

# *Université Louis Pasteur*

---

## *Thèse de Sciences*

*Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

---

*Présentée par*

*Frédéric BERNARD*

*Pour l'obtention du titre de*

*Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg*

---

# *Rôle du pH intracellulaire dans le contrôle de la différenciation des cellules oligodendrocytaires*

---

*Soutenue le 31 octobre 2003 devant la commission d'examen :*

*Rapporteur externe : Prof. Catherine LUBETZKI*

*Rapporteur externe : Dr. Michel PUCÉAT*

*Rapporteur interne : Prof. Rémy SCHLICHTER*

*Directeur de thèse : Dr. Dominique AUNIS*

*Examineur : Dr. Stéphane GAILLARD*

## *Sommaire*

<i>Avant-propos</i>	8
<i>Etude bibliographique</i>	12
<i>A. Marqueurs du lignage oligodendrocytaire</i>	12
1. Les protéolipides (PLP et DM-20)	12
2. Le récepteur $\alpha$ du "Platelet-Derived Growth Factor" (PDGFR $\alpha$ )	13
3. Le disialoganglioside GD3	13
4. L'anticorps monoclonal A2B5	13
5. Les sulfatides	14
6. Les glycolipides	14
7. Les protéines basiques de la myéline (MBP)	14
8. Les glycoprotéines associée à la myéline (MAG)	15
9. La glycoprotéine des oligodendrocytes (MOG)	16
10. La 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase (CNP)	16
11. Autres protéines	17
<i>B. Origine et différenciation des oligodendrocytes</i>	18
1. Origine	18
1.1. La moelle épinière	18
1.2. L'encéphale	19
2. Développement des cellules oligodendrocytaires	19
2.1. Migration	19
2.2. Différenciation	20
2.2.1. Aspects antigéniques	20
3. Régulation du développement des oligodendrocytes	21
3.1 Le "Platelet-Derived Growth Factor" (PDGF)	21
3.1.1. Les récepteurs du PDGF	21
3.1.2 Rôle du PDGF	22

<b>3.2. Le "basic Fibroblast Growth Factor" (bFGF)</b>	23
3.2.1. bFGF et développement des oligodendrocytes	24
3.2.2. Les récepteurs du FGF, expression et régulation	25
<b>3.3. L'"Insulin-like Growth Factor I" (IGF-I)</b>	25
<b>3.4. Les Hormones thyroïdiennes</b>	26
<b>3.5. Neurotransmetteurs et oligodendrocytes</b>	26
3.5.1. Le glutamate	26
3.5.2. La noradrénaline (NA)	27
3.5.3. La dopamine	27
3.5.4. L'acide gamma-aminobutyric (GABA)	28
3.5.5. L'acétylcholine (ACh)	28
3.5.6. Autres neurotransmetteurs	29
<b>3.6. Signalisation intracellulaire</b>	29
3.6.1. La voie des Protéines kinases C (PKC)	29
3.6.1.1. OLP et pré-oligodendrocytes	30
3.6.1.2. Cellules matures	30
3.6.1.3. Cellules myélinisantes	31
3.6.1.4. Conclusion	31
3.6.2. L'AMPc	33
3.6.3. Cycle cellulaire, rôle de la protéine p27 <sup>kip1</sup>	33
3.6.4. Voie des MAPK	34
<b>C. pH</b>	36
<b>1. Régulation du pH intracellulaire</b>	36
<b>1.1. Pouvoir tampon</b>	36
1.1.1. Origine des mécanismes tampons	36
1.1.2. Quantification du pouvoir tampon cellulaire	37
<b>1.2. Mécanismes de transport des ions H<sup>+</sup></b>	38
1.2.1. L'échangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	39
1.2.1.1. Fonctionnement	39
1.2.1.2. Les différentes isoformes (NHE1-NHE6)	39
1.2.1.3. Régulation de l'activité de l'échangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	40
1.2.2. L'échangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /Cl <sup>-</sup>	42

1.2.2.1. <i>Fonctionnement</i>	42
1.2.2.2. <i>Régulation de l'activité de l'échangeur <math>Na^+/H^+/HCO_3^-/Cl^-</math></i>	42
1.2.3. <i>L'échangeur <math>Cl^-/HCO_3^-</math></i>	43
1.2.3.1. <i>Fonctionnement</i>	43
1.2.3.2. <i>Les différentes isoformes (AE1-3)</i>	43
1.2.3.3. <i>Régulation de l'activité de l'échangeur <math>Cl^-/HCO_3^-</math></i>	43
1.2.4. <i>Le co-transporteur <math>Na^+-HCO_3^-</math> (NBC)</i>	44
1.2.4.1. <i>Fonctionnement</i>	44
1.2.4.2. <i>Régulation de l'activité du co-transporteur <math>Na^+-HCO_3^-</math></i>	45
1.2.4.3. <i>Les différentes isoformes (NBC1-4)</i>	46
1.2.5. <i>Le co-transporteur <math>NO_3^-/H^+</math></i>	47
1.2.5.1. <i>Fonctionnement</i>	47
1.2.5.2. <i>Structure et expression du co-transporteur <math>NO_3^-/H^+</math></i>	48
1.2.5.3. <i>Régulation de l'activité du co-transporteur <math>NO_3^-/H^+</math></i>	48
1.2.6. <i>La pompe <math>H^+-ATPase</math></i>	48
1.2.6.1. <i>Fonctionnement</i>	48
1.2.6.2. <i>Modulation pharmacologique de la pompe <math>H^+-ATPase</math></i>	49
2. <i>pH et fonctions cellulaires</i>	49
2.1. <i>Effets sur les conductances ioniques</i>	49
2.2. <i>Effets sur la transmission synaptique</i>	50
2.3. <i>Effets sur l'excitabilité neuronale</i>	51
2.4. <i>Effets sur la conductance intergliale</i>	51
2.5. <i>Effets sur le métabolisme des cellules gliales</i>	52
3. <i>Rôle de <math>pH_i</math> dans les grandes étapes du développement cellulaire</i>	53
3.1. <i>Prolifération cellulaire</i>	53
3.2. <i>Migration cellulaire</i>	54
3.3. <i>Différenciation cellulaire</i>	56
3.4. <i>Apoptose</i>	56
<b><i>Rationnel de l'étude</i></b>	58
1. <i>Contrôle de la différenciation cellulaire par l'acide rétinoïque</i>	58
1.1. <i>Synthèse et mécanismes d'action</i>	58
1.2. <i>Acide rétinoïque et différenciation cellulaire</i>	59

1.3. <i>Acide rétinoïque et pH intracellulaire</i>	59
2. <i>Effets des molécules de guidage</i>	60
2.1. <i>Les sémaphorines</i>	61
2.2. <i>Récepteurs des sémaphorines et transduction du signal</i>	62
3. <i>Analyse quantitative de la morphologie oligodendrocytaire</i>	63

Bernard F, Bossu JL, Gaillard S (2001) Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *J Neurosci Res* 65:439-445.

<b><i>Matériels et Méthodes</i></b>	64
<b><i>A. Cultures cellulaires et marquages immunocytochimiques</i></b>	64
1. <i>Cultures primaires d'oligodendrocytes</i>	64
1.1. <i>Préparation des boîtes</i>	64
1.2. <i>Mise en culture des cellules de cervelet</i>	64
1.3. <i>Orientation du développement des cellules</i>	65
2. <i>Cultures secondaires d'oligodendrocytes</i>	65
3. <i>Marquages immunocytochimiques</i>	66
3.1. <i>Fixation et perméabilisation des cellules</i>	66
3.2. <i>Blocage des sites non spécifiques</i>	67
3.3. <i>Incubation avec les anticorps primaires</i>	67
3.4. <i>Incubation avec les anticorps secondaires</i>	67
4. <i>Détection de la fluorescence</i>	67
4.1. <i>Principe de la fluorescence</i>	67
5. <i>Dispositif expérimental</i>	68
5.1. <i>Système optique</i>	68
5.2. <i>Système d'acquisition</i>	68
<b><i>B. Mesure de <math>pH_i</math> par microfluorimétrie</i></b>	69
1. <i>La molécule BCECF : un indicateur majeur du pH intracellulaire</i>	69
1.1. <i>Caractéristiques générales</i>	69
1.2. <i>Spécificité de la fluorescence du BCECF</i>	70
1.3. <i>Introduction de la sonde BCECF</i>	71
2. <i>Dispositif expérimental de mesure de <math>pH_i</math></i>	71

2.1. <i>Système optique</i>	71
2.2. <i>Bruit de fond</i>	72
2.3. <i>Acquisition des données</i>	72
2.4. <i>Visualisation des paramètres</i>	73
3. <i>Calcul du pH intracellulaire</i>	73
3.1. <i>Etalonnage des rapports de fluorescence</i>	73
<b>C. <i>Système et solutions de perfusion</i></b>	<b>74</b>
1. <i>Perfusion des cellules</i>	74
2. <i>Solutions de perfusion</i>	74
3. <i>Technique d'acidification par le NH<sub>4</sub><sup>+</sup></i>	75
4. <i>Manipulation expérimentale du pH<sub>i</sub></i>	75
<b>D. <i>Implication fonctionnelle des MAPK ERK1/2</i></b>	<b>76</b>
1. <i>Préparation des cellules</i>	76
1.1. <i>Effets du pH<sub>i</sub></i>	76
1.2. <i>Sema3A et ERK1/2</i>	77
2. <i>Lyse cellulaire</i>	77
3. <i>Dosage des protéines</i>	77
4. <i>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes</i>	77
5. <i>Western Blot</i>	77
<b>E. <i>Calculs</i></b>	<b>78</b>
1. <i>Calcul du pouvoir tampon</i>	78
2. <i>Calcul du flux de proton</i>	79
3. <i>Statistiques</i>	79

<b>Résultats</b>	80
<b>A. Rôle de <math>pH_i</math> lors de la différenciation des OLP induite par l'AR</b>	80
1. Stimulation de la différenciation par l'AR	80
2. L'acide rétinoïque induit une alcalinisation intracellulaire des OLP	80
3. Activation par l'AR de l'échangeur $Na^+/H^+$	81
4. $pH_i$ et différenciation des OLP	82
5. $pH_i$ et signalisation intracellulaire	83
<b>B. Contrôle de l'élaboration de la morphologie cellulaire par le <math>pH_i</math></b>	84
1. Sémaphorine 3A et élaboration de la morphologie oligodendrocytaire	84
1.1. Inhibition de la croissance par la Sema3A	84
1.2. Les oligodendrocytes expriment la plexine A1 (Plex-A1)	85
2. Sema3A et signalisation pH	85
2.1. Contrôle du développement morphologique par le $pH_i$	85
2.2. Effets de la Sema3A sur le cytosquelette	86
2.3. La Sema3A et les voies de signalisation intracellulaires	87
<b>Discussion</b>	88
A. L'AR induit la différenciation par une voie dépendante du $pH_i$	88
B. Le $pH_i$ contrôle la différenciation des OLP	90
C. Le $pH_i$ contrôle l'activité des voies de signalisation	93
D. $pH_i$ et contrôle du cytosquelette	97
<b>Perspectives</b>	105
<b>Bibliographie</b>	108

## ***AVANT-PROPOS***

Les oligodendrocytes présents dans le système nerveux central (SNC) synthétisent une structure membranaire compacte s'enroulant autour des segments axonaux. Cette structure, la myéline, permet la propagation de l'influx nerveux par conduction saltatoire.

