors vérifié l'expression de leurs récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM ainsi que leur(s) potentielle(s) activation(s) dans les CSN, puis nous avons étudié l'effet de la protéine S et de la protéine Gas6 sur la prolifération et l'autorenouvellement des ces cellules.

La protéine Gas6 et la protéine S étant des facteurs impliqués dans diverses étapes de la phagocytose, nous avons testé la capacité des cellules de la SVZ en culture à phagocyter, puis étudié l'influence sur ce processus de ces deux PVKDs.

Enfin, alors que de nombreux travaux montrent l'implication dans la physiologie rétinienne de la protéine Gas6, de la protéine S et de leurs récepteurs, aucun phénotype rétinien n'a pour le moment été associé à l'invalidation du gène codant pour la protéine Gas6 chez la souris maintenue dans des conditions physiologiques. Dans ces conditions, l'absence de protéine Gas6 semble être compensée par la présence de protéine S. C'est ainsi que, dans la dernière partie de mon travail, nous nous sommes intéressés au phénotype rétinien chez les souris Gas6^{-/-} en conditions pathologiques suite à une lésion rétinienne par impact laser argon.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1 Culture des CSN issues de la SVZ et caractérisation immunocytoologique

2.1.1 Culture primaire de cellules issues de la SVZ *in vitro*

Les encéphales sont prélevés sur des rats Wistar ou sur des souris C57Bl/6J âgés de 2 à 5 jours ou adultes âgés de 4 mois anesthésiés avec 300 mg.kg⁻¹ d'hydrate de chloral. Après décapitation, les encéphales sont prélevés et placés dans du milieu de dissection (**Tableau IV**) et les méninges sont retirées. La SVZ, située en bordure des ventricules latéraux, est disséquée sur les coupes frontales de 500 µm d'épaisseur obtenues à l'aide d'un *tissue chopper* (McIlwain). Les fragments de SVZ issus d'encéphales de rats nouveau-nés sont dissociés mécaniquement à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille 25 G. Les fragments de SVZ isolés à partir des encéphales d'animaux adultes nécessitent une dissociation enzymatique préalable dans 0,025% de trypsine et 0,265 M d'EDTA à 37°C pendant 10 minutes. Après détermination de la densité cellulaire sur cellule de Malassez, les cellules de SVZ sont mises en culture à raison de 3000 cellules par cm² dans des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture (SFM) additionné de 20 ng.ml⁻¹ d'EGF (**Tableau IV**). Les cultures sont maintenues dans des incubateurs à 37°C, en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Après 5 jours de culture, des colonies clonales de cellules sont observables : ce sont les neurosphères primaires. Ces sphères peuvent être repiquées. Pour cela, les milieux et les neurosphères sont récoltés puis centrifugés pendant 10 minutes à 200 *g*. Les culots contenant les neurosphères sont alors dissociés mécaniquement comme décrit précédemment et les cellules sont placées dans des boîtes de pétri dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de la culture primaire. Les neurosphères ainsi obtenues sont appelées neurosphères secondaires.

Milieux	Compositions des milieux et références
Milieu de dissection	Hank's sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Gibco) additionné de HEPES 15 mM (Gibco), pénicilline 100 U.ml ⁻¹ et streptomycine 100 µg.ml ⁻¹ (Gibco) et D-Glucose 25 mM (Sigma)
Milieu de culture des cellules de SVZ chez le rongeur nouveau-né (SFM)	MEM alpha (Gibco) additionné de D-Glucose 25 mM, Pyruvate de sodium 1 mM (Sigma), HEPES 15 mM, pénicilline 100 U.ml ⁻¹ et streptomycine 100 µg.ml ⁻¹ (Gibco), B27 1% (Gibco)
Milieu de culture des cellules de SVZ chez le rongeur adulte	Neurobasal (Gibco) complété avec du B27 1%, de la glutamine 200 µM (Sigma), pénicilline 100 U.ml ⁻¹ et streptomycine 100 µg.ml ⁻¹

Tableau IV : **Composition des milieux de culture.**

2.1.2 Caractérisation immunocytologique

Les cultures de cellules de la SVZ sont constituées de différents types cellulaires à savoir des cellules souches, des cellules progénitrices, des neuroblastes et des neurones. Ces cellules peuvent être identifiées par immunomarquage de marqueurs spécifiques (**Tableau V**):

- les cellules de type souche expriment la nestine, protéine des filaments intermédiaires et LeX/SSEA1, un carbohydre membranaire;
- les neurones matures expriment la MAP-2 et la β III-tubuline, des protéines du cytosquelette. La MAP-2 est associée aux microtubules et la β III-tubuline est présente dans les microtubules de ces neurones.
- les astrocytes expriment la GFAP (glial fibrillary acidic protein), une protéine des filaments intermédiaires du cytosquelette;
- les oligodendrocytes produisent une protéine membranaire spécifique, O4.

Pour les immunomarquages, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,4) pendant 1 heure à 4°C. Après 3 rinçages dans du tampon PBS, les cellules sont perméabilisées avec une solution de triton X-100 à 0,5% dans du PBS pendant 30 minutes. Après une incubation d'une heure dans une solution de blocage constituée de 1% BSA et 0,1% triton X-100 dans du PBS, les cellules sont placées en présence des anticorps primaires dilués dans du PBS pendant une nuit à 4°C. Les dilutions utilisées pour chaque anticorps primaire sont répertoriées dans le tableau V. Pour

l'étude par microscopie confocale, les cellules sont ensuite rincées plusieurs fois avec du PBS puis placées en présence des anticorps secondaires adéquats couplés à un fluorochrome. Les dilutions d'anticorps secondaires sont répertoriées dans le tableau V. Les noyaux des cellules sont colorés à l'aide d'intercalants de l'ADN, le TOPRO-3 (1/1000) ou le DAPI (1/2000).

Après rinçages les lamelles sont montées dans un milieu de montage aqueux (Mowiol).

Antigène recherché	Nature de l'antigène recherché	Anticorps primaires, fournisseur et dilution	Anticorps secondaires, fournisseur et dilution
Nestine	Protéine du cytosquelette exprimée dans les filaments intermédiaires des cellules indifférenciées (Lendahl et al., 1990)	Souris monoclonal (Chemicon), 1/1000	Chèvre anti-souris Alexa Fluor 568 (Molecular probes), 1/200
GFAP	Protéine des filaments intermédiaires du cytosquelette exprimée par les astrocytes (Abd-el-Basset et al., 1992)	Lapin polyclonal (Dako), 1/1000 Souris monoclonal (Chemicon), 1/1000	Chèvre anti-lapin Alexa Fluor 568 (Molecular probes), 1/200 ou Chèvre anti-souris biotinylé (Calbiochem) 1/200
β III-tubuline	Protéine des microtubules du cytosquelette des neurones immatures (Handford et al., 1990)	Souris monoclonal (Sigma), 1/500	Chèvre anti-souris Alexa Fluor 568 (Molecular probes), 1/200 ou Chèvre anti-souris biotinylé (Vector), 1/200
O4	Protéine exprimée à la surface des progéniteurs des oligodendrocytes (Kuhlmann-Krieg et al., 1988)	Souris monoclonal, (R&D), 1/1000	Chèvre anti-souris biotinylé (Vector), 1/200
MAP-2	Protéines associées aux microtubules des neurones matures (Johnson and Jope, 1992)	Souris monoclonal, (Sigma), 1/300	Chèvre anti-souris Alexa Fluor 568 (Molecular probes), 1/200

Tableau V: **Antigènes recherchés et anticorps utilisés pour la caractérisation immunocytochimique des cultures de SVZ.**

Pour une étude par microscopie en contraste de phase, après rinçage, les cellules sont incubées pendant 2 heures à température ambiante en présence d'anticorps biotinylés. L'activité des peroxydases endogènes est préalablement bloquée par une solution d' H_2O_2 à 3% dans du PBS pendant 20 minutes et les cellules sont placées pendant 1 heure en présence de complexe Avidine-Biotine (1/100 ; kit ABC Elite Standard ; Vector) couplé à la peroxydase. L'activité peroxydase est révélée grâce à de la diaminobenzidine (Peroxidase substrate kit DAB, Vector). L'apparition de noyaux marqués en noir est contrôlée sous microscope et la réaction est stoppée par 3 rinçages à l'eau. Les préparations sont déshydratées par des bains d'alcool de degrés croissants (70, 80, 90 et 100°) et de toluène avant montage des lamelles sur des lames en utilisant du DEPEX.

2.2 Détermination de l'effet des PVKDs sur les CSN issues de la SVZ *in vitro*

2.2.1 Préparation des milieux conditionnés

Les milieux conditionnés sont collectés à partir de cellules de SVZ cultivées 5 jours dans du milieu SFM complémenté ou non de vitamine K1 (10 $\mu\text{g/ml}$, Roche) ou de warfarine (1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Sigma). Après deux centrifugations de 10 minutes à 200 et 2400 g respectivement, les milieux sont concentrés environ trois fois avant leur utilisation immédiate à l'aide de microconcentrateurs pourvus d'une membrane filtrante qui permet de retenir les molécules de plus de 30 kDa (Centricon 30K, Millipore). Cette opération permet de concentrer le milieu et d'éliminer la warfarine et la vitamine K présentes dans les milieux conditionnés. L'efficacité de cette élimination sera vérifiée par HPLC en phase inverse.

2.2.2 Traitements réalisés sur les cellules issues de la SVZ *in vitro*

Afin d'étudier l'effet des PVKDs sur des cultures de SVZ, différents traitements sont réalisés sur des neurosphères obtenues après 5 jours de culture en présence de SFM supplémenté de 20 ng.ml^{-1} d'EGF. Lors du traitement, les neurosphères sont placées dans du SFM seul pendant 5 jours. Les sphères sont collectées, dissociées et les cellules sont comptées. Pour les caractérisations immunocytochimiques, les traitements sont réalisés sur neurosphères adhérentes qui ont été placées sur des lamelles de verre 2 à 3 jours avant d'être

traitées. Chacun des traitements a été réalisé en quadruplicat et l'ensemble des expériences a été répété 3 à 5 fois.

L'étude de l'effet des PVKDs sur la croissance des cultures de SVZ a été réalisée par traitement des cellules pendant 5 jours avec :

- de la warfarine R+S (de 0 à 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, Sigma), de la S-Warfarine (0 à 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, Sigma) et /ou de la vitamine K1 (10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, Roche) dans du SFM.
- des milieux conditionnés, provenant de cellules cultivées 5 jours dans du milieu SFM complémenté ou non de vitamine K1 ou de warfarine et dont la préparation est décrite ci-dessus. Le facteur de dilution de ces milieux conditionnés tient compte de son taux de concentration ainsi que du nombre de cellules ayant conditionné ce milieu de culture.
- de la protéine S humaine exogène à une concentration finale de 140 nM (Calbiochem).
- de la protéine Gas6 de souris purifiée au laboratoire (se reporter à la partie 2.5.1) diluée au final au 1/200.

2.2.3 Vérification de l'élimination de la vitamine K et de la warfarine des milieux conditionnés par HPLC

Un échantillon de chaque milieu conditionné est prélevé avant et après concentration. Pour mesurer l'efficacité de l'élimination de la warfarine, les échantillons sont injectés directement sur une colonne analytique HPLC en phase inverse Kromasil C₈ (5 μm , 100 Å, 4.6 x 250 mm, AIT). L'élution est suivie par la mesure de l'absorbance à 305 nm. La séparation est effectuée en utilisant un système de solvant eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique 0,1% (vol/vol). Après un lavage de 5 minutes avec de l'eau, l'élution est achevée par le passage d'un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 100% à une vitesse de 0,8 $\text{ml}.\text{min}^{-1}$ pendant 20 minutes, suivi par un lavage d'acétonitrile 100% pendant 15 minutes.

Pour mesurer l'efficacité de l'élimination de la vitamine K1, une extraction liquide-liquide est réalisée avant la séparation sur HPLC (Elmadfa, 1996). Pour cela, 10 ml de dichlorométhane-méthanol (2:1 v/v) sont ajoutés à 15 ml de milieu conditionné. Le tout est vortexé vigoureusement pendant 1 minute puis centrifugé 5 minutes à 4000 g. La couche de dichlorométhane inférieure est collectée. 10 ml du solvant d'extraction sont à nouveau ajoutés à la phase supérieure aqueuse, l'ensemble est à nouveau vortexé et centrifugé. La nouvelle couche de dichlorométhane est ajoutée à la première. Après évaporation de la fraction de dichlorométhane, les résidus sont dissous dans 5 ml d'hexane. Un volume équivalent de méthanol /eau (9:1 v/v) est ajouté, les échantillons sont vortexés avant centrifugation. La

couche supérieure d'hexane est ôtée et évaporée. Les résidus sont resuspendus dans l'éluant et injectés sur une colonne analytique HPLC en phase inverse Kromasil C₈ (5 µm, 120 Å, 4,6 x 250 mm, DIONEX). Une élution isocratique est effectuée par le passage d'un mélange méthanol/ eau (99,5%/ 0,5%) à la vitesse de 1 ml.min⁻¹. L'élution est suivie par la mesure de l'absorbance à 246 nm.

2.2.4 Mesure de l'effet des PVKDs sur la croissance et l'autorenouvellement des cultures de SVZ

Pour analyser l'influence des PVKDs sur le nombre de neurosphères et sur la croissance des cultures de SVZ, les cellules sont maintenues en culture dans du SFM seul (contrôle) ou supplémenté en S-warfarine. A l'issue des traitements, les milieux et les neurosphères sont collectés. Les cellules sont dissociées mécaniquement et leur nombre est compté après exclusion à l'aide d'un colorant vital, le bleu Trypan.

La warfarine a également été testée pour son implication dans l'autorenouvellement des cellules souches de la SVZ. Dans les conditions de cultures réalisées, seules les cellules aux propriétés de souches sont capables de générer des neurosphères *in vitro* et chaque neurosphère obtenue est issue d'une cellule de type souche (Chiasson et al., 1999; Coles-Takabe et al., 2008; Morshead et al., 2003; Weiss et al., 1996). Pour réaliser ce test qui permet d'évaluer l'effet d'un traitement sur la population de cellules souches, les cellules de la SVZ sont mises en culture à raison de 5000 cellules par puits (Coles-Takabe et al., 2008) pendant 5 jours dans du SFM additionné de 20 ng.ml⁻¹ d'EGF supplémenté ou non avec 1 µg.ml⁻¹ de S-warfarine. Après une semaine, les neurosphères primaires sont comptées. Elles contiennent des cellules souches et progénitrices. Les cellules souches contenues dans les neurosphères primaires pourront générer des neurosphères secondaires lorsqu'elles seront placées en présence d'EGF. Pour cela, les milieux sont collectés et centrifugés et les culots cellulaires sont resuspendus dans 500 µl de milieu de culture et les cellules sont dissociées mécaniquement. Les cellules sont colorées au bleu Trypan et comptées sur cellule de Malassez puis réensemencées dans du SFM supplémenté de 20 ng.ml⁻¹ d'EGF à la densité de 5000 cellules par puits. Après 5 jours, les sphères secondaires se sont développées et leur nombre est compté, ce qui permet d'évaluer le nombre de cellules de type souches qui étaient présentes dans les neurosphères primaires.

2.2.5 Mesure de l'effet des PVKDs sur la prolifération des cellules par incorporation de BrdU

La prolifération des cellules de la SVZ a été évaluée par mesure de l'incorporation de BrdU, un analogue de la thymidine utilisé pour marquer les cellules en division. Lorsqu'il est ajouté dans les cultures ou administré à des animaux, le BrdU s'intègre dans l'ADN des cellules en division lors de la phase S du cycle cellulaire. Afin d'évaluer l'influence de la S-warfarine sur la prolifération des CSN, les cellules de rats nouveau-nés obtenues après 5 jours de culture dans du SFM contenant 20 ng.ml^{-1} d'EGF sont placées en présence de S-warfarine pendant 24 heures. Le BrdU ($10 \text{ }\mu\text{M}$, Sigma) est ajouté pendant les 4 dernières heures de culture. Les cultures sont fixées dans du PFA 4%, rincées avec du PBS puis perméabilisées avec une solution de triton X-100 à 0,5 % pendant 30 minutes. L'ADN est dénaturé afin de permettre le démasquage du BrdU par une incubation pendant 3 minutes en présence de $0,125 \text{ mg.ml}^{-1}$ de pepsine dans une solution d'HCl à 0,1N, puis par deux incubations dans du HCl 0,1N pendant 20 minutes à 4°C suivie de HCl 2N pendant 1 heure à 40°C. L'acidité est neutralisée par une incubation pendant 10 minutes à température ambiante dans du tampon borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/10\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M ; H_3BO_3 0,1 M, pH 8,4). Le BrdU est ensuite révélé par immunocytochimie. Pour cela, les cellules sont préincubées pendant une heure dans un tampon de blocage composé de 1% BSA et 0,1 % triton X-100 puis placées en présence de $5 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'anticorps monoclonaux rat anti-BrdU (Harlan Sera Lab, Royaume-Uni) durant une nuit à 4°C. Après rinçage, les cellules sont incubées pendant 2 heures à température ambiante en présence de $7 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'anticorps biotinylés de lapin anti-rat (Vector). Puis, les peroxydases endogènes sont bloquées avant la révélation de l'activité peroxydase exogène et le montage des lamelles sont montées comme précédemment décrit. Le comptage des cellules est réalisé sous microscope en utilisant le logiciel Neurolucida. La prolifération est exprimée en pourcentage de cellules immunomarquées au BrdU par rapport au nombre total de cellules.

2.2.6 Mesure de l'effet des PVKDs sur l'apoptose par marquage TUNEL

Afin d'évaluer l'effet des PVKDs sur la mort cellulaire, nous avons procédé à une détection des cellules en apoptose. Lors de l'apoptose, l'ADN est dégradé en fragments qu'il est possible de détecter à l'aide de la technique TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labelling). Pour cela, les cellules sont traitées avec $1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ de S-warfarine pendant 24 heures. A l'issue du traitement, les cellules sont fixées pendant 1 heure dans du PFA 4% puis

perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,5% de triton X-100 pendant 30 minutes. L'activité des peroxydases endogènes est bloquée avec une solution d'H₂O₂ à 3% dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Après rinçages, les cellules sont incubées pendant 1 heure à 37°C en présence de 0,25 U.µl⁻¹ d'enzyme Terminal Transferase (Boehringer, Allemagne) et de 6 µM de dUTP biotinylé (Boehringer) dans un tampon contenant 30 mM de Tris HCl, 140 mM de Cacodylate de sodium et 1 mM de CoCl₂. La réaction enzymatique est arrêtée par l'incubation des cellules dans du tampon contenant 300 mM de NaCl et 30 mM de Citrate de sodium pendant 15 minutes à température ambiante. Après plusieurs rinçages dans du PBS, les dUTPs biotinylés sont détectés par le complexe Avidine-Biotine, l'activité peroxydase est révélée et les lamelles montées comme précédemment décrit.

2.2.7 Mesure de l'effet des PVKDs sur la différenciation cellulaire

L'étude de l'effet des PVKDs sur la différenciation des CSN s'est faite par traitement des cellules pendant 5 jours dans du SFM supplémenté ou non de 1 µg.ml⁻¹ de S-warfarine. Cet effet a été évalué par l'immunomarquage d'antigènes spécifiques de neurones, de cellules gliales et d'oligodendrocytes comme décrit dans la partie 2.1.2 de cette partie expérimentale.

2.3 Détermination du rôle des PVKDs dans la SVZ *in vivo*

2.3.1 Injection intracérébroventriculaire de warfarine chez la souris

Afin d'étudier *in vivo* l'effet de la suppression de la sécrétion des PVKDs sur la prolifération des cellules de la SVZ, 1 µl de warfarine (100 µg) a été injecté dans les ventricules latéraux du cerveau de souris adultes. Une injection de 1 µl de NaCl 9‰ a été réalisée comme contrôle.

Pour cela, des souris âgées de 3 à 4 mois sont anesthésiées avec de l'avertine (100 µl.g⁻¹) puis placées dans un appareil stéréotaxique. Les injections sont réalisées dans le ventricule gauche à l'aide d'une seringue Hamilton. La seringue a été introduite aux coordonnées suivantes par rapport au Bregma : antérieur 0,76 mm ; latéral 0,6 mm ; profondeur 2,18 mm. 68 heures après l'injection, du BrdU (50 µg.mg⁻¹) est administré par voie intra-péritonéale. Les animaux sont sacrifiés 4 heures après cette injection puis perfusés avec une solution de PFA à 4%. Les cerveaux sont extraits des boîtes crâniennes et postfixés

au moins 24 heures à 4°C dans cette même solution. Des coupes coronales d'une épaisseur de 40 μm sont réalisées à l'aide d'un vibratome et placées à -20°C dans une solution de cryoprotection (éthylène glycol 30%, glycérol 30%) jusqu'à leur utilisation pour les immunomarquages. Dans un premier temps les peroxydases endogènes sont bloquées dans une solution de PBS contenant de l' H_2O_2 à 3% et du méthanol à 10%. Pour la détection du BrdU, l'ADN est dénaturé dans une solution de PBS contenant du HCL à une concentration finale de 2N et du triton X-100 à 0,5% pendant 30 minutes à 37°C, puis l'acidité est neutralisée par une incubation de 30 minutes à température ambiante dans du tampon borax. Le BrdU est ensuite révélé en présence de 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ d'anticorps monoclonaux rat anti-BrdU (Harlan Sera Lab, Royaume-Uni) durant une nuit à 4°C. Après rinçages, les coupes sont incubées pendant 1 heure 30 à température ambiante en présence de 7 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ d'anticorps biotinylés de lapin anti-rat (Vector). La révélation des peroxydases exogènes a lieu comme décrit précédemment. Le nombre de cellules en prolifération est évalué dans la SVZ sur 5 coupes espacées régulièrement entre les coordonnées Bregma + 1,18 mm à + 0,14 mm.

Le phénotype des cellules en prolifération (BrdU positives) suite à l'injection de warfarine a été caractérisé par immunodétection de la GFAP, exprimée par les astrocytes et la Dcx, exprimée par les neuroblastes. Dans ce cas, le BrdU a été révélé par immunohistochimie en utilisant de l'avidine couplée à un fluorochrome. Les coupes sont ensuite placées en présence des anticorps primaires anti-GFAP (polyclonal de poulet, 1/1000) ou anti- Dcx (polyclonal de chèvre, 1/1000) pendant une nuit à 4°C. Les coupes de cerveaux sont alors rincées plusieurs fois avec du PBS puis incubées avec les anticorps secondaires adéquats couplés à un fluorochrome.

2.3.2 Recherche des PVKDs dans la SVZ et le LCR de souris adulte

La protéine Gas6 et la protéine S ont été recherchées *in vivo* par immunohistochimie chez les souris adultes C57Bl/6J sauvages ou chez les souris dont le gène codant pour la protéine Gas6 a été invalidé. Ces dernières servent par ailleurs de témoins négatifs à l'immunohistochimie de la protéine Gas6 faite chez les souris sauvages. Après euthanasie, les animaux sont perfusés par du NaCl 9‰ puis du PFA 4%. Les cerveaux sont prélevés, postfixés et coupés comme précédemment décrit. Après blocage des sites non spécifiques et perméabilisation dans une solution de Triton à 0,3% et BSA à 3% dans du PBS, les coupes sont incubées en présence des anticorps anti-protéine S (polyclonal de lapin, 1/200, Dako) ou

anti-Gas6 (polyclonal de lapin, 1/250, don du Dr M. Hall) pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires sont ensuite détectés à l'aide d'anticorps secondaires biotinylés de chèvre anti-lapin (1/200, Calbiochem) qui seront révélés par de l'avidine-neutravidine couplée au FITC (1/200, Molecular Probes). Les noyaux des cellules sont colorés par du TOPRO-3 (1/1000).

La SVZ borde les ventricules latéraux qui contiennent le liquide céphalo-rachidien (LCR) sécrété par les plexus choroïdes (Doetsch, 2003; Redzic and Segal, 2004). Afin de vérifier la présence de(s) PVKD(s) dans le LCR de souris, du LCR a été prélevé dans les ventricules latéraux à l'aide d'une seringue Hamilton chez des animaux anesthésiés. La seringue a été introduite aux coordonnées suivantes par rapport au Bregma : antérieur 0,76 mm ; latéral 0,6 mm ; profondeur 2,18 mm. Seuls quelques microlitres ont été prélevés pour être analysés par Western blot.

2.3.3 Mesure de la prolifération des cellules souches de la SVZ chez les souris Gas6^{-/-}

Les cellules souches, contrairement aux progéniteurs, se divisent relativement peu et sont considérées comme des « cellules retenant le marquage BrdU » (Shen et al., 2008).

Afin d'examiner le rôle de la protéine Gas6 sur la prolifération des cellules souches de la SVZ *in vivo*, 7 souris Gas6^{-/-} (don du Dr Pablo Garcia de Frutos) et 7 souris Gas6^{+/+} ont reçu des injections intrapéritonéales de BrdU (50 µg.g⁻¹) tous les jours pendant 5 jours afin de marquer l'ensemble des cellules en prolifération. 24 jours après l'arrêt des injections, les animaux sont sacrifiés et perfusés. A ce stade, seules les cellules à prolifération lente telles que les cellules souches neurales dans la SVZ sont encore marquées par le BrdU. Les cerveaux sont prélevés, postfixés puis coupés. Le marquage BrdU est alors révélé comme décrit dans la partie 2.3.1.

2.4 Caractérisation des PVKDs présentes dans les cultures de CSN et de plexus choroïdes *in vitro*

2.4.1 Recherche par RT-PCR de l'expression des ARNm des PVKDs

L'ARN total est extrait des cellules à l'aide du kit Rneasy (Qiagen). Les réactions de transcription inverse sont effectuées à 37°C pendant 1h30 dans un volume total de 25 µl constitué de 2 µg d'ARN total, 6 unités de reverse transcriptase (MMLV-reverse

2.4 Caractérisation des PVKDs présentes dans les cultures de CSN et de plexus choroïdes *in vitro*

transcriptase, Promega), 0,5 μ M de dNTPs et 10 ng de primers. La réaction de PCR est effectuée dans 20 μ l. Elle utilise 2 μ l des produits de la réaction de réverse transcription, 0,04 unités de polymérase GoTaq (promega), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, ainsi que 0,5 μ M d'amorces répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau VI**).

Cible	Amorces (sens, anti-sens)	Température d'hybridation (°C)	Taille de la séquence amplifiée (bp)	Numéro d'accession Genbank
Protéine S	5'-AAAGCCAAGTGTCTGTGGCA-3' 5'-TTGCACCCAAAGCTCCTTGT-3'	52.5	770	145386552
Gas6	5'-ATGCGCGTTGCAAGAACCTT-3' 5'-ACCGTTTCCTGAATGGCACTGT-3'	54.0	760	145279185
Calumenine	5'-AACCTCAGCTCAGCGACAAAGT-3' 5'-TTGGTGAGCTTGCCATCCTTGT-3'	54.0	769	76559924
VKORC1	5'-ACGTTTGC GGCTTGCACTAT-3' 5'-TCTGGCACCTTCTGGAAGCTAA-3'	53.0	438	45827740
Carboxylase	5'-AAACCTGGCTGTCTTCCGTT-3' 5'-ACAATGAAGATCTGGCCACGCA-3'	52.5	444	13929061
Thrombine	5'-TCACTGAGAATGACCTCC-3' 5'-CTTCACAAGCATCTCCTC-3'	48.0	447	161333846
Proteine C	5'-GACTGTCGGGTGAAAAATGGC-3' 5'-TCTTCGTCTTCTGGGTCTATGTCC-3'	52.5	206	6981411
Facteur X	5'-CCCCTGTGGAAAAACCAATAAAGG-3' 5'-GAAGTCGTAGGTGTCCCTCTGAAAC-3'	52.5	448	56961646
Facteur IX	5'-AAGATCACCCGTGCTGAGACTGTT-3' 5'-TGGAAGCCTGTCTCCCTTTGTTGA-3'	54.5	562	109511288
Facteur VII	5'-TGCTTCTCTACTTTCTGCTCCAGC-3' 5'-TTTCTACAACAGGTATTCTCCCGC-3'	54.5	525	25742854
MGP	5'-AGCCCTGTGCTATGAATCTCACGA-3' 5'-TTATTTGGCTCCTCGGCGCT-3'	54.5	265	6981203
Cx 26	5'-CGGAAGTTCATGAAGGGAGAGAT-3' 5'-GGTCTTTTGGACTTCCCTGAGCA-3'	51.5	365	51871606
Cx 32	5'-CTGCTCTACCCGGGCTAT-3' 5'-TGAGCATCGGTCGCTCTT-3'	51.5	381	82617584
GAPDH	5'-AATGCATCCTGCACCACCAACTGC-3' 5'-GGAGGCCATGTAGGCCATGAGGTC-3'	57.0	555	110347607

Tableau VI : Séquence des primers utilisés pour la RT-PCR

Les conditions de PCR consistent en une étape initiale de dénaturation de 3 min à 94°C suivie de 32 cycles de PCR (30 s à 94°C, 35 s d'hybridation dont la température est

2.4 Caractérisation des PVKDs présentes dans les cultures de CSN et de plexus choroïdes *in vitro*

spécifique de l'amorce utilisée, 50 s à 72°C). La PCR se termine par une étape finale d'élongation de 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1,8%.

Les ARNs extraits de plexus choroïdes de rats sont utilisés comme contrôles positifs pour l'expression de l'ARNm de la protéine Gas6 et de la protéine S. Des ARNs isolés de foie sont utilisés comme contrôles positifs pour l'expression de l'ARNm des protéines intervenant dans la cascade de coagulation ainsi que pour les protéines du système de γ -carboxylation.

2.4.2 Recherche de l'expression des PVKDs par Western blot et immunocytochimie dans les cultures de SVZ

Western blot

La recherche des PVKDs sécrétées dans le milieu conditionné par les CSN est effectuée après concentration sélective des PVKDs par précipitation au citrate de barium (Berkner, 1993). Cette technique est détaillée dans la partie 2.5.1 de cette partie expérimentale.

Les extraits de milieu conditionné concentré ou les lysats cellulaires sont solubilisés dans du Laemmli (0,06 M Tris pH 6,8 ; 2% SDS ; 5% β -mercaptoethanol). Les protéines sont séparées sur un gel SDS-polyacrylamide à 10% et transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA). Les sites d'hybridation non spécifiques sont bloqués 2 heures dans un tampon TBS Tween-20 (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0,1% Tween 20) contenant 5% de lait écrémé. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C dans la solution de blocage contenant les anticorps primaires dirigés contre l'ensemble des PVKDs (anti- γ -carboxyglutamyl (Gla) résidus ou anti-Gla), contre la protéine Gas6 ou contre la protéine S. Le lendemain, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (**Tableau VII**). Enfin, les complexes immuns sont révélés par chimioluminescence à l'aide du kit « ECL-plus » (Amersham Biosciences) sur film (BioMax MR film, Kodak).

Immunocytochimie

L'expression de la protéine Gas6 et de la protéine S ont été recherchées par immunocytochimie. Pour cela, les cultures sont incubées en présence des anticorps primaires pendant une nuit à 4°C. Les anticorps primaires sont révélés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (**Tableau VII**).

2.4 Caractérisation des PVKDs présentes dans les cultures de CSN et de plexus choroïdes *in vitro*

Antigènes recherchés	Anticorps primaires, fournisseur et dilution	Anticorps secondaires, fournisseur et dilution
Résidu d'acide γ -carboxyglutamique (résidus Gla)	WB : souris monoclonal (American diagnostica), 1/1000	WB : chèvre anti-souris peroxydase (Sigma), 1/15000
Gas6	WB et ICC polyclonal de lapin (don du Dr M. Hall), 1/200	WB : chèvre anti-lapin peroxydase (Sigma), 1/20000 ICC : chèvre anti-lapin Alexa Fluor 488 (Molecular probe), 1/200
protéine S	Lapin polyclonal (Dako), WB : 1/4000 ICC : 1/200	WB : chèvre anti-lapin peroxydase (Sigma), 1/20000 ICC : chèvre anti-lapin Alexa Fluor 488 (Molecular probes), 1/200

Tableau VII : **Anticorps utilisés pour la caractérisation de l'expression des PVKDs dans les cultures de SVZ**

2.4.3 Recherche par Western blot de l'expression des PVKDs dans le milieu conditionné par des plexus choroïdes

Les plexus choroïdes des ventricules latéraux ont été prélevés sur des coupes frontales de cerveaux de rats Wistar âgés de 3 à 5 jours (R. Janvier, Le Genest-Saint Isles, France) ou de souris C57B6J adultes. Après rinçage dans du milieu de dissection, ils sont incubés dans du SFM pendant 3 à 5 jours à 37°C. Le milieu conditionné est prélevé, centrifugé, concentré deux fois sur centricon 30K et précipité au citrate de barium avant d'être analysé par Western blot.