La différenciation postnatale des oligodendrocytes aboutit à l'expression de gènes codant des molécules impliquées dans la reconnaissance de l'axone et des protéines spécifiques de la myéline. Parmi les processus du développement du système nerveux, la formation de la myéline est un phénomène tardif parachevant la mise en place des structures nerveuses fonctionnelles. Celle-ci intervient après les phases de prolifération et de migration neuronales, lorsque les neurones ont établis leurs connexions. Chez l'homme, la myélinisation débute entre la 25<sup>ème</sup> et la 30<sup>ème</sup> semaine de vie embryonnaire, pour s'achever à l'adolescence.

Pendant longtemps, on pensa que la seule fonction des oligodendrocytes était la myélinisation des axones, mais ces cellules jouent aussi d'autres rôles. Par exemple, dans l'homéostasie du milieu extracellulaire et la modulation de la transmission synaptique, en faisant varier l'activité des canaux ioniques et des récepteurs exprimés par les neurones. En effet, un des paramètres modulant l'activité de ces protéines est le pH interstitiel ( $\text{pH}_e$ ), il est donc important que celui-ci soit rigoureusement contrôlé (Tombaugh et Somjen, 1996). Le co-transporteur  $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$  exprimé par les oligodendrocytes assure en grande partie la régulation du pH interstitiel. Ce co-transporteur permet en particulier de sécréter des ions  $\text{HCO}_3^-$  dans le milieu interstitiel, en réponse à une acidification de celui-ci, ou d'en éliminer les ions  $\text{HCO}_3^-$  lors d'une alcalinisation (Boussouf et al., 1997). D'autre part, l'activité neuronale génère la libération de  $\text{K}^+$  dans le milieu extracellulaire, induisant une dépolarisation de la membrane des oligodendrocytes voisins. Cette dépolarisation entraîne une augmentation de l'activité du co-transporteur  $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ , et permet l'entrée de  $\text{HCO}_3^-$  dans la cellule (Boussouf et al., 1997). Ce mécanisme est très important au niveau de synapses glutamatergiques. Il a pu être montré que cette entrée permet d'augmenter le pH intracellulaire des oligodendrocytes et ainsi de compenser l'extrusion d'équivalents  $\text{OH}^-$  au travers de transporteurs (GLAST et GLT-1) lors de la recapture du glutamate (Kondo et al., 1995). La présence de ce co-transporteur dans la membrane des oligodendrocytes permet donc à ceux-ci de participer à la régulation du pH extracellulaire et de maintenir le fonctionnement des mécanismes de recapture du glutamate.

De nombreuses maladies nerveuses ont pour origine des dysfonctionnements de la myéline. Ces pathologies sont regroupées en deux grandes catégories, les pathologies démyélinisantes correspondant à la dégradation de la gaine de myéline, c'est le cas de la sclérose en plaque par exemple et les pathologies induisant une dysmyélinisation c'est à dire la production d'une myéline défectueuse comme dans le cas de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher. Dans tous les cas ces pathologies induisent d'importantes perturbations de la conduction nerveuse. Une bonne conduction nerveuse dépend non seulement de l'intégrité structurale de la myéline mais encore de l'interaction de certains constituants de la myéline avec les axones. Par exemple, le long de l'axone entre les manchons de myéline, au niveau des noeuds de Ranvier (zone étroite de l'axone située entre deux gaines de myélines adjacentes), il y a une concentration de canaux sodium permettant la conduction saltatoire de l'influx électrique (potentiel d'action). Cette localisation spécifique des canaux est due au fait que le contact entre la membrane des oligodendrocytes et l'axone induit une suppression des canaux sodium sous la membrane de myéline (Black et al., 1985). Les canaux restants se concentrent donc au niveau des noeuds de Ranvier. Par ailleurs, la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) (un des constituants de la myéline) induit la phosphorylation des neurofilaments des neurones (Filbin, 1996). Cette phosphorylation induit à son tour une augmentation du diamètre des axones, qui est un des paramètres influençant la propagation des potentiels d'action. Au travers de ces exemples, on comprend que la disparition des cellules myélinisantes perturbe le fonctionnement des connexions neuronales.

On a longtemps pensé que les pathologies de la myéline n'affectaient que les cellules produisant cette structure, or de nombreux résultats démontrent maintenant que les neurones des territoires lésés sont également touchés. Ces résultats mettent en évidence que les oligodendrocytes ne servent pas seulement à faciliter la propagation de l'influx nerveux ou à réguler l'homéostasie du milieu mais participent au maintien et à la survie des neurones. *In vivo*, l'absence de myéline induit ainsi une diminution du diamètre des axones (Aguayo et al., 1977a; Aguayo et al., 1977b; Perkins et al., 1981). Dans les neurones des régions lésés, on peut aussi détecter l'accumulation du peptide précurseur amyloïde. Cette accumulation se traduit par un dysfonctionnement du transport axonal conduisant à une dégénérescence des neurones (Ferguson et al., 1997). Il existe un lien étroit entre l'évolution de la maladie et les dommages neuronaux (Barnes et al., 1991). Des résultats identiques sont trouvés à partir des modèles animaux des pathologies démyélinisantes. L'encéphalopathie allergique expérimentale (EAE), utilisée comme

## Avant-propos

modèle de la sclérose en plaques, est induite par l'injection d'antigènes de la myéline. Ces injections vont entraîner une réaction immunologique contre les cellules myélinisantes qui aboutit à une démyélinisation importante (Raine et Traugott, 1984). Chez ces animaux, la démyélinisation est suivie d'une dégénérescence axonale importante induisant une diminution très forte du nombre de neurones (Brown et al., 1982; Raine et Cross, 1989). Il paraît de ce fait, nécessaire de connaître les mécanismes et les signaux impliqués dans le développement des cellules oligodendrocytaires pour pouvoir élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mon travail s'inscrit dans cette perspective. Prenant pour point de départ des résultats obtenus antérieurement au laboratoire, il a consisté, pour l'essentiel, à déterminer et à caractériser le rôle du pH intracellulaire dans le développement des oligodendrocytes.

*In vitro*, une augmentation du pH intracellulaire ( $\text{pH}_i$ ) d'environ 0,15 unité intervient au début de la différenciation des cellules précurseurs (OLP). Ce changement de  $\text{pH}_i$  est dû à l'arrêt de l'activité de l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Outre cet échangeur, deux autres mécanismes permettant de réguler le  $\text{pH}_i$  sont exprimés par les cellules oligodendrocytaires, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et un co-transporteur  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  (Boussouf et al., 1997; Boussouf et Gaillard, 2000). Ce changement de  $\text{pH}_i$  étant concomitant avec le début de la différenciation, nous nous sommes demandés s'il existait une relation causale entre ces deux événements.

Dans la première partie du travail présenté, j'ai réévalué l'influence de l'acide rétinoïque (AR) sur la différenciation des OLP. J'ai ensuite cherché à savoir si l'effet de l'AR s'accompagnait d'une variation du pH intracellulaire. Enfin, j'ai testé plus directement l'effet du  $\text{pH}_i$  sur la différenciation oligodendrocytaire en le faisant varier artificiellement, en présence ou en absence d'AR.

Dans la seconde partie du travail, j'ai recherché l'implication de changements de  $\text{pH}_i$  sur les oligodendrocytes lors de la transduction du signal déclenché par des molécules de guidage.

Ces facteurs, nous intéressent car ils sont capables d'influencer la croissance des extensions des oligodendrocytes, ce qui est d'un grand intérêt compte tenu de l'importance de la remyélinisation pour une restauration fonctionnelle totale. C'est le cas d'une famille de molécules, les sémaphorines et plus particulièrement la sémaphorine 3A (Sema3A). Or, les oligodendrocytes expriment la Neuropiline-1 (NRP-1), un des composants essentiels du complexe de récepteurs de Sema3A et, d'un point de vue fonctionnel, ces cellules sont

## Avant-propos

également sensibles à la Sema3A qui inhibe totalement l'émission de leurs prolongements (Ricard et al., 2001). Par ailleurs, la sémaphorine 3F et la Netrine-1 (une autre molécule de guidage) ont un effet attracteur sur les oligodendrocytes, alors que Sema3A inhibe leur migration (Spassky et al., 2002).

J'ai donc étudié les effets de la Sema3A sur l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires et sur le  $pH_i$ . Cette approche intégrée s'est ensuite portée également sur les voies de signalisations induites par Sema3A.

Mon mémoire de thèse est divisé en six parties :

- Les deux premières parties analysent les données bibliographiques sur la biologie et les propriétés physiologiques des oligodendrocytes ainsi que sur le rôle du  $pH_i$  dans le contrôle des fonctions cellulaires.

- Une troisième partie est consacrée à la mise au point d'un outil d'analyse permettant de quantifier la morphologie cellulaire.

- La quatrième partie est consacrée aux matériels et aux méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail.

- La cinquième partie de ce manuscrit regroupe les résultats obtenus.

- La dernière partie est consacrée à l'interprétation des résultats.

### ***A. Marqueurs du lignage oligodendrocytaire***

La différenciation des précurseurs oligodendrocytaires (OLP) est caractérisée par de nombreux changements phénotypiques : la complexification de la morphologie cellulaire, l'expression de marqueurs spécifiques, de récepteurs. Il est de ce fait important de connaître le stade de différenciation des cellules analysées préalablement à toute étude. L'analyse par immunocytochimie de l'expression temporelle et spécifique de certaines protéines par les cellules oligodendrocytaires lors de leur développement (voir ci-dessous) permet de caractériser leurs stades de différenciation. Une approche complémentaire peut se faire par l'analyse de l'expression des transcrits.

#### ***1. Les protéolipides (PLP et DM-20)***

Le gène du protéolipide majeur ("protéolipid protein" ou *plp*) localisé chez l'homme sur le chromosome X, produit par épissage alternatif, deux isoformes, le PLP et le DM-20 constituent environ 50% des protéines totales de la myéline. La séquence du protéolipide DM-20 diffère de celle du PLP par une suppression de 35 acides aminés. Cette suppression se situe à la fin de l'exon 3 et concerne les acides aminés 116 à 150 (Nave et al., 1987). Lors de la myélinisation, le DM-20 est distribué de manière homogène dans la cellule (corps cellulaire et prolongements) alors que le PLP se trouve majoritairement dans la membrane de la myéline (Trapp et al., 1997). Les fonctions du PLP et du DM-20 n'ont pu être encore clairement établies. Cependant l'analyse de souris "knock-out" *plp* déficientes pour les deux isoformes, met en évidence une altération des lignes intrapériodiques de la myéline ainsi qu'une dégénérescence axonale (Griffiths et al., 1998). Chez l'homme, une mutation du gène *plp* peut induire une importante hypomyélinisation : la pathologie de Pelizaeus-Merzbacher. Chez la souris, la mutation *jimpy* qui affecte l'expression du PLP et du DM-20 induit aussi une hypomyélinisation, une diminution du nombre des oligodendrocytes (OL) et la mort précoce des mutants (Nave, 1994). La caractérisation des produits d'expression de *plp* permet de déterminer certains stades de développement des OL. Par RT-PCR ou hybridation *in situ*, l'ARN messager du DM-20 peut être détecté de manière précoce lors du développement, avant le début de la myélinisation. Les premiers transcrits sont détectés vers 9,5 jours de vie embryonnaire (E9,5) chez la souris (Timsit et al., 1992; Timsit et al., 1995).

## **2. Le récepteur $\alpha$ du "Platelet-Derived Growth Factor" (PDGFR $\alpha$ )**

L'ARN messager du PDGFR $\alpha$  est exprimé à des stades précoces du développement et notamment à partir du 14<sup>ème</sup> jours embryonnaire (E14) chez le rat (Pringle et Richardson, 1993). Bien que les cellules exprimant le récepteur PDGFR $\alpha$  et le DM-20 soient localisées dans des sites très proches lors du développement précoce, on ne trouve que très peu de cellules co-exprimant les deux transcrits. Cette observation laisse à penser qu'il pourrait exister plusieurs populations d'oligodendrocytes (Thomas et al., 2000). Nous discuterons plus tard cette hypothèse.

## **3. Le disialoganglioside GD3**

Il existe un certain nombre d'anticorps reconnaissant GD3. Les anticorps monoclonaux R24 (Pukel et al., 1982; Goldman et al., 1984) et LB1 (Levi et al., 1986; Gallo et al., 1987a; Levi et al., 1987) sont parmi les plus connus. *In vitro*, GD3 est fortement exprimé par les précurseurs oligodendrocytaires puis son expression diminue au cours de la différenciation (Hardy et Reynolds, 1991). Ces caractéristiques permettent d'utiliser en culture GD3 comme un marqueur d'OLP. *In vivo*, GD3 est également exprimé par d'autres types cellulaires comme les cellules de la zone subventriculaire (Goldman et al., 1984) et les cellules de Purkinje du cervelet (Reynolds et Wilkin, 1988b), ce qui ne permet pas de l'utiliser pour caractériser *in vivo* les OLP.

## **4. L'anticorps monoclonal A2B5**

Cet anticorps reconnaît divers gangliosides, notamment les GT1a, GQ1b, GD2 et le GD3 (Kundu et al., 1983). La présence de ces gangliosides joue un rôle dans la fluidité membranaire des cellules et pourrait réguler, dans certains, cas la transduction d'un signal du niveau extra- au niveau intracellulaire. *In vivo*, ces différents gangliosides sont exprimés par diverses populations cellulaires (neuronales et gliales), ne permettant donc pas d'utiliser cet anticorps comme marqueur spécifique des OLP (Eisenbarth et al., 1979). Les antigènes mis en évidence par A2B5 disparaissent de la surface des OLP lors de leur différenciation en OL. Les caractéristiques de cet anticorps en font uniquement en culture un bon marqueur permettant de caractériser le stade de différenciation des cellules (Levi et al., 1986).

### **5. Les sulfatides**

Les sulfatides sont présents en quantité relativement importante dans la myéline et représentent 7% des lipides totaux. L'anticorps monoclonal O4 (Sommer et Schachner, 1981) réagit avec le cholestérol et deux galactolipides sulfatés, le 3'-sulfogalactosylcéramide (sulfatide) et un séminolipide. Ces deux glycolipides possèdent en commun un épitope qui comprend la structure moléculaire du 3'-O- sulfate galactose (Goujet-Zalc et al., 1986). Ils s'accumulent dans le cerveau durant la période de myélinisation active (Ishizuka et al., 1978). L'anticorps monoclonal O4 caractérise des cellules appelées pré-oligodendrocytes, avant l'apparition des galactocérebrosides (Gal-C). Les galactocérebrosides sont les précurseurs métaboliques des sulfatides. Or de manière contradictoire les cellules Gal-C<sup>+</sup> apparaissent après les cellules O4<sup>+</sup>. Il n'est pas exclu que O4 reconnaisse aussi d'autres antigènes non identifiés (Bansal et al., 1989).

### **6. Les glycolipides**

Les galactocérebrosides et les sulfogalactosylcéramides correspondent à environ 24% des lipides de la myéline. Ces glycolipides utilisés comme marqueurs précoces de la différenciation, sont exprimés à la fois dans le corps cellulaire et dans la gaine de myéline. Ils apparaissent peu après l'immunoréactivité obtenue avec l'anticorps O4, et leur expression persiste dans les OL matures (Gard et Pfeiffer, 1989). Le laboratoire de M. Raff a été le premier à obtenir des anticorps dirigés contre le Gal-C (Raff et al., 1978). Il existe aussi un anticorps monoclonal, dénommé O1 (Sommer et Schachner, 1981), reconnaissant le Gal-C mais également des monogalactosyldiglycérines, des séminolipides et un antigène non identifié (Bansal et al., 1989). Le rôle de ces glycolipides serait de contribuer au maintien de la structure de la membrane myélinique. En effet l'application d'anticorps anti-Gal-C induit une désorganisation de la membrane myélinique (Dyer et Benjamins, 1988).

### **7. Les protéines basiques de la myéline (MBP)**

Ces protéines représentent environ 35% des protéines de la myéline. Il en existe différentes isoformes obtenues par épissage alternatif du gène, localisées sur le chromosome 18 chez la souris et chez l'homme (Zeller et al., 1984). Les formes majeures sont au nombre de 4. Par hybridation *in situ*, des transcrits de la MBP peuvent être détectés dans la moelle épinière de la souris à partir de E14,5 (Peyron et al., 1997). Les transcrits de MBP sont d'abord trouvés dans le corps cellulaire des OL puis, plus tardivement, au début

de la myélinisation dans les prolongements oligodendrocytaires. Il existe, dans certains segments des prolongements, des quantités très élevées d'ARN messagers de MBP. Ces segments qui correspondent à des lieux d'accumulation de ribosomes libres, seraient le point de départ de l'élaboration des enroulements myéliniques (Ghandour et Skoff, 1991). L'obtention d'anticorps anti-MBP a permis de préciser la localisation des MBP dans la ligne dense de la myéline (Roussel et Nussbaum, 1981; Schwob et al., 1985). L'obtention de souris mutantes pour le gène de la MBP a permis de mieux connaître le rôle de cette protéine dans la formation de la myéline. Le phénotype des souris *mld* (duplication du gène MBP sur le chromosome 18 en une copie interrompue) se caractérise par une diminution de la quantité de MBP entraînant une décompaction de la myéline (Matthieu et al., 1984). Chez la souris mutante *shiverer* (suppression d'une région du gène MBP), on observe l'absence des lignes denses de la myéline entraînant des dysfonctionnements neurologiques (Privat et al., 1979; Baumann et al., 1980).

### **8. Les glycoprotéines associées à la myéline (MAG)**

Les MAG correspondent quantitativement à 1% des protéines totales de la myéline du SNC. Deux isoformes ont pu être mises en évidence, la small MAG (S-MAG) de 67 kDa et la large MAG (L-MAG) de 72 kDa (Frail et Braun, 1984). Ces deux glycoprotéines résultent d'un mécanisme d'épissage alternatif et possèdent une région extracellulaire de cinq domaines. Chacun des domaines présente une forte homologie avec le motif caractéristique des immunoglobulines (Lai et al., 1987; Salzer et al., 1987; Bartsch, 1996). La synthèse des MAG est étroitement couplée à la production des gaines de myéline (Quarles et Trapp, 1984). Chez les rongeurs, l'ARNm codant la L-MAG est exprimé de manière précoce au cours du développement et atteint un maximum 3 semaines après la naissance (en phase avec le pic de myélinisation), puis son taux décline ensuite jusqu'à 62 jours et reste constant. L'ARNm codant la S-MAG devient prédominant dans le cerveau adulte, après la phase de myélinisation (Frail et Braun, 1984). Chez la souris la L-MAG est impliquée dans l'activation de Fyn, une protéine kinase de la famille de src, jouant un rôle lors de la myélinisation (Jaramillo et al., 1994; Umemori et al., 1994). L'analyse de souris "knock-out" déficientes en MAG met en évidence un rôle dans l'organisation de la membrane de myélinique, périaxonal des régions internodales (Li et al., 1994; Montag et al., 1994). A ce niveau la membrane de myéline est décompactée (présence d'organites cellulaires) et un ralentissement de la myélinisation est observé. La MAG a aussi la capacité d'induire la phosphorylation des neurofilaments des neurones, par l'intermédiaire

d'un récepteur non caractérisé (Filbin, 1996). Cette phosphorylation des neurofilaments induit une augmentation du diamètre des axones, qui est un des paramètres influençant la propagation des potentiels d'action. La MAG semble aussi avoir un rôle lors de la reconnaissance entre les prolongements oligodendrocytaires et les axones myélinisés. En effet, chez les souris "knock-out", de nombreux axones sont myélinisés par plusieurs membranes de myéline (Montag et al., 1994). De plus, l'utilisation d'anticorps bloquants, dirigés contre le domaine extracellulaire de la MAG, empêche l'adhésion avec les axones (Johnson et al., 1989). Une autre implication est l'inhibition de la régénération neuronale (DeBellard et al., 1996; Filbin, 1996). Il est à noter que les MAG ont une structure proche des molécules d'adhésion telles que N-CAM, L1 et contactine neurale et pourraient jouer un rôle dans la reconnaissance et l'adhésion OL/neurones (Milner et al., 1990).