2.5 Détermination du rôle des protéines S et Gas6 dans les CSN issues de la SVZ *in vitro*

2.5.1 Purification de la protéine Gas6

La protéine Gas6 n'étant pas disponible commercialement sous sa forme γ -carboxylée (forme active), nous la purifions régulièrement au laboratoire. La purification se fait à partir

de milieux conditionnés produits à partir de cellules HEK 293 qui surexpriment, après une transfection stable, la forme murine de la protéine Gas6. Les cellules HEK sont incubées dans un milieu défini en présence de $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de vitamine K1 pendant 3 jours. Le milieu est prélevé, centrifugé puis concentré sur centricon 30K. Le milieu conditionné concentré est alors précipité à l'aide de citrate de barium, méthode de précipitation sélective des protéines γ -carboxylées (Berkner, 1993). Pour cela, il est supplémenté d'antiprotéases (P2714, Sigma) puis traité avec une solution de citrate de sodium à une concentration de 0,5 M (concentration finale de 20 mM) sur glace pendant 10 minutes. Le citrate chélate les ions Ca^{2+} fixés sur le domaine Gla des protéines γ -carboxylées. Une solution de BaCl_2 à 1 M (concentration finale de 40 mM) est ensuite ajoutée pendant 2 heures sur glace. Durant cette étape, les ions Ba^{2+} se fixent sur le domaine Gla et il se forme un précipité de barium citrate qui absorbe les protéines γ -carboxylées.

Enfin, le précipitat est collecté par centrifugation puis lavé deux fois dans un tampon contenant 100 mM de BaCl_2 et 100 mM de NaCl afin d'éliminer l'excès d'ions Ba^{2+} non fixés au domaine Gla. Il est ensuite ressolubilisé dans $1/10^{\text{ème}}$ du volume de départ dans une solution de citrate de sodium à 150 mM. Le citrate chélate les ions Ba^{2+} fixés sur le domaine Gla ce qui permet la solubilisation du culot.

2.5.2 Mesure de l'effet de la protéine Gas6 et de la protéine S sur la croissance et l'autorenouvellement des cellules issues de la SVZ

Les effets de la protéine Gas6 et de la protéine S sur la prolifération et l'autorenouvellement des cellules ont été évalués d'un part en additionnant ces deux PVKDs aux cultures de SVZ et d'autre part en examinant l'effet de l'absence de la protéine Gas6 sur des cultures de SCN issues de souris déficientes pour le gène codant pour la protéine Gas6 ($\text{Gas6}^{-/-}$) par rapport à des cellules issues de SVZ de souris sauvages ($\text{Gas6}^{+/+}$).

Comme précédemment décrit, les cellules de la SVZ issues de rats nouveau-nés sont mises en culture pendant 5 jours dans du SFM additionné de $20 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$ d'EGF supplémenté de la protéine Gas6 ou de la protéine S à 140 nM (Calbiochem). Des cellules issues de la SVZ de souris $\text{Gas6}^{-/-}$ et de souris $\text{Gas6}^{+/+}$ de même espèce et de même âge sont également mises en culture dans du SFM additionné de $20 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$ de EGF. Après comptage des neurosphères primaires et des cellules, celles-ci sont réensemencées à la densité de $3000 \text{ cellules}.\text{ml}^{-1}$. Après 5 jours, le nombre de sphères secondaires ainsi que de cellules vivantes est évalué.

2.6 Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'effet des PVKDs sur les CSN issues de la SVZ

2.6.1 Recherche par RT- PCR de l'expression des ARNm des récepteurs TAM

L'extraction des ARNs totaux, la transcription inverse et la PCR sont effectuées comme précédemment décrit. Les ARNs extraits de testicules de rats sont utilisés comme contrôles positifs pour l'expression des récepteurs TAM. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Cible	Amorces (sens, anti-sens)	Température d'hybridation (°C)	Taille de la sequence amplifiée (bp)	Numéro d'accession Genbank
Tyro3	5'-TTTGCGTGTGTGTGCCTCCAAT-3' 5'-ATGTCCTCTGCCAGCATGCAAT-3'	54.5	828	8394495
Axl	5'-TGTTTCGAGCCAACTGTGGAA-3' 5'-ACTTGACTGGCATCTTGGCA-3'	52.0	693	18389318
Mer	5'-AATGCACAATGCCACCTGCACA-3' 5'-ATCCCGCAACATGCAATTCCGA-3'	55.5	847	12738846

Tableau VIII : Amorces utilisées lors de la transcription inverse et la réaction de PCR

2.6.2 Recherche de l'expression des récepteurs TAM par Western blot et immunocytochimie

Western blot

Afin de rechercher la présence des récepteurs TAM dans les lysats de culture de CSN, les lysats cellulaires sont solubilisés dans du tampon Laemmli et sont traités comme précédemment décrit en respectant les dilutions d'anticorps répertoriées dans le tableau IX ci-dessous

Immunocytochimie

Les cultures de cellules de SVZ étant constituées de différents types cellulaires, nous sommes intéressés à déterminer le profil d'expression des récepteurs TAM par co-immunomarquage en respectant les dilutions d'anticorps répertoriées dans les tableaux IX et V.

2.6 Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'effet des PVKDs sur les CSNs issues de la SVZ

Antigène recherché	Anticorps primaires, fournisseur et dilution	Anticorps secondaires, fournisseur et dilution
Tyro3	WB : chèvre polyclonal (C-20, Santa cruz), 1/500 ICC : chèvre polyclonal (N-18, Santa cruz), 1/200	WB: Âne anti-chèvre peroxydase (Santa cruz), 1/8000 ICC : Âne anti-chèvre Alexa Fluor 568 (Molecular probe), 1/200
Axl	WB : chèvre polyclonal (Santa cruz), 1/500 ICC : lapin polyclonal (Santa cruz), 1/200	WB : Âne anti-chèvre peroxydase (Santa cruz), 1/8000 ICC : chèvre anti-latin Alexa Fluor 488 (Molecular probe), 1/200
Mer	chèvre polyclonal (Santa cruz) WB : 1/500 ICC : 1/200	WB : Âne anti-chèvre peroxydase (Santa cruz), 1/8000 ICC : Âne anti-chèvre Alexa Fluor 568 (Molecular probe), 1/200
Phospho-tyrosine	WB : souris monoclonal (Sigma) 1/5000	WB : chèvre anti-souris peroxydase (Sigma), 1/80000
Phospho-Axl	WB : lapin polyclonal (R&D systems) 1/200	WB : chèvre anti-lapin peroxydase (Sigma), 1/20000
Phospho-Mer	WB : lapin polyclonal (Fabgennix) 1/750	WB : chèvre anti-lapin peroxydase (Sigma), 1/20000

Tableau IX : **Anticorps utilisés pour la caractérisation des récepteurs TAM dans les cultures de SVZ**

2.6.3 Etude de l'activation des récepteurs TAM par la protéine Gas6 et la protéine S

Afin de déterminer les voies de signalisation activées suite à une stimulation des cellules par la protéine Gas6 et/ou la protéine S nous avons réalisé une analyse quantitative par immunoprécipitation et par Western blot, de la phosphorylation des récepteurs TAM ainsi que de certaines protéines intracellulaires. Pour cela, les neurosphères obtenues après 5 jours de culture dans du SFM contenant 20 ng.ml⁻¹ d'EGF sont repiquées dans du SFM à une concentration de 5.10⁶ cellules.ml⁻¹ dans des tubes eppendorfs. Les cellules sont ensuite incubées en présence de la protéine Gas6 et/ou de 140 mM de protéine S pendant 8 minutes à 37°C sur une roue rotative. Elles sont ensuite centrifugées 2 minutes à 200 g à 4°C après l'ajout de 1 mM d'orthovanadate de sodium par tube. Le culot est resuspendu dans 120 µl de tampon de lyse Laemmli en présence d'un mélange d'inhibiteurs de phosphatases

2.6 Voies de signalisation intracellulaires impliquées dans l'effet des PVKDs sur les CSNs issues de la SVZ

(Calbiochem) et d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (Roche) puis incubé 10 minutes à 100°C avant le dosage des protéines par la méthode de Lowry. Pour l'immunoprécipitation, 100 µg de protéines totales sont dilués dans du tampon RIPA (50 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 0.5% sodium déoxycholate, 1% tergitol, 0.2% SDS), auxquels sont ajoutés 1 µg d'anticorps primaires anti-Tyro3 ou anti-Mer. Les échantillons sont incubés une nuit à 4°C sur roue rotative. Les complexes immuns sont alors précipités par l'addition de 30 µl de billes couplées à la protéine G sépharose une heure à température ambiante. L'immunoprécipitat est ensuite collecté par centrifugation et lavé dans du tampon RIPA avant d'être resuspendu dans du tampon laemmli. La phosphorylation du récepteur Axl est directement analysée par Western blot.

Les protéines sont séparées sur un gel SDS-polyacrylamide à 10% et transférées sur une membrane de PVDF. Les sites d'hybridation non-spécifiques sont bloqués 2 heures dans une solution de TBS Tween-20 contenant 5% de lait écrémé pour la détection des récepteurs TAM et 5% de BSA pour la détection des phospho-tyrosines. Les membranes sont ensuite incubées une nuit à 4°C dans la solution de blocage contenant les anticorps primaires. Le lendemain, les membranes sont incubées 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (**Tableau IX**). Enfin, les complexes immuns sont révélés par chimioluminescence à l'aide du kit « ECL-plus » sur film.

2.7 Activité phagocytaire des CSN issues de la SVZ du cerveau de rats nouveau-nés.

La phagocytose est impliquée dans une grande variété d'évènements cellulaires, notamment lors du développement du système nerveux central. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à vérifier la capacité des CSN de la SVZ à phagocyter et dans un deuxième temps à examiner la capacité de la protéine Gas6 et la protéine S à moduler ce processus.

2.7.1 Etude de la phagocytose par microscopie confocale

Cette expérience est réalisée sur des cellules adhérentes à des lamelles de verre. Des billes de latex d'un diamètre de 1 µm couplées au FITC (Sigma) à une concentration de

25.10^6 billes.mL⁻¹ sont pré-incubées pendant 1 heure à 37°C dans du SFM supplémenté ou non de protéine S à une concentration finale de 140 nM ou de protéine Gas6 diluée au final au 1/200. Le mélange est ensuite ajouté aux cellules pendant 1 heure à 37°C. Après lavages au HBSS, les cellules sont fixées au PFA 4% durant 20 minutes à température ambiante. Afin de visualiser le cytosquelette d'actine, les cellules sont lavées avec du TBS, perméabilisées avec une solution de TBS contenant 0,1% de triton puis incubées avec 1 µg/ml de phalloïdine 30 minutes et du TOPRO-3 (1/1000). Après rinçage les lamelles sont montées dans du Mowiol.

Une série d'immunomarquage permettant d'identifier les différents types cellulaires capables de phagocyter a été menée. Pour cela, après perméabilisation dans une solution de PBS contenant 0,1% de triton, les cellules sont incubées une heure dans une solution de blocage constituée de 1% BSA et 0,1% triton X-100 dans du PBS. Les cellules sont ensuite placées en présence des anticorps primaires anti-MAP2, anti-GFAP ou anti-Nestine (**Tableau V**) une nuit à 4°C. Après rinçages, les cellules sont placées en présence des anticorps secondaires adéquats couplés à un fluorochrome et avec du TOPRO-3 (1/1000) puis montées dans du Mowiol. Les cellules sont observées en microscopie confocale afin de vérifier l'internalisation des billes de latex.

2.7.2 Repiquage des CSN ayant phagocyté des billes de latex et étude par microscopie confocale

Nous avons testé si des cellules aux propriétés de cellules souches sont capables de phagocytose. Pour cela, des billes de latex pré-incubées dans du SFM seul pendant 1 heure à 37°C sont ajoutées aux sphères primaires à une concentration de 25.10^6 billes.mL⁻¹ pendant 4 heures. Les sphères primaires sont ensuite rincées deux fois au HBSS puis repiquées à une concentration de 10000 cellules.mL⁻¹ dans du SFM supplémenté par 20 ng.mL⁻¹ d'EGF. La présence de billes de latex à l'intérieur des sphères secondaires sera alors vérifiée. Pour cela, après rinçages, les cellules sont soit observées directement sous microscope, soit incubées avec 20 µM d'une sonde fluorescente FM4/64 qui s'intercale dans la membrane des cellules vivantes. La visualisation de la sonde se fait immédiatement sous microscope avant son entrée dans la cellule par endocytose.

La présence de billes de latex à l'intérieur des neurosphères secondaires prouve qu'elles ont été initialement phagocytées par des cellules aux propriétés de cellules souches lors de l'incubation de ces billes fluorescentes avec les sphères primaires.

2.7.3 Etude de la phagocytose par cytométrie en flux

Afin de permettre une quantification de la phagocytose observée en microscopie confocale, nous avons choisi d'utiliser la cytométrie en flux pour mesurer le nombre de cellules ayant internalisé des billes de latex fluorescentes. Cette expérience est réalisée sur des cellules repiquées à une concentration de 75.10^3 cellules.mL⁻¹ en plaque 6 puits dans du SFM. Les billes de latex sont pré-incubées pendant 1 heure à 37°C à une concentration de 25.10^6 billes.mL⁻¹ dans du SFM supplémenté ou non de protéine S à une concentration finale de 140 nM. Le mélange est ensuite ajouté aux cellules pendant 1 heure à 37°C. Après lavages et dissociation, les cellules sont reprises dans une solution de HBSS contenant 0,4% de bleu trypan. Ce colorant vital, utilisé habituellement pour le comptage cellulaire, a ici pour rôle d'éteindre la fluorescence présente à l'extérieur des cellules vivantes et donc de supprimer la fluorescence des billes accrochées à la surface de la membrane plasmique et non phagocytées. Les échantillons sont conservés sur glace puis analysés par cytométrie en flux (BD FACSCanto II). Plusieurs paramètres seront mesurés, la taille et la granularité des cellules ainsi que la fluorescence des billes internalisées.

2.8 Étude du rôle de la protéine Gas6 dans la rétinogénèse

2.8.1 Photocoagulation rétinienne au laser argon

Cette étude a été réalisée en collaboration avec les Dr Jean-Claude Jeanny et Yves Courtois de l'Institut Biomédical des Cordeliers (INSERM U598, Paris). Des impacts laser ont été faits chez 5 souris C57Bl/6J Gas6^{+/+} et 5 souris Gas6^{-/-} âgées de 2 mois à la Fondation Rothschild à Paris par le Dr Charles Feumi, ophtalmologiste. Deux impacts d'un diamètre de 50 µm, d'une durée de 0,05 seconde et d'une puissance de 400 mW sont réalisés par œil autour du nerf optique sur des souris anesthésiées. Le laser utilisé dans cette étude est un laser argon émettant une longueur d'onde de 532 nm dont les effets sur le tissu rétinien sont majoritairement thermiques, par brûlure. La lumière émise par le laser est transférée par un jeu de miroirs à une lampe à fente. Grâce à l'interposition d'une lamelle de verre entre l'œil de la souris et la lampe, l'ophtalmologiste peut observer le fond d'œil de l'animal et contrôler la localisation, la mise au point et la focalisation sur la rétine du spot de visée du laser afin de réaliser la photocoagulation.

Les souris sont sacrifiées 3 ou 14 jours après photocoagulation laser. Les yeux sont immédiatement prélevés, montés dans du Tissue Tek (OCT) (Bayer Diagnostics, Puteaux, France) et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

L'analyse immunohistologique des rétines de souris sacrifiées 3 jours après photocoagulation nous permettrons d'observer, au niveau du site de l'impact, des réactions cellulaires précoces induites par le laser telles que :

- l'apoptose de photorécepteurs lésés dans l'axe de l'impact (cellules Tunel positives);
- l'infiltration macrophagique (cellules F4/80 positives);
- et la prolifération cellulaire incluant la prolifération de macrophages, de cellules endothéliales, de cellules vasculaires de muscle lisse, de cellules de l'EPRet d'autres types cellulaires non identifiés (cellules Ki67 positives) (Espinosa-Heidmann et al., 2005). L'apparition de néovaisseaux (cellules endothéliales Von Willebrand positives) sera analysée 14 jours après lésion, temps nécessaire à leur organisation (Dot et al., 2009). Ces données ne seront pas présentées dans ce manuscrit.

2.8.2 Mesure des réactions cellulaires induites par la photocoagulation laser

2.8.2.1 Détection des antigènes Ki67 et F4/80

Des coupes en série de 10 µm des yeux sont réalisées grâce à l'utilisation d'un cryostat CM3050S (Leica). Les lésions induites par le laser sont localisées à l'aide d'un microscope. Toutes les coupes contenant des traces de l'impact sont récupérées sur des lames de verre superfrost et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Durant les 7 jours suivant la photocoagulation, le processus de réparation de la lésion est caractérisé par l'infiltration de macrophages (cellules F4/80 positives) et la prolifération cellulaire (cellules Ki67 positives). Ces cellules en prolifération sont localisées à l'intérieur de la choroïde, au niveau de la sclère au centre de la lésion induite par le laser.

La protéine Ki67 est une protéine nucléaire exprimée préférentiellement au cours de phases actives du cycle cellulaire, sa détection permet donc de quantifier le taux de cellules en prolifération. La protéine F4/80 est une glycoprotéine de surface exprimée par les macrophages circulants recrutés en réponse à la lésion ainsi que par les cellules de la microglie qui représentent les macrophages résidants de la rétine. Afin de révéler ces

antigènes, les coupes de rétine sont fixées au PFA 4% pendant 5 minutes puis lavées avant d'être incubées dans du PBS avec les anticorps primaires anti-Ki67 (1/50, Dako) ou anti-F4/80 (1/100, Serotec) et anti-GFAP (1/100, Dako) pendant 1 heure. Le marquage anti-GFAP nous permet de marquer les cellules gliales de Müller activées lors de la lésion et ainsi de localiser l'impact laser avec certitude. Après lavages, les coupes sont alors mises en présence des anticorps secondaires de chèvre anti-rat Alexa Fluor 488 et chèvre anti-lapin Alexa Fluor 568 (1/200, Molecular probes) pendant 1 heure et les noyaux sont colorés au Dapi dilué au 1/2000 pendant 5 minutes avant montage des coupes dans du glycérol/PBS (1/1).

2.8.2.2 Mesure de l'apoptose

La photocoagulation laser de la rétine induit une apparition de cellules apoptotiques localisées en majorité dans la couche nucléaire externe sur la trajectoire du laser. Ces cellules apoptotiques seront détectées par marquage TUNEL.

Après fixation 1 heure dans une solution de PFA à 4% et lavages, les coupes de rétine sont perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0,3% de triton X-100. Elles sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37°C dans un tampon 500 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA pH 8,5 contenant 1 unité par coupe de phosphatase alcaline (Miles corporation) afin d'éliminer des groupements phosphate présents à l'extrémité des fragments d'ADN qui viennent perturber l'action de l'enzyme Terminal Transferase. Après lavages, les coupes sont incubées avec le mélange réactionnel TUNEL (20 µl de TUNEL Enzyme pour 180 µl de TUNEL Label, Roche) 1 heure à 37°C et en atmosphère humide. Elles sont de nouveau lavées avant d'être incubées dans une solution de PBS contenant du Dapi dilué au 1/2000 pendant 5 minutes. Les coupes sont montées dans du glycérol/PBS (1/1).

2.9 Analyse des données et tests statistiques

2.9.1 Photographies

Les photographies en immunofluorescence et microscopie confocale sont obtenues au moyen d'une unité confocale (FV-1000) équipée d'un laser argon et HeNe de 15 mW associée à un microscope à platine inversée (IX-80, Olympus, Tokyo, Japon). Les fluorochromes sont excités avec une longueur d'onde de 405 nm pour le DAPI, 488 nm pour Alexa Fluor 488, 543 nm pour Alexa Fluor 555 et 568, 633 nm pour Alexa Fluor 647 et le

TOPRO-3. La fluorescence émise est collectée, *via* un photomultiplicateur, à des longueurs d'onde comprises entre 425 et 475 nm pour le Dapi, 500 et 530 nm pour l'Alexa Fluor 488, 550 et 625 nm pour les Alexa Fluor 555 et 568 et à 650 nm pour l'Alexa Fluor 647 et le TOPRO-3

2.9.2 Mesures

Les comptages des cellules immunoréactives pour BrdU, TUNEL, GFAP, β III-tubuline ou O4 sur les cellules de la SVZ ont été réalisés avec un microscope BX60 Olympus à platine motorisée, couplé à un ordinateur et piloté par le logiciel d'analyse d'images Neurolucida (MicrobrightField Inc., Colchester VT, USA). Le comptage des cellules positives et négatives a été effectué sur chaque lamelle, pour au moins 10 champs analysés à l'objectif 40X. Les données sont présentées sous forme de pourcentage du nombre de cellules positives par rapport au nombre total de cellules comptées dans les champs analysés, ou sous forme de variation du nombre de cellules, en pourcentage par rapport au témoin. Les données obtenues sont exprimées en moyenne $\pm$ écart type (SEM).

Les comptages sur la rétine et les coupes de cerveaux en fluorescence ont été réalisés à partir de photos prises au microscope confocal et à l'aide du logiciel Image J.

La quantification des cellules BrdU positives révélées en DAB a été effectuée directement sous microscope à transmission.

2.9.3 Analyses statistiques

Pour une même expérience, chaque condition expérimentale est reproduite dans 4 puits séparés. Sauf indication contraire, pour chaque série, les expériences sont reproduites au moins 3 fois. L'analyse statistique a été réalisée au moyen des logiciels *Statview 5.0* ou *Graphpad Prism 4*. Les résultats obtenus dans les différentes mesures ont été comparés entre les différents groupes expérimentaux en utilisant le test statistique d'analyse de variance ANOVA suivi du test posthoc de Bonferroni ou Mann&Whitney pour des comparaisons 2 à 2. Les données sont considérées significativement différentes pour des valeurs de $P < 0,05$.

RÉSULTATS et DISCUSSIONS

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des cellules souches neurales issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence le rôle des protéines vitamine-K dépendantes sur la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales issues de la zone sous-ventriculaire du cerveau de rats nouveaux-nés *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, nous avons mis au point un modèle expérimental qui consiste à moduler la sécrétion de l'ensemble des PVKDs. L'utilisation de la warfarine nous a permis d'inhiber la sécrétion des PVKDs par les CSN (Wallin and Hutson, 2004), alors que l'ajout de vitamine K1 a au contraire permis de stimuler leur production. Cette étude *in vitro* a été complétée par une étude *in vivo* qui a consisté en l'injection intracérébroventriculaire de warfarine dans le ventricule latéral de souris adultes.

3.1.1 Effet des PVKDs sur la prolifération des CSN *in vitro*

3.1.1.1 Expression et fonctionnalité du système de γ -carboxylation

Dans un premier temps, nous avons étudié, par RT-PCR, la présence des acteurs majeurs du complexe enzymatique permettant la réaction de γ -carboxylation dans les cellules de la SVZ de rats nouveau-nés. Cette analyse montre que les CSN expriment l'ARNm de la γ -carboxylase, de la VKOR ainsi que de la caluménine (**Figure 18a**). Ces cellules expriment donc la machinerie enzymatique nécessaire à la γ -carboxylation des protéines vitamine K-dépendantes.

Afin de vérifier la fonctionnalité du système de γ -carboxylation et donc de la sécrétion des PVKDs par les CSN, les cellules ont été cultivées pendant 5 jours en conditions basales ou en présence de S-warfarine à 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ou de vitamine K1 à 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Nous avons ensuite détecté dans le milieu conditionné par les CSN l'ensemble des PVKDs par Western

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

blot, en utilisant des anticorps, nommés communément anti-Gla, dirigés spécifiquement contre les résidus d'acide γ -carboxyglutamique (Brown et al., 2000). Nos résultats montrent que les CSN sécrètent une ou des PVKD(s) en conditions basales (**Figure 18b**) et que cette sécrétion est absente en présence de warfarine et présente en présence de vitamine K1 (**Figure 18c**).

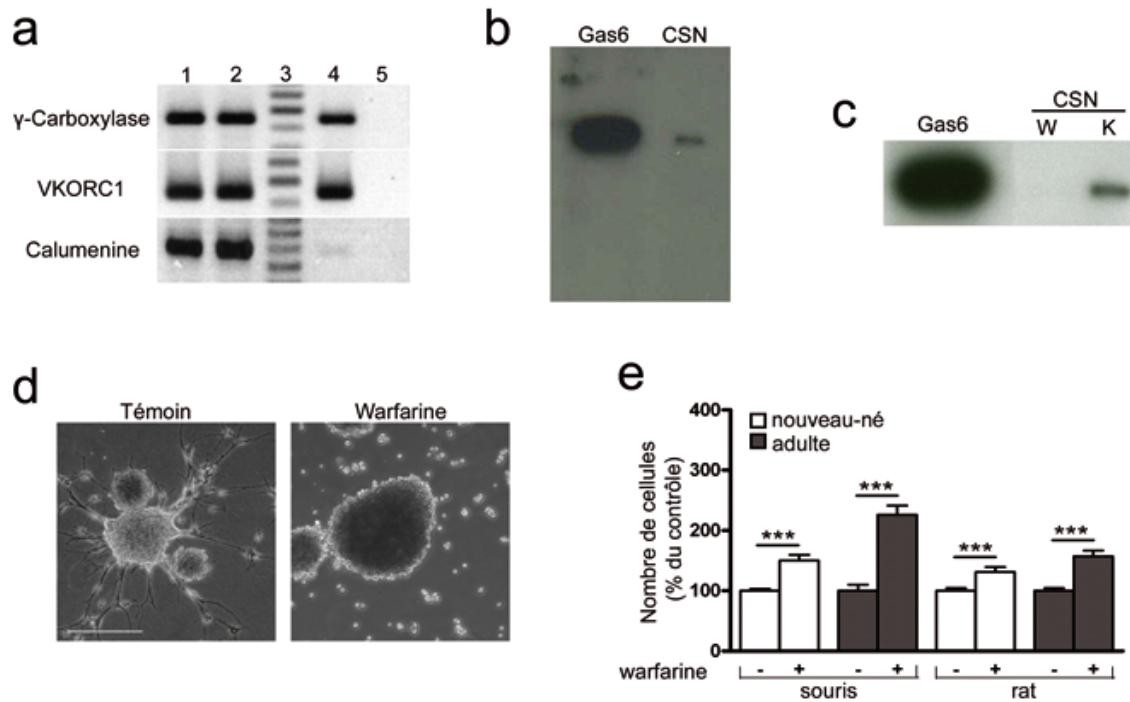


Figure 18 : La suppression de la production des protéines vitamine K-dépendantes change la morphologie cellulaire et stimule la croissance des CSN *in vitro* chez le rat et la souris post-natale. (a) RT-PCR réalisée à partir d'extraits d'ARN totaux de cellules de la SVZ (pistes 1 et 2) ou de foie (piste 4) de rat utilisé comme contrôle positif. La piste 3 correspond aux marqueurs de poids moléculaire et la piste 5 au contrôle négatif de la PCR. (b) Détection par Western blot de l'ensemble des protéines vitamine K-dépendantes par les anticorps anti-Gla dans le milieu conditionné par les CSN à l'état basal ou (c) suite au traitement des cellules de la SVZ avec de la warfarine (W) à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou de la vitamine K1 (K) à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pendant 5 jours. De la protéine Gas6 murine purifiée (mGas6) a été utilisée comme témoin positif. (d) Photos représentatives des neurosphères maintenues pendant 5 jours dans du SFM supplémenté ou pas avec 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de S-warfarine. Barre d'échelle : 200 μm . (e) Nombre de cellules vivantes issues de la SVZ de souris et de rats nouveau-nés (blanc) et adultes (noir) maintenues pendant 5 jours dans du SFM seul ou supplémenté de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de S-warfarine. *** $P < 0,001$ comparé au contrôle.

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

L'influence des PVKDs sur la morphologie et le nombre des cellules de la SVZ *in vitro* a alors été étudiée en maintenant les cultures pendant 5 jours en présence de $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de S-warfarine. Nous avons observé, dans un premier temps, un changement drastique de la morphologie des cellules en présence de warfarine par rapport à une condition contrôle (**Figure 18d**). Les cellules sont plus rondes et les neurosphères plus grosses en présence de ce traitement. Nous avons observé, dans un second temps, l'effet de l'inhibition de la sécrétion des PVKDs par la warfarine sur des CSN provenant de rats ou de souris nouveau-nés et adultes. Cette expérience a été réalisée sur des cellules provenant de différentes espèces à différents âges car des études précédentes ont démontré des variations de la réponse cellulaire à certains facteurs selon l'espèce et l'âge des animaux dont les cellules sont issues (Baker et al., 2005; Van Kampen et al., 2004). Nos résultats montrent que l'inhibition de la sécrétion des PVKDs par la warfarine induit *in vitro* une augmentation du nombre de CSN provenant de rats ou de souris nouveau-nés et adultes (**Figure 18e**). L'effet de l'inhibition de la sécrétion des PVKDs sur les CSN est donc indépendant de l'âge et de l'espèce des animaux dont elles dérivent.

L'ensemble de ces résultats montre donc qu'une ou plusieurs PVKD(s) régule(nt) la croissance des CSN. La suite des expériences *in vitro* sera réalisée sur des CSN issues de la SVZ de rats nouveau-nés.

3.1.1.2 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la croissance des cellules de la SVZ de façon dose-dépendante

Nous avons alors recherché si l'effet de la warfarine est dose-dépendant. Pour cela, les CSN sont traitées avec des concentrations croissantes allant de 1 à $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de S/R-warfarine pendant 5 jours. Les résultats obtenus montrent que la S/R-warfarine stimule la croissance des CSN à des concentrations de 100 et $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure 19a**). Ces concentrations sont relativement élevées en comparaison à celles utilisées pour d'autres types cellulaires (Wu et al., 1997; Zhang and Suttie, 1994). Nous avons testé de la même façon l'isoforme S de la warfarine. Cette isoforme est connue pour avoir une action plus puissante que l'isoforme R et donc que le mélange racémique à des concentrations similaires (Choonara et al., 1986; Gage and Milligan, 2005). Nos résultats montrent que la S-warfarine stimule la croissance, de façon significative, à des doses de 1 et $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (**Figure 19b**). Pour

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

l'ensemble des expériences *in vitro*, l'isoforme S de la warfarine sera donc utilisée à une concentration de 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

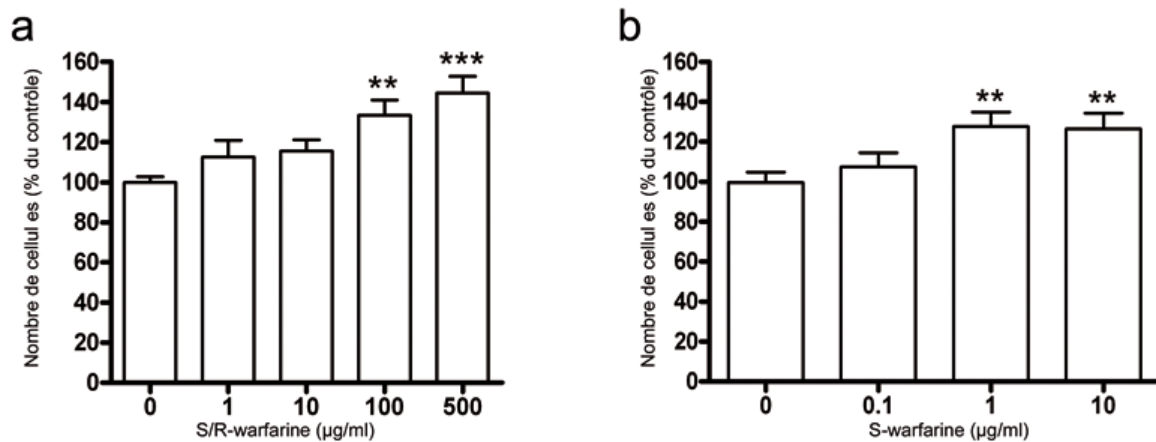


Figure 19 : L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la croissance des CSN de façon dose-dépendante. Dose-réponse des effets de la warfarine sur la croissance des cultures de SVZ maintenues pendant 5 jours dans du SFM supplémenté avec (a) de la S/R-warfarine à une concentration de 1 à 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ou (b) de la S-warfarine à une concentration de 1 à 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. ** $P < 0,05$ et *** $P < 0,001$ comparé au contrôle.