### ***9. La glycoprotéine des oligodendrocytes (MOG)***

La MOG correspond à environ 0,05% des protéines totales de la myéline (Amiguet et al., 1992). Cette protéine de masse moléculaire de 26 kDa est présente dans le SNC, principalement à la surface des enroulements myéliniques et des prolongements oligodendrocytaires (Brunner et al., 1989; Scolding et al., 1989). Bien que la MOG soit un composant quantitativement mineur de la myéline du SNC, elle est hautement immunogène, c'est d'ailleurs par cette propriété qu'elle fût caractérisée. En effet, l'immunisation d'animaux avec un homogénat de tissu du SNC induit une encéphalite allergique expérimentale (EAE, modèle de pathologie démyélinisante) et génère des taux notables d'anticorps anti-MOG (Lebar et al., 1976; Lebar et al., 1979; Linington et Lassmann, 1987). L'accumulation de la MOG observée dans des cultures oligodendrocytaires ainsi que dans le cerveau durant la myélinogenèse suggère un rôle essentiel dans le maintien et/ou l'achèvement du feuillet myélinique (Scolding et al., 1989; Kerlero de Rosbo et al., 1990; Matthieu et Amiguet, 1990).

### ***10. La 2',3'-nucléotide cyclique 3'-phosphodiesterase (CNP)***

Cette enzyme existe sous deux formes, la CNPI (46 kDa) et la CNPII (48 kDa) (Bernier et al., 1987), et représentent quantitativement 4 à 5% des protéines totales de la myéline du SNC. Son substrat physiologique n'a pas été identifié. Elle constitue un marqueur spécifique des stades précoces du développement oligodendrocytaire. La CNP est concentrée sous la membrane plasmique des oligodendrocytes et dans les régions internodales de la myéline qui contiennent encore du cytoplasme oligodendrocytaire

(Braun et al., 1988; Brunner et al., 1989). La fonction de cette protéine lors de la myélinisation reste encore largement inconnue. Cependant, des expériences de surexpression de la CNP chez la souris ont mis en évidence un rôle (direct ou indirect) dans l'établissement de l'architecture de la membrane de myéline. Chez ces souris, on note l'absence de ligne dense majeure de la myéline, une désorganisation de la région périaxonale et l'absence d'expression des MBP (Yin et al., 1997).

### ***11. Autres protéines***

#### *L'OMgp (Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein)*

L'OMgp est une protéine hautement glycosylée retrouvée dans la région paranodale des feuillet myéliniques (Mikol et Stefansson, 1988; Mikol et al., 1990). Il a récemment été démontré que l'OMgp est un ligand du récepteur de Nogo (NogoR), exprimé par les neurones. De ce fait, cette protéine induit l'inhibition de la croissance neuritique (Kottis et al., 2002; Wang et al., 2002).

#### *La MOSP (Myelin/Oligodendrocyte Specific Protein)*

C'est une protéine membranaire mineure spécifique de la myéline du SNC et des oligodendrocytes. La MOSP est une protéine de surface capable de former des associations transmembranaires avec le cytosquelette des oligodendrocytes et elle semble jouer un rôle important dans l'assemblage et le maintien des feuillet myéliniques (Dyer et Matthieu, 1994; Mu et Dyer, 1994). La MOSP apparaît chez le rongeur vers 4 à 5 jours après la naissance, après l'apparition du galactocérobroside et des sulfatides, lors du début de l'élaboration de la membrane de myéline (Mu et Dyer, 1994).

#### *L'anhydrase carbonique II (CAII)*

Il existe 7 isoenzymes de l'anhydrase carbonique chez les mammifères (CAI à CAVII). Ces isoformes sont les produits de gènes différents. Seule l'isoenzyme II est détectée dans le SNC. Dans le cerveau de rat adulte, la CAII est présente sous forme soluble (55%) ou liée à la membrane (45%) (Ghandour et al., 1980b). Durant la première semaine postnatale, la forme soluble est prédominante (Ghandour et al., 1980a). Dans les cerveaux de rat, souris et chez l'homme, la CAII a été localisée dans les oligodendrocytes (Ghandour et al., 1980b). Cette enzyme catalyse la réaction d'hydratation du CO<sub>2</sub>, permettant la formation d'ions bicarbonate. De plus, l'anhydrase carbonique II interagit

directement avec l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pour en augmenter son activité (Li et al., 2002). De ce fait, la présence de l'isoenzyme II dans le SNC pourrait contribuer à la régulation du pH intracellulaire. Le développement des oligodendrocytes, obtenus à partir de souris "knock-out" pour le gène de la CAII, est ralenti au niveau de la différenciation morphologique et de l'expression de protéines de la myéline telle que la MBP (Cammer, 1998).

L'expression différentielle durant le développement des protéines décrites ci-dessus a permis de les utiliser comme marqueurs et d'étudier ainsi l'origine et la différenciation des précurseurs oligodendrocytaires. La connaissance des mécanismes mis en jeu lors du développement est résumée dans le chapitre suivant.

## ***B. Origine et différenciation des oligodendrocytes***

### ***1. Origine***

Le neuroépithélium est le territoire de l'embryon à partir duquel, après invagination, le tube nerveux est mis en place. Les cellules ventriculaires dérivant de ce neuroépithélium constituent une monocouche pseudo-stratifiée dans laquelle les cellules vont proliférer et migrer vers les zones sous-ventriculaires, intermédiaires et marginales. Tous les neurones et les cellules gliales du SNC sont issus de ces cellules. Les OL se différencient à partir de cellules précurseurs hautement prolifératives issues de cette zone sous-ventriculaire (Privat et Leblond, 1972). La différenciation des cellules du neuroépithélium puis du tube nerveux, en cellules oligodendrocytaires dans la région ventrale se fait sous le contrôle de la plaque neurale et de la notochorde, par l'intermédiaire de signaux diffusibles tels que la protéine Sonic Hedgehog (Pringle et al., 1996).

#### ***1.1. La moelle épinière***

Les OLP apparaissent dans la région ventrale de la moelle épinière puis migrent dorsalement durant le développement (Warf et al., 1991). Par des techniques d'hybridation in situ, des cellules  $\text{PDGFR}^+$  sont retrouvées dans la région ventrale du tube neural à partir de E13-E14 chez le rat et E12,5 chez la souris. Ces cellules sont considérées comme les précurseurs à l'origine des cellules oligodendrocytaires (Pringle et Richardson, 1993; Hall et al., 1996).

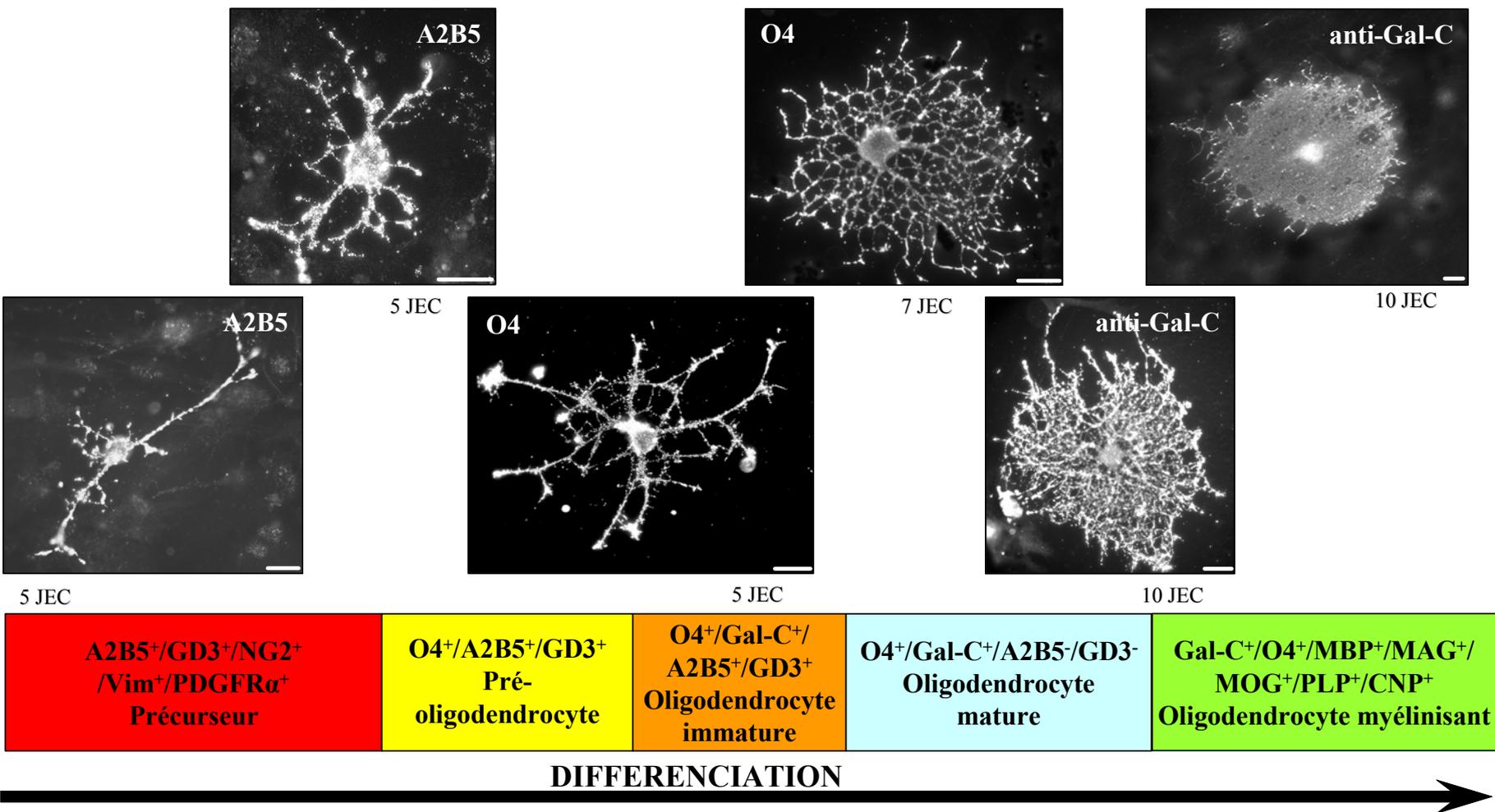
## **1.2. L'encéphale**

Chez le rat, à des âges embryonnaires de E13-E14, des cellules *pdgfra*<sup>+</sup> sont aussi trouvées dans la région ventrale du diencephale (Pringle et Richardson, 1993). Un autre marqueur permettant de caractériser les OLP est l'ARNm du *plp/dm-20* (Timsit et al., 1995). Malgré l'expression tardive des protéines PLP et DM-20 par les oligodendrocytes, les transcrits de ces protéines sont détectés de manière précoce pendant le développement (Kanfer et al., 1989; Dickinson et al., 1996). Par hybridation *in situ* chez la souris, des cellules exprimant le *plp/dm-20* sont retrouvées à partir de E9,5 dans la plaque latéro-basale du diencephale, du prosencéphale près du thalamus et dans le rhombencéphale (Timsit et al., 1995; Spassky et al., 1998). Bien que les cellules *plp/dm20*<sup>+</sup> et *pdgfra*<sup>+</sup> soient retrouvées dans des régions identiques, ces deux transcrits ne sont jamais co-exprimés au sein d'une même cellule (Yu et al., 1994). Ces populations de cellules sont toutes deux capables de générer des OL myélinisants. De ce fait, les OL du SNC seraient issus de deux populations cellulaires différentes (Spassky et al., 1998; Spassky et al., 2001).

## **2. Développement des cellules oligodendrocytaires**

### **2.1. Migration**

Les OLP qui émergent des différents foyers vont migrer à travers le SNC afin de le coloniser puis vont se différencier en cellules myélinisantes (Small et al., 1987). Les mécanismes mis en jeu lors de la migration des OLP à travers le système nerveux ne sont pas clairement identifiés. Mais la migration des cellules nerveuses est régulée par des facteurs extracellulaires sécrétés ou membranaires. *In vitro*, les OLP expriment le récepteur de l'intégrine  $\alpha\beta 1$  et l'utilisation d'un anticorps bloquant dirigé contre ce récepteur inhibe la migration cellulaire (Milner et al., 1996). D'autres résultats ont permis de démontrer le rôle des récepteurs  $\alpha\beta 3$  et  $\alpha\beta 5$  de l'intégrine dans les phénomènes de prolifération et de différenciation des oligodendrocytes *in vitro* (Blaschuk et al., 2000). Des molécules de la matrice extracellulaire comme la ténascine-C ou des molécules diffusibles comme la sémaphorine 3A ou la nétrine-1 permettent aussi de contrôler la migration des OLP. La sémaphorine 3A et la nétrine-1 jouent un rôle important lors de la myélinisation du nerf optique, en empêchant la migration des OLP vers la rétine (Ffrench-Constant et al., 1988; Bartsch et al., 1994; Tsai et Miller, 2002). Pour migrer et développer leurs prolongements, les OLP doivent pouvoir rendre le milieu extracellulaire permissif. Ceci se fait par la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP) capables de cliver les molécules de la



**Planche 1.** Aspects morphologiques et antigéniques des oligodendrocytes au cours de leur différenciation en culture.

La barre de calibration représente 20  $\mu$ m.

JEC : jours en culture.

matrice extracellulaire (Werb, 1997). *In vivo*, il y a une augmentation du niveau d'expression des MMP au cours du développement dans les tissus riches en OLP, coïncidant avec le début de la myélinisation. La MMP-9 est fortement impliquée dans ces processus. L'inhibition de la MMP-9 induit une diminution et un retard dans la formation des prolongements oligodendrocytaires et l'apparition de la myéline (Uhm et al., 1998; Oh et al., 1999).

## **2.2. Différenciation**

### **2.2.1. Aspects antigéniques (voir planche 1)**

L'évolution progressive du précurseur vers la cellule myélinisante est caractérisée par des modifications morphologiques, une variation de sensibilité et de réponse à certains facteurs de l'environnement, une diminution progressive de leurs propriétés migratoires et mitotiques ainsi que des changements de l'expression et de l'activité de conductances ioniques et récepteurs membranaires.

*In vitro* et seulement dans ce cas, la présence de gangliosides comme le GD3 reconnu par les anticorps anti-GD3 et A2B5 (Levi et al., 1987; Raff, 1989) permet l'identification des cellules précurseurs. *In vivo*, ces anticorps ne peuvent permettre l'identification des OLP car GD-3 est aussi exprimé par des neurones. *In vivo*, au cours de la migration dans la zone sous-ventriculaire, les cellules expriment entre autre un protéoglycane reconnu par l'anticorps NG2, la vimentine constituant les filaments intermédiaires et le récepteur  $\alpha$  du PDGF permettant de caractériser le stade précurseur. Ces précurseurs prolifèrent activement et possèdent toujours des propriétés migratoires.

A l'issue de leur migration le long des fibres nerveuses, les précurseurs se transforment en pré-oligodendrocytes, qui sont des cellules post-migratoires. Celles-ci présentent une morphologie étoilée, avec une importante arborisation. Ce stade est caractérisé par l'expression de sulfatides reconnus par l'anticorps O4 (Sommer et Schachner, 1981) et par la perte de réponse mitogénique au PDGF (Fok-Seang et Miller, 1994).

Le pré-oligodendrocyte poursuit sa transformation en un oligodendrocyte immature, richement arborisé, avec l'apparition du galactocérobroside (Raff et al., 1978) et de la CNP. Une série d'étapes de maturation le conduit vers l'oligodendrocyte mature non myélinisant, une cellule à arborisation extrêmement développée. De nouveaux antigènes myéliniques apparaissent de façon séquentielle : la MBP, le PLP, la MAG et la MOG (Dubois-Dalcq et al., 1986; Curtis et al., 1988; Reynolds et Wilkin, 1988a). La cellule va

alors s'engager *in vivo* dans le processus de myélinisation : l'enroulement des prolongements de l'oligodendrocyte autour des axones (Solly et al., 1996). *In vitro*, en l'absence de neurones, il se forme un tapis de pseudo-myéline.

### **3. Régulation du développement des oligodendrocytes**

Une particularité des oligodendrocytes est leur capacité à développer leur programme de différenciation *in vitro* de manière relativement autonome, indépendamment de la présence des cellules qui constituent leur environnement normal *in vivo* (Pfeiffer et al., 1981). Cependant leur développement peut être profondément influencé par d'autres cellules, par contacts directs ou par l'intermédiaire de facteurs diffusibles. De nombreux facteurs environnementaux comme les hormones (thyroïdiennes), des facteurs de croissance, des cytokines, des neurotrophines et des neurotransmetteurs contrôlent dans l'espace et dans le temps la production et le développement des oligodendrocytes.

#### **3.1. Le "Platelet-Derived Growth Factor" (PDGF)**

Le PDGF est actif sous forme de dimère. Il existe trois isoformes du PDGF, dues à l'expression de deux gènes, PDGF-A et PDGF-B codant chacun pour une chaîne polypeptidique. Ces trois isoformes sont constituées des combinaisons, AA, AB et BB. Le PDGF est sécrété dans le SNC par les neurones, les astrocytes de type 1 et les cellules méningées.

##### **3.1.1. Les récepteurs du PDGF**

Il existe deux types de récepteurs du PDGF avec des spécificités différentes envers les ligands. Le récepteur alpha (PDGFR $\alpha$ ) peut lier les chaînes A et B du PDGF et le récepteur bêta (PDGFR $\beta$ ) qui ne peut lier que la chaîne B du PDGF. De ce fait, pour une cellule donnée, la réponse biologique va dépendre du type de récepteur exprimé et du type d'isoforme du PDGF sécrétée.

Les cellules oligodendrocytaires expriment le PDGFR $\alpha$  à des stades de développement bien déterminés (Hall et al., 1996; Oumesmar et al., 1997). Dans la moelle épinière de rat, les premières cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> se trouvent dans la zone sous-ventriculaire à partir de E14, puis à E16 ces cellules prolifèrent et migrent dans la moelle épinière. Ellison et de Vellis ont déterminé l'existence de trois populations de cellules exprimant le PDGFR $\alpha$  : PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/GD3<sup>+</sup>, PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/GD3<sup>+</sup>/O4<sup>+</sup> et PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>/O4<sup>+</sup> (Ellison et de Vellis, 1994).

### **3.1.2. Rôle du PDGF**

*In vitro*, le PDGF stimule la survie cellulaire, la prolifération et la migration des OLP et retarde leur différenciation (Raff et Lillien, 1988; Raff et al., 1988; Barres et al., 1992a). L'application de PDGF peut aussi induire une dédifférenciation des cellules O4<sup>+</sup>/Gal-C<sup>-</sup> vers un stade A2B5<sup>+</sup>/O4<sup>-</sup> (Gard et Pfeiffer, 1993). Des études, réalisées sur des souris mutantes, chez lesquelles le gène codant la chaîne A du PDGF a été supprimé, ont permis d'analyser *in vivo* le rôle du PDGF. Dans ces conditions, une diminution très importante du nombre de cellules exprimant le récepteur  $\alpha$  du PDGF est observée. La prolifération des OLP est donc dépendante du PDGF-A (Calver et al., 1998). Il existe une corrélation entre diminution du nombre de cellules PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>, et diminution du nombre d'oligodendrocytes. De plus, les souris présentent une importante démyélinisation (Calver et al., 1998; Fruttiger et al., 1999). Au contraire, la surexpression de ce même facteur va induire une hyperprolifération et la localisation ectopique d'OLP. Ces OLP qui seront éliminés par la suite, grâce à des mécanismes de mort cellulaire qui permettent le contrôle du nombre final d'oligodendrocytes (Calver et al., 1998; Fruttiger et al., 1999). *In vitro*, suite à une exposition continue au PDGF, les cellules vont tout de même, après un certain nombre de cycles cellulaires, cesser de proliférer et commencer à se différencier en oligodendrocytes. Il apparaît donc une forme de désensibilisation envers le PDGF. Les événements conduisant à cette désensibilisation ne sont pas encore connus mais ils n'impliquent pas l'arrêt de l'expression du récepteur au PDGF (Hart et al., 1989). Hart et al. ont émis l'hypothèse que ces cellules devenues insensibles aux effets prolifératifs du PDGF et exprimant encore les récepteurs  $\alpha$ , subiraient une modification des mécanismes permettant la transduction du signal induit par le PDGF (Hart et al., 1989). Il y aurait des changements des cascades de signalisation induites par le récepteur  $\alpha$  en fonction du stade de développement des cellules.