3.1.1.3 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération et n'affecte pas l'apoptose des cellules de la SVZ *in vitro*

L'inhibition de la sécrétion des PVKDs par la warfarine induit une augmentation du nombre de cellules en culture comparable à celle qui est observée en présence d'EGF (**Figure 20a**). Cette stimulation de la croissance cellulaire pourrait être due à une augmentation de la prolifération cellulaire associée ou non à une diminution de la mortalité. Afin de mesurer l'influence de l'inhibition de la sécrétion des PVKDs sur la prolifération des cultures de SVZ, ces dernières ont été mises en culture 24 heures en présence de SFM supplémenté ou pas de S-warfarine à 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Le BrdU, qui s'intègre dans l'ADN des cellules en phase S et qui marque ainsi les cellules en prolifération, est ajouté durant les 4 dernières heures du traitement. Nos résultats montrent que la warfarine induit une stimulation de la prolifération des CSN (**Figure 20b**).

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-nataux *in vitro* et *in vivo*

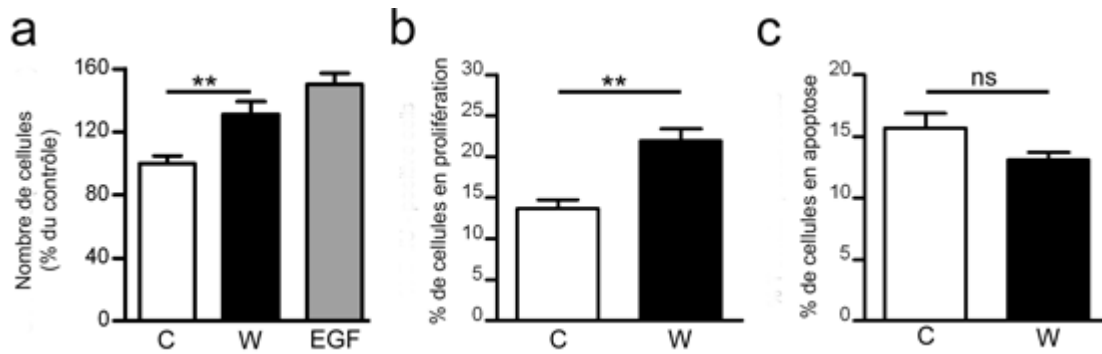


Figure 20 : L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN. (a) les cellules de la SVZ sont maintenues pendant 5 jours dans du SFM seul supplémenté de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de S-warfarine ou de $20 \text{ ng}.\text{ml}^{-1}$ d'EGF qui figure ici comme témoin positif mitogène. (b) Pourcentages de cellules ayant incorporé le BrdU ou (c) de cellules TUNEL positives, dans des cultures maintenues 24 heures dans du SFM seul ou supplémenté de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de S-warfarine. ns $P > 0,05$ et ** $P < 0,01$ comparé au contrôle.

Afin de mesurer l'effet de la warfarine sur la mort cellulaire, l'apoptose des CSN issues de la SVZ cultivées 24 heures en présence de SFM supplémenté ou pas de S-warfarine à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ est mesurée par marquage TUNEL. Au vu de nos résultats, la warfarine n'induit pas de baisse significative de la mort cellulaire (**Figure 20c**).

Dans des conditions basales, la warfarine stimule donc la prolifération des cellules souches neurales issue de la SVZ *in vitro*, ce qui suggère qu'une ou plusieurs protéines vitamine K-dépendantes inhibent la prolifération de ces cellules.

3.1.1.4 La vitamine K ainsi qu'un milieu conditionné enrichi en PVKDs réversent l'effet de la warfarine

Afin de vérifier la spécificité d'action de la warfarine sur les cellules de la SVZ, les cultures sont traitées pendant 5 jours dans du SFM seul ou supplémenté de warfarine à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et/ou de vitamine K1, un antagoniste de la warfarine, à $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. La mesure de la croissance cellulaire montre que l'ajout de vitamine K reverse l'effet pro-prolifératif de la warfarine, ce qui indique que les résultats observés sont bien spécifiques de la réaction de γ -carboxylation. La vitamine K utilisée seule n'a pas d'effet significatif (**Figure 21a**).

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-nataux *in vitro* et *in vivo*

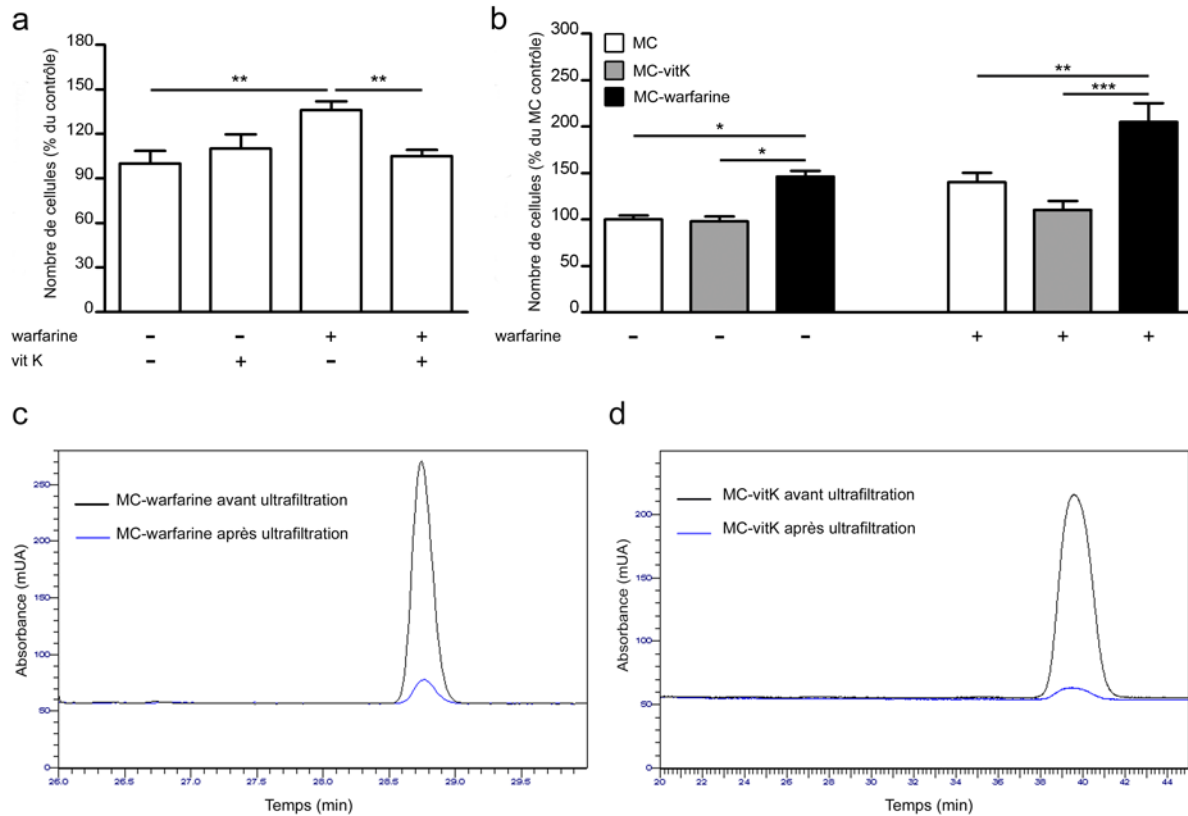


Figure 21 : La Vitamine K et le milieu conditionné riche en PVKDs réversent la stimulation de la croissance cellulaire des cellules de la SVZ induite par la warfarine. (a) Mesure de la croissance cellulaire des CSN issues de la SVZ cultivées dans du SFM seul (contrôle) ou supplémenté avec de la warfarine à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et/ou de la vitamine K1 (vit K) à $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. **(b)** Mesure de la croissance des cellules de SVZ cultivées 5 jours dans du SFM (contrôle) ou dans du SFM supplémenté avec de la warfarine à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et/ou avec du milieu conditionné provenant de cellules cultivées 5 jours avec du SFM seul (MC), de la vitamine K1 à $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (MC-vitK) ou de la warfarine à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (MC-warfarine). **(c, d)** Le milieu conditionné obtenu de cultures de SVZ maintenues pendant 5 jours en présence de warfarine à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (warfarine-MC) ou de vitamine K1 à $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (vitamine K-MC) est concentré par ultrafiltration. Un échantillon avant (ligne noire) et après (ligne bleue) filtration est analysé par HPLC pour vérifier l'élimination de la warfarine et de la vitamine K. En abscisse figure le temps d'élution et en ordonnée l'absorbance en mUA. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

De manière à prouver que les effets observés sur la réaction de γ -carboxylation sont dus à la modulation de la sécrétion des protéines vitamine K-dépendantes par la warfarine, nous avons généré des milieux conditionnés de culture de cellules de SVZ cultivées pendant 5 jours en présence de vitamine K1 ou de warfarine. Ces milieux ont été concentrés à l'aide de

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

microconcentrateurs pourvus d'une membrane filtrante qui permet de retenir les molécules de plus de 30 kDa. Cette concentration permet également d'éliminer la warfarine et la vitamine K1 des milieux conditionnés avant leur utilisation. Cette élimination a été vérifiée par HPLC (**Figure 21c et 21d**). Ces milieux enrichis ou déplétés en protéines vitamine K-dépendantes (**Figure 18c**) ont servi au traitement d'autres cultures de CSN dans du SFM seul pendant 5 jours. Nos résultats montrent qu'en absence de warfarine, le milieu conditionné provenant de cellules traitées avec de la warfarine (MC-warfarine), c'est-à-dire déplété en PVKDs stimule la croissance cellulaire, alors qu'un milieu provenant de cellules traitées avec de la vitamine K (MC-vitK), c'est-à-dire un milieu riche en PVKDs n'a pas d'effet sur cette croissance (**Figure 21b**). Nous montrons également que l'effet stimulateur de la prolifération cellulaire par la warfarine est inhibé par l'ajout d'un milieu conditionné riche en PVKDs. De plus, l'ajout d'un milieu déplété en PVKDs amplifie la croissance cellulaire observée en présence de warfarine (**Figure 21b**).

La réversion de l'effet pro-prolifératif de la warfarine sur les CSN issues de la SVZ de rats nouveau-nés par l'ajout de vitamine K1 ou de milieu riche en PVKDs suggère que l'effet observé de la warfarine est effectivement dû à la suppression de la sécrétion des protéines vitamine K-dépendantes solubles. De ce fait, les PVKDs endogènes seraient des inhibiteurs de la prolifération cellulaire.

3.1.2 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des cellules progénitrices *in vitro*

3.1.2.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs n'affecte pas l'autorenouvellement des cellules souches

Au sein des neurosphères, seules les cellules souches sont capables de générer des neurosphères *in vitro*. Chaque sphère est donc issue d'une cellule de type souche (Chiasson et al., 1999; Morshead et al., 2003; Weiss et al., 1996). Par repiquage, les sphères primaires donnent lieu à des sphères secondaires, dont le nombre est dépendant du nombre de cellules souches mises en culture, c'est-à-dire préalablement présentes dans les sphères primaires.

Afin de déterminer si les cellules de type souches sont plus nombreuses en présence de warfarine, nous avons utilisé ce test fonctionnel d'auto-renouvellement (Coles-Takabe et al., 2008). Pour cela, les cultures sont maintenues 5 jours en présence de SFM contenant 20 ng.ml⁻¹ d'EGF seul ou supplémenté de warfarine à 1 µg.ml⁻¹. Après comptage, les sphères

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

primaires sont repiquées et les cellules sont à nouveau cultivées pendant 5 jours dans du SFM contenant 20 ng.ml⁻¹ d'EGF. Ce test montre que le traitement à la warfarine n'influence ni le nombre de sphères primaires ni le nombre de sphères secondaires, ce qui signifie que la warfarine et donc l'inhibition de la sécrétion des PVKDs n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules de type souches (**Figure 22a et 22b**).

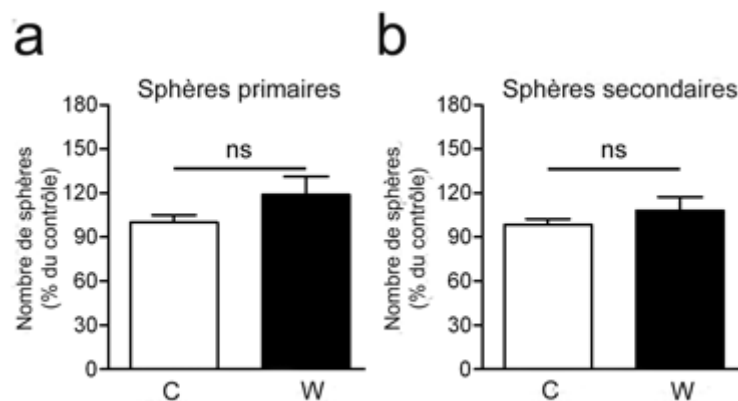


Figure 22 : La suppression de la sécrétion des PVKDs n'augmente pas le nombre de cellules de type souche. (a) Nombre de sphères primaires obtenues en présence de SFM contenant de l'EGF seul (C) ou supplémenté de S-warfarine à 1 µg.ml⁻¹ (W). **(b)** Nombre de sphères secondaires obtenues après repiquage des sphères primaires. ns, P>0,05.

3.1.2.2 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule l'émergence de cellules progénitrices des lignages neuronal et glial

Les cultures de cellules souches neurales issues de la SVZ correspondent *in vitro* à une population hétérogène de cellules constituée de cellules souches neurales immatures, de progéniteurs gliaux et neuronaux, de cellules gliales ainsi que de neurones (Doetsch, 2003). Nous avons tenté de déterminer quelle(s) population(s) cellulaire(s) est (sont) amplifiée(s) par la warfarine. Pour ce faire les cellules de la SVZ sont cultivées durant 5 jours dans du SFM seul ou supplémenté de S-warfarine à 1 µg.ml⁻¹ et des immunomarquages d'antigènes spécifiques des différents types cellulaires sont réalisés (**Partie expérimentale, Tableau V**).

Nos résultats montrent que la warfarine augmente significativement la proportion de cellules du lignage glial (cellules GFAP positives) (**Figure 23a**) et neuronal (cellules βIII-tubuline positives) (**Figure 23b**), sans affecter la proportion d'oligodendrocytes (cellules O4 positives) (**Figure 23c**). Ces résultats suggèrent donc que les protéines vitamine K-dépendantes inhibent la prolifération de cellules progénitrices de lignage neuronal et glial.

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

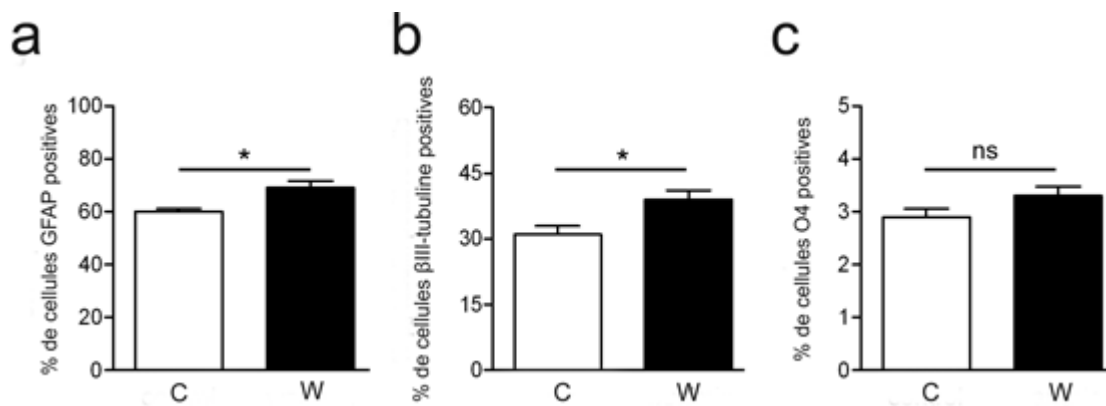


Figure 23 : La suppression de la sécrétion des PVKDs amplifie la proportion de cellules des lignages glial et neuronal dans les cultures de CSN issue de la SVZ. (a) Pourcentage de cellules GFAP (b), βIII-tubuline et (c) O4 positives obtenues après 5 jours de culture en présence de (C) SFM seul ou (W) supplémenté de S-warfarine. ns, $P > 0,05$, * $P < 0,05$.

Les résultats décrits ci-dessus montrent que l'inhibition de la sécrétion des PVKDs par la warfarine stimule la prolifération des cellules souches neurales issues de la SVZ *in vitro*, ce qui signifie qu'une ou plusieurs PVKD(s) inhibe(nt) la prolifération de ces cellules.

3.1.3 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des cellules de la SVZ *in vivo*

3.1.3.1 L'injection intracérébroventriculaire de warfarine stimule la prolifération des cellules de la SVZ *in vivo*

Dans la suite de ce travail, nous avons cherché à vérifier l'effet des PVKDs sur la prolifération des cellules de la SVZ *in vivo*. Nous avons réalisé des injections intracérébroventriculaires de 100 ng de warfarine ou de chlorure de sodium (NaCl 9%, contrôle) chez des souris adultes (**Figure 24a et b**). L'effet de la warfarine sur la prolifération cellulaire a été déterminé 72 heures après l'injection par incorporation de BrdU. L'observation des coupes montre une prolifération cellulaire localisée dans deux régions, la région 1 correspondant à la SVZ et la région 2 à la zone du striatum bordant la SVZ (**Figure 24g**). Nous montrons qu'une injection intracérébroventriculaire de warfarine induit une augmentation de 16% de la prolifération des cellules de la SVZ au niveau de l'hémisphère ipsilatéral par comparaison aux souris contrôles (Région 1, **Figure 24c-e**).

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

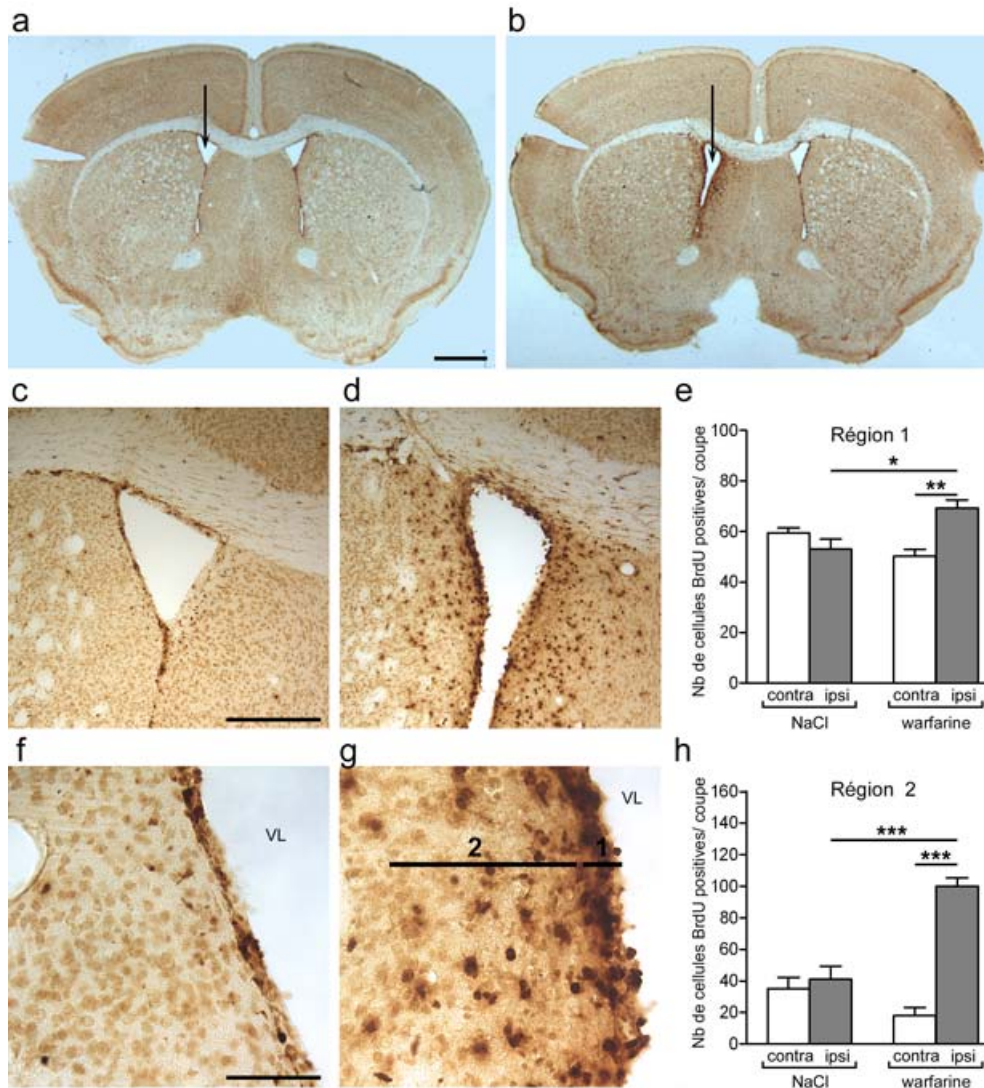


Figure 24 : La suppression de la production des PVKDs endogènes par injection intracérébroventriculaire de warfarine stimule la prolifération cellulaire au niveau et à proximité de la SVZ. (a, c, f) Immunomarquage du BrdU (en noir) sur des coupes de cerveau suite à une injection de NaCl (1 μ l ; 1,9 mg.ml⁻¹) ou **(b, d, g)** de warfarine (1 μ l; 100 mg.ml⁻¹) dans le ventricule latéral (VL) de souris (coordonnées relatives au Bregma : antérieur : +0,74 mm, latéral : 0,6 mm ; profondeur : 2,18 mm). **(a, b)** Barre d'échelle : 1 mm; **(c, d)** 500 μ m; **(f, g)** 100 μ m. **(e, h)** Quantification des cellules BrdU positives dans la SVZ (région 1) et autour de la SVZ (région 2) des hémisphères controlatéraux (contra) et ipsilatéraux (ipsi) suite à l'injection de NaCl ou de warfarine. *P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,0001.

L'injection de warfarine induit également une augmentation de la prolifération des cellules du striatum bordant la SVZ de 60% par rapport à une injection de NaCl (Région 2, **Figure 24f-h**). Nous observons que l'augmentation de la prolifération des cellules de la SVZ

3.1 L'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals *in vitro* et *in vivo*

et du striatum suite à une injection de warfarine est localisée au niveau de l'hémisphère ipsilatéral par comparaison à l'hémisphère controlatéral (**Figure 24e et h**).

Ces résultats montrent que l'inhibition de la γ -carboxylation *in vivo* stimule la prolifération des cellules dans la SVZ et dans le striatum bordant la SVZ et suggère donc l'implication d'une ou plusieurs PVKD(s) dans la régulation de la prolifération des CSN *in vivo*.

3.1.3.2 L'injection intracérébroventriculaire de warfarine stimule la gliogenèse et inhibe la neurogenèse

Afin de déterminer le phénotype des cellules en prolifération suite à l'injection intracérébroventriculaire de warfarine, nous avons réalisé sur les coupes de cerveau de souris un co-immunomarquage du BrdU et des cellules gliales (cellules GFAP positives) ou des neuroblastes (cellules Dcx positives).

Nous montrons que la warfarine augmente le nombre de cellules GFAP positives en prolifération dans la SVZ et le striatum (**Figure 25a-c**), alors qu'elle inhibe le nombre de cellules DCX positives en prolifération dans la SVZ (**Figure 25d-f**). Ces résultats suggèrent que les protéines vitamine K-dépendantes inhibent la prolifération de cellules de type glial dans la SVZ et dans le striatum.

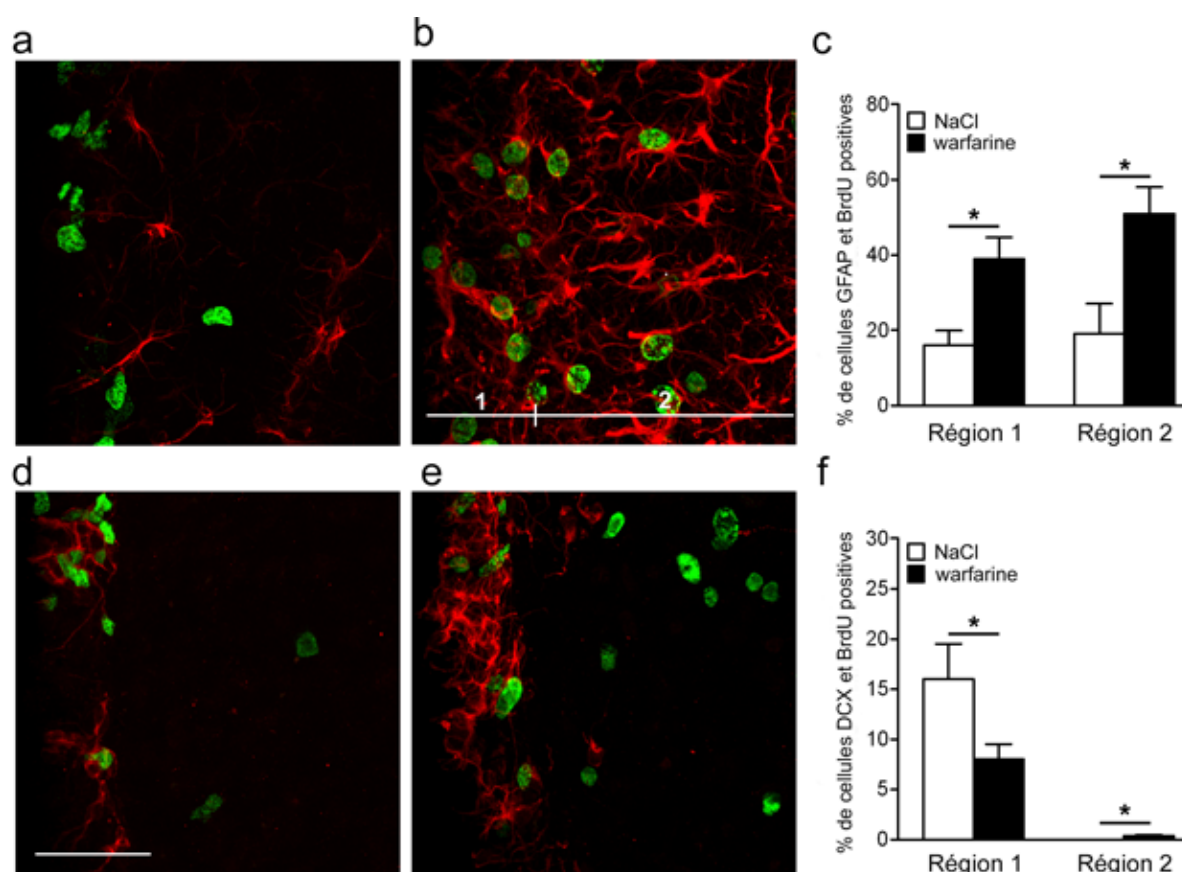


Figure 25 : L'injection intracérébroventriculaire de warfarine induit la prolifération de cellules gliales. Co-immunomarquages du BrdU (vert) et (a, b) de la GFAP (rouge) ou (d, e) de Dcx (rouge) au niveau de l'hémisphère cérébral ipsilatéral de souris injectées avec (a, d) du NaCl ou (b, e) de la warfarine. Barre d'échelle : 200 μ m. Pourcentage de la population de cellules BrdU positives immunoréactives (c) pour la GFAP et (f) pour Dcx. * $P < 0,05$.

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-nataux

Après avoir montré que l'inhibition de la sécrétion de l'ensemble des protéines vitamine K-dépendantes stimule la prolifération des cellules souches neurales de la SVZ *in vitro* et *in vivo*, nous avons cherché à mettre en évidence quelle(s) serai(en)t la ou les PVKD(s) responsable(s) de ces effets.

Dans un premier temps nous avons procédé à l'étude de l'expression des PVKDs par RT-PCR dans les CSN puis nous avons recherché par Western blot la (ou les) PVKD(s) sécrétée(s) dans le milieu conditionné de cellules issues de la SVZ de cerveaux de rats

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

nouveau-nés, ainsi que dans le milieu conditionné provenant de cultures de plexus choroïdes. Nous rechercherons également la présence de PVKDs dans le liquide céphalorachidien de souris et de brebis. Après avoir identifié la présence de certaines PVKDs dans les cultures de cellules issues de SVZ, nous avons recherché leurs effets sur la prolifération cellulaire et l'autorenouvellement des CSN.

3.2.1 La protéine Gas6 et la protéine S sont les seules PVKDs sécrétées par les cellules de la SVZ *in vitro*

La famille des protéines vitamine K-dépendantes ne comportant qu'une quinzaine de membres, nous avons décidé dans un premier temps d'analyser leur expression par les CSN par RT-PCR.

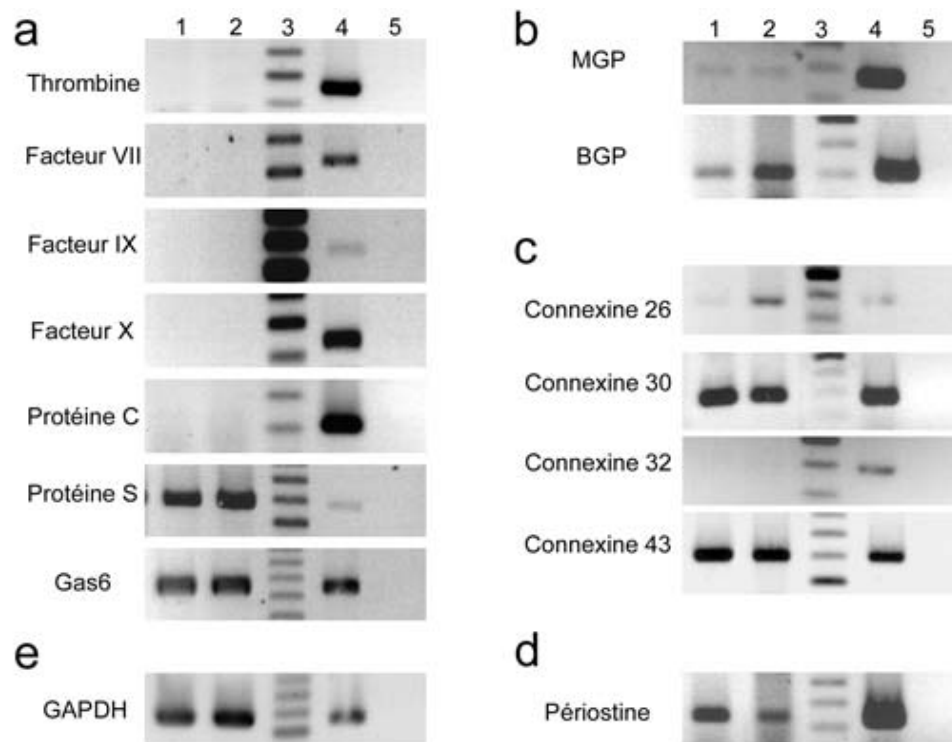


Figure 26 : Les cellules de la SVZ expriment certaines protéines vitamine K-dépendantes. Analyse par RT-PCR de l'expression **(a)** des PVKDs intervenant dans la coagulation sanguine, **(b)** des PVKDs de la matrice extracellulaire, **(c)** de connexines potentiellement γ -carboxylables et **(d)** de la périostine. **(e)** L'expression de la GAPDH est utilisée comme contrôle. Pistes 1 et 2 : ARN obtenus de deux extraits cellulaires différents de cellules de SVZ cultivées en conditions basales *in vitro* ; piste 3 : marqueurs de taille ; piste 4 : ARN obtenus de tissus servant de contrôle positif ; piste 5 : contrôle négatif.

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

Nos résultats montrent que les cellules de la SVZ expriment les ARNm de la protéine Gas6 et de la protéine S (**Figure 26a**), de la MGP et de la BGP (**Figure 26b**), de certaines connexines (**Figure 26c**) ainsi que de la périostine (**Figure 26d**). Comme attendu, les CSN n'expriment aucune PVKD impliquées dans la cascade de coagulation (**Figure 26a**). L'expression des PVKD transmembranaires et de la protéine Z n'ont pas été recherchées car leurs séquences ne sont actuellement pas clonées chez le rat.