Les précurseurs PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> expriment le protéoglycane NG2 (Nishiyama et al., 1996a). *In vivo*, durant le développement, il existe une colocalisation importante du NG2 et du PDGFR $\alpha$ . *In vitro*, le PDGFR $\alpha$  et le NG2 peuvent être co-immunoprécipités, suggérant leur localisation au sein d'un complexe. Le PDGFR $\alpha$  et le NG2 sont colocalisés jusqu'au moment où les OLP se différencient en pré-oligodendrocytes (O4<sup>+</sup>). L'expression et la localisation du NG2 (avec le PDGFR $\alpha$ ) coïncide dans le temps avec la période pendant laquelle les cellules prolifèrent en réponse au PDGF (Levine et Nishiyama, 1996; Nishiyama et al., 1996a, b). La présence de NG2 serait donc indispensable pour induire la prolifération cellulaire en réponse au PDGF.

L'analyse de souris "knock-out" pour le gène de NG2, a effectivement mis en évidence que les cellules ne peuvent plus proliférer en réponse au PDGF. De plus, en l'absence de NG2, il n'y a plus d'autophosphorylation du PDGFR $\alpha$  ni d'activation de ERK1/2, deux phénomènes indispensables au déclenchement de la prolifération (Grako et al., 1999). Le NG2 possède deux sites de fixation à très haute affinité pour le PDGF, ce qui laisse à penser que NG2 joue un rôle dans la présentation du facteur de croissance à son récepteur (Goretzki et al., 1999).

### **3.2. Le "basic Fibroblast Growth Factor" (bFGF)**

Le bFGF est formé par une unique chaîne polypeptidique qui se fixe sur des sites à haute et faible affinité. Les sites à haute affinité sont les récepteurs actifs. A ce jour, 4 récepteurs ont été identifiés (avec des variants). Les sites à faible affinité sont des héparanes sulfates protéoglycanes et la liaison préalable à ce site est indispensable à la fixation sur les récepteurs. Le bFGF est fortement exprimé dans le SNC durant le développement, à partir de E9 chez la souris (Nurcombe et al., 1993). Les niveaux de l'ARNm et de la protéine de bFGF augmentent entre E14 et E18, au moment de la gliogenèse, suggérant un rôle de ce facteur lors de la mise en place de la myéline (Powell et Klagsbrun, 1993; Weise et al., 1993).

### ***3.2.1. bFGF et développement des oligodendrocytes***

Les effets du bFGF sur les cellules oligodendrocytaires dépendent de leur stade de développement.

#### *Les précurseurs*

Le bFGF inhibe la différenciation et active la prolifération des précurseurs issus de plusieurs régions du cerveau. L'inhibition de la différenciation se caractérise par une inhibition de l'expression de protéines de la myéline telles que la MBP, la CNP et le PLP (Besnard et al., 1989; Engele et Bohn, 1992). Le développement des précurseurs en présence de bFGF est bloqué au stade pré-oligodendrocytes (O4<sup>+</sup>/Gal-C<sup>-</sup>) (McKinnon et al., 1990). Le bFGF induit l'expression du PDGFR $\alpha$  et du NG2 et augmente leur degré de colocalisation (McKinnon et al., 1990). Nous avons vu plus haut que, pour être opérationnel, le PDGFR $\alpha$  nécessite d'être colocalisé avec NG2. Ces résultats expliqueraient pourquoi l'application simultanée de bFGF et de PDGF permet la prolifération à long terme des précurseurs sans que ceux-ci ne se différencient en pré-oligodendrocytes (Bogler et al., 1990).

#### *Pré-oligodendrocytes*

A ce stade de différenciation, l'application de bFGF bloque encore la différenciation et induit la prolifération des cellules (McKinnon et al., 1990; Gard et Pfeiffer, 1993).

#### *Oligodendrocytes matures*

L'application de bFGF sur des oligodendrocytes matures induit une diminution de l'expression de MBP et une décompaction partielle de la membrane de pseudo-myéline (Fressinaud et al., 1995). Bansal et Pfeiffer ont mis en évidence l'existence d'une réversion du phénotype des oligodendrocytes matures. Le bFGF induit ; une diminution de l'expression des protéines de la myéline ; une décomplexification de la morphologie cellulaire ; une diminution de l'expression du récepteur FGFR2 (normalement très exprimé par les oligodendrocytes matures) ; une augmentation de l'incorporation de BrdU<sup>1</sup> (Bansal et Pfeiffer, 1997). R. Bansal et S. Pfeiffer ont nommé ces cellules "nouveaux oligodendrocytes" car elles ne possèdent pas tout à fait le phénotype de pré-oligodendrocytes ou de précurseurs.

---

<sup>1</sup> Bromodésoxyuridine

Les souris "knock-out" pour le gène du bFGF sont viables et ne présentent pas d'altération de la myéline (Dono et al., 1998; Ortega et al., 1998). Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de compensation. En effet, le FGF9 induit sur les cellules oligodendrocytaires les mêmes effets que le bFGF (Cohen et Chandross, 2000). A l'inverse, une augmentation de la quantité de bFGF pratiquée par des injections chez le rat nouveau-né induisent un retard de la myélinisation (Goddard et al., 1999).

### ***3.2.2. Les récepteurs du FGF, expression et régulation***

Les récepteurs du FGF appartiennent à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinases. Ils sont codés par quatre gènes différents : FGFR-1,-2,-3 et -4. Bansal et al. ont analysé l'expression de ces récepteurs durant le développement des OLP en culture. FGFR-4 n'est pas exprimé par les oligodendrocytes. L'expression du FGFR-1 augmente durant la différenciation, FGFR-2 n'est exprimé que par les oligodendrocytes matures et l'expression de FGFR-3 est maximale au stade pré-oligodendrocytes, puis décline (Bansal et al., 1996). L'addition de bFGF augmente l'expression du FGFR-1 sur les précurseurs, diminue celle du FGFR-2 sur les pré-oligodendrocytes mais n'a pas d'effet sur le FGFR-3. Ce schéma d'expression des récepteurs pourrait expliquer les diverses réponses induites par le bFGF en fonction du stade de développement. Bansal et al. ont proposé comme hypothèse qu'en réponse au bFGF, FGFR-1 pourrait déclencher une signalisation induisant la prolifération et la migration des précurseurs, FGFR-3 permettrait la prolifération et l'arrêt de la différenciation des pré-oligodendrocytes et FGFR-2 permettrait la différenciation finale des oligodendrocytes (Williams et al., 1994; Bansal et al., 1996).

### ***3.3. L'"Insulin-like Growth Factor I" (IGF-I)***

L'IGF-I stimule la prolifération des précurseurs et des pré-oligodendrocytes (McMorris et Dubois-Dalcq, 1988). Différents milieux de culture sont complétés en insuline, à des doses suffisantes pour activer le récepteurs de l'IGF-I (McMorris et McKinnon, 1996), et permettre aussi la survie des cellules A2B5<sup>+</sup>/O4<sup>+</sup> (Barres et al., 1992b). L'étude de souris transgéniques sur- ou sous-exprimant l'IGF-I démontrent que ce facteur stimule la différenciation des OL et induit la production de myéline (Carson et al., 1993).

### **3.4. Les Hormones thyroïdiennes**

L'importance des hormones thyroïdiennes au cours des grandes étapes du développement du SNC est bien établie. L'absence de T3<sup>2</sup> pendant la vie fœtale (hypothyroïdie) entraîne, outre une réduction définitive du nombre de synapses, un retard important de la différenciation et de la maturation des oligodendrocytes. D'autre part, un excès de T3 (hyperthyroïdie) induit une accélération de la différenciation des oligodendrocytes (Walters et Morell, 1981). En effet, la T3 induit une augmentation de l'expression de MBP, MAG, PLP et CNP. De ce fait, l'hypothyroïdie se caractérise par une diminution de l'expression de ces gènes (Farsetti et al., 1992; Tosic et al., 1992; Strait et al., 1997). *In vitro*, la T3 inhibe la prolifération cellulaire et joue un rôle dans la régulation du nombre et de la différenciation des oligodendrocytes (Baas et al., 1994; Baas et al., 1997).

### **3.5. Neurotransmetteurs et oligodendrocytes**

La plupart des récepteurs aux différents neurotransmetteurs sont exprimés par les OLP (Verkhatsky et Steinhäuser, 2000; Nguyen et al., 2001). Certains de ces neurotransmetteurs contrôlent la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire (Lauder, 1993).

#### **3.5.1. Le glutamate**

L'application de glutamate sur des OL exprimant des récepteurs fonctionnels ionotropiques de type non NMDA<sup>3</sup> induit une dépolarisation (Kettenmann et al., 1984). Sur ces OLP, l'activation des récepteurs de type ionotropiques (AMPA<sup>4</sup>/kaïnate) induit une entrée de calcium qui va aboutir à la phosphorylation du facteur de transcription CREB via la voie de la kinase C (PKC) et des MAPK<sup>5</sup> (Pende et al., 1997; Liu et al., 1999). L'activation de CREB<sup>6</sup> par le glutamate ne peut pas se faire sur des cellules matures (Sato-Bigbee et al., 1999), ceci est dû à des diminutions de l'expression des récepteurs aux neurotransmetteurs durant la différenciation (Takeda et al., 1995).