Nous avons recherché dans des milieux conditionnés par les CSN le profil d'expression de l'ensemble des PVKD sécrétées par Western blot en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre les résidus d'acide γ -carboxyglutamique.

Notre expérience révèle que les cellules de la SVZ produisent une ou des PVKD(s) d'un poids moléculaire apparent de 80 kDa (**Figure 18b**). Deux PVKD ont un poids moléculaire proche de 80 kDa : la protéine Gas6 et la protéine S. Nous avons alors recherché la présence par Western blot de ces deux protéines dans le milieu conditionné par les cellules souches en utilisant des anticorps spécifiquement dirigés contre ces protéines. Pour cela les milieux conditionnés ont été précipités au citrate de baryum. Nos résultats montrent que ces deux protéines sont sécrétées par les CSN en conditions basales (**Figure 27a et b**). Lorsque les cellules sont traitées avec de la vitamine K1, nous observons une augmentation de la sécrétion de la protéine Gas6 dans les milieux conditionnés (MC) par rapport aux conditions contrôles ainsi qu'une diminution de sa concentration dans les lysats cellulaires (LC) (**Figure 27c**). A l'inverse lorsque les cellules sont traitées avec de la warfarine, la protéine Gas6 s'accumule au niveau intracellulaire et sa sécrétion diminue (**Figure 27c**). Nous n'avons pas pu reproduire cette expérience avec la protéine S, cette dernière étant faiblement sécrétée en conditions basales. Effet le milieu conditionné a été concentré 100 fois après précipitation au citrate de baryum pour permettre sa détection. De plus, par double-immunomarquage, nous montrons que la protéine Gas6 et la protéine S sont exprimées par les cellules de type glial (cellules GFAP positives), de type neuronal (cellules β III-tubulines positives) et par des cellules immatures (cellules Nestine positives) (**Figure 27d**).

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-nataux

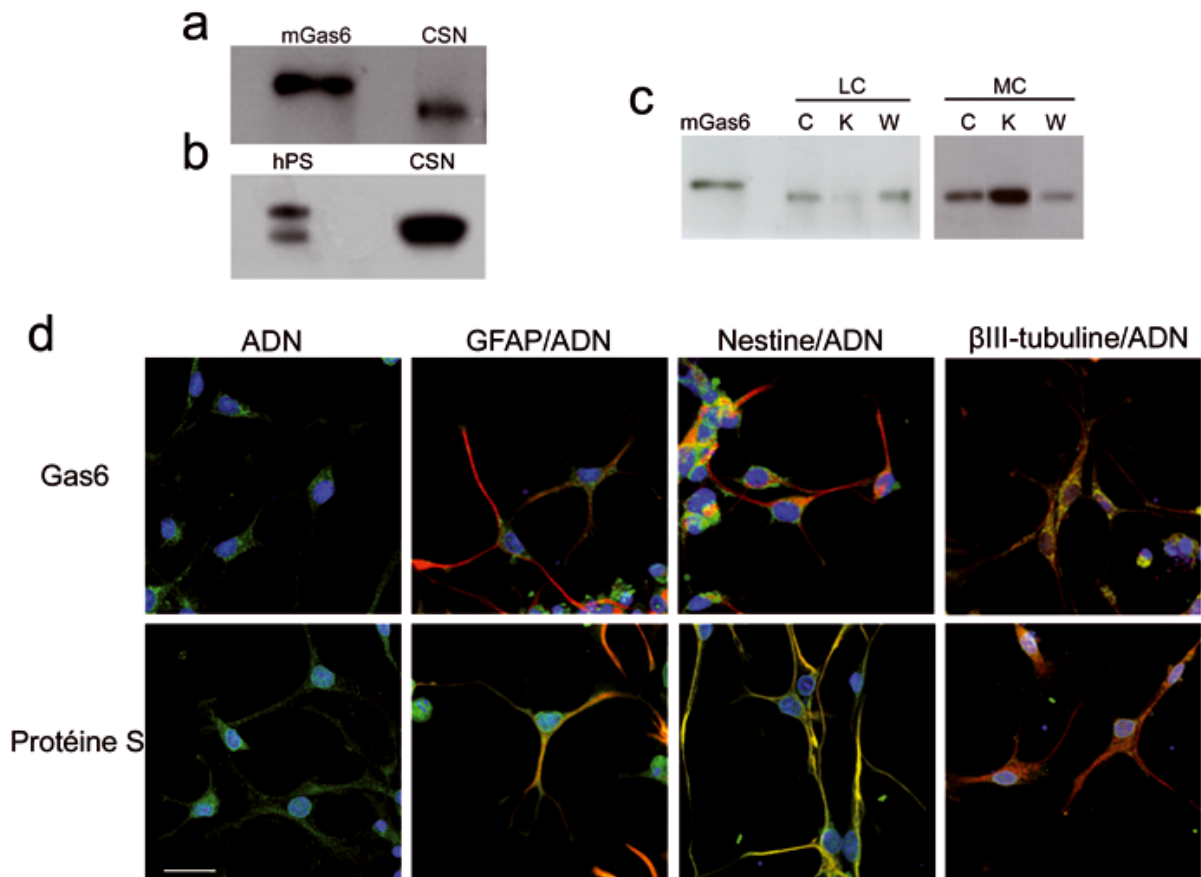


Figure 27 : La protéine Gas6 et la protéine S sont exprimées *in vitro* par les cellules de la SVZ. Détection par Western blot **(a)** de la protéine Gas6 et **(b)** de la protéine S sécrétées dans le milieu conditionné. De la protéine Gas6 murine purifiée (mGas6) ainsi que de la protéine S humaine (hPS) sont utilisées comme témoin positif. **(c)** Expression de la protéine Gas6 dans des lysats cellulaires (LC) ou dans des milieux conditionnés (MC) de cellules traitées pendant 5 jours dans du SFM seul (C) ou supplémenté de warfarine (W) à $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ou de vitamine K1 (K) à $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. **(d)** Immunodétection de la protéine Gas6 ou de la protéine S (en vert) ainsi que de la GFAP, de la Nestine ou de la β III-tubuline (en rouge) dans les CSN. Les noyaux sont marqués par du Topro-3 (en bleu). Barre d'échelle : $25 \mu\text{m}$.

Nos résultats montrent que les CSN issues de la SVZ de rats nouveau-nés ne sécrètent que deux PVKDs *in vitro*, la protéine Gas6 et la protéine S. C'est pourquoi, la suite de notre étude ne concernera que l'effet de ces deux protéines sur la régulation cellulaire des CSN.

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-nataux

3.2.2 La protéine Gas6 et la protéine S sont exprimées *in vivo* par les cellules de la SVZ

Nous avons alors recherché l'expression de la protéine Gas6 *in vivo* par immunocytochimie sur des coupes de cerveaux provenant de souris sauvages (Gas6^{+/+}) ou de souris dont le gène codant pour la protéine Gas6 a été invalidé (Gas6^{-/-}) comme contrôle (**Figure 28a**). Ces immunocytochimies montrent que la protéine Gas6 est présente *in vivo* dans la SVZ (**Figure 28b**, flèches).

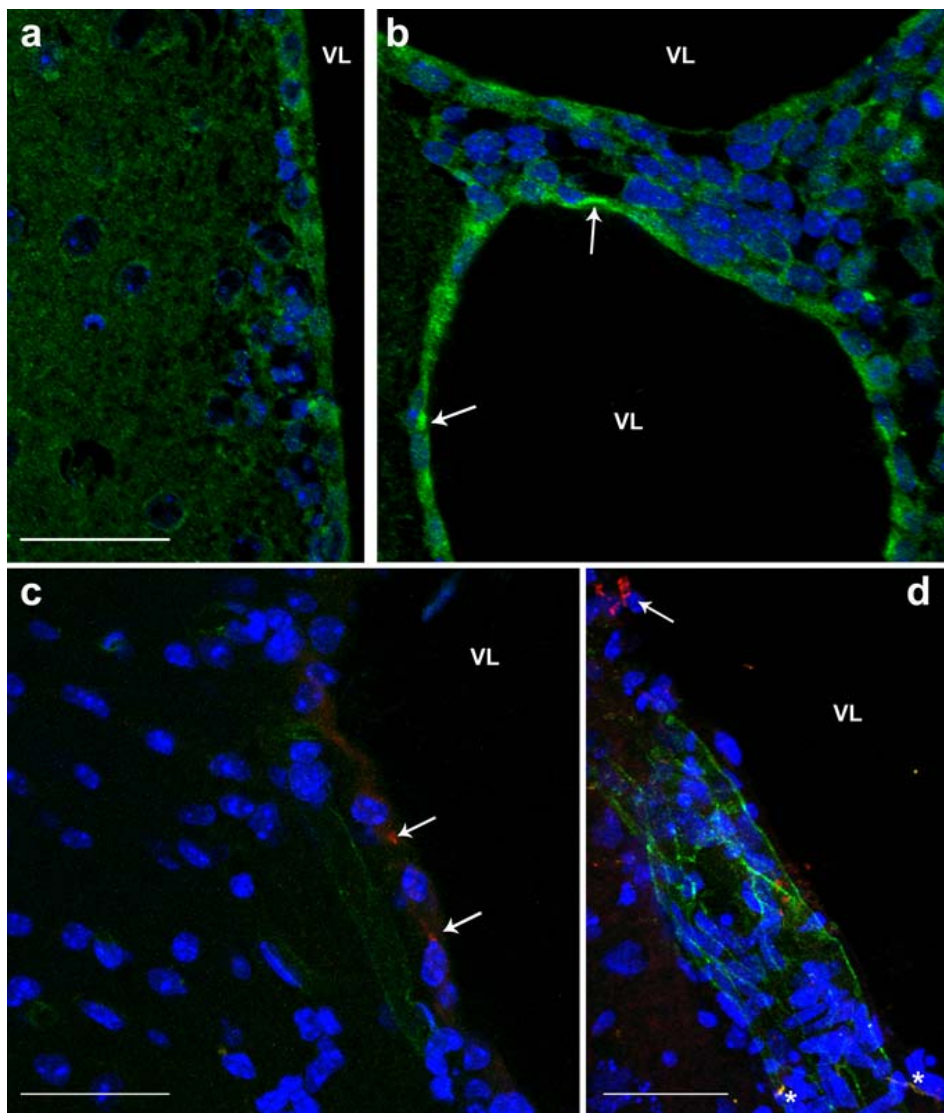


Figure 28 : Expression de la protéine Gas6 et de la protéine S dans la SVZ *in vivo*. Immunodétection (**a**, **b**) de la protéine Gas6 (en vert) et (**c**, **d**) co-immunomarquage de la protéine S (en rouge) et de CD31 (en vert) sur des coupes de cerveaux provenant de souris (**a**) Gas6^{-/-} ou (**b-d**) Gas6^{+/+}. Les noyaux sont marqués en bleu par du Dapi. VL : ventricule latéral. Barre d'échelle : (**a-c**) 30 μ m, (**d**) 40 μ m.

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

Nous avons alors recherché la présence de protéine S dans les cellules de la SVZ ainsi dans les vaisseaux sanguins localisés dans cette région, la concentration plasmatique de la protéine S étant relativement élevée (150 nM environ chez l'Homme). Pour cela, nous avons réalisé un double immunomarquage contre la protéine S et la protéine CD31 qui est un marqueur des cellules endothéliales (Vecchi et al., 1994). Nos résultats montrent que la protéine S est exprimée *in vivo* dans des cellules de la SVZ (**Figure 28c et d, flèches**) mais également dans des vaisseaux sanguins localisés dans la SVZ (**Figure 28d, étoiles**). L'expression de la protéine S est beaucoup plus restreinte que celle de la protéine Gas6.

La protéine S et la protéine Gas6 sont donc deux PVKDs exprimées *in vivo* par les cellules de la SVZ de souris adultes.

3.2.3 La protéine Gas6 est produite par des cultures de plexus choroïdes *in vitro* et est présente dans le LCR des rongeurs

La SVZ est une zone bordant les ventricules latéraux qui contiennent le LCR (liquide céphalo-rachidien) produit par les plexus choroïdes (Doetsch, 2003; Redzic and Segal, 2004). Sachant que la majorité des protéines γ -carboxylées sont des protéines sécrétées, qu'il existe des échanges entre le fluide interstitiel du tissu cérébral et le LCR (Kimmelberg, 2004) et que les cellules de la SVZ sont au contact du LCR (Doetsch et al., 1997), nous nous sommes posés la question de la présence de(s) PVKD(s) dans ce fluide (Redzic and Segal, 2004). Pour répondre à cette question, nous avons prélevé quelques microlitres de LCR à l'aide d'une seringue Hamilton chez des souris C57Bl/6J sauvages. Nos résultats montrent que la protéine Gas6 est présente dans le LCR de souris, ce qui n'est pas le cas de la protéine S (**Figure 29a**).

Afin de travailler sur des quantités plus importantes de LCR nous avons réalisé la même série d'expérience sur du LCR de brebis dans lequel l'anti-Gla révèle une bande d'un poids moléculaire apparent de 80 kDa pouvant correspondre à la protéine Gas6 et/ou à la protéine S. La présence de ces deux PVKDs est confirmée par l'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces protéines (**Figure 29b**).

Afin de déterminer l'origine de la protéine Gas6 dans le LCR de souris, nous avons étudié la présence des PVKD(s) dans le milieu conditionné par du plexus choroïde. Ces petites structures très vascularisées, présentes à l'intérieur des ventricules latéraux, produisent la majorité des protéines contenues dans le LCR (Redzic and Segal, 2004). Par Western blot,

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

nous détectons la présence d'une ou plusieurs PVKD(s) grâce à l'anti-Gla, de la protéine Gas6 mais pas de protéine S dans le milieu conditionné par du plexus choroïde de rats nouveau-nés (**Figure 29c**). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des cultures de plexus choroïdes de souris adulte (résultats non montrés). Ceci suggère que la protéine Gas6 pourrait être sécrétée dans le LCR par les plexus choroïdes. Chez la souris, la protéine S n'est pas produite par les plexus choroïdes, ce qui pourrait expliquer qu'on ne la retrouve pas dans le LCR.

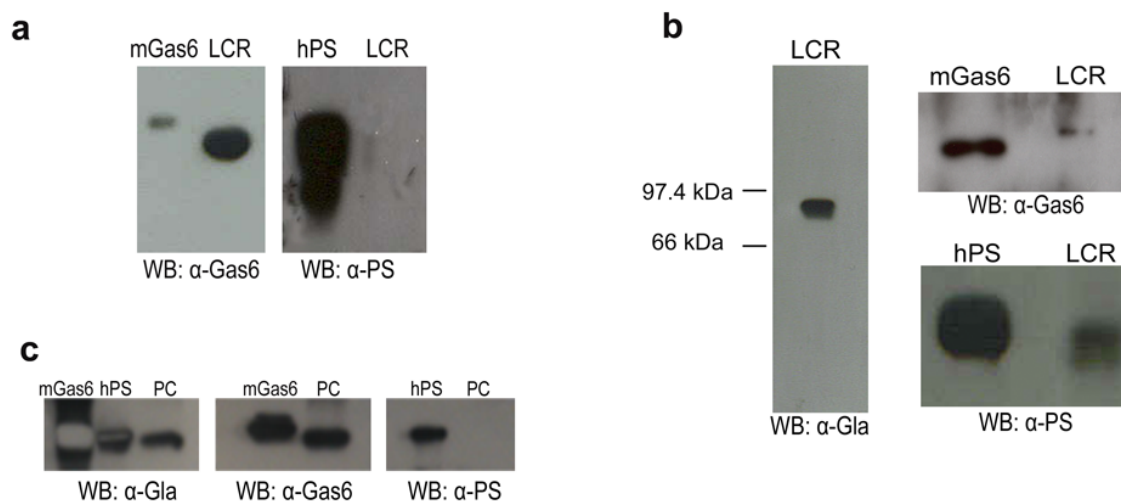


Figure 29 : Expression de la protéine Gas6 et de la protéine S dans le LCR *in vivo* et dans des cultures de plexus choroïdes *in vitro*. Détection par Western blot des PVKDs (WB: α-Gla), de la protéine Gas6 (WB : α-Gas-6) et de la protéine S (WB : α-PS) dans (a) du LCR de souris adultes, (b) du LCR de brebis ou (c) du milieu conditionné par des plexus choroïdes (PC) de rat nouveau-nés. De la protéine Gas6 murine purifiée (mGas6) ainsi que de la protéine S humaine (hPS) sont utilisées comme témoin positif.

Nos résultats suggèrent que la protéine Gas6 est sécrétée par les plexus choroïdes dans le LCR chez la souris, alors que dans nos conditions expérimentales, nous n'y détectons pas de protéine S. De plus, nos résultats montrent que la protéine Gas6 et la protéine S sont sécrétées dans le LCR de brebis.

3.2.4 Expression et activation des récepteurs TAM dans les CSN

La protéine Gas6 et la protéine S ont la particularité, contrairement aux autres membres de la famille à laquelle elles appartiennent, de se lier et d'activer des récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM pour lesquels elles sont les seuls ligands connus.

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-nataux

L'activation de ces récepteurs intervient dans divers processus cellulaires dont la prolifération cellulaire et la survie. Dans un premier temps, nous avons recherché la présence de ces récepteurs dans les CSN issues de la SVZ.

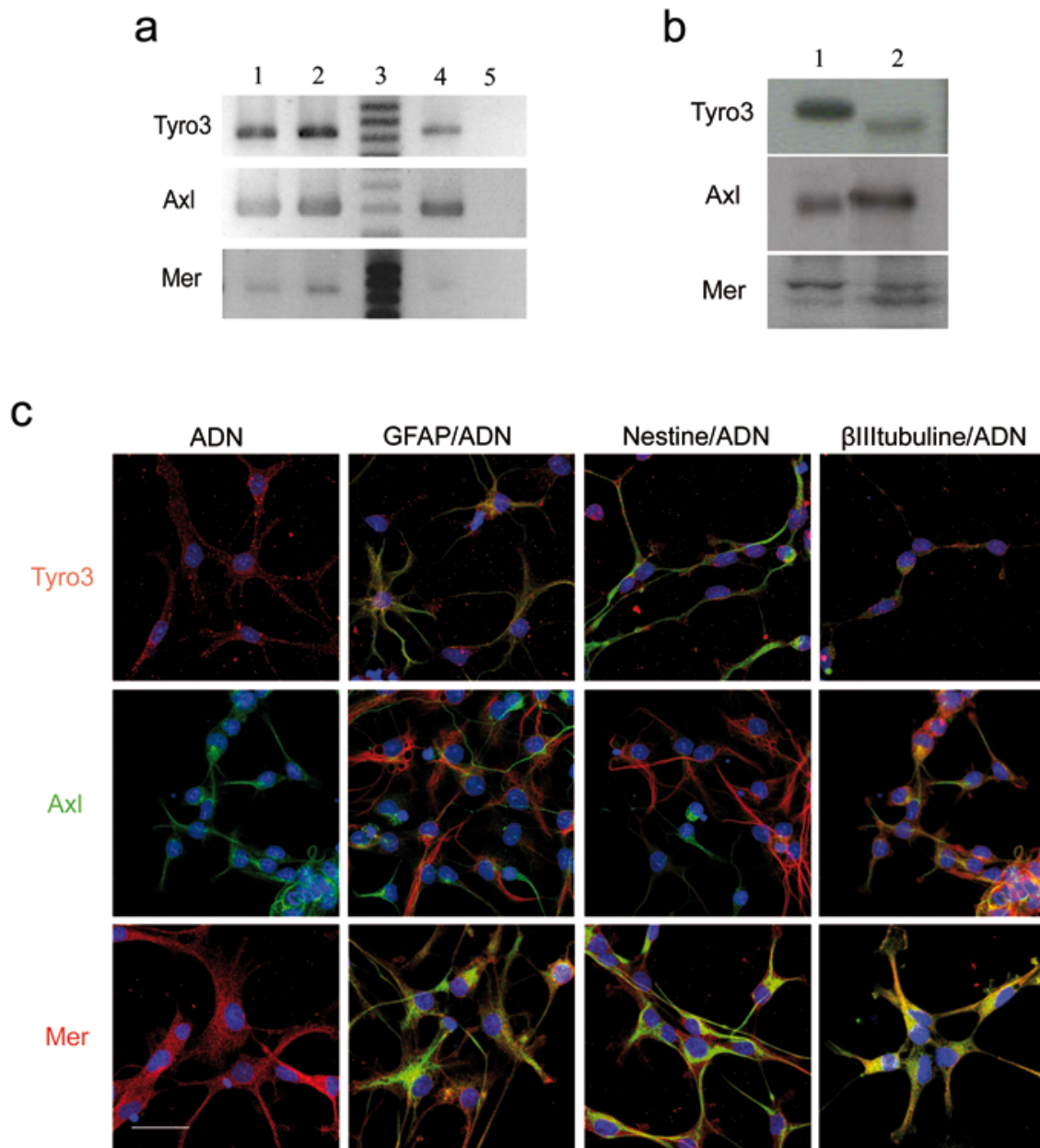


Figure 30 : Les cellules de la SVZ expriment les récepteurs de la famille TAM. (a) Analyse par RT-PCR de l'expression des récepteurs TAM par les cellules de SVZ cultivées en conditions basales *in vitro* (pistes 1 et 2) et par les testicules qui servent de contrôle positif (piste 4). La piste 3 correspond aux marqueurs de taille et la piste 5 au contrôle négatif. **(b)** Détection des récepteurs TAM par Western blot (piste 2), un extrait protéique de testicule est utilisé comme contrôle positif (piste 1). **(c)** Détection par immunocytochimie des récepteurs Tyro3 (en rouge), Mer (en rouge) et Axl (en vert) ainsi que de la GFAP, de la Nestine ou de la βIII tubuline (en vert pour les co-marquages avec les récepteurs Tyro3 et Mer et en rouge pour

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

le co-marquage avec le récepteur Axl). Les noyaux sont marqués par du Topro-3 (en bleu).
Barre d'échelle : 25 μ m.

Nos résultats de RT-PCR et de Western blot montrent que les trois récepteurs de la famille TAM sont exprimés par les cellules de la SVZ *in vitro* (**Figure 30a et b**). Par immunocytochimie, nous montrons que les cellules de type glial, de type neuronal et les cellules immatures expriment les récepteurs Mer et Tyro3. Le récepteur Axl est exprimé par les cellules de type neuronal, dans certaines cellules gliales et rarement par les cellules immatures (**Figure 30c**).

L'immunomarquage sur les cellules de la SVZ révèle également la présence d'Axl au niveau du fuseau mitotique, de ses pôles (**Figure 31a**) ainsi qu'au point de cytodièrese (**Figure 31b**). Ces observations ont été faites dans des cellules gliales (GFAP positives), des cellules du lignage neuronal (β III-tubuline positives) mais aussi dans des cellules immatures (Nestine positives). La protéine Axl est un récepteur tyrosine kinase localisé normalement à la membrane plasmique. Cette localisation aberrante devra faire l'objet d'études ultérieures.

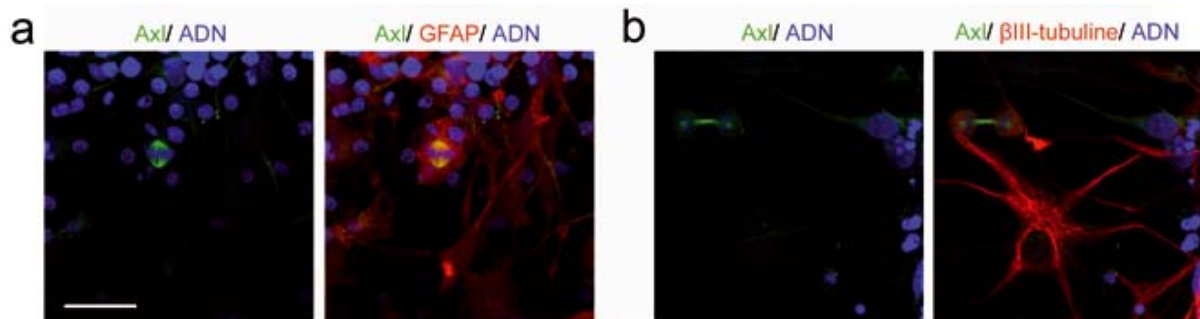


Figure 31 : Localisation atypique du récepteur Axl dans les CSN. Détection par immunocytochimie du récepteur Axl (en vert) ainsi que de la GFAP ou de la β III-tubuline (en rouge) au niveau **(a)** du fuseau mitotique et **(b)** au point de cytodièrese. Les noyaux sont marqués par du Topro-3 (en bleu). Barre d'échelle : 25 μ m.

Dans un second temps, nous avons vérifié l'activation potentielle des récepteurs TAM par leur ligand. Pour cela les cellules de la SVZ ont été traitées avec la protéine Gas6 ou la protéine S à 140 nM pendant 10 minutes (**Figure 32**). Nous observons une activation par phosphorylation du récepteur Tyro3 en présence de la protéine S seule ou supplémentée de la protéine Gas6 par rapport aux conditions contrôles. La protéine Gas6 active le récepteur Axl, cette activation est inhibée en présence de la protéine S (**Figure 32**). Dans nos conditions expérimentales, l'activation du récepteur Mer n'a pas été observée.

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

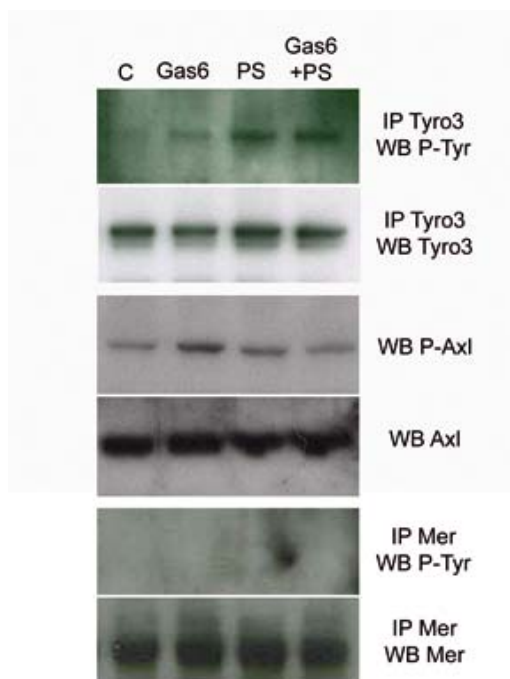


Figure 32 : Activation des récepteurs TAM par la protéine Gas6 et la protéine S. Détection de la phosphorylation des récepteurs Tyro3 et Mer par immunoprécipitation (IP) et Western blot (WB) phospho-tyrosine, et de la phosphorylation du récepteur Axl par Western blot par rapport aux récepteurs totaux suite au maintien des cellules 10 minutes dans du SFM seul (C), ou supplémenté de la protéine Gas6 et/ou de la protéine S (PS).

Les cellules souches neurales issues de la SVZ de rats nouveau-nés expriment donc les trois récepteurs TAM. Dans nos conditions expérimentales, la protéine Gas6 active le récepteur Axl, et la protéine S active le récepteur Tyro3 et inhibe l'activation du récepteur Axl induite par la protéine Gas6.

3.2.5 La protéine S inhibe la croissance des cellules de la SVZ et reverse l'effet stimulateur de la warfarine *in vitro*

La prolifération des cellules souches neurales issues de la zone sous-ventriculaire pouvant être régulée de manière autocrine et paracrine par les PVKDs, nous avons étudié l'effet d'un apport exogène en protéine Gas6 et en protéine S sur la croissance de ces cellules. Le traitement de cellules issues de SVZ *in vitro* par la protéine S induit une baisse significative d'environ 20% du nombre de cellules en culture alors que la protéine Gas6 n'a pas d'effet (**Figure 33 a et b**). De plus, la protéine S reverse l'effet stimulateur de la warfarine sur la croissance des cellules (**Figure 33c**). La protéine S a donc un effet inhibiteur sur la

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

croissance des cellules souches, ce qui est en accord avec les effets de la warfarine précédemment décrits.

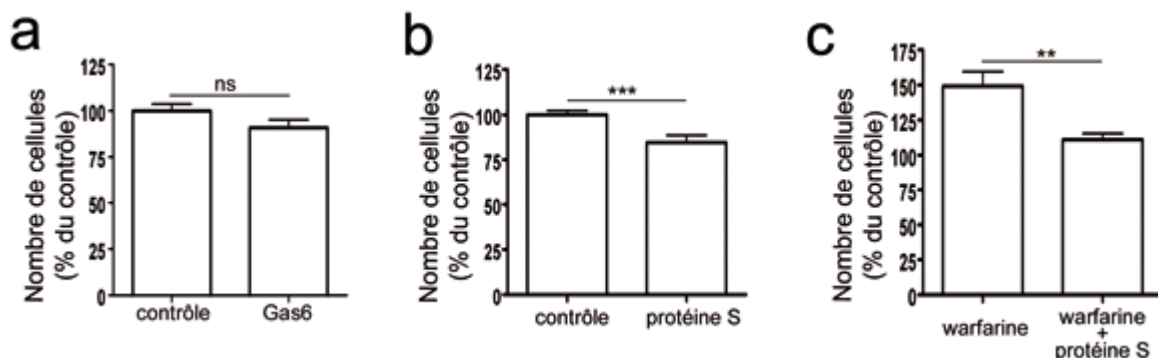


Figure 33 : La protéine S inhibe la croissance des cellules de la SVZ. Les cellules de la SVZ sont maintenues pendant 5 jours dans du SFM seul ou du SFM supplémenté avec (a) de la protéine Gas6, (b) de la protéine S et (c) de la protéine S et de la S-warfarine à 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. ns, $P>0,05$; ***, $P<0,001$ comparé au contrôle.

Nos résultats suggèrent donc que la protéine S induit une baisse de la croissance des cellules de la SVZ et que l'inhibition de sa sécrétion pouvait être responsable des effets mitogènes de la warfarine.

3.2.6 La protéine Gas6 stimule l'autorenouvellement des cellules de la SVZ *in vitro*

Beaucoup d'études démontrent la capacité de la protéine Gas6 à promouvoir la survie ou la prolifération cellulaire (Melaragno et al., 2004; Sainaghi et al., 2005). Compte tenu de l'absence d'effet apparent de l'apport exogène de la protéine Gas6 sur des cellules de la SVZ, nous avons alors poursuivi notre étude en réalisant des cultures de cellules chez les souris invalidées pour le gène codant pour cette protéine ($\text{Gas6}^{-/-}$) en comparaison avec des souris sauvages ($\text{Gas6}^{+/+}$).

Des cultures de cellules souches issues de la SVZ de souris $\text{Gas6}^{-/-}$ et $\text{Gas6}^{+/+}$ de souris nouveau-nées ont été mises en culture dans du SFM supplémenté de 20 $\text{ng}.\text{ml}^{-1}$ d'EGF. Après 5 jours de culture les cellules et les sphères primaires sont comptées, et les cellules sont repiquées afin de compter les sphères secondaires. Nous observons une baisse du nombre de sphères primaires et secondaires en absence de protéine Gas6 par rapport aux souris sauvages,

3.2 Implication du facteur anticoagulant, protéine S, et de son homologue structural Gas6 dans la croissance des cultures de CSN issues de la SVZ du cerveau de rongeurs post-natals

alors que le nombre de cellules reste inchangé (**Figure 34 a et b**). Ceci indique que la protéine Gas6 stimule la prolifération des cellules souches.

Afin de déterminer un éventuel effet de la protéine S sur la croissance des cellules de type souche, un test d'autorenouvellement a également été réalisé en présence de 140 nM de protéine S. Ce test montre que la protéine S n'influence ni le nombre de sphères primaires, ni le nombre de sphères secondaires (**Figure 34 c**), ce qui signifie qu'elle n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules de type souche.