Sur les OLP, l'activation des récepteurs AMPA/kaïnate induit une dépolarisation membranaire due à une entrée massive de Na<sup>+</sup>. Cette dépolarisation a pour effet de bloquer

---

<sup>2</sup> Triiodo-thyronine

<sup>3</sup> N-méthyl-D-aspartate

<sup>4</sup> acide  $\gamma$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique

<sup>5</sup> Mitogen-activated protein kinase

<sup>6</sup> cyclic AMP response element-binding protein

les canaux  $K^+$  dépendant du potentiel (Borges et al., 1994). Il est bien établi que ces canaux  $K^+$  jouent un rôle très important dans les phénomènes de prolifération et de différenciation cellulaire (Ribera et Spitzer, 1992; Pappas et al., 1994). Sur des OLP, l'activation des récepteurs AMPA inhibe la prolifération et la différenciation par le blocage des canaux  $K^+$  (Gallo et al., 1996). L'arrêt de la prolifération des OLP se fait à la suite de l'accumulation des protéines inhibitrices de kinases dépendantes des cyclines (p27<sup>Kip</sup> et p21<sup>CIP1</sup>) qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire (Ghiani et al., 1999a; Ghiani et al., 1999b). Sur les OLP, l'activation des récepteurs AMPA/kainate induit aussi l'expression du proto-oncogène *c-fos* induisant alors l'inhibition de la prolifération (Liu et Almazan, 1995).

### **3.5.2. La noradrénaline (NA)**

L'application de noradrénaline (NA) et d'isoprotérénol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique, régule le développement des OLP via l'activation de l'adénylate cyclase entraînant l'accumulation d'AMP cyclique (AMPC) (Ghiani et al., 1999a). Cette augmentation du niveau d'AMPC induit l'inhibition de la prolifération et la stimulation de la différenciation des précurseurs (Raible et McMorris, 1989, 1990, 1993), se traduisant par l'induction de la synthèse de protéines de la myéline telle que la PLP (Jensen et al., 1993). Ces variations du niveau d'AMPC après une stimulation  $\beta$ -adrénergique ne sont pas observées sur des cellules en voie de différenciation comme les pré-oligodendrocytes. L'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques entraîne une accumulation de p27<sup>Kip1</sup> et p21<sup>CIP1</sup> (comme l'activation par le glutamate) induisant l'arrêt du cycle cellulaire (Ghiani et al., 1999a). Ces effets sont spécifiques de l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques car les agonistes  $\alpha$ -adrénergiques (phényléphrine et clonidine) n'induisent aucune variation de la prolifération et de la différenciation. Des effets similaires ont été observés à partir de tranches en culture et suggèrent donc que la NA pourrait participer au contrôle de la prolifération et de la différenciation des OLP *in vivo*. Cette hypothèse est renforcée par l'existence, dans le cortex cérébral de rat, de nombreux contacts entre les fibres nerveuses noradrénergiques et les oligodendrocytes (Paspalas et Papadopoulos, 1996).

### **3.5.3. La dopamine**

En culture primaire les OLP et les pré-oligodendrocytes expriment le récepteur D3 (D3r) de la dopamine (Bongarzone et al., 1998). L'addition d'un agoniste de D3r induit en culture une diminution du nombre de cellules matures ainsi qu'une augmentation du nombre d'OLP. Ces effets sont inhibés en présence d'un antagoniste de ce récepteur. Ces

résultats suggèrent que la dopamine joue un rôle lors du développement des OLP en prévenant leur différenciation terminale et l'élaboration de la myéline.

Sur les OLP, la signalisation intracellulaire mise en jeu par l'activation des récepteurs dopaminergiques n'est pas encore connue, mais elle l'est pour d'autres types cellulaire. Elle consiste en une inhibition de l'adénylate cyclase qui produit l'AMPC, une inhibition de la production d'inositol phosphate, une modulation des canaux  $K^+$  et une inhibition des courants calciques (Huff, 1996). Ces événements, comme nous l'avons vu, modulent la différenciation des OLP.

#### ***3.5.4. L'acide gamma-aminobutyric (GABA)***

Les OLP en culture expriment de manière fonctionnelle le récepteur  $GABA_A$  (von Blankenfeld et Kettenmann, 1991). Lors de la différenciation des OLP, la densité de récepteur  $GABA_A$  diminue d'un facteur 100, indiquant l'existence d'une régulation de l'expression de ces récepteurs au cours du développement. Malgré la méconnaissance du rôle de cette signalisation GABAergique sur les OLP, ces observations suggèrent que le GABA pourrait intervenir dans le contrôle du développement cellulaire. En effet, le GABA est impliqué dans le contrôle de la prolifération, de la migration et de la différenciation des précurseurs neuronaux (Varju et al., 2001). Il est concevable que le GABA puisse avoir de tels effets sur les OLP durant leur développement. L'activation des récepteurs  $GABA_A$  des oligodendrocytes permet la sortie de  $Cl^-$ , résultant en une dépolarisation membranaire entraînant l'ouverture des canaux  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$  dépendant du potentiel (Gilbert et al., 1984; Hoppe et Kettenmann, 1989). Ces événements vont induire le blocage des canaux  $K^+$  entraînant l'arrêt de la prolifération cellulaire.

#### ***3.5.5. L'acétylcholine (ACh)***

Les récepteurs muscariniques (métabotropiques) et nicotiques sont exprimés par les OLP (Cohen et Almazan, 1994; Rogers et al., 2001; Molina-Holgado et al., 2003). L'activation des récepteurs muscariniques sur les OLP induit une augmentation intracellulaire de calcium et d'inositol triphosphate, et inhibe la production d'AMPC induite en réponse à une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Cohen et Almazan, 1994). En réponse au carbachol qui est un agoniste de l'ACh, on observe sur les OLP une induction de c-fos, ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire via l'activation de la PKC et des MAPK (Cohen et al., 1996; Pende et al., 1997).

### **3.5.6. Autres neurotransmetteurs**

Les cellules oligodendrocytaires expriment plusieurs autres types de récepteurs aux neurotransmetteurs (Nguyen et al., 2001). On trouve parmi ces neurotransmetteurs, la glycine (Belachew et al., 2000); les opiacés (Besnard et al., 1989; Tryoen-Toth et al., 2000; Knapp et al., 2001); la sérotonine (Belachew et al., 1998). Le rôle des ces neurotransmetteurs dans la physiologie de cellules non excitables comme les oligodendrocytes n'est pas encore connu.

## **3.6. Signalisation intracellulaire**

### **3.6.1. La voie des Protéines kinases C (PKC)**

Les esters de phorbols sont des molécules synthétiques pouvant se fixer sur les PKC et les activer. Les sites de liaison des esters de phorbols sont plus nombreux dans la substance blanche de l'encéphale que dans les autres régions du SNC (Shoyab et Todaro, 1980). Il a ainsi pu être établi que les oligodendrocytes expriment fortement les PKC. Il existe plusieurs isoformes de la PKC et des changements importants du niveau de leur expression au cours du développement des oligodendrocytes sont décrits. Ces changements se traduisent chez le rat par une augmentation de leurs niveaux d'expression à partir de la naissance. Ils atteignent un maximum entre le 14<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour postnatal (Girard et al., 1986; Hashimoto et al., 1988), à un moment correspondant à la myélinisation *in vivo* (Monge et al., 1986). Les oligodendrocytes expriment des protéines telles que la neuromoduline (GAP43) (Deloulme et al., 1990), et la MARCKS<sup>7</sup> (Bhat, 1991), qui sont des substrats spécifiques des PKC. Ces observations suggèrent que les PKC jouent un rôle dans le développement des oligodendrocytes. L'utilisation de dérivés des esters de phorbols capables d'activer spécifiquement les PKC, a permis d'analyser leur rôle. Les effets des PKC sur la physiologie des cellules oligodendrocytaires se sont révélés multiples et variables en fonction du stade de développement.

Les paragraphes suivants analysent respectivement les effets des PKC sur les OLP, les pré-oligodendrocytes, les cellules matures et les cellules myélinisantes.

---

<sup>7</sup> MARCKS : myristoylated alanine-rich C-kinase substrate protein

### **3.6.1.1. OLP et pré-oligodendrocytes**

L'application d'esters de phorbols sur des pré-oligodendrocytes induit la dédifférenciation des cellules, se traduisant par un arrêt de l'expression des antigènes reconnus par l'anticorps O4, la réexpression de la vimentine (Avossa et Pfeiffer, 1993) et une diminution de l'expression de MBP, MAG, CNP et PLP (Baron et al., 1998). Cette dédifférenciation se traduit aussi par une simplification de la morphologie des cellules. Comme mentionné ci-dessus, la MARCKS est un substrat privilégié de la PKC. L'expression de cette protéine augmente de manière constante durant le développement des OL, (Bhat et al., 1995). Ces observations laissent à penser que la MARCKS peut jouer un rôle durant le développement des OL. La MARCKS est une protéine ancrée dans la membrane cellulaire. A la suite d'une phosphorylation dans son domaine de liaison à la membrane, la protéine est transloquée de la membrane plasmique au cytosol. La MARCKS possède un autre domaine permettant sa liaison à l'actine, et constitue un point d'ancrage des microfilaments à la membrane (Hartwig et al., 1992). L'activation des PKC induit une phosphorylation de MARCKS, puis sa translocation vers le cytosol sur des OLP. L'utilisation de marqueurs du transport a permis de mettre en évidence que la translocation de MARCKS entraîne une perturbation du transport. Elle désorganise le transport assuré par les microfilaments, empêchant l'intégration de vésicules acheminées par les microtubules (Baron et al., 1999). Ceci pourrait expliquer pourquoi l'activation de la PKC inhibe le développement des oligodendrocytes

### **3.6.1.2. Cellules matures**

*In vitro*, lors de l'adhésion sur un substrat (dans ce cas, de la poly-lysine), les oligodendrocytes matures synthétisent un tapis membranaire constitué des différents éléments de la myéline. L'adhésion des oligodendrocytes au substrat induit une expression accrue de la MBP ainsi que sa phosphorylation. Cette phosphorylation et cette synthèse consécutives à l'adhésion peuvent être prévenues par l'utilisation d'inhibiteur des PKC. Au contraire, l'application d'un ester de phorbol sur des cellules non adhérentes reproduit les effets obtenus à la suite de l'adhésion (Vartanian et al., 1986). La MAG, une des protéines de la myéline est aussi phosphorylée par les PKC (Kirchhoff et al., 1993). En phosphorylant certaines protéines de la myéline, les PKC pourraient ainsi participer à la maturation finale des oligodendrocytes. En effet, l'activation de la PKC contrôle l'expression de la MAG, de la MBP, du PLP et de la CNP (Asotra et Macklin, 1993). L'application d'ester de phorbol a pour effet d'induire la complexification du réseau de

prolongements oligodendrocytaires et leur allongement. Les PKC activent l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et son blocage par l'amiloride, inhibe totalement la croissance des prolongements (Althaus et al., 1991). Comme nous le verrons plus tard, des changements de pH intracellulaire jouent un rôle lors la maturation morphologique des oligodendrocytes. Des travaux plus approfondis ont permis de démontrer que l'induction de la croissance des prolongements est due spécifiquement à la PKC $\alpha$  (Yong et al., 1994).