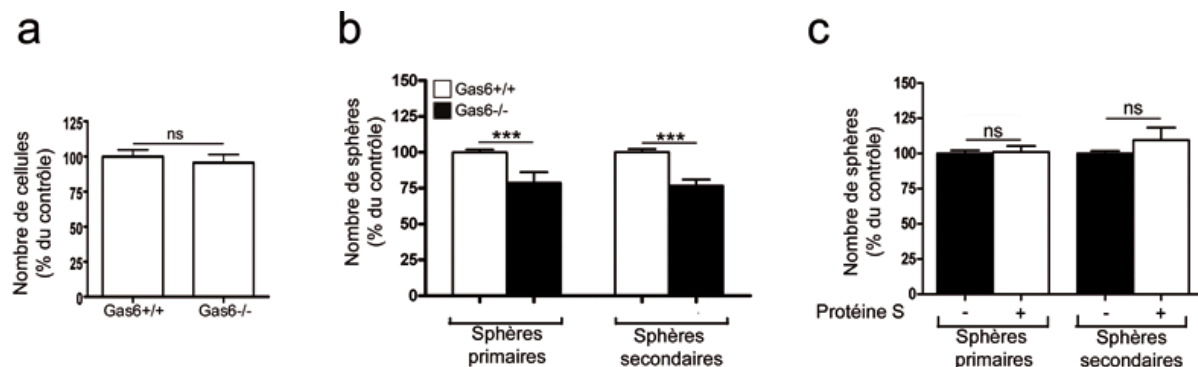


Figure 34 : La protéine Gas6 stimule la prolifération des cellules de type souche *in vitro*.

(a) Nombre de CSN de la SVZ issues de souris *Gas6*^{-/-} et *Gas6*^{+/+} obtenues après 5 jours de culture dans du SFM supplémenté de 20 ng.ml⁻¹ d'EGF et (b) nombre de sphères primaires et de sphères secondaires obtenues après leur repiquage. (c) Nombre de sphères primaires obtenues après 5 jours de culture dans du SFM supplémenté de 20 ng.ml⁻¹ d'EGF en absence ou en présence de protéine S à 140 nM et nombre de sphères secondaires obtenues après leur repiquage. ns, P>0,05; ***, P<0,001 comparé au contrôle.

Ces résultats montrent que la protéine Gas6, contrairement à la protéine S, stimule la prolifération des cellules de type souche *in vitro*.

3.2.7 La protéine Gas6 stimule la prolifération des cellules de type souche *in vivo*

Afin d'examiner l'effet de la protéine Gas6 sur la prolifération des cellules de type souche de la SVZ *in vivo*, des souris *Gas6*^{-/-} et *Gas6*^{+/+} ont reçu des injections intrapéritonéales de BrdU tous les jours pendant 5 jours afin de marquer l'ensemble des cellules en prolifération de la SVZ. Les animaux sont sacrifiés 24 jours après ces injections, moment où seules les cellules à prolifération lente, telles que les cellules souches, sont encore marquées

dans la SVZ par le BrdU. Cette expérience révèle une baisse significative de 16% par rapport aux souris sauvages du nombre de cellules en prolifération dans la SVZ chez les souris déficientes en protéine Gas6 (**Figure 35**).

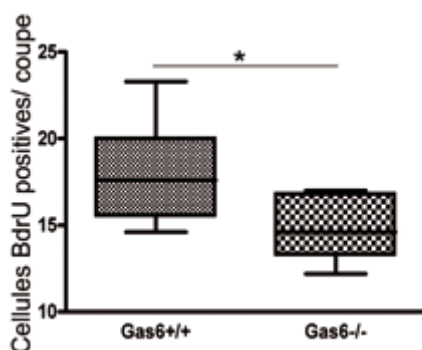


Figure 35 : La protéine Gas6 stimule la prolifération des cellules de type souche *in vivo*. Quantification des cellules BrdU positives dans la SVZ du cerveau de souris Gas6^{+/+} ou Gas6^{-/-}.

Ce résultat montre que la protéine Gas6 stimule la prolifération des cellules de type souche de la SVZ *in vivo*.

3.3 Discussion

Les PVKDs inhibent la prolifération des CSN

Dans la première partie de mon travail, j'ai mis en œuvre des approches expérimentales multiples afin de mettre en évidence l'implication des protéines vitamine-K dépendantes dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules souches neurales de la SVZ du cerveau de rongeur.

Nos travaux montrent que l'inhibition de la sécrétion des PVKDs stimule la prolifération des cellules souches neurales issues de la SVZ à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les PVKDs ont donc un rôle inhibiteur sur la croissance de ces cellules, un milieu enrichi en PVKDs contrebalançant l'effet stimulateur de la warfarine. La γ -carboxylase est exprimée dans le neuroépithélium pendant le développement et son expression persiste à l'âge adulte (Romero et al., 1998). Notre étude montre que cette enzyme est exprimée, tout comme la caluménine et la VKOR, par les cultures de SVZ. Ceci suggère que les PVKDs synthétisées

localement peuvent être γ -carboxylées et agir de façon autocrine et paracrine sur les cellules de la SVZ qui dérivent du neuroépithélium embryonnaire.

Nos travaux utilisant la warfarine montrent que les PVKDs n'ont pas d'effet sur l'autorenouvellement des cellules, c'est-à-dire sur la croissance des cellules de type souche, mais inhibent la croissance des cellules progénitrices de lignage neuronal *in vitro* et neuronal et glial *in vivo*. Ces différences observées entre les données *in vitro* et *in vivo* peuvent être expliquées par l'influence du micro-environnement sur les cellules de la SVZ *in vivo*. La SVZ contient notamment un réseau vasculaire riche (Palmer et al., 2000; Shen et al., 2008) connu pour libérer des facteurs solubles capables d'influencer l'autorenouvellement ainsi que la différenciation des cellules de la SVZ (Shen et al., 2004).

L'inhibition de la sécrétion des PVKDs *in vivo* stimule la prolifération des cellules de la SVZ mais aussi des cellules localisées au niveau du striatum en bordure de la SVZ. Ces cellules pourraient provenir de cellules de la SVZ qui migreraient vers le striatum, comme cela a été observé dans le cas d'injection intracérébroventriculaire d'EGF (Doetsch et al., 2002). Toutefois, les cellules présentes dans le striatum sont majoritairement des cellules gliales et n'expriment pas de marqueur de neuroblastes en migration (Gleeson et al., 1999). D'autres investigations seront nécessaires pour déterminer l'origine des cellules BrdU positives dans le striatum.

Des travaux récents suggèrent qu'une dérégulation de la prolifération, de la différenciation et de la migration des cellules souches neurales du cerveau est responsable du développement de gliomes (Gil-Perotin et al., 2006; Sanai et al., 2005; Wang et al., 2009). En effet, dans un modèle murin de gliome astrocytaire, l'accumulation d'une forme mutante de p53 est détectée en premier lieu dans les CSN de la SVZ (Gil-Perotin et al., 2006; Wang et al., 2009). De même, des cellules souches neurales transformées avec l'oncogène K-ras génèrent des cellules tumorales infiltrantes aboutissant à la formation de tumeurs localisées dans la région de l'amygdale, de l'hippocampe et du cortex avoisinant (Abel et al., 2009).

Nos résultats montrent que l'effet inhibiteur de la protéine S sur la croissance des CSN serait médié par le récepteur Tyro3 et que la protéine S empêcherait également l'activation du récepteur Axl par la protéine Gas6. Dans les conditions physiologiques, la protéine S semble donc être un régulateur négatif de la prolifération cellulaire des CSN. En situations pathologiques, une surexpression des récepteurs TAM et de la protéine Gas6 est observée dans les gliomes (Hutterer et al., 2008; Staflin et al., 2009). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que, dans ces conditions pathologiques, si la quantité de protéine S exprimée

n'augmente pas parallèlement à quantité de protéine Gas6 et de récepteur Axl, la protéine S ne puisse plus assumer son rôle d'inhibiteur de la prolifération cellulaire. De ce fait, il serait intéressant de mesurer l'expression de la protéine S dans les gliomes en comparaison avec les conditions physiologiques et d'évaluer l'effet d'un apport de protéine S sur la prolifération de ces cellules *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, la protéine S sécrétée par les CSN et par les cellules endothéliales (Benzakour and Kanthou, 2000) est une candidate potentielle pour limiter l'expansion tumorale. En effet, une étude montre que les CSN sécrètent des facteurs qui inhibent la prolifération des cellules de gliomes (Suzuki et al., 2005) et dont la masse est comprise entre 50 et 100 kDa. La protéine S, dont la masse est de 69 kDa, pourrait être un de ces facteurs.

Le rôle des récepteurs TAM dans la tumorigenèse a été étudié *in vitro* sur ces tumeurs cérébrales. Ainsi, la transfection de cellules de gliome avec un dominant négatif pour Axl induit une diminution de leur prolifération ainsi que de leur potentiel invasif (Vajkoczy et al., 2006). Compte tenu de nos travaux montrant un rôle de la protéine Gas6 sur la capacité d'autorenouvellement des CSN et de la relation entre les CSN et les gliomes, il pourrait être intéressant d'évaluer les effets de la signalisation Gas6/Axl sur l'autorenouvellement des cellules souches tumorales, probablement dérivées des CSN.

La protéine Gas6 et la protéine S sont sécrétées par les cellules de la SVZ et présentes dans le LCR

L'expression de la protéine S et de son homologue structural Gas6 ont précédemment été décrites au sein du SNC. Prieto et collaborateurs ont démontré que l'ARNm de ces deux protéines était, entre autres, présent au niveau des plexus choroïdes (Prieto et al., 2000; Prieto et al., 1999). Notre étude montre que la protéine S et la protéine Gas6 sont les seules PVKDs sécrétées par les cellules de la SVZ qui expriment également les récepteurs TAM.

Chez la souris, seule la protéine Gas6, sécrétée par les plexus choroïdes, est retrouvée dans le LCR, alors que la protéine S, tout comme la protéine Gas6, sont retrouvées dans le LCR de brebis. Cette différence inter-espèce pourrait être la conséquence d'une faible concentration de protéine S dans le LCR de souris. Pour évaluer cette hypothèse, il serait important d'utiliser des moyens de détection protéique plus sensibles que le Western blot tel qu'un dosage ELISA.

La protéine S, tout comme la protéine Gas6, sont également des protéines produites par les cellules endothéliales (Fair et al., 1986; Ganopolsky et al., 2008). Comme le montre

nos résultats, la protéine S est présente dans des vaisseaux sanguins dans la SVZ et pourrait alors agir de façon endocrine sur les cellules de la SVZ *in vivo*.

Des études récentes suggèrent que les CSN pourraient contribuer au développement de gliome. Nos résultats montrent que la protéine Gas6 et la protéine S contrôle la prolifération et la différenciation des CSN. Une dérégulation de ces mécanismes de contrôle pourrait donc participer à la survenue de tumeur cérébrale.

La protéine Gas6 et la protéine S : frères jumeaux ou frères ennemis

Notre étude montre pour la première fois des effets distincts des homologues structuraux la protéine S et de la protéine Gas6 sur un modèle d'étude commun, les cellules souches neurales de la SVZ. La protéine Gas6 stimule la prolifération des cellules de types souches *in vitro* et *in vivo* et la protéine S inhibe la prolifération des CSN *in vitro*. L'effet de ces deux PVKDs est médié par deux récepteurs tyrosine kinase distincts, le récepteur Axl et le récepteur Tyro3. La voie de signalisation Gas6/Axl est donc une voie stimulatrice alors que la voie de signalisation protéine S/Tyro3 est une voie inhibitrice de la prolifération des CSN. Beaucoup d'études ont été réalisées sur l'effet cellulaire des protéines S et Gas6 via leurs récepteurs TAM. Ces protéines ont parfois des effets identiques, elles stimulent particulièrement la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR (Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006b) et l'activité des ostéoclastes (Katagiri et al., 2001; Nakamura et al., 1998b) ou des effets propres, ainsi la protéine Gas6 stimule par exemple la migration cellulaire (Fridell et al., 1998) et la croissance tumorale (Holland et al., 2005). Il s'avère que la protéine Gas6 stimule la prolifération de certains types cellulaires tels que celle des cellules de carcinomes prostatiques ou des fibroblastes cardiaques (Sainaghi et al., 2005; Stenhoff et al., 2004). La protéine S a été démontré comme stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses humaines (Benzakour and Kanthou, 2000) mais également comme inhibant la prolifération des astrocytes de rat après lésion (Tomobe et al., 1996).

La protéine S et la protéine Gas6 ont une homologie structurale de 43% et exercent leurs effets via les récepteurs tyrosine kinase TAM. L'expression des protéines S et Gas6 ainsi que de leurs récepteurs varient au cours du développement et sont différentes selon l'organe ou le type cellulaire considéré. De plus, l'affinité de ces deux ligands pour leurs récepteurs est très différente et varie notamment en fonction de l'espèce (Pour revue (Hafizi and Dahlback, 2006a; Hafizi and Dahlback, 2006b)). Ce modèle d'étude comportant deux ligands de structure semblable pour trois récepteurs reste donc d'une grande complexité. La

signalisation Gas6/protéine S/récepteurs TAM peut alors être complémentaire, redondante ou, dans notre cas, antagoniste. Pour la suite de cette étude, il serait important de procéder à un dosage ELISA des protéines S et Gas6 dans le milieu conditionné par les cellules souches neurales *in vitro*, d'étudier de façon plus approfondie l'affinité des ces protéines pour leurs récepteurs et de déterminer la contribution physiologique respective de ces deux facteurs à la prolifération et la différenciation des CSN en poursuivant notamment nos travaux chez les souris Gas6^{-/-}.

Effets secondaires de la warfarine et cellules souches

Alors que la warfarine est ici utilisée comme inhibiteur de l'activation des PVKDs, cette molécule ainsi que ses dérivés sont couramment utilisés de façon aigue ou chronique pour prévenir l'apparition ou traiter des désordres thromboemboliques, la dose journalière variant de 1 à 10 mg. Une étude montre que cette molécule induit de sévères anomalies telles qu'une hydroencéphalie, une absence de formation du corps calleux ou encore une dilatation des ventricule cérébraux au sein du SNC chez l'embryon humain dont la mère est sous traitement anti-thrombotique (Chan et al., 2003; Kaplan, 1985; Pati and Helmbrecht, 1994). Ces anomalies pourraient être une conséquence directe ou indirecte de l'effet de la warfarine sur la prolifération des cellules de la SVZ. Les PVKDs ayant notamment un rôle primordial dans la physiologie du SNC (Chan et al., 2003; Kaplan, 1985; Li et al., 1996; Liu et al., 2003; Pati and Helmbrecht, 1994), de la rétine (Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006a), des testicules (Lu et al., 1999) ou de l'os (Ducy et al., 1996; Luo et al., 1997), et les cellules souches ayant la capacité de produire de nouveaux neurones tout au long de la vie de l'individu, il serait intéressant chez les patients traités à la warfarine de mener des études épidémiologiques allant au delà de la simple mesure de paramètres touchant la coagulation du sang. Dans ce contexte des mesures de paramètres physiologiques concernant la dégénérescence neuronale, la dégénérescence rétinienne, la spermatogenèse ou encore la minéralisation osseuse, seraient importantes.

Une localisation atypique du récepteur Axl est observée dans les cultures de SVZ

Le récepteur Axl est un récepteur tyrosine kinase localisé à la membrane plasmique. Ce récepteur peut être retrouvé sous forme soluble suite à un clivage protéolytique qui libère le domaine extracellulaire. Cette forme soluble a été retrouvée dans le plasma humain et murin (Budagian et al., 2005; Costa et al., 1996; O'Bryan et al., 1995). Un épissage alternatif

de l'ARNm d'Axl peut également aboutir à la production d'une forme soluble (O'Bryan et al., 1995).

Lors de diverses expériences d'immunomarquages d'Axl sur les cellules de la SVZ, nous l'avons détecté, de façon surprenante mais reproductible, au niveau du fuseau mitotique, aux pôles de ce dernier ainsi qu'au point de cytotéière entre deux cellules filles. Cette localisation d'Axl, typique de protéines ayant un rôle dans la ségrégation des chromosomes (Leon et al., 2006) n'a pour le moment jamais été décrite. Néanmoins une étude montre que la partie intracellulaire d'Axl est capable d'interagir avec la protéine RanBPM via son domaine intracellulaire (Hafizi et al., 2005). La protéine RanBPM (Ran Binding Protein in Microtubule organising center) est une protéine interagissant avec les petites GTPase de la famille Ran localisée à la fois dans le cytoplasme et au niveau des nucléoles (Nakamura et al., 1998a). La protéine RanBPM est également retrouvée à la membrane plasmique grâce à son interaction avec d'autres protéines (Bai et al., 2003; Denti et al., 2004). Axl pourrait être présent aux pôles du fuseau mitotique grâce à son interaction avec RanBPM ou encore interagir avec les microtubules lors de la mitose. Lors de nos expériences, nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la partie N-terminale d'Axl, il est donc probable que l'on détecte une forme soluble de la protéine. Il serait alors intéressant de déterminer dans un premier temps si cette localisation est observée dans d'autres types cellulaires mais également la capacité d'Axl à interagir directement ou indirectement avec les microtubules lors de la mitose et si oui, sous quelle forme. Il serait également important d'entreprendre une série d'expériences nous permettant d'examiner un quelconque rôle d'Axl lors de la mitose, rôle ne pouvant qu'être limité ou redondant. En effet, les souris dont le gène codant pour la protéine Axl a été invalidées sont viables et ne présentent pas de défauts anatomiques majeurs (Lu et al., 1999).

Une partie de ce travail est en révision pour publication dans le journal Nature Neuroscience (Annexe 2). Aurore Gely*, Valérie Coronas*, Laetitia Prestoz, Jean Marc Berjeaud, Arnaud Monvoisin, Anaïs Noblanc, Pablo García de Frutos, Michel Philippe and Omar Benzakour.

A constitutive vitamin K-dependent mechanism inhibits subventricular zone neural stem cell proliferation.

3.4 Capacité des cellules souches neurales à phagocyter : implication de la protéine S

Il est admis que la phagocytose est un mécanisme important pour le développement et l'intégrité du SNC. La microglie est le phagocyte prédominant du SNC (Pour revue (Mallat et al., 2005; Neumann et al., 2009)), des études montrent également que les oligodendrocytes ainsi que les neurones ont la capacité de phagocyter (Bowen et al., 2007; Pender and Rist, 2001).

Les récepteurs TAM ainsi que leurs ligands sont impliqués dans la phagocytose (Hall et al., 2005; Seitz et al., 2007; Xiong et al., 2008). En effet, les souris dont les gènes pour les récepteurs TAM ont été invalidés présentent des anomalies phénotypiques dont le dénominateur commun est un déficit de la phagocytose (**Tableau II**). La protéine Gas6 tout comme la protéine S sont qualifiées d'opsonines c'est-à-dire qu'elles créent un pont protéique entre un phagocyte et une entité à phagocyter (Wu et al., 2005; Wu et al., 2006). Dans cette partie du travail, nous avons cherché le potentiel et les mécanismes moléculaires de phagocytose des cellules issues de la SVZ.

Dans un premier temps, en nous appuyant expérimentalement sur les travaux de Bowen et collaborateurs, qui ont mis en évidence la capacité de certaines populations de neurones à phagocyter (Bowen et al., 2007), nous avons mis au point un test de phagocytose en utilisant des billes de latex chargées négativement de 1 μm de diamètre conjuguées à un fluorochrome (FITC). La taille de 1 μm a été choisie car le mécanisme d'internalisation est qualifié de phagocytose lorsque la taille de l'élément à ingérer est supérieur à 0,5 μm (Bowen et al., 2007). De plus, ces billes sont chargées négativement à leur surface afin de reproduire l'état des membranes plasmiques d'une cellule à phagocyter. Enfin, la fluorescence de ces billes a deux avantages : dans un premier temps, elle nous permettra de les visualiser directement en microscopie confocale et de suivre ainsi leur internalisation et dans un second temps, elle nous permettra de quantifier cette internalisation par cytométrie en flux.

3.4.1 Les cultures de cellules issues de la SVZ sont capables de phagocytose *in vitro*

Afin de vérifier la capacité des cellules souches neurales issues de la SVZ de rats nouveau-nés à phagocyter, ces cellules ont été incubées avec les billes de latex fluorescentes dans du SFM seul. Cette première expérience montre que, dans les conditions basales, des billes de latex se retrouvent à l'intérieur des cellules (**Figure 36a**). L'analyse par microscopie confocale de la localisation de ces billes montre qu'elles sont localisées entre le cytosquelette d'actine et le noyau de la cellule considérée (à l'intersection des lignes horizontales et verticales) (**Figure 36b**). Le nombre de billes phagocytées par cellule varie approximativement de 0 à 10 en fonction des cellules observées.

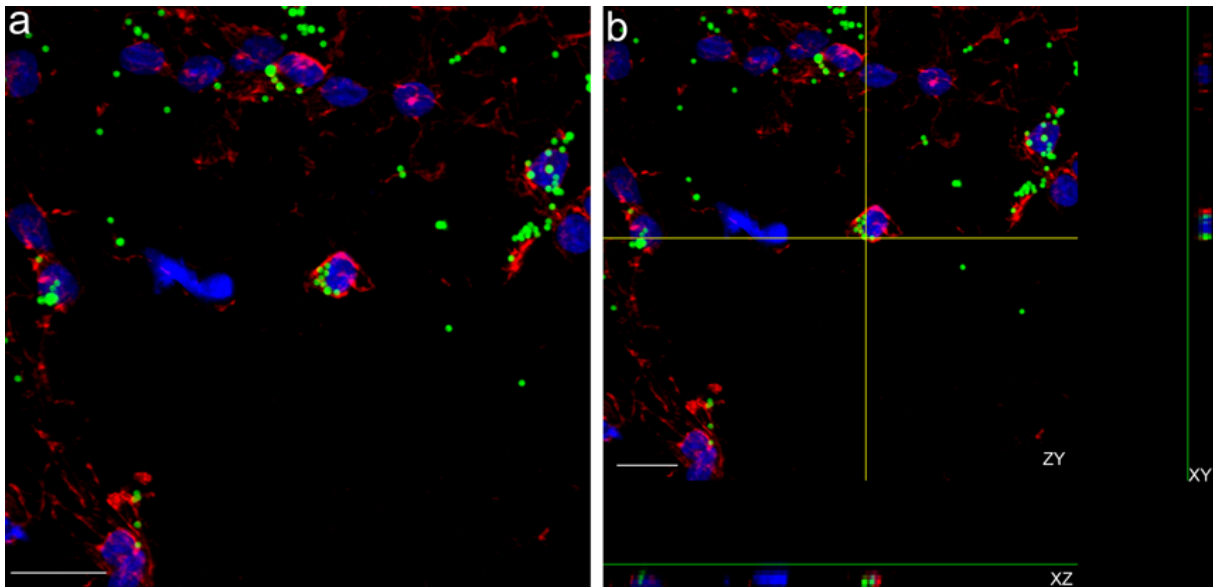


Figure 36 : Les CSN phagocytent des billes de latex *in vitro*. (a, b) Détection de l'actine (en rouge), des noyaux (en bleu) et des billes de latex (en vert). (b) Illustration d'une bille de latex phagocytée à l'intersection des lignes verticales et horizontales dans les plans ZY, XZ et XY. Barre d'échelle : 20 μ m.

La présence des billes de latex de 1 μ m de diamètre dans les CSN montre pour la première fois que des cellules au sein de la culture de cellules de SVZ de rats nouveau-nés sont capables de phagocytose.

Dans la suite de ce travail, nous avons cherché à démontrer quel(s) type(s) de cellule(s) phagocyte(nt) et plus particulièrement si les cellules de type souche sont capables

de phagocyter. Pour cela, nous avons incubé des cultures primaires de CSN avec des billes de latex pendant 4 heures dans du SFM seul. Après dissociation, les cellules ont été réensemencées jusqu'à l'obtention de sphères secondaires. Nous avons ensuite marqué les phospholipides membranaires des cellules vivantes à l'aide d'une sonde fluorescente nommée FM4-64 afin de visualiser la membrane plasmique et ainsi la présence des billes à l'intérieur des cellules.

La détection de billes de latex à l'intérieur des sphères secondaires signifie qu'elles ont été préalablement phagocytées par des cellules présentes dans les sphères primaires et capables de s'autorenouveler, c'est-à-dire des cellules de type souche. Nos résultats mettent en évidence la présence de billes de latex fluorescentes à l'intérieur de cellules contenues dans des sphères secondaires dans le plan ZY (**Figure 37a et b**) ainsi que dans le plan XZ (**Figure 37c**), ce qui suggère qu'elles ont été phagocytées par des cellules de type souche.

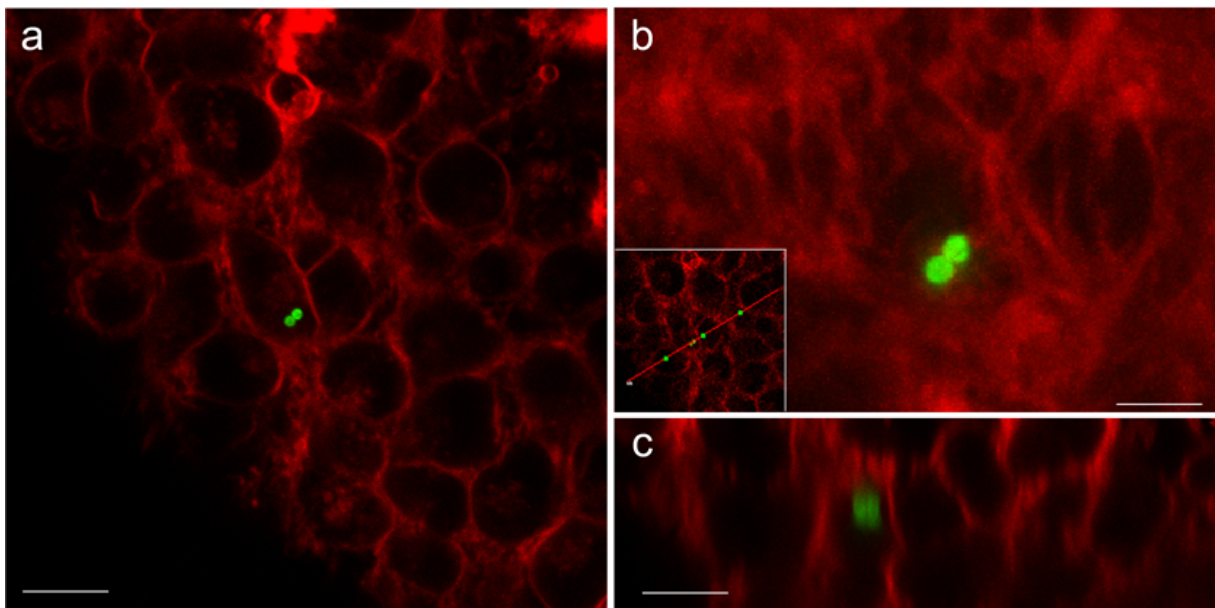


Figure 37 : Les cellules de type souche de la SVZ sont capables de phagocytose. Détection des membranes plasmiques (en rouge) par la sonde FM4-64 ainsi que de deux billes de latex (en vert) dans les plans (**a,b**) ZY et (**c**) XZ. L'illustration en **b** est un grossissement de l'image **a**. Le plan de coupe de l'image **c** figure dans l'encadré en **b**. Barre d'échelle : **a**, 10 μm ; **b** et **c**, 8 μm .

Des immunomarquages réalisés sur des cultures primaires de SVZ suite à une incubation d'une heure avec les billes de latex dans du SFM confirment qu'elles sont phagocytées par des cellules immatures (nestine positives) et montrent qu'elles sont

également phagocytées par des cellules gliales (GFAP positives) ainsi que des neurones (MAP2 positifs) (**Figure 38**).

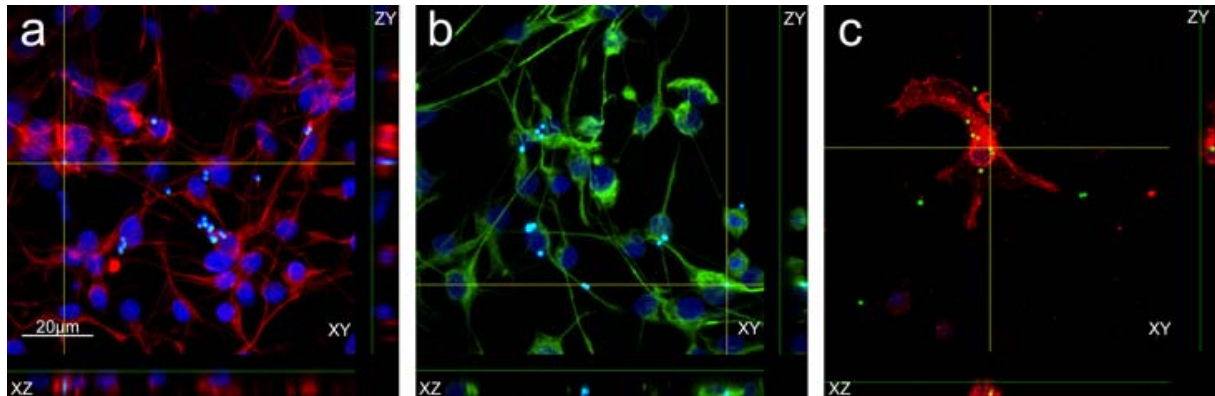


Figure 38 : Les cellules immatures, les cellules gliales ainsi que les neurones présents dans les cultures de cellules de SVZ phagocytent les billes de latex. (a-c), Phagocytose de billes de latex (**a,b**, en bleu clair ; **c**, en vert) par les cellules issues de SVZ de rats nouveau-nés. (**a**) Marquage des cellules immatures (nestine, en rouge), (**b**) des cellules gliales (GFAP, en vert) et (**c**) des neurones (MAP2, en rouge) dans les plans XY, ZY et XZ. Les noyaux sont révélés en bleu par du Dapi. Barre d'échelle : 20 µm.

Ces résultats montrent que des CSN issues de la SVZ de rats nouveau-nés phagocytent des billes de latex *in vitro*. Cette phagocytose est assurée par des cellules de type souche, des cellules gliales et des neurones matures.

3.4.2 La protéine S stimule la phagocytose de billes de latex par les cellules de la SVZ

L'ensemble de ces données indique que les cellules de la SVZ, et notamment les cellules de type souche, ont la capacité de phagocyter. Nous avons alors cherché à mettre en évidence le rôle de la protéine Gas6 et de la protéine S dans ce processus. Pour cela, les billes de latex fluorescentes ont été préincubées une heure avec de la protéine Gas6 ou de la protéine S, puis elles ont été incubées avec les cellules de la SVZ dans du milieu seul ou supplémenté de protéine Gas6 ou de protéine S. L'incubation a duré une heure.

Les images obtenues en microscopie confocale suggèrent que la quantité de billes internalisées par cellule augmente en présence de protéine S par rapport à une condition contrôle, ce qui ne semble pas être le cas en présence de protéine Gas6 (**Figure 39**).

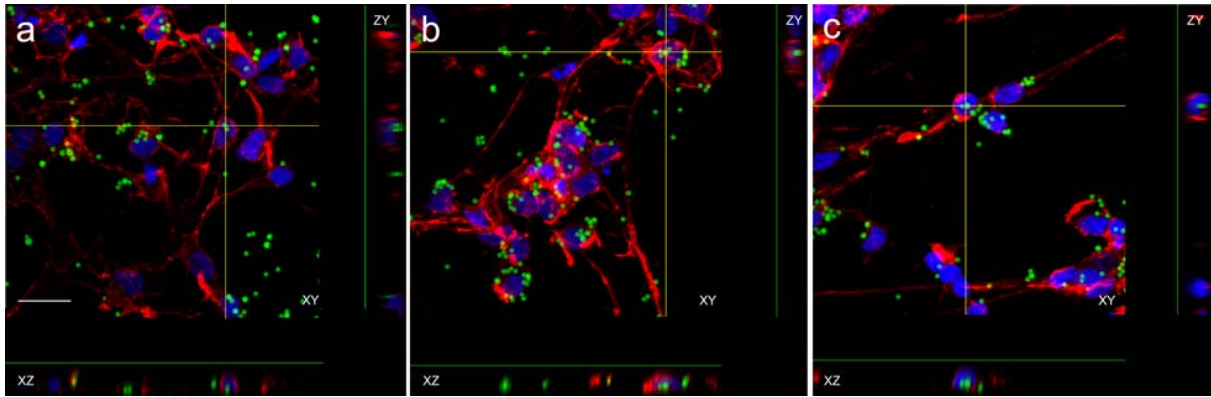


Figure 39 : La protéine S favorise la phagocytose de billes de latex par les cultures de SVZ *in vitro*. Marquage du cytosquelette d'actine (en rouge) et des billes de latex (en vert) dans les cellules de SVZ de rats nouveau-nés **(a)** dans des conditions contrôles, **(b)** en présence de la protéine S et **(c)** en présence de la protéine Gas6 visualisées dans les plans XY, XZ et ZY. Les billes de latex phagocytées se trouvent à l'intersection des lignes verticales et horizontales. Les noyaux sont révélés par du TOPRO-3 (en bleu). Barre d'échelle : 20 μ m.

L'observation en microscopie confocale nous permet de visualiser l'internalisation de billes de latex fluorescentes mais ne nous permet pas de la quantifier. Nous avons donc décidé de quantifier ce processus par cytométrie en flux. La limite de cette technique réside dans le fait que l'appareil ne différencie pas la fluorescence accrochée aux cellules de celle y étant internalisée. Afin de remédier à ce problème nous avons eu recours à une méthode d'extinction de la fluorescence en utilisant du bleu trypan. Ce colorant, exclu des cellules vivantes, va éteindre la fluorescence avec laquelle il est en contact, c'est-à-dire la fluorescence présente à l'extérieur de la cellule (Lehmann et al., 2000). Seule la fluorescence « internalisée » due à la phagocytose des billes sera alors détectée.

Afin de vérifier la capacité des cellules de SVZ à phagocyter, les cellules sont incubées 1 heure avec des billes de latex couplées au FITC puis analysées par cytométrie en flux.

Dans des conditions basales, cette technique nous a permis de voir que les cultures de SVZ sont très hétérogènes en termes de taille et de granularité (**Figure 40a**, population P1). Il semble néanmoins qu'elles soient composées de deux sous-populations majeures, à savoir, une population P2 de faible taille et granularité (en vert) et d'une population P3 (en bleu) de faible granularité mais de taille plus importante (**Figure 40a**).

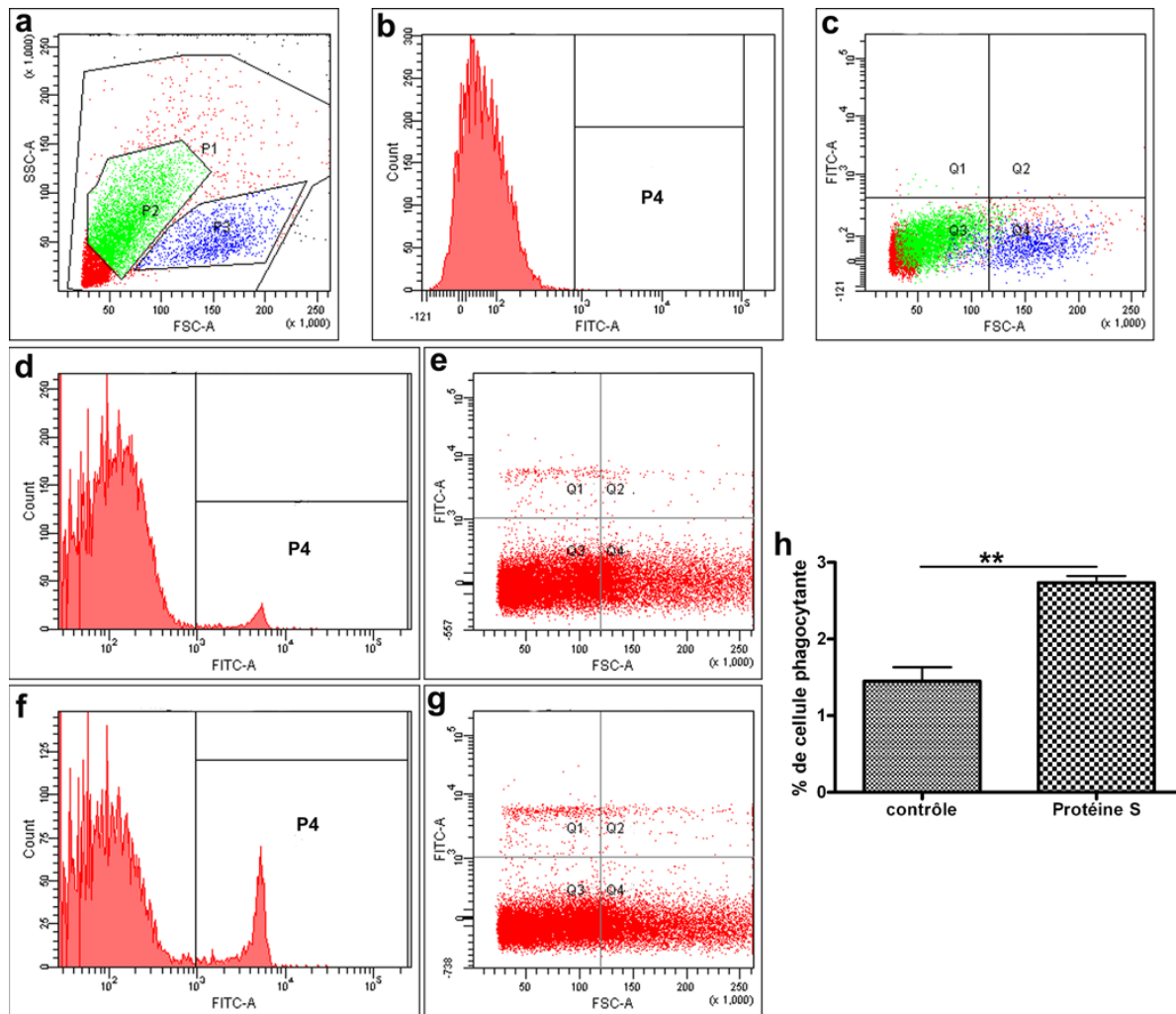


Figure 40 : **Analyse par cytométrie en flux de la phagocytose des billes de latex par des cellules de la SVZ.** (a) Analyse par cytométrie en flux de la taille (FSC pour Forward scatter) et de la granularité (SSC pour Side scatter) des cellules de la SVZ en conditions basales. Analyse par cytométrie en flux des CSN (b-c) en absence ou (d-g) en présence de billes de latex. (b, d, f) Représentation graphique de la quantité de cellules en fonction de la quantité de fluorescence phagocytée. Les cellules ayant incorporées de la fluorescence se trouvent dans la fenêtre P4. (c, e, g) Représentation de la quantité de fluorescence phagocytée (fenêtre Q1 et Q2) ou non (fenêtre Q3 et Q4) en fonction de la taille des cellules. (d-e) Analyse par cytométrie en flux de la capacité des CSN à phagocyter dans des conditions contrôles ou (f-g) en présence de la protéine S. (h) Pourcentage de cellules de la SVZ ayant phagocyté en absence ou en présence de la protéine S. n=2 ; **P<0,01.

Une étude sur les neurosphères issues de la SVZ *in vitro* ne met en évidence que la population P2 présentée ici (Bez et al., 2003). Cette différence provient vraisemblablement de l'état de différenciation des cellules, cette équipe ayant fait ces expériences sur des

neurosphères flottantes peu différenciées alors que nous les avons faites sur des neurosphères adhérentes dont l'état de différenciation semble plus avancé.

Lorsque les CSN ne sont pas incubées avec les billes de latex couplées au FITC, aucune fluorescence n'est détectée dans les fenêtres P4, Q1 et Q2 (**Figure 40b et c**). Suite à l'incubation des cellules pendant 1 heure avec les billes, on observe un pic dans la fenêtre P4 (**Figure 40d**) ainsi que des signaux dans les fenêtres Q1 et Q2 (**Figure 40 e**). Ceci signifie qu'une sous-population de cellules, qui correspond ici à 1,2% de la population totale, est capable de phagocyter des billes de latex. D'après la figure 40e, il semble que la majorité des cellules qui phagocytent soient de petite taille (cellules présentes dans la fenêtre Q1), elles pourraient correspondre à la population P2 précédemment décrite.

Dans des conditions contrôle les CSN ont phagocytées des billes de latex fluorescentes. En présence de la protéine S à 140 nM, le pourcentage de cellules ayant phagocyté double (**Figure 40f et g**). Là encore, nous remarquons que les cellules qui phagocytent sont majoritairement des cellules de petite taille (**Figure 40**) cellules présentes dans la fenêtre Q1). L'analyse statistique réalisée sur deux séries d'expériences en triplicates montre que la protéine S stimule de façon significative la phagocytose des billes de latex par les CSN (**Figure 40h**).

L'ensemble de ces données confirme que les cellules souches neurales issues de la SVZ de rats nouveau-nés sont capables de phagocyter et montre que la protéine S stimule significativement ce mécanisme.

3.4.3 Discussion

Les cellules souches dérivées de la SVZ : phagocytes du système nerveux central ?

Les résultats précédemment décrits montrent que les cellules de la SVZ sont capables de phagocyter des billes de latex de 1 μm de diamètre. Cette phagocytose est observée dans des cellules gliales, des neurones matures, ainsi que des cellules immatures dérivées de la SVZ. De plus, la phagocytose par les cellules de type souche a été vérifiée par un test d'autorenouvellement, les billes phagocytées au sein d'une culture primaire se retrouvant dans les neurosphères secondaires après repiquage. Pour compléter cette caractérisation nous pourrions également utiliser un autre marqueur de cellule souche, le carbohydrate membranaire LeX/SSEA1 (Capela and Temple, 2002). De plus, de récentes études montrent

que les cellules de la SVZ pourraient se différencier en cellules de la microglie (Marshall et al., 2008), connue pour leur capacité à phagocyter. Il serait donc intéressant de vérifier la présence de ce type cellulaire, phagocytant ou non, par immunocytochimie dans nos cultures en utilisant un marqueur spécifique de microglie tel que le marqueur F4/80 (Austyn and Gordon, 1981). Nous pourrions également quantifier par cytométrie en flux la proportion de chaque type cellulaire au sein de la population de cellules qui phagocytent.

Alors que la phagocytose par les cellules de la microglie permet l'élimination de la majorité des débris au sein du SNC (Garden and Moller, 2006) et qu'il a déjà été mis en évidence la capacité de certaines populations de neurones à phagocyter (Bowen et al., 2007), aucune étude n'a montré, avant la notre, d'activité phagocytaire des cellules de type souche dérivées de la SVZ. Néanmoins, Bez et collaborateurs ont étudiés par microscopie électronique l'ultrastructure et la morphologie des neurosphères issues de SVZ embryonnaire humaine ainsi que des cellules qui en dérivent (Bez et al., 2003). Ces travaux montrent que ces cellules présentent des événements phagocytiques tels que la présence de corps apoptotiques au niveau intracellulaire. Ce phénomène n'est jamais présent en périphérie des neurosphères mais typiquement observé entre la 2^{ème} et la 3^{ème} couche de cellules externes et le centre de la neurosphère (Bez et al., 2003). Indépendamment, une étude montre que d'autres cellules souches, notamment des cellules souches embryonnaires murines, ont une activité phagocytaire ainsi qu'un profil d'expression transcriptomique proche de celui des macrophages (Charriere et al., 2006). Les gènes communs aux macrophages et à ces cellules souches sont impliqués dans les processus d'endocytose et de trafic vésiculaire. Il serait intéressant de réaliser la même expérience en comparant les cellules de la SVZ et les macrophages et de trouver ainsi des caractéristiques communes. Au delà de l'étude de la phagocytose par les cellules souches de la SVZ, cette analyse pourrait aider à la compréhension du développement du système nerveux central, et notamment à la capacité des cellules dérivées de la SVZ à donner des cellules de la microglie (Marshall et al., 2008). Ce phénomène serait comparable à ce qui a déjà été observé sur des cellules souches embryonnaires humaines dérivées de l'épithélium pigmentaire rétinien, à savoir que ces cellules, tout comme les cellules dont elles dérivent, sont capables de phagocyter les segments externes des photorécepteurs (Carr et al., 2009).

Phagocytose, système nerveux central et PVKDs

Nous avons également démontré que la protéine S module la capacité des cellules souches à phagocyter. *In vivo*, la protéine S est localement présente dans les cellules de la

SVZ et il semble qu'elle soit également présente dans le liquide céphalo-rachidien. Elle pourrait alors favoriser localement la phagocytose par les cellules de la SVZ mais aussi par d'autres types cellulaires dont la microglie.

La protéine S stimule la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien (Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006b) ou la phagocytose des cellules apoptotiques par des macrophages (Anderson et al., 2003). De plus, la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien dérivées de cellules souches embryonnaires humaines est bloquée par un anticorps dirigé contre le récepteur tyrosine kinase Mer (Carr et al., 2009). Afin d'approfondir les travaux sur la capacité des cellules souches à phagocyter il serait intéressant d'utiliser un substrat physiologique de la phagocytose tel que des corps apoptotiques dérivés de neurones. Nous pourrions également refaire ces expériences en présence d'inhibiteurs spécifiques de phagocytose tels que l'annexine V ou la cytochalasine D ou d'anticorps neutralisants dirigés contre la protéine S. Nous pourrions également étudier l'implication du ou des récepteur(s) TAM dans ce processus en utilisant des anticorps neutralisant dirigés contre chacun d'entre eux dans un premier temps, puis en réalisant des cultures dérivées de la SVZ d'individus dont le gène codant pour le récepteur d'intérêt a été invalidé.

Phagocytose, système nerveux central et maladies neurodégénératives

Une étude montre que la protéine MFG-E8, protéine ayant les mêmes caractéristiques d'opsonine que Gas6 ou la protéine S, voit son expression fortement diminuée dans le cerveau d'un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris Tg2576 exprimant la protéine précurseur amyloïde mutante) (Fuller and Van Eldik, 2008). Cette protéine est sécrétée par les cellules de la microglie et stimule la phagocytose des neurones apoptotiques. Ceci suggère qu'un défaut d'élimination des corps apoptotiques de neurones par les cellules de la microglie peut être impliqué dans certaines pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Fuller and Van Eldik, 2008). Afin de déterminer le rôle que pourrait avoir Gas6 ou la protéine S dans ce type de pathologie, il serait intéressant de comparer leur niveau d'expression et d'activation (état de γ -carboxylation) dans le cerveau d'individus sains par rapport à des individus malades. D'autres études montrent également une possible implication de la vitamine K dans la maladie d'Alzheimer (Han, 2005; Presse et al., 2008). L'implication de la vitamine K dans cette pathologie reste pour le moment obscure. Elle pourrait agir via les PVKDs, de façon directe par un mécanisme inconnu ou encore via le métabolisme des sphingolipides.

En effet, en plus de son rôle dans la γ -carboxylation des protéines, la vitamine K a un rôle dans le métabolisme des sphingolipides (Lev and Milford, 1972), dont les sulfatides font partie. L'administration de warfarine à de jeunes rats induit une baisse significative de la concentration de sulfatides dans le cerveau, effet qui est reversé suite à l'administration de vitamine K (Sundaram and Lev, 1988; Sundaram and Lev, 1990). L'influence de la vitamine K sur le métabolisme des sulfatides serait indépendante des protéines γ -carboxylées (Shearer and Newman, 2008). Les sulfatides sont des composants importants de la myéline, une dérégulation de leur métabolisme aboutit à des pathologies graves. Une accumulation de sulfatides dans le cerveau est à l'origine de leucodystrophie métachromatique (Raghavan et al., 1981) ou encore de problèmes psychiatriques (Heavey et al., 1990). Une étude récente montre également que des patients au stade précoce de la maladie d'Alzheimer consomment deux fois moins de vitamine K que des individus sains témoins (Presse et al., 2008). Des rats âgés maintenus avec une alimentation pauvre en vitamine K tout au long de leur vie développent des déficits cognitifs aussi bien que des changements au niveau du métabolisme cérébral des sphingolipides comparables à ce qui est observé chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Han, 2005).

Là encore il serait intéressant de procéder à une étude épidémiologique chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et traités à la warfarine. Un traitement à la warfarine, tout comme une baisse de l'apport de vitamine K par l'alimentation, pourrait alors être un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer ou pourrait accélérer la progression de cette maladie.

3.5 Implication de la protéine Gas6 dans la rétinogénèse

La fonction et la viabilité des photorécepteurs de la rétine chez les vertébrés nécessitent la phagocytose journalière de leurs segments externes par l'épithélium pigmentaire rétinien adjacent (Young and Bok, 1969). Un défaut lors de ce processus mène à une dégénérescence rétinienne observée notamment chez le rat RCS (D'Cruz et al., 2000) qui présente une mutation du récepteur tyrosine kinase Mer. Ces données suggèrent que l'activation du récepteur Mer est responsable de l'ingestion des segments externes des photorécepteurs de la rétine par l'EPR et donc que la signalisation Gas6/Mer est essentielle à la survie des photorécepteurs (Hall et al., 2001). Néanmoins, et de façon surprenante, les souris knock-out pour la protéine Gas6 présentent une rétine normale. Des travaux montrent également que l'absence de la protéine Gas6 *in vitro* n'empêche pas la phagocytose du segment externe des photorécepteurs par l'EPR (Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006b). Dans des conditions basales, il semble donc que l'absence de protéine Gas6 soit compensée par la présence de la protéine S.

Au vu de ces données, il serait donc intéressant de tester, dans des conditions non physiologiques de lésion rétinienne, si la présence de la protéine S suffit à compenser l'absence de la protéine Gas6 chez les souris dont le gène codant pour la protéine Gas6 a été invalidé (Gas6^{-/-}). Pour cela, nous avons réalisé une irradiation au laser argon de rétines de souris Gas6^{-/-} et de souris sauvages Gas6^{+/+} (groupe témoin).

3.5.1 La protéine Gas6 semble nécessaire à la prolifération des cellules suite à une lésion de la rétine induite par un impact laser argon

Durant les sept premiers jours suivant la photocoagulation, le processus de réparation est accompagné de l'infiltration de cellules en prolifération Ki67 positives et de cellules F4/80 positives, marqueur spécifique des macrophages et des cellules de la microglie. Les cellules Ki67 (**Figure 41aet b**) et F4/80 (**Figure 41cet d**) positives sont retrouvées au niveau de la choroïde au centre de la lésion induite par le laser.

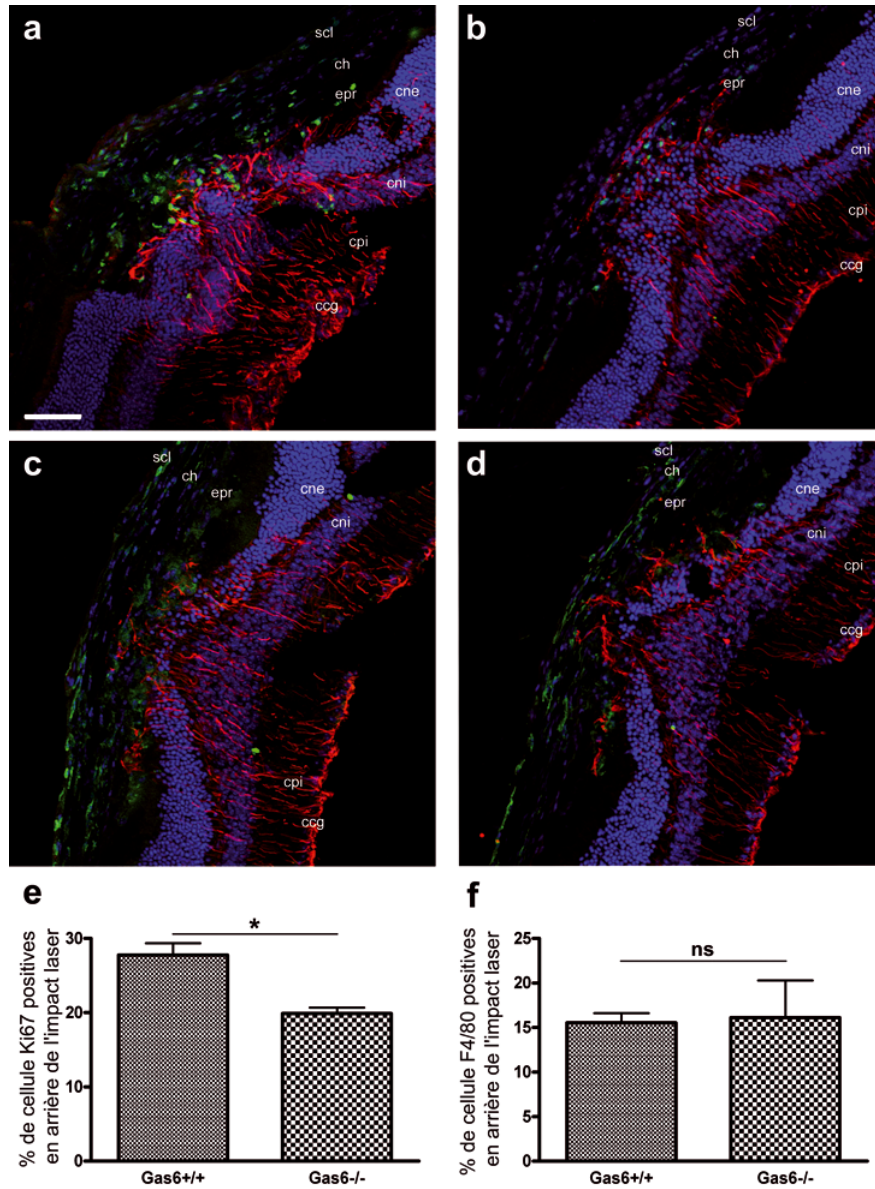


Figure 41 : Quantification de la prolifération cellulaire et de la réaction inflammatoire suite à un impact laser sur la rétine de souris sauvages ou de souris dont le gène codant pour la protéine Gas6 a été invalidé. (a, b) Immunodétection de Ki67 ou (c, d) de F4/80 (en vert) et GFAP (en rouge) sur des coupes radiales de rétine (a, c) de souris *Gas6*^{+/+} et (b, d) de souris *Gas6*^{-/-}. Les noyaux sont marqués en bleu par du Dapi. scl : sclère ; ch : choroïde ; epr : épithélium pigmentaire rétinien ; cne : couche nucléaire externe ; cni : couche nucléaire interne ; cpi : couche plexiforme interne ; ccg : couche des cellules ganglionnaires. Barre d'échelle : 50 μ m. (e) Pourcentage de cellules Ki67 positives et (f) F4/80 positives en arrière de l'impact laser sur une zone de $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$. * $P < 0,05$; ns $P > 0,05$.

Nous avons alors comparé la réaction à la lésion rétinienne de souris sauvages (**Figure 41a et c**) et de souris *Gas6*^{-/-} (**Figure 41b et d**) afin d'évaluer l'implication de la protéine

Gas6 dans le processus lésionnel. Trois jours après l'irradiation, deux souris par génotype sont euthanasiées, leur œil est prélevé puis coupé. Les coupes de rétine sont alors révélées avec les anticorps anti-Ki67 ou anti-F4/80. Nos résultats montrent une diminution significative de 28% du nombre de cellules Ki67 positives sur les rétines de souris Gas6^{-/-} par rapport aux souris Gas6^{+/+} (**Figure 41e**). Par contre, nous ne détectons pas de variation du nombre de cellules F4/80 positives au niveau de la lésion entre les souris sauvages et les souris dont le gène codant pour la protéine Gas6 a été invalidé(**Figure 41f**).

La protéine Gas6 est donc nécessaire à la prolifération cellulaire de cellules non-inflammatoires en vue de la réparation d'une lésion rétinienne induite par un laser argon.

3.5.2 Effet de la protéine Gas6 sur l'apoptose des cellules suite à une lésion de la rétine induite par un impact laser

Afin d'étudier l'effet de l'absence de la protéine Gas6 sur la survie des cellules de la couche nucléaire externe (cne) de rétines de souris Gas6^{-/-} trois jours après un impact laser, en comparaison avec les rétines de souris Gas6^{+/+}, nous avons réalisé un marquage Tunel sur ces dernières (**Figure 42a et b**).

Nos résultats montrent une augmentation non significative du nombre de cellules Tunel positives au niveau de la lésion rétinienne (**Figure 42c**).

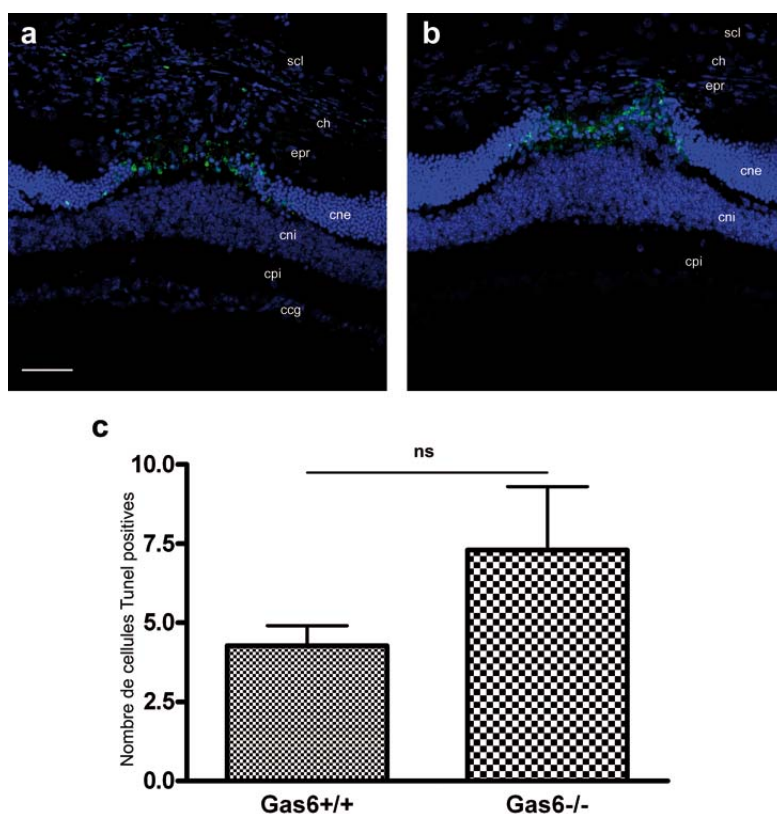


Figure 42 : Quantification de l'apoptose suite à un impact laser sur la rétine de souris sauvages ou de souris dont le gène codant pour la protéine Gas6 a été invalidé. Réaction TUNEL montrant les cellules apoptotiques (en vert) sur des coupes radiales de rétine **(a)** de souris $Gas6^{+/+}$ et **(b)** de souris $Gas6^{-/-}$. scl : sclère ; ch : choroïde ; epr : épithélium pigmentaire rétinien ; cne : couche nucléaire externe ; cni : couche nucléaire interne ; cpi : couche plexiforme interne ; ccg : couche des cellules ganglionnaires. Les noyaux sont marqués en bleu par du Dapi. **(c)** Nombre de cellules TUNEL positives au centre de l'impact laser sur une largeur de 150 μ m. Barre d'échelle : 50 μ m. ns $P > 0,05$.

3.5.3 Discussion

Dans la rétine, la protéine Gas6 et la protéine S stimulent la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR (Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006b), fonction indispensable à la physiologie rétinienne. Cette fonction n'étant pas altérée chez les souris $Gas6^{-/-}$, la protéine S, seul autre ligand connu des récepteurs TAM, pourrait se substituer à la protéine Gas6 (Prasad et al., 2006b).

Notre étude révèle une prolifération cellulaire moins importante chez les individus $Gas6^{-/-}$ par rapport aux individus $Gas6^{+/+}$ en réaction à la lésion. Ces résultats sont en accord

avec un grand nombre d'études qui montrent que Gas6 stimule la prolifération cellulaire (Sainaghi et al., 2005; Stenhoff et al., 2004). Nos résultats ne montrent pas de variation du nombre de cellules inflammatoires au niveau du site de lésion entre les rétines de souris sauvages et de souris déficiente en protéine Gas6. Ceci suggère que la protéine Gas6, dans ce modèle de lésion rétinienne, n'est pas nécessaire à la prolifération des cellules inflammatoires résidentes de la rétine, les cellules de la microglie, ainsi qu'au recrutement de macrophages à partir de la circulation sanguine. Néanmoins, l'implication de la protéine Gas6 dans la régulation de la prolifération de cellules non inflammatoires dans la rétine lésée n'exclut pas l'implication de cette protéine dans le contrôle des processus inflammatoires. De récentes études montrent que la signalisation via les récepteurs TAM est impliquée dans la régulation du système immunitaire (Lu and Lemke, 2001; Sharif et al., 2006). Des interactions étroites entre les récepteurs TAM et les récepteurs aux cytokines mènent notamment à une inhibition de l'inflammation. La protéine Gas6 et la protéine S inhiberaient l'activation des récepteurs Toll-like localisés sur les cellules dendritiques (Rothlin et al., 2007).

La protéine Gas6 stimulerait donc la prolifération d'autres types cellulaires au niveau du site de lésion tels que des cellules endothéliales, des cellules vasculaires du muscle lisse, des fibrocytes et/ou fibroblastes ou des cellules de l'EPR (Espinosa-Heidmann et al., 2005). La quantification de la vascularisation 14 jours après la lésion rétinienne devrait permettre de répondre en partie à cette question.

Alors qu'un grand nombre de travaux montre que la protéine Gas6 stimule la survie cellulaire (Demarchi et al., 2001; Melaragno et al., 2004; van Ginkel et al., 2004), nos résultats montrent une augmentation non significative de la mort cellulaire au niveau de l'impact laser réalisé sur des rétines de souris Gas6^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Cette étude n'ayant été réalisée que sur un faible nombre d'individus, il serait nécessaire d'étudier un plus grand nombre de rétines lésées afin de confirmer ces résultats.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mécanismes de contrôle de la prolifération des cellules souches par les PVKDs

Nos résultats montrent que les PVKDs inhibent significativement la prolifération des CSN aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Notre étude a également permis d'identifier la protéine S et la protéine Gas6 comme les deux seules PVKDs fonctionnelles sécrétées par ces cellules. La protéine S ne semble pas avoir d'effet sur l'autorenouvellement des cellules mais elle inhibe la croissance des CSN et contrebalance l'effet mitogène de la warfarine. La protéine Gas6 stimule l'autorenouvellement des CSN *in vitro*. Le phénotype initial associé aux souris invalidées pour le gène codant pour la protéine Gas6 est un défaut d'agrégation plaquettaire (Angelillo-Scherrer et al., 2005). Notre étude montre que ces souris ont un pool de cellules souches neurales en prolifération plus restreint que des souris sauvages. Ces données, ainsi que l'expression de la protéine S et de la protéine Gas6 dans la SVZ *in vivo* et dans le liquide céphalo-rachidien, montrent un rôle important de ces deux PVKDs au sein du système nerveux central. Notre étude montre également que Gas6 et la protéine S activent les récepteurs de la famille TAM dans les CSN *in vitro*. Pour la première fois, notre étude met en évidence la dualité de ces deux PVKDs pour leurs récepteurs. La protéine S active le récepteur Tyro3 et empêche l'activation du récepteur Axl par la protéine Gas6.

Pour la suite de ce travail, il serait important d'approfondir l'implication des protéines S et Gas6 et des récepteurs TAM dans la prolifération et la différenciation des CSN. Pour cela, il serait particulièrement intéressant de travailler *in vitro* sur des CSN dérivées de la SVZ de souris invalidées pour un ou plusieurs récepteurs TAM. Nous pourrions également travailler sur la SVZ issue de rongeurs nouveau-nés avec des anticorps neutralisant anti-Gas6 ou anti-protéine S afin de comprendre la contribution respective de ces deux protéines dans la prolifération des CSN. Les voies de signalisation impliquées dans l'effet des protéines S et Gas6 sur l'activité des CSN restent également à déterminer.

Le contrôle de l'activité des cellules souches est d'une importance capitale pour prévenir l'apparition de cancer et maintenir le pool de ces cellules. L'activité des cellules souches est régulée par un grand nombre de facteurs solubles. Parmi eux, la protéine Gas6 joue un rôle important dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes

(Dormady et al., 2000) et les récepteurs Axl et Tyro3 ont été démontrés comme impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse, particulièrement au stade embryonnaire (Crosier et al., 1996). Nos travaux montrent, pour la première fois, un contrôle de l'activité des cellules souches neurales par les PVKDs, avec une fonction stimulatrice de la protéine Gas6 sur l'autorenouvellement et inhibitrice de la protéine S sur la prolifération cellulaire. Ceci suggère que les PVKDs pourraient constituer des mécanismes pleiotropes de contrôle des cellules souches.

Plusieurs études récentes suggèrent une relation entre les cellules souches de la SVZ et les gliomes (Liliental and Chang, 1998). En particulier il a été proposé qu'une prolifération aberrante des cellules souches ou des cellules progénitrices de la SVZ peut aboutir à l'apparition de cancer (Abel et al., 2009; Liliental and Chang, 1998; Wang et al., 2009). De plus le récepteurs Axl et la protéine Gas6 sont surexprimées dans un grand nombre de cancers chez l'Homme, dont les gliomes (pour revue : (Angelillo-Scherrer et al., 2005; Linger et al., 2008) (Hutterer et al., 2008; Staflin et al., 2009)).

Une perspectives de ce travail pourrait alors être de moduler l'expression ou l'activation des récepteurs TAM et d'en observer les effets sur la capacité des cellules souches à induire des gliomes. Actuellement, plusieurs laboratoires de recherche tentent de développer des molécules ciblant les récepteurs TAM. Une molécule nommée MP470, dont la spécificité d'action n'est pour le moment pas totalement avérée, inhibe la fonction de ces récepteurs (Mahadevan et al., 2007). D'autres équipes de recherche travaillent sur le développement de récepteurs TAM solubles (Costa et al., 1996; Sainaghi et al., 2005) ou sur le développement d'anticorps dirigés contre ces récepteurs visant à réduire leur activation potentielle (Angelillo-Scherrer et al., 2005). Ces molécules pourraient présenter, après détermination de leurs effets, un intérêt majeur dans les domaines de la cancérologie et de la neurologie. L'étude et la compréhension des mécanismes régulant la prolifération de ces cellules présentent à la fois des intérêts fondamentaux et thérapeutiques.

Les cellules souches neurales ont la capacité de phagocyter

La phagocytose est un mécanisme fondamental au développement et à l'intégrité de l'organisme. Au sein du système nerveux central, la phagocytose permet entre autre l'élimination de neurones apoptotiques et de leur connexions établies en excès (Frade and Barde, 1998; Marin-Teva et al., 2004). Une partie de ce travail démontre que les cellules souches neurales sont capables de phagocyter des billes de latex. Cette étude laisse apparaître

un nouvel aspect de la physiologie des cellules souches neurales. Elles pourraient, grâce à leur potentiel de phagocytes, être de nouveaux acteurs du développement de l'architecture du SNC mais aussi intervenir, aux côtés de la microglie, dans le contrôle de la réponse inflammatoire observée en conditions pathologiques. La phagocytose par les cultures de SVZ est stimulée par la protéine S, comme cela a déjà été démontré dans d'autres modèles d'étude (Anderson et al., 2003; Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006b). Ce travail devrait être poursuivi par l'étude de la phagocytose de substrats physiologiques par des cultures de SVZ et par la détermination du phénotype des cellules phagocytant par cytométrie en flux.

La fonction de cette phagocytose est actuellement inconnue. Elle pourrait être impliquée lors du développement ou encore dans la régulation de processus inflammatoires. L'existence d'une phagocytose par les CSN n'ayant pas pu être démontrée *in vivo*, les données obtenues *in vitro* au cours de notre étude doivent être considérées avec prudence. Comme l'équipe du Dr Parati l'a évoqué (Bez et al., 2003), la capacité *in vitro* des cellules souches à phagocyter pourrait être la conséquence d'une « adaptation environnementale » qui assimilerait la neurosphère à un microsystème. L'organisation des CSN en neurosphères limite l'apport en oxygène et en nutriments des cellules situées au centre. Les événements phagocytiques observés *in vitro* permettraient de maintenir un équilibre entre la génération de nouvelles cellules et l'apoptose d'autres cellules plus âgées. La phagocytose par les CSN *in vivo* n'a pour le moment pas été étudiée. Dans le cadre de cette recherche, il apparaît fondamental de vérifier *in vivo* la présence d'évènements phagocytiques (corps apoptotiques internalisés, présence de lysosomes) dans les cellules de la SVZ et il serait plus qu'intéressant, si ces événements sont observés *in vivo*, d'en connaître l'origine.

La protéine Gas6 est nécessaire à la prolifération cellulaire induite en vue de la réparation rétinienne

Dans le cas de lésions, la phagocytose des débris cellulaires permet la création d'un environnement propice à la régénération (David and Lacroix, 2003; Vargas and Barres, 2007). Ce processus est finement régulé par un grand nombre de protéines dont les protéines S et Gas6. Ainsi, la protéine S stimule la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'EPR au sein de la rétine (Prasad et al., 2006b). Cette phagocytose est primordiale pour l'autorenouvellement des photorécepteurs et peut également être essentielle lors de lésion rétinienne pour la création d'un environnement favorable à la réparation. La réparation rétinienne pourrait donc être favorisée par une stimulation de la phagocytose des macrophages

par la protéine S, ce qui reste à vérifier, mais également, comme le montre notre travail, par une stimulation de la prolifération cellulaire par la protéine Gas6.

Une partie de cette étude montre que la protéine Gas6 stimule la prolifération cellulaire impliquée dans la réparation d'une lésion rétinienne induite par photocoagulation laser argon alors qu'aucun phénotype rétinien n'avait pour le moment été associé à l'inactivation du gène codant pour la protéine Gas6 chez la souris (Prasad et al., 2006b). Cette étude montre que dans des conditions pathologiques la protéine S ne suffirait pas à compenser l'absence de protéine Gas6, contrairement à ce qui semble se passer en conditions physiologiques (Prasad et al., 2006b).

Les perspectives de ce travail seraient de réaliser à nouveau des impacts laser chez les souris dont le gène codant pour la protéine Gas6 a été invalidé et chez les souris sauvages afin d'augmenter le nombre de rétines analysées 3 jours après lésion et de quantifier l'angiogenèse induite 14 jours après l'impact laser.

Les protéines vitamine K-dépendantes, et plus particulièrement les protéines S et Gas6, constituent des acteurs majeurs de la physiologie du système nerveux central. La compréhension de la dualité de ces deux protéines pour leurs récepteurs membranaires ainsi que leur effet sur la prolifération et la différenciation cellulaire est d'un intérêt fondamental.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd-el-Basset, E.M., I. Ahmed, V.I. Kalnins, and S. Fedoroff. 1992. Immuno-electron microscopical localization of vimentin and glial fibrillary acidic protein in mouse astrocytes and their precursor cells in culture. *Glia*. 6:149-53.
- Abdelmohsen, K., D. Stuhlmann, F. Daubrawa, and L.O. Klotz. 2005. Dicumarol is a potent reversible inhibitor of gap junctional intercellular communication. *Arch Biochem Biophys*. 434:241-7.
- Abel, T.W., C. Clark, B. Bieri, A. Chytil, M. Aakre, A. Gorska, and H.L. Moses. 2009. GFAP-Cre-mediated activation of oncogenic K-ras results in expansion of the subventricular zone and infiltrating glioma. *Mol Cancer Res*. 7:645-53.
- Abrous, D.N., M. Koehl, and M. Le Moal. 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*. 85:523-69.
- Agasse, F., M. Roger, and V. Coronas. 2004. Neurogenic and intact or apoptotic non-neurogenic areas of adult brain release diffusible molecules that differentially modulate the development of subventricular zone cell cultures. *Eur J Neurosci*. 19:1459-68.
- Allen, M.P., D.A. Linseman, H. Udo, M. Xu, J.B. Schaack, B. Varnum, E.R. Kandel, K.A. Heidenreich, and M.E. Wierman. 2002. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. 22:599-613.
- Allen, M.P., C. Zeng, K. Schneider, X. Xiong, M.K. Meintzer, P. Bellosta, C. Basilico, B. Varnum, K.A. Heidenreich, and M.E. Wierman. 1999. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt. *Mol Endocrinol*. 13:191-201.
- Alvarez-Buylla, A., B. Seri, and F. Doetsch. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull*. 57:751-8.
- Anderson, H.A., C.A. Maylock, J.A. Williams, C.P. Paweletz, H. Shu, and E. Shacter. 2003. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol*. 4:87-91.
- Angelillo-Scherrer, A., L. Burnier, N. Flores, P. Savi, M. DeMol, P. Schaeffer, J.M. Herbert, G. Lemke, S.P. Goff, G.K. Matsushima, H.S. Earp, C. Vesin, M.F. Hoylaerts, S. Plaisance, D. Collen, E.M. Conway, B. Wehrle-Haller, and P. Carmeliet. 2005. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest*. 115:237-46.
- Angelillo-Scherrer, A., P. de Frutos, C. Aparicio, E. Melis, P. Savi, F. Lupu, J. Arnout, M. Dewerchin, M. Hoylaerts, J. Herbert, D. Collen, B. Dahlback, and P. Carmeliet. 2001. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*. 7:215-21.
- Austyn, J.M., and S. Gordon. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*. 11:805-15.
- Bai, D., H. Chen, and B.R. Huang. 2003. RanBPM is a novel binding protein for p75NTR. *Biochem Biophys Res Commun*. 309:552-7.
- Baker, S.A., K.A. Baker, and T. Hagg. 2005. D3 dopamine receptors do not regulate neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. *Neurobiol Dis*. 18:523-7.

- Balordi, F., and G. Fishell. 2007. Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci.* 27:14248-59.
- Banasr, M., M. Hery, R. Printemps, and A. Daszuta. 2004. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 29:450-60.
- Bartlett, W.P., X.S. Li, and M. Williams. 1992. Expression of IGF-1 mRNA in the murine subventricular zone during postnatal development. *Brain Res Mol Brain Res.* 12:285-91.
- Behrens, E.M., P. Gadue, S.Y. Gong, S. Garrett, P.L. Stein, and P.L. Cohen. 2003. The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity. *Eur J Immunol.* 33:2160-7.
- Bellosta, P., M. Costa, D.A. Lin, and C. Basilico. 1995. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol.* 15:614-25.
- Benraiss, A., E. Chmielnicki, K. Lerner, D. Roh, and S.A. Goldman. 2001. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci.* 21:6718-31.
- Benzakour, O., A. Gely, R. Lara, and V. Coronas. 2007. [Gas-6 and protein S: vitamin K-dependent factors and ligands for the TAM tyrosine kinase receptors family]. *Med Sci (Paris).* 23:826-33.
- Benzakour, O., and C. Kanthou. 2000. The anticoagulant factor, protein S, is produced by cultured human vascular smooth muscle cells and its expression is up-regulated by thrombin. *Blood.* 95:2008-14.
- Berkner, K.L. 1993. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: factors IX and VII. *Methods Enzymol.* 222:450-77.
- Betarbet, R., T. Zigova, R.A. Bakay, and M.B. Luskin. 1996. Dopaminergic and GABAergic interneurons of the olfactory bulb are derived from the neonatal subventricular zone. *Int J Dev Neurosci.* 14:921-30.
- Bez, A., E. Corsini, D. Curti, M. Biggiogera, A. Colombo, R.F. Nicosia, S.F. Pagano, and E.A. Parati. 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.* 993:18-29.
- Binder, M.D., H.S. Cate, A.L. Prieto, D. Kemper, H. Butzkueven, M.M. Gresle, T. Cipriani, V.G. Jokubaitis, P. Carmeliet, and T.J. Kilpatrick. 2008. Gas6 deficiency increases oligodendrocyte loss and microglial activation in response to cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci.* 28:5195-206.
- Bolteus, A.J., and A. Bordey. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci.* 24:7623-31.
- Bolton-Smith, C., R.J. Price, S.T. Fenton, D.J. Harrington, and M.J. Shearer. 2000. Compilation of a provisional UK database for the phylloquinone (vitamin K1) content of foods. *Br J Nutr.* 83:389-99.
- Borowski, M., B.C. Furie, S. Bauminger, and B. Furie. 1986. Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. Conformation-specific antibodies directed against the phospholipid-binding site on prothrombin. *J Biol Chem.* 261:14969-75.
- Bostrom, K., D. Tsao, S. Shen, Y. Wang, and L.L. Demer. 2001. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem.* 276:14044-52.
- Bowen, S., D.D. Ateh, K. Deinhardt, M.M. Bird, K.M. Price, C.S. Baker, J.C. Robson, M. Swash, W. Shamsuddin, S. Kawar, T. El-Tawil, J. Roos, A. Hoyle, C.D. Nickols, C.H. Knowles, A.H. Pullen, P.J. Luthert, R.O. Weller, M. Hafezparast, R.J. Franklin, T.

- Revesz, R.H. King, O. Berninghausen, E.M. Fisher, G. Schiavo, and J.E. Martin. 2007. The phagocytic capacity of neurones. *Eur J Neurosci*. 25:2947-55.
- Brooker, G.J., M. Kalloniatis, V.C. Russo, M. Murphy, G.A. Werther, and P.F. Bartlett. 2000. Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J Neurosci Res*. 59:332-41.
- Brown, M.A., G.S. Begley, E. Czerwiec, L.M. Stenberg, M. Jacobs, D.E. Kalume, P. Roepstorff, J. Stenflo, B.C. Furie, and B. Furie. 2005. Precursors of novel Gla-containing conotoxins contain a carboxy-terminal recognition site that directs gamma-carboxylation. *Biochemistry*. 44:9150-9.
- Brown, M.A., L.M. Stenberg, U. Persson, and J. Stenflo. 2000. Identification and purification of vitamin K-dependent proteins and peptides with monoclonal antibodies specific for gamma -carboxyglutamyl (Gla) residues. *J Biol Chem*. 275:19795-802.
- Broze, G.J., Jr. 2001. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost*. 86:8-13.
- Brugnera, E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S.F. Walk, A.C. Tosello-Tramont, I.G. Macara, H. Madhani, G.R. Fink, and K.S. Ravichandran. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*. 4:574-82.
- Budagian, V., E. Bulanov, Z. Orinska, L. Thon, U. Mamat, P. Bellosta, C. Basilico, D. Adam, R. Paus, and S. Bulfone-Paus. 2005. A promiscuous liaison between IL-15 receptor and Axl receptor tyrosine kinase in cell death control. *Embo J*. 24:4260-70.
- Burdon, T., A. Smith, and P. Savatier. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol*. 12:432-8.
- Capela, A., and S. Temple. 2002. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*. 35:865-75.
- Carlen, M., R.M. Cassidy, H. Brismar, G.A. Smith, L.W. Enquist, and J. Frisen. 2002. Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol*. 12:606-8.
- Carleton, A., L.T. Petreanu, R. Lansford, A. Alvarez-Buylla, and P.M. Lledo. 2003. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 6:507-18.
- Carmeliet, P. 2001. Biomedicine. Clotting factors build blood vessels. *Science*. 293:1602-4.
- Carr, A.J., A. Vugler, J. Lawrence, L.L. Chen, A. Ahmado, F.K. Chen, M. Semo, C. Gias, L. da Cruz, H.D. Moore, J. Walsh, and P.J. Coffey. 2009. Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay. *Mol Vis*. 15:283-95.
- Castiglione, M., M. Calafiore, L. Costa, M.A. Sortino, F. Nicoletti, and A. Copani. 2008. Group I metabotropic glutamate receptors control proliferation, survival and differentiation of cultured neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of adult mice. *Neuropharmacology*. 55:560-7.
- Chan, K.Y., E. Gilbert-Barness, and G. Tiller. 2003. Warfarin embryopathy. *Pediatr Pathol Mol Med*. 22:277-83.
- Charriere, G.M., B. Cousin, E. Arnaud, C. Saillan-Barreau, M. Andre, A. Massoudi, C. Dani, L. Penicaud, and L. Casteilla. 2006. Macrophage characteristics of stem cells revealed by transcriptome profiling. *Exp Cell Res*. 312:3205-14.
- Chen, J., K. Carey, and P.J. Godowski. 1997. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene*. 14:2033-9.
- Chiasson, B.J., V. Tropepe, C.M. Morshead, and D. van der Kooy. 1999. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*. 19:4462-71.
- Chimini, G., and P. Chavrier. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol*. 2:E191-6.

- Choonara, I.A., B.P. Haynes, S. Cholerton, A.M. Breckenridge, and B.K. Park. 1986. Enantiomers of warfarin and vitamin K1 metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 22:729-32.
- Cohen, P.L., R. Caricchio, V. Abraham, T.D. Camenisch, J.C. Jennette, R.A. Roubey, H.S. Earp, G. Matsushima, and E.A. Reap. 2002. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med*. 196:135-40.
- Coles-Takabe, B.L., I. Brain, K.A. Purpura, P. Karpowicz, P.W. Zandstra, C.M. Morshead, and D. van der Kooy. 2008. Don't look: growing clonal versus nonclonal neural stem cell colonies. *Stem Cells*. 26:2938-44.
- Cooper-Kuhn, C.M., J. Winkler, and H.G. Kuhn. 2004. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res*. 77:155-65.
- Cooper, A.D. 1997. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res*. 38:2173-92.
- Coronas, V., K. Bantubungi, J. Fombonne, S. Krantic, S.N. Schiffmann, and M. Roger. 2004. Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem*. 91:1292-301.
- Coronas, V., L.K. Srivastava, J.J. Liang, F. Jourdan, and E. Moyse. 1997. Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb: a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. *J Chem Neuroanat*. 12:243-57.
- Coskun, V., H. Wu, B. Bianchi, S. Tsao, K. Kim, J. Zhao, J.C. Biancotti, L. Hutnick, R.C. Krueger, Jr., G. Fan, J. de Vellis, and Y.E. Sun. 2008. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:1026-31.
- Costa, M., P. Bellosta, and C. Basilico. 1996. Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 168:737-44.
- Coutu, D.L., J.H. Wu, A. Monette, G.E. Rivard, M.D. Blostein, and J. Galipeau. 2008. Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*. 283:17991-8001.
- Covey, M.V., and S.W. Levison. 2007. Leukemia inhibitory factor participates in the expansion of neural stem/progenitors after perinatal hypoxia/ischemia. *Neuroscience*. 148:501-9.
- Crosier, P.S., S.A. Freeman, D. Orlic, D.M. Bodine, and K.E. Crosier. 1996. The Dtk receptor tyrosine kinase, which binds protein S, is expressed during hematopoiesis. *Exp Hematol*. 24:318-23.
- D'Cruz, P.M., D. Yasumura, J. Weir, M.T. Matthes, H. Abderrahim, M.M. LaVail, and D. Vollrath. 2000. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet*. 9:645-51.
- David, S., and S. Lacroix. 2003. Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci*. 26:411-40.
- Demarchi, F., R. Verardo, B. Varnum, C. Brancolini, and C. Schneider. 2001. Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem*. 276:31738-44.
- Denti, S., A. Sirri, A. Cheli, L. Rogge, G. Innamorati, S. Putignano, M. Fabbri, R. Pardi, and E. Bianchi. 2004. RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J Biol Chem*. 279:13027-34.
- Desagher, S., and J.C. Martinou. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*. 10:369-77.
- Di Giorgi Gerevini, V.D., A. Caruso, I. Cappuccio, L. Ricci Vitiani, S. Romeo, C. Della Rocca, R. Gradini, D. Melchiorri, and F. Nicoletti. 2004. The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 150:17-22.
- Doetsch, F. 2003. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 6:1127-34.

- Doetsch, F., and A. Alvarez-Buylla. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14895-900.
- Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 17:5046-61.
- Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1999. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:11619-24.
- Doetsch, F., L. Petreanu, I. Caille, J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*. 36:1021-34.
- Domotor, E., O. Benzakour, J.H. Griffin, D. Yule, K. Fukudome, and B.V. Zlokovic. 2003. Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood*. 101:4797-801.
- Dormady, S.P., X.M. Zhang, and R.S. Basch. 2000. Hematopoietic progenitor cells grow on 3T3 fibroblast monolayers that overexpress growth arrest-specific gene-6 (GAS6). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:12260-5.
- Dot, C., V. Parier, F. Behar-Cohen, D. Benezra, L. Jonet, B. Goldenberg, E. Picard, S. Camelo, Y. de Kozak, F. May, G. Soubrane, and J.C. Jeanny. 2009. Influence of age on retinochoroidal healing processes after argon photocoagulation in C57bl/6j mice. *Mol Vis*. 15:670-84.
- Ducy, P., C. Desbois, B. Boyce, G. Pinero, B. Story, C. Dunstan, E. Smith, J. Bonadio, S. Goldstein, C. Gundberg, A. Bradley, and G. Karsenty. 1996. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 382:448-52.
- Duncan, J.L., M.M. LaVail, D. Yasumura, M.T. Matthes, H. Yang, N. Trautmann, A.V. Chappelow, W. Feng, H.S. Earp, G.K. Matsushima, and D. Vollrath. 2003. An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:826-38.
- Elmadfa, E.j.a.I. 1996. Application of a simplified HPLC assay for the determination of phylloquinone (vitamin K1) in animal and plant food items. *Food Chemistry*. 56:87-91.
- Emsley, J.G., and T. Hagg. 2003. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol*. 183:298-310.
- Espinosa-Heidmann, D.G., M.A. Reinoso, Y. Pina, K.G. Csaky, A. Caicedo, and S.W. Cousins. 2005. Quantitative enumeration of vascular smooth muscle cells and endothelial cells derived from bone marrow precursors in experimental choroidal neovascularization. *Exp Eye Res*. 80:369-78.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, D.M. Rose, A. Pearson, R.A. Ezekewitz, and P.M. Henson. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 405:85-90.
- Fair, D.S., R.A. Marlar, and E.G. Levin. 1986. Human endothelial cells synthesize protein S. *Blood*. 67:1168-71.
- Fauser, S., K. Engelmann, T.U. Krohne, A. Lappas, B. Kirchhof, and A.M. Jousen. 2003. [Pathogenesis of choroidal neovascularization. Old concepts, new questions]. *Ophthalmologe*. 100:300-5.
- Feistritzer, C., R. Lenta, and M. Riewald. 2005. Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *J Thromb Haemost*. 3:2798-805.
- Fernandez, M., S. Pirondi, M. Manservigi, L. Giardino, and L. Calza. 2004. Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. *Eur J Neurosci*. 20:2059-70.

- Frade, J.M., and Y.A. Barde. 1998. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron*. 20:35-41.
- Frederiksen, K., and R.D. McKay. 1988. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*. 8:1144-51.
- Freedman, S.J., M.D. Blostein, J.D. Baleja, M. Jacobs, B.C. Furie, and B. Furie. 1996. Identification of the phospholipid binding site in the vitamin K-dependent blood coagulation protein factor IX. *J Biol Chem*. 271:16227-36.
- Fridell, Y.W., J. Villa, Jr., E.C. Attar, and E.T. Liu. 1998. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 273:7123-6.
- Fuller, A.D., and L.J. Van Eldik. 2008. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. *J Neuroimmune Pharmacol*. 3:246-56.
- Funakoshi, H., T. Yonemasu, T. Nakano, K. Matumoto, and T. Nakamura. 2002. Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 68:150-60.
- Gage, B.F., and P.E. Milligan. 2005. Pharmacology and pharmacogenetics of warfarin and other coumarins when used with supplements. *Thromb Res*. 117:55-9; discussion 65-7.
- Ganopoulosky, J.G., M.R. Abid, W.C. Aird, and M.D. Blostein. 2008. GAS6-induced signaling in human endothelial cells is mediated by FOXO1a. *J Thromb Haemost*. 6:1804-11.
- Garcia, A.D., N.B. Doan, T. Imura, T.G. Bush, and M.V. Sofroniew. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*. 7:1233-41.
- Garden, G.A., and T. Moller. 2006. Microglia biology in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 1:127-37.
- Giardino, L., C. Bettelli, and L. Calza. 2000. In vivo regulation of precursor cells in the subventricular zone of adult rat brain by thyroid hormone and retinoids. *Neurosci Lett*. 295:17-20.
- Gil-Perotin, S., M. Marin-Husstege, J. Li, M. Soriano-Navarro, F. Zindy, M.F. Roussel, J.M. Garcia-Verdugo, and P. Casaccia-Bonnel. 2006. Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *J Neurosci*. 26:1107-16.
- Gitel, S.N., W.G. Owen, C.T. Esmon, and C.M. Jackson. 1973. A polypeptide region of bovine prothrombin specific for binding to phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70:1344-8.
- Gleeson, J.G., S.R. Minnerath, J.W. Fox, K.M. Allen, R.F. Luo, S.E. Hong, M.J. Berg, R. Kuzniecky, P.J. Reitnauer, R. Borgatti, A.P. Mira, R. Guerrini, G.L. Holmes, C.M. Rooney, S. Berkovic, I. Scheffer, E.C. Cooper, S. Ricci, R. Cusmai, T.O. Crawford, R. Leroy, E. Andermann, J.W. Wheless, W.B. Dobyns, C.A. Walsh, and et al. 1999. Characterization of mutations in the gene doublecortin in patients with double cortex syndrome. *Ann Neurol*. 45:146-53.
- Godowski, P.J., M.R. Mark, J. Chen, M.D. Sadick, H. Raab, and R.G. Hammonds. 1995. Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3. *Cell*. 82:355-8.
- Graham, D.K., G.W. Bowman, T.L. Dawson, W.L. Stanford, H.S. Earp, and H.R. Snodgrass. 1995. Cloning and developmental expression analysis of the murine c-mer tyrosine kinase. *Oncogene*. 10:2349-59.
- Graham, D.K., T.L. Dawson, D.L. Mullaney, H.R. Snodgrass, and H.S. Earp. 1994. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ*. 5:647-57.
- Greaves, J.H., C. Lind, B. Rase, and K. Enander. 1973. Warfarin resistance and DT diaphorase activity in the rat. *FEBS Lett*. 37:144-6.

- Gritti, A., L. Cova, E.A. Parati, R. Galli, and A.L. Vescovi. 1995. Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett.* 185:151-4.
- Gritti, A., P. Frolichsthal-Schoeller, R. Galli, E.A. Parati, L. Cova, S.F. Pagano, C.R. Bjornson, and A.L. Vescovi. 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci.* 19:3287-97.
- Guo, H., D. Liu, H. Gelbard, T. Cheng, R. Insalaco, J.A. Fernandez, J.H. Griffin, and B.V. Zlokovic. 2004. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron.* 41:563-72.
- Hafizi, S., and B. Dahlback. 2006a. Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *Febs J.* 273:5231-44.
- Hafizi, S., and B. Dahlback. 2006b. Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:295-304.
- Hafizi, S., A. Gustafsson, J. Stenhoff, and B. Dahlback. 2005. The Ran binding protein RanBPM interacts with Axl and Sky receptor tyrosine kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:2344-56.
- Hall, M.O., M.S. Obin, M.J. Heeb, B.L. Burgess, and T.A. Abrams. 2005. Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 81:581-91.
- Hall, M.O., M.S. Obin, A.L. Prieto, B.L. Burgess, and T.A. Abrams. 2002. Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro. *Exp Eye Res.* 75:391-400.
- Hall, M.O., A.L. Prieto, M.S. Obin, T.A. Abrams, B.L. Burgess, M.J. Heeb, and B.J. Agnew. 2001. Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp Eye Res.* 73:509-20.
- Han, X. 2005. Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2:65-77.
- Hanayama, R., M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama, and S. Nagata. 2004. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science.* 304:1147-50.
- Handford, P.A., M. Baron, M. Mayhew, A. Willis, T. Beesley, G.G. Brownlee, and I.D. Campbell. 1990. The first EGF-like domain from human factor IX contains a high-affinity calcium binding site. *Embo J.* 9:475-80.
- Hara, K., Y. Akiyama, T. Nakamura, S. Murota, and I. Morita. 1995. The inhibitory effect of vitamin K2 (menatetrenone) on bone resorption may be related to its side chain. *Bone.* 16:179-84.
- He, X., L. Shen, A. Bjartell, and B. Dahlback. 1995. The gene encoding vitamin K-dependent anticoagulant protein S is expressed in multiple rabbit organs as demonstrated by northern blotting, in situ hybridization, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 43:85-96.
- Heavey, A.M., M.P. Philpot, A.H. Fensom, M. Jackson, and J.L. Crammer. 1990. Leucocyte arylsulphatase A activity and subtypes of chronic schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand.* 82:55-9.
- Heiring, C., B. Dahlback, and Y.A. Muller. 2004. Ligand recognition and homophilic interactions in Tyro3: structural insights into the Axl/Tyro3 receptor tyrosine kinase family. *J Biol Chem.* 279:6952-8.
- Hitoshi, S., N. Maruta, M. Higashi, A. Kumar, N. Kato, and K. Ikenaka. 2007. Antidepressant drugs reverse the loss of adult neural stem cells following chronic stress. *J Neurosci Res.* 85:3574-85.

- Hoehn, H.J., Y. Kress, A. Sohn, C.F. Brosnan, S. Bourdon, and B. Shafit-Zagardo. 2008. Axl-/- mice have delayed recovery and prolonged axonal damage following cuprizone toxicity. *Brain Res.* 1240:1-11.
- Hoglinger, G.U., P. Rizk, M.P. Muriel, C. Duyckaerts, W.H. Oertel, I. Caille, and E.C. Hirsch. 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci.* 7:726-35.
- Holland, S.J., M.J. Powell, C. Franci, E.W. Chan, A.M. Frier, R.E. Atchison, J. McLaughlin, S.E. Swift, E.S. Pali, G. Yam, S. Wong, J. Lasaga, M.R. Shen, S. Yu, W. Xu, Y. Hitoshi, J. Bogenberger, J.E. Nor, D.G. Payan, and J.B. Lorens. 2005. Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res.* 65:9294-303.
- Huang, M., A.C. Rigby, X. Morelli, M.A. Grant, G. Huang, B. Furie, B. Seaton, and B.C. Furie. 2003. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat Struct Biol.* 10:751-6.
- Hutterer, M., P. Knyazev, A. Abate, M. Reschke, H. Maier, N. Stefanova, T. Knyazeva, V. Barbieri, M. Reindl, A. Muigg, H. Kostron, G. Stockhammer, and A. Ullrich. 2008. Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 14:130-8.
- Imura, T., H.I. Kornblum, and M.V. Sofroniew. 2003. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci.* 23:2824-32.
- Ip, N.Y., J. McClain, N.X. Barrezaeta, T.H. Aldrich, L. Pan, Y. Li, S.J. Wiegand, B. Friedman, S. Davis, and G.D. Yancopoulos. 1993. The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron.* 10:89-102.
- Ishii, Y., Y. Matsumoto, R. Watanabe, M. Elmi, T. Fujimori, J. Nissen, Y. Cao, Y. Nabeshima, M. Sasahara, and K. Funa. 2008. Characterization of neuroprogenitor cells expressing the PDGF beta-receptor within the subventricular zone of postnatal mice. *Mol Cell Neurosci.* 37:507-18.
- Jackson, E.L., J.M. Garcia-Verdugo, S. Gil-Perotin, M. Roy, A. Quinones-Hinojosa, S. VandenBerg, and A. Alvarez-Buylla. 2006. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron.* 51:187-99.
- Jamison, C.S., S.A. McDowell, R.A. Marlar, and S.J. Degen. 1995. Developmental expression of protein C and protein S in the rat. *Thromb Res.* 78:407-19.
- Janes, R.W. 2005. alpha-Conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses. *Curr Opin Pharmacol.* 5:280-92.
- Jiang, J., V. Kini, N. Belikova, B.F. Serinkan, G.G. Borisenko, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, and V.E. Kagan. 2004. Cytochrome c release is required for phosphatidylserine peroxidation during Fas-triggered apoptosis in lung epithelial A549 cells. *Lipids.* 39:1133-42.
- Jin, K., Y. Zhu, Y. Sun, X.O. Mao, L. Xie, and D.A. Greenberg. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11946-50.
- Johnson, G.V., and R.S. Jope. 1992. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *J Neurosci Res.* 33:505-12.
- Josephs, K.A., J.L. Holton, M.N. Rossor, H. Braendgaard, T. Ozawa, N.C. Fox, R.C. Petersen, G.S. Pearl, M. Ganguly, P. Rosa, H. Laursen, J.E. Parisi, G. Waldemar, N.P. Quinn, D.W. Dickson, and T. Revesz. 2003. Neurofilament inclusion body disease: a new proteinopathy? *Brain.* 126:2291-303.

- Kaneko, N., H. Okano, and K. Sawamoto. 2006. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. *Genes Cells*. 11:1145-59.
- Kaplan, L.C. 1985. Congenital Dandy Walker malformation associated with first trimester warfarin: a case report and literature review. *Teratology*. 32:333-7.
- Katagiri, M., Y. Hakeda, D. Chikazu, T. Ogasawara, T. Takato, M. Kumegawa, K. Nakamura, and H. Kawaguchi. 2001. Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem*. 276:7376-82.
- Kimelberg, H.K. 2004. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience*. 129:851-60.
- Kippin, T.E., D.J. Martens, and D. van der Kooy. 2005. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev*. 19:756-67.
- Kiss, J.Z., and G. Rougon. 1997. Cell biology of polysialic acid. *Curr Opin Neurobiol*. 7:640-6.
- Koshihara, Y., K. Hoshi, and M. Shiraki. 1993. Vitamin K2 (menatetrenone) inhibits prostaglandin synthesis in cultured human osteoblast-like periosteal cells by inhibiting prostaglandin H synthase activity. *Biochem Pharmacol*. 46:1355-62.
- Kuhlmann-Krieg, S., I. Sommer, and M. Schachner. 1988. Ultrastructural features of cultured oligodendrocytes expressing stage-specific cell-surface antigens. *Brain Res*. 467:269-80.
- Kulman, J.D., J.E. Harris, B.A. Haldeman, and E.W. Davie. 1997. Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:9058-62.
- Kulman, J.D., J.E. Harris, L. Xie, and E.W. Davie. 2001. Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1370-5.
- Kuriyama, S., M. Hitomi, H. Yoshiji, T. Nonomura, T. Tsujimoto, A. Mitoro, T. Akahane, M. Ogawa, S. Nakai, A. Deguchi, T. Masaki, and N. Uchida. 2005. Vitamins K2, K3 and K5 exert in vivo antitumor effects on hepatocellular carcinoma by regulating the expression of G1 phase-related cell cycle molecules. *Int J Oncol*. 27:505-11.
- Lai, C., and G. Lemke. 1991. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron*. 6:691-704.
- Leger, A.J., L. Covic, and A. Kuliopulos. 2006. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*. 114:1070-7.
- Lehmann, A.K., S. Sornes, and A. Halstensen. 2000. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 243:229-42.
- Lemke, G., and Q. Lu. 2003. Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr Opin Immunol*. 15:31-6.
- Lemkine, G.F., A. Raj, G. Alfama, N. Turque, Z. Hassani, O. Alegria-Prevot, J. Samarut, G. Levi, and B.A. Demeneix. 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *Faseb J*. 19:863-5.
- Lendahl, U., L.B. Zimmerman, and R.D. McKay. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 60:585-95.
- Leon, A., B. Omri, A. Gely, C. Klein, and P. Crisanti. 2006. QN1/KIAA1009: a new essential protein for chromosome segregation and mitotic spindle assembly. *Oncogene*. 25:1887-95.
- Lev, M., and A.F. Milford. 1972. Effect of vitamin K depletion and restoration on sphingolipid metabolism in *Bacteroides melaninogenicus*. *J Lipid Res*. 13:364-70.

- Levison, S.W., C. Chuang, B.J. Abramson, and J.E. Goldman. 1993. The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development*. 119:611-22.
- Li, J., J.C. Lin, H. Wang, J.W. Peterson, B.C. Furie, B. Furie, S.L. Booth, J.J. Volpe, and P.A. Rosenberg. 2003. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. *J Neurosci*. 23:5816-26.
- Li, R., J. Chen, G. Hammonds, H. Phillips, M. Armanini, P. Wood, R. Bunge, P.J. Godowski, M.X. Sliwowski, and J.P. Mather. 1996. Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci*. 16:2012-9.
- Liliental, J., and D.D. Chang. 1998. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem*. 273:2379-83.
- Lim, D.A., A.D. Tramontin, J.M. Trevejo, D.G. Herrera, J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 28:713-26.
- Linger, R.M., A.K. Keating, H.S. Earp, and D.K. Graham. 2008. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*. 100:35-83.
- Liu, D., H. Guo, J.H. Griffin, J.A. Fernandez, and B.V. Zlokovic. 2003. Protein S confers neuronal protection during ischemic/hypoxic injury in mice. *Circulation*. 107:1791-6.
- Liu, X., Q. Wang, T.F. Haydar, and A. Bordey. 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*. 8:1179-87.
- Locke, D., I.V. Koreen, and A.L. Harris. 2006. Isoelectric points and post-translational modifications of connexin26 and connexin32. *Faseb J*. 20:1221-3.
- Lois, C., and A. Alvarez-Buylla. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2074-7.
- Lois, C., and A. Alvarez-Buylla. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 264:1145-8.
- Lu, Q., M. Gore, Q. Zhang, T. Camenisch, S. Boast, F. Casagrande, C. Lai, M.K. Skinner, R. Klein, G.K. Matsushima, H.S. Earp, S.P. Goff, and G. Lemke. 1999. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*. 398:723-8.
- Lu, Q., and G. Lemke. 2001. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 293:306-11.
- Luo, G., P. Ducy, M.D. McKee, G.J. Pinero, E. Loyer, R.R. Behringer, and G. Karsenty. 1997. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 386:78-81.
- Magnus, T., A. Chan, J. Savill, K.V. Toyka, and R. Gold. 2002. Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications. *J Neuroimmunol*. 130:1-9.
- Mahadevan, D., L. Cooke, C. Riley, R. Swart, B. Simons, K. Della Croce, L. Wisner, M. Iorio, K. Shakalya, H. Garewal, R. Nagle, and D. Bearss. 2007. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 26:3909-19.
- Mahajan, N.P., and H.S. Earp. 2003. An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. *J Biol Chem*. 278:42596-603.
- Maillard, C., M. Berruyer, C.M. Serre, M. Dechavanne, and P.D. Delmas. 1992. Protein-S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology*. 130:1599-604.

- Mallat, M., J.L. Marin-Teva, and C. Cheret. 2005. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Curr Opin Neurobiol.* 15:101-7.
- Manfioletti, G., C. Brancolini, G. Avanzi, and C. Schneider. 1993. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol.* 13:4976-85.
- Mann, K.G., M.E. Nesheim, W.R. Church, P. Haley, and S. Krishnaswamy. 1990. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood.* 76:1-16.
- Mann, K.G., M.E. Nesheim, P.B. Tracy, L.S. Hibbard, and J.W. Bloom. 1982. Assembly of the Prothrombinase Complex. *Biophys J.* 37:106-107.
- Marin-Teva, J.L., I. Dusart, C. Colin, A. Gervais, N. van Rooijen, and M. Mallat. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron.* 41:535-47.
- Mark, M.R., J. Chen, R.G. Hammonds, M. Sadick, and P.J. Godowsk. 1996. Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem.* 271:9785-9.
- Marshall, G.P., 2nd, M. Demir, D.A. Steindler, and E.D. Laywell. 2008. Subventricular zone microglia possess a unique capacity for massive in vitro expansion. *Glia.* 56:1799-808.
- Maslov, A.Y., T.A. Barone, R.J. Plunkett, and S.C. Pruitt. 2004. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci.* 24:1726-33.
- Maurer, M.H., W.K. Tripps, R.E. Feldmann, Jr., and W. Kuschinsky. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci Lett.* 344:165-8.
- McCloskey, P., Y.W. Fridell, E. Attar, J. Villa, Y. Jin, B. Varnum, and E.T. Liu. 1997. GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J Biol Chem.* 272:23285-91.
- McIntosh, J.M., B.M. Olivera, L.J. Cruz, and W.R. Gray. 1984. Gamma-carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J Biol Chem.* 259:14343-6.
- Melaragno, M.G., M.E. Cavet, C. Yan, L.K. Tai, Z.G. Jin, J. Haendeler, and B.C. Berk. 2004. Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol.* 37:881-7.
- Memberg, S.P., and A.K. Hall. 1995. Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *J Neurobiol.* 27:26-43.
- Menezes, J.R., C.M. Smith, K.C. Nelson, and M.B. Luskin. 1995. The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Mol Cell Neurosci.* 6:496-508.
- Mizuta, T., I. Ozaki, Y. Eguchi, T. Yasutake, S. Kawazoe, K. Fujimoto, and K. Yamamoto. 2006. The effect of menatetrenone, a vitamin K2 analog, on disease recurrence and survival in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment: a pilot study. *Cancer.* 106:867-72.
- Molofsky, A.V., S.G. Slutsky, N.M. Joseph, S. He, R. Pardal, J. Krishnamurthy, N.E. Sharpless, and S.J. Morrison. 2006. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature.* 443:448-52.
- Morshead, C.M., C.G. Craig, and D. van der Kooy. 1998. In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development.* 125:2251-61.
- Morshead, C.M., A.D. Garcia, M.V. Sofroniew, and D. van Der Kooy. 2003. The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci.* 18:76-84.

- Morshead, C.M., B.A. Reynolds, C.G. Craig, M.W. McBurney, W.A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, and D. van der Kooy. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*. 13:1071-82.
- Murshed, M., T. Schinke, M.D. McKee, and G. Karsenty. 2004. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol*. 165:625-30.
- Nagata, K., K. Ohashi, T. Nakano, H. Arita, C. Zong, H. Hanafusa, and K. Mizuno. 1996. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 271:30022-7.
- Nakamura, M., H. Masuda, J. Horii, K. Kuma, N. Yokoyama, T. Ohba, H. Nishitani, T. Miyata, M. Tanaka, and T. Nishimoto. 1998a. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol*. 143:1041-52.
- Nakamura, Y.S., Y. Hakeda, N. Takakura, T. Kameda, I. Hamaguchi, T. Miyamoto, S. Kakudo, T. Nakano, M. Kumegawa, and T. Suda. 1998b. Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem Cells*. 16:229-38.
- Nakano, T., Y. Ishimoto, J. Kishino, M. Umeda, K. Inoue, K. Nagata, K. Ohashi, K. Mizuno, and H. Arita. 1997. Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem*. 272:29411-4.
- Neubauer, A., A. Fiebler, D.K. Graham, J.P. O'Bryan, C.A. Schmidt, P. Barckow, S. Serke, W. Siegert, H.R. Snodgrass, D. Huhn, and et al. 1994. Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood*. 84:1931-41.
- Neumann, H., M.R. Kotter, and R.J. Franklin. 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*. 132:288-95.
- Newman, P., and M.J. Shearer. 1998. Vitamin K metabolism. *Subcell Biochem*. 30:455-88.
- Nguyen-Legros, J., and D. Hicks. 2000. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol*. 196:245-313.
- Nicoleau, C., O. Benzakour, F. Agasse, N. Thiriet, J. Petit, L. Prestoz, M. Roger, M. Jaber, and V. Coronas. 2009. Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal. *Stem Cells*. 27:408-19.
- O'Bryan, J.P., Y.W. Fridell, R. Koski, B. Varnum, and E.T. Liu. 1995. The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem*. 270:551-7.
- O'Bryan, J.P., R.A. Frye, P.C. Cogswell, A. Neubauer, B. Kitch, C. Prokop, R. Espinosa, 3rd, M.M. Le Beau, H.S. Earp, and E.T. Liu. 1991. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 11:5016-31.
- Ohashi, K., K. Nagata, J. Toshima, T. Nakano, H. Arita, H. Tsuda, K. Suzuki, and K. Mizuno. 1995. Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem*. 270:22681-4.
- Oshima, Y., S. Oshima, H. Nambu, S. Kachi, S.F. Hackett, M. Melia, M. Kaleko, S. Connelly, N. Esumi, D.J. Zack, and P.A. Campochiaro. 2004. Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*. 201:393-400.
- Packer, M.A., Y. Stasiv, A. Benraiss, E. Chmielnicki, A. Grinberg, H. Westphal, S.A. Goldman, and G. Enikolopov. 2003. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:9566-71.

- Palmer, T.D., J. Takahashi, and F.H. Gage. 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 8:389-404.
- Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 425:479-94.
- Pati, S., and G.D. Helmbrecht. 1994. Congenital schizencephaly associated with in utero warfarin exposure. *Reprod Toxicol.* 8:115-20.
- Pender, M.P., and M.J. Rist. 2001. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia.* 36:137-44.
- Penfold, P.L., J.G. Wong, J. Gyory, and F.A. Billson. 2001. Effects of triamcinolone acetonide on microglial morphology and quantitative expression of MHC-II in exudative age-related macular degeneration. *Clin Experiment Ophthalmol.* 29:188-92.
- Peretto, P., A. Merighi, A. Fasolo, and L. Bonfanti. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull.* 42:9-21.
- Pierce, A., B. Bliesner, M. Xu, S. Nielsen-Preiss, G. Lemke, S. Tobet, and M.E. Wierman. 2008. Axl and Tyro3 modulate female reproduction by influencing gonadotropin-releasing hormone neuron survival and migration. *Mol Endocrinol.* 22:2481-95.
- Pierre-Jacques, H., C.J. Glueck, M.A. Mont, and D.S. Hungerford. 1997. Familial heterozygous protein-S deficiency in a patient who had multifocal osteonecrosis. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* 79:1079-84.
- Platel, J.C., B. Lacar, and A. Bordey. 2007. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Histol.* 38:303-11.
- Plaza, S.M., and D.W. Lamson. 2005. Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Altern Med Rev.* 10:24-35.
- Prasad, D., C.V. Rothlin, P. Burrola, T. Burstyn-Cohen, Q. Lu, P. Garcia de Frutos, and G. Lemke. 2006a. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci.* 33:96-108.
- Prasad, D., C.V. Rothlin, P. Burrola, T. Burstyn-Cohen, Q. Lu, P. Garcia de Frutos, and G. Lemke. 2006b. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci.*
- Preissner, K.T., P.P. Nawroth, and S.M. Kanse. 2000. Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol.* 190:360-72.
- Presse, N., B. Shatenstein, M.J. Kergoat, and G. Ferland. 2008. Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease. *J Am Diet Assoc.* 108:2095-9.
- Price, P.A., J.D. Fraser, and G. Metz-Virca. 1987. Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:8335-9.
- Prieto, A.L., S. O'Dell, B. Varnum, and C. Lai. 2007. Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons. *Neuroscience.* 150:319-34.
- Prieto, A.L., J.L. Weber, and C. Lai. 2000. Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and mer in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 425:295-314.
- Prieto, A.L., J.L. Weber, S. Tracy, M.J. Heeb, and C. Lai. 1999. Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res.* 816:646-61.
- Proudfoot, D., J.N. Skepper, C.M. Shanahan, and P.L. Weissberg. 1998. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:379-88.
- Rabinovitch, M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 5:85-7.

- Raghavan, S.S., A. Gajewski, and E.H. Kolodny. 1981. Leukocyte sulfatidase for the reliable diagnosis of metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem.* 36:724-31.
- Ravichandran, K.S. 2003. "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell.* 113:817-20.
- Reddi, K., B. Henderson, S. Meghji, M. Wilson, S. Poole, C. Hopper, M. Harris, and S.J. Hodges. 1995. Interleukin 6 production by lipopolysaccharide-stimulated human fibroblasts is potently inhibited by naphthoquinone (vitamin K) compounds. *Cytokine.* 7:287-90.
- Redzic, Z.B., and M.B. Segal. 2004. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv Drug Deliv Rev.* 56:1695-716.
- Reynolds, B.A., and S. Weiss. 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 255:1707-10.
- Rios, H., S.V. Koushik, H. Wang, J. Wang, H.M. Zhou, A. Lindsley, R. Rogers, Z. Chen, M. Maeda, A. Kruzynska-Frejtak, J.Q. Feng, and S.J. Conway. 2005. periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Mol Cell Biol.* 25:11131-44.
- Roky, R., L. Paut-Pagano, V. Goffin, K. Kitahama, J.L. Valatx, P.A. Kelly, and M. Jouvet. 1996. Distribution of prolactin receptors in the rat forebrain. Immunohistochemical study. *Neuroendocrinology.* 63:422-9.
- Romero, E.E., L.J. Velazquez-Estades, R. Deo, B. Schapiro, and D.A. Roth. 1998. Cloning of rat vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase and developmentally regulated gene expression in postimplantation embryos. *Exp Cell Res.* 243:334-46.
- Rost, S., A. Fregin, M. Hunerberg, C.G. Bevans, C.R. Muller, and J. Oldenburg. 2005. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thromb Haemost.* 94:780-6.
- Rost, S., A. Fregin, V. Ivaskevicius, E. Conzelmann, K. Hortnagel, H.J. Pelz, K. Lappegard, E. Seifried, I. Scharrer, E.G. Tuddenham, C.R. Muller, T.M. Strom, and J. Oldenburg. 2004. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* 427:537-41.
- Rothlin, C.V., S. Ghosh, E.I. Zuniga, M.B. Oldstone, and G. Lemke. 2007. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell.* 131:1124-36.
- Ruiz i Altaba, A., V. Palma, and N. Dahmane. 2002. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci.* 3:24-33.
- Sainaghi, P.P., L. Castello, L. Bergamasco, M. Galletti, P. Bellosta, and G.C. Avanzi. 2005. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol.* 204:36-44.
- Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, and M.S. Berger. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 353:811-22.
- Sasaki, T., P.G. Knyazev, N.J. Clout, Y. Cheburkin, W. Gohring, A. Ullrich, R. Timpl, and E. Hohenester. 2006. Structural basis for Gas6-Axl signalling. *Embo J.* 25:80-7.
- Satoh, M., and T. Yoshida. 1997. Promotion of neurogenesis in mouse olfactory neuronal progenitor cells by leukemia inhibitory factor in vitro. *Neurosci Lett.* 225:165-8.
- Schwesinger, C., C. Yee, R.M. Rohan, A.M. Jousen, A. Fernandez, T.N. Meyer, V. Poulaki, J.J. Ma, T.M. Redmond, S. Liu, A.P. Adamis, and R.J. D'Amato. 2001. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol.* 158:1161-72.
- Scott, R.S., E.J. McMahon, S.M. Pop, E.A. Reap, R. Caricchio, P.L. Cohen, H.S. Earp, and G.K. Matsushima. 2001. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature.* 411:207-11.

- Seaberg, R.M., and D. van der Kooy. 2002. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J Neurosci.* 22:1784-93.
- Seitz, H.M., T.D. Camenisch, G. Lemke, H.S. Earp, and G.K. Matsushima. 2007. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol.* 178:5635-42.
- Seki, T., and Y. Arai. 1993. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci.* 13:2351-8.
- Seroogy, K.B., C.M. Gall, D.C. Lee, and H.I. Kornblum. 1995. Proliferative zones of postnatal rat brain express epidermal growth factor receptor mRNA. *Brain Res.* 670:157-64.
- Shankar, S.L., K. O'Guin, M. Cammer, F.A. McMorris, T.N. Stitt, R.S. Basch, B. Varnum, and B. Shafit-Zagardo. 2003. The growth arrest-specific gene product Gas6 promotes the survival of human oligodendrocytes via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Neurosci.* 23:4208-18.
- Shankar, S.L., K. O'Guin, M. Kim, B. Varnum, G. Lemke, C.F. Brosnan, and B. Shafit-Zagardo. 2006. Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Neurosci.* 26:5638-48.
- Sharif, M.N., D. Sosic, C.V. Rothlin, E. Kelly, G. Lemke, E.N. Olson, and L.B. Ivashkiv. 2006. Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. *J Exp Med.* 203:1891-901.
- Shearer, M.J., and P. Newman. 2008. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb Haemost.* 100:530-47.
- Shen, Q., S.K. Goderie, L. Jin, N. Karanth, Y. Sun, N. Abramova, P. Vincent, K. Pumiglia, and S. Temple. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 304:1338-40.
- Shen, Q., Y. Wang, E. Kokovay, G. Lin, S.M. Chuang, S.K. Goderie, B. Roysam, and S. Temple. 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell.* 3:289-300.
- Shimazaki, T., T. Shingo, and S. Weiss. 2001. The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 21:7642-53.
- Shingo, T., C. Gregg, E. Enwere, H. Fujikawa, R. Hassam, C. Geary, J.C. Cross, and S. Weiss. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science.* 299:117-20.
- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359:843-5.
- Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 417:39-44.
- Staflin, K., T. Zuchner, G. Honeth, A. Darabi, and C. Lundberg. 2009. Identification of proteins involved in neural progenitor cell targeting of gliomas. *BMC Cancer.* 9:206.
- Stenhoff, J., B. Dahlback, and S. Hafizi. 2004. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 319:871-8.
- Stitt, T.N., G. Conn, M. Gore, C. Lai, J. Bruno, C. Radziejewski, K. Mattsson, J. Fisher, D.R. Gies, P.F. Jones, and et al. 1995. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell.* 80:661-70.
- Sundaram, K.S., and M. Lev. 1988. Warfarin administration reduces synthesis of sulfatides and other sphingolipids in mouse brain. *J Lipid Res.* 29:1475-9.

- Sundaram, K.S., and M. Lev. 1990. Regulation of sulfotransferase activity by vitamin K in mouse brain. *Arch Biochem Biophys.* 277:109-13.
- Suttie, J.W. 1995. The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 15:399-417.
- Suzuki, T., S. Izumoto, K. Wada, Y. Fujimoto, M. Maruno, M. Yamasaki, Y. Kanemura, T. Shimazaki, H. Okano, and T. Yoshimine. 2005. Inhibition of glioma cell proliferation by neural stem cell factor. *J Neurooncol.* 74:233-9.
- Sweatt, A., D.C. Sane, S.M. Hutson, and R. Wallin. 2003. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost.* 1:178-85.
- Szulc, P., M.C. Chapuy, P.J. Meunier, and P.D. Delmas. 1996. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture: a three year follow-up study. *Bone.* 18:487-8.
- Tanabe, K., K. Nagata, K. Ohashi, T. Nakano, H. Arita, and K. Mizuno. 1997. Roles of gamma-carboxylation and a sex hormone-binding globulin-like domain in receptor-binding and in biological activities of Gas6. *FEBS Lett.* 408:306-10.
- Taupin, P., and F.H. Gage. 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res.* 69:745-9.
- Thijssen, H.H., and M.J. Drittij-Reijnders. 1996. Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phyloquinone and menaquinone-4. *Br J Nutr.* 75:121-7.
- Thomas, D.D., K.J. Krzykowski, J.A. Engelke, and G.E. Groblewski. 2004. Exocrine pancreatic secretion of phospholipid, menaquinone-4, and caveolin-1 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 319:974-9.
- Tobe, T., S. Ortega, J.D. Luna, H. Ozaki, N. Okamoto, N.L. Derevjani, S.A. Vinore, C. Basilico, and P.A. Campochiaro. 1998. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol.* 153:1641-6.
- Todt, J.C., B. Hu, and J.L. Curtis. 2004. The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages. *J Leukoc Biol.* 75:705-13.
- Tomobe, Y.I., H. Hama, T. Sakurai, A. Fujimori, Y. Abe, and K. Goto. 1996. Anticoagulant factor protein S inhibits the proliferation of rat astrocytes after injury. *Neurosci Lett.* 214:57-60.
- Torroglosa, A., M. Murillo-Carretero, C. Romero-Grimaldi, E.R. Matarredona, A. Campos-Caro, and C. Estrada. 2007. Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells.* 25:88-97.
- Tropepe, V., C.G. Craig, C.M. Morshead, and D. van der Kooy. 1997. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci.* 17:7850-9.
- Tuppo, E.E., and H.R. Arias. 2005. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:289-305.
- Vajkoczy, P., P. Knyazev, A. Kunkel, H.H. Capelle, S. Behrndt, H. von Tengg-Kobligk, F. Kiessling, U. Eichelsbacher, M. Essig, T.A. Read, R. Erber, and A. Ullrich. 2006. Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:5799-804.
- van Ginkel, P.R., R.L. Gee, R.L. Shearer, L. Subramanian, T.M. Walker, D.M. Albert, L.F. Meisner, B.C. Varnum, and A.S. Polans. 2004. Expression of the receptor tyrosine kinase Axl promotes ocular melanoma cell survival. *Cancer Res.* 64:128-34.
- Van Kampen, J.M., T. Hagg, and H.A. Robertson. 2004. Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D3 receptor stimulation. *Eur J Neurosci.* 19:2377-87.

- Vargas, M.E., and B.A. Barres. 2007. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci.* 30:153-79.
- Vasse, M. 2008. Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb Haemost.* 100:548-56.
- Vecchi, A., C. Garlanda, M.G. Lampugnani, M. Resnati, C. Matteucci, A. Stoppacciaro, H. Schnurch, W. Risau, L. Ruco, A. Mantovani, and et al. 1994. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol.* 63:247-54.
- Villoutreix, B.O., P. Garcia de Frutos, M. Lovenklev, S. Linse, P. Fernlund, and B. Dahlback. 1997. SHBG region of the anticoagulant cofactor protein S: secondary structure prediction, circular dichroism spectroscopy, and analysis of naturally occurring mutations. *Proteins.* 29:478-91.
- Wajih, N., S.M. Hutson, and R. Wallin. 2007. Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction. *J Biol Chem.* 282:2626-35.
- Wajih, N., D.C. Sane, S.M. Hutson, and R. Wallin. 2004. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem.* 279:25276-83.
- Wajih, N., D.C. Sane, S.M. Hutson, and R. Wallin. 2005. Engineering of a recombinant vitamin K-dependent gamma-carboxylation system with enhanced gamma-carboxyglutamic acid forming capacity: evidence for a functional CXXC redox center in the system. *J Biol Chem.* 280:10540-7.
- Wallin, R., D. Cain, S.M. Hutson, D.C. Sane, and R. Loeser. 2000. Modulation of the binding of matrix Gla protein (MGP) to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Thromb Haemost.* 84:1039-44.
- Wallin, R., and S.M. Hutson. 2004. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med.* 10:299-302.
- Wallin, R., S.M. Hutson, D. Cain, A. Sweatt, and D.C. Sane. 2001. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *Faseb J.* 15:2542-4.
- Wang, Y., J. Yang, H. Zheng, G.J. Tomasek, P. Zhang, P.E. McKeever, E.Y. Lee, and Y. Zhu. 2009. Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer Cell.* 15:514-26.
- Weiss, S., C. Dunne, J. Hewson, C. Wohl, M. Wheatley, A.C. Peterson, and B.A. Reynolds. 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* 16:7599-609.
- Wilkinson, B., and H.F. Gilbert. 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 1699:35-44.
- Wu, W., J.D. Bancroft, and J.W. Suttie. 1997. Structural features of the kringle domain determine the intracellular degradation of under-gamma-carboxylated prothrombin: studies of chimeric rat/human prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13654-60.
- Wu, Y., S. Singh, M.M. Georgescu, and R.B. Birge. 2005. A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci.* 118:539-53.
- Wu, Y., N. Tibrewal, and R.B. Birge. 2006. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol.* 16:189-97.
- Xiong, W., Y. Chen, H. Wang, H. Wang, H. Wu, Q. Lu, and D. Han. 2008. Gas6 and the Tyro 3 receptor tyrosine kinase subfamily regulate the phagocytic function of Sertoli cells. *Reproduction.* 135:77-87.
- Yagami, T., K. Ueda, K. Asakura, N. Okamura, T. Sakaeda, G. Sakaguchi, N. Itoh, Y. Hashimoto, T. Nakano, and M. Fujimoto. 2003. Effect of Gas6 on secretory phospholipase A(2)-IIA-induced apoptosis in cortical neurons. *Brain Res.* 985:142-9.

- Yanagita, M., Y. Ishimoto, H. Arai, K. Nagai, T. Ito, T. Nakano, D.J. Salant, A. Fukatsu, T. Doi, and T. Kita. 2002. Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest.* 110:239-46.
- Yang, P., S.A. Arnold, A. Habas, M. Hetman, and T. Hagg. 2008. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci.* 28:2231-41.
- Yang, X., and P.N. Walsh. 2005. An ordered sequential mechanism for Factor IX and Factor IXa binding to platelet receptors in the assembly of the Factor X-activating complex. *Biochem J.* 390:157-67.
- Young, K.M., T.D. Merson, A. Sotthibundhu, E.J. Coulson, and P.F. Bartlett. 2007. p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. *J Neurosci.* 27:5146-55.
- Young, R.W., and D. Bok. 1969. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol.* 42:392-403.
- Yuan, H.Y., J.J. Chen, M.T. Lee, J.C. Wung, Y.F. Chen, M.J. Charng, M.J. Lu, C.R. Hung, C.Y. Wei, C.H. Chen, J.Y. Wu, and Y.T. Chen. 2005. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet.* 14:1745-51.
- Zebboudj, A.F., M. Imura, and K. Bostrom. 2002. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem.* 277:4388-94.
- Zhang, B., and D. Ginsburg. 2004. Familial multiple coagulation factor deficiencies: new biologic insight from rare genetic bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2:1564-72.
- Zhang, P., and J.W. Suttie. 1994. Prothrombin synthesis and degradation in rat hepatoma (H-35) cells: effects of warfarin. *Blood.* 84:169-75.
- Zigova, T., V. Pencea, S.J. Wiegand, and M.B. Luskin. 1998. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci.* 11:234-45.

ANNEXE 1

Revue

Gas-6 and protein S: vitamin K-dependent factors and ligands for the TAM tyrosine kinase receptors family.

Benzakour O., Gely A., Lara R., Coronas V.

ANNEXE 2

Article

A constitutive vitamin K-dependent mechanism inhibits subventricular zone neural stem cell proliferation.

Aurore Gely*, Valérie Coronas*, Laetitia Prestoz, Jean Marc Berjeaud, Arnaud Monvoisin,
Anaïs Noblanc, Pablo García de Frutos, Michel Philippe and Omar Benzakour.

,

Implication des protéines vitamine K-dépendantes dans la régulation de l'activité des cellules souches du cerveau et dans la réparation de la lésion rétinienne chez le rongeur adulte.

Les protéines vitamine K-dépendantes (PVKDs) sont une famille de protéines connues pour leur implication dans la régulation de la coagulation sanguine. Leur activité dépend d'une modification post-traductionnelle, la γ -carboxylation qui est inhibée par la warfarine. Deux PVKDs, les protéines S et Gas6 ont été identifiées comme ligands des récepteurs tyrosine kinase de la famille TAM. L'étude menée chez les souris invalidées pour ces récepteurs suggère une implication des PVKDs dans la neurogenèse. Chez les rongeurs, la neurogenèse assurée par les cellules souches neurales (CSN) persiste à l'âge adulte dans quelques régions cérébrales dont la zone sous-ventriculaire (SVZ). Mon travail de thèse a eu pour objectif majeur de comprendre l'effet des PVKDs sur l'activité des CSN de la SVZ mais aussi l'implication de la protéine Gas6 dans la rétinogenèse.

Nos résultats montrent que l'inhibition de la sécrétion des PVKDs par la warfarine stimule la prolifération des CSN. En outre, nous montrons que les récepteurs TAM et leurs ligands sont exprimés par les CSN et dans le LCR, que la protéine S exogène inverse les effets de la warfarine et que l'absence de la protéine Gas6 chez les souris Gas6^{-/-} induit une réduction de la prolifération des CSN. L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence l'implication des PVKDs dans la régulation de la prolifération des CSN.

La deuxième partie de ce travail montre que les CSN possèdent une activité phagocytaire basale qui est stimulée par la protéine S. La troisième partie de ce travail montre que chez les souris Gas6^{-/-} soumises à une lésion rétinienne, la prolifération cellulaire permettant la réparation de la lésion est moins importante que chez des souris sauvages.

Involvement of vitamin K-dependent protein in regulation of the activity of brain stem cells and repair of the retinal lesion in adult rodents.

Vitamin K-dependent protein (VKDPs) is a family of proteins known for their involvement in the regulation of blood coagulation. Their activity depends on post-translational modification, the γ -carboxylation, which is inhibited by warfarin. Two VKDPs, protein S and Gas6 have been identified as ligands of TAM receptor tyrosine kinase family. The study lead in mice invalidated for these receptors suggests the involvement of VKDPs in neurogenesis. In rodents, neurogenesis provided by neural stem cells (NSC) persists into adulthood in several brain regions including the subventricular zone (SVZ). My thesis had the main objective to understand the effect of VKDPs on NSC activity of the SVZ but also the involvement of Gas6 protein in retinogenesis.

Our results show that the inhibition of VKDPs secretion by warfarin stimulates NSC proliferation. In addition, we show that TAM receptors and their ligands are expressed by NSC and in CSF, that exogenous protein S reverses the warfarin effects and that absence of Gas6 protein in Gas6^{-/-} mice induced a reduction of NSC proliferation. All these results revealed the involvement of VKDPs in the regulation of NSC proliferation. The second part of this work shows that NSC have a basal phagocytosis activity that is stimulated by protein S. The third part of this work shows that Gas6^{-/-} mice subject to a retinal lesion, cell proliferation to repair the damage is less important than in wild mice.

Doctorat de l'Université de Poitiers-Discipline : Biologie Cellulaire

Mots clés : Protéine vitamine K-dépendante, warfarine, prolifération, différenciation, cellules souches, cerveau, phagocytose, lésion, rétine

CNRS UMR 6187, Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires
Université de Poitiers-40, Avenue du Recteur Pineau, 86022 **POITIERS** Cedex