#### **3.6.1.3. Cellules myélinisantes**

L'activation des PKC dans des oligodendrocytes myélinisants, induit une réversion du phénotype des cellules. Cette réversion est caractérisée par une diminution de l'expression de plusieurs protéines de la myéline telles que la MBP, le PLP et une diminution de l'activité de la CNP. Ceci se traduit par la décompaction de la membrane de myéline, et donc par une démyélinisation progressive des axones (Pouly et al., 1997). Des effets identiques sont obtenus en présence de bFGF. En effet, à ce stade de développement, le bFGF active les PKC (Radhakrishna et Almazan, 1994).

#### **3.6.1.4. Conclusion**

Les PKC agissent sur le développement des oligodendrocytes, mais celles-ci, comme nous l'avons vu, induisent des effets différents selon le stade de développement des cellules : inhibition de la différenciation des précurseurs et des pré-oligodendrocytes, activation de la différenciation des oligodendrocytes matures et diminution de l'expression des protéines de la myéline des cellules myélinisantes.

Il n'y a pas encore d'explication quant à ces différents effets, néanmoins il est à noter qu'il existe un grand nombre d'isoformes de la PKC et que leurs expressions est régulée de manière temporelle durant la différenciation (Asotra et Macklin, 1994). D'autre part, les PKC induisent la phosphorylation de la MARCKS et l'influx de calcium et l'augmentation de pH intracellulaire tous deux connus pour jouer un rôle dans le contrôle de la stabilité du cytosquelette (Yong et al., 1988; Yong et al., 1991; Avossa et Pfeiffer, 1993; Yong et al., 1994; Baron et al., 1999; Yoo et al., 1999). Lors du développement des oligodendrocytes, le cytosquelette subit de profonds remaniements. Chez les précurseurs, les microfilaments d'actine sont plus nombreux que les microtubules (Wilson et Brophy, 1989; Richter-Landsberg, 2000). De plus les microtubules ne sont localisés que dans les corps cellulaire et quelques grands prolongements. De ce fait, une phosphorylation de la MARCKS à ce stade va induire une déstabilisation du réseau de microfilaments et perturber

## Etude bibliographique

l'acheminement des vésicules de transport vers les prolongements (Baron et al., 1999). Parmi les molécules ne pouvant plus être incorporées à la membrane, on pourrait retrouver les protéines spécifiques de la myéline, et d'autres protéines nécessaires à la différenciation. Sur des gliomes, l'activation des PKC déstabilise les microfilaments d'actine et empêche la libération des MMP (Chintala et al., 1999). Ces enzymes sont très importantes dans tous les phénomènes de croissance cellulaire car elles créent un environnement permissif dans la matrice extracellulaire permettant la progression des prolongements (Uhm et al., 1998; Oh et al., 1999).

Au contraire des OLP et des pré-oligodendrocytes, l'activation des PKC sur les cellules matures, stimule la différenciation. A ce stade, ces cellules expriment beaucoup plus largement les microtubules que les microfilaments d'actine, notamment dans leurs prolongements (Richter-Landsberg, 2000). De ce fait, l'activation de la PKC et la phosphorylation de la MARCKS ne pourront plus induire la formation d'un réseau cortical d'actine suffisant pour empêcher le stockage et la fusion des vésicules convoyées par les microtubules (Baron et al., 1999). De plus, sur ces cellules l'activation des PKC augmente le transport des vésicules par les microtubules (Baron et al., 1999), permettant l'incorporation de plus de matériel dans la membrane plasmique, activant ainsi la différenciation.

Il existe, au cours du développement des oligodendrocytes, des changements très importants de l'expression des différentes isoformes de PKC et des protéines associées aux microtubules (MAP) (Richter-Landsberg, 2000). Ces MAP permettent de stabiliser les microtubules et sont phosphorylées, notamment par les PKC. Les oligodendrocytes expriment les MAP-1b, -2b, -2c et -4 et les isoformes 1 à 6 de tau (Vouyiouklis et Brophy, 1995; Muller et al., 1997). L'expression de MAP4 augmente durant la différenciation, les MAP2 atteignent un pic d'expression dans les pré-oligodendrocytes puis décroît (Vouyiouklis et Brophy, 1995; Muller et al., 1997). Ces variations dans l'expression de ces isoformes pourraient expliquer pourquoi les cellules myélinisantes se dédifférencient après activation de la PKC. Certaines MAP pourraient être plus sensibles à la phosphorylation, ou certaines isoformes de PKC pourraient être plus aptes à phosphoryler des MAP en fonction du stade de développement. En effet, la phosphorylation des MAP peut entraîner une inhibition de leur capacité à stabiliser les microtubules, déstabilisant le transport vésiculaire (Jameson et al., 1980).

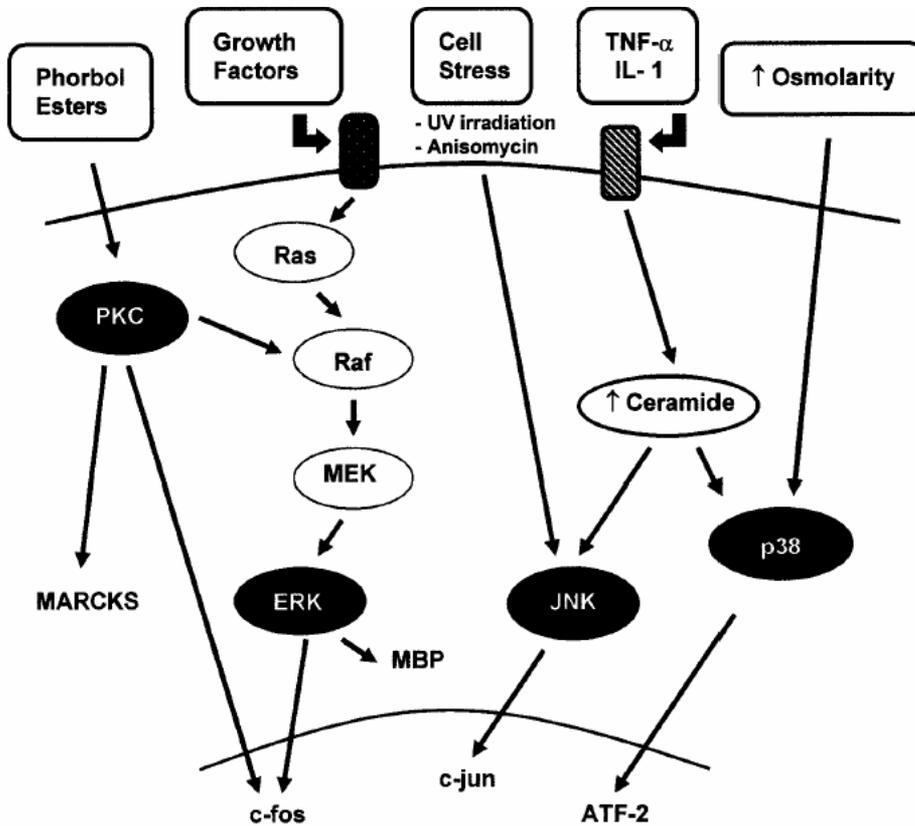
### **3.6.2. L'AMPC**

L'hypothèse d'un rôle de l'AMPC dans le développement des oligodendrocytes est née de plusieurs études montrant que l'application d'un analogue de l'AMPC, le N<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyryl cyclique AMP (db cAMP) induit une augmentation de l'activité de la CNP (McMorris, 1983), de la synthèse de galactocérebrosides (Pleasure et al., 1986), de l'immunoréactivité à l'anticorps O4 et du taux d'expression du PLP (Jensen et al., 1993). De plus, l'application de db cAMP sur des cultures d'OLP inhibe la prolifération et accélère la différenciation des cellules (Raible et McMorris, 1989, 1993). Il est à noter que l'induction de la différenciation des OLP par le db cAMP ne peut se faire que durant une période restreinte du développement, avant que les cellules expriment le galactocérebrosides et la MBP.

L'AMPC active la protéine kinase A (PKA), cette protéine est elle-même capable de moduler l'expression de gènes en activant, par phosphorylation, des facteurs de transcription. Un de ces facteurs phosphorylés par la PKA est la protéine CREB (Sato-Bigbee et Yu, 1993). Cette protéine est exprimée par les oligodendrocytes, et son expression est maximale au 14<sup>ème</sup> jour en culture, juste avant le maximum de myélinisation (Sato-Bigbee et Yu, 1993; Sato-Bigbee et al., 1994). En présence d'oligonucléotides antisens dirigés contre CREB, le db cAMP n'a plus d'effet sur la différenciation des oligodendrocytes. L'AMPC active CREB qui, phosphorylé, va alors stimuler l'expression des gènes nécessaires à la maturation finale des oligodendrocytes. Tel est le cas pour la MBP, dont l'expression est accrue après une stimulation de CREB (Sato-Bigbee et DeVries, 1996).

### **3.6.3. Cycle cellulaire, rôle de la protéine p27<sup>kip1</sup>**

La différenciation des cellules nécessite leur sortie du cycle cellulaire et l'induction d'un nouveau programme d'expression génique pour la spécialisation du phénotype. La progression des cellules de la phase G1 du cycle cellulaire vers la phase S de réplication de l'ADN est dépendante de l'activation coordonnée de deux kinases dépendantes des cyclines (CDK), la CDK4/6 et la CDK2. Tout événement interférant avec l'activité de ces deux kinases est suffisant pour induire l'arrêt de la prolifération des cellules. L'activation des CDK est très finement régulée. La première étape de leur activation consiste en leur association avec d'autres protéines telles que la cycline E pour CDK2 et la cycline D pour CDK4/6. Sous forme de complexe, les CDK sont alors activées par phosphorylation par



*D'après Stariha R.L., Kim S.U., (2001). Microsc Res Tech 52,680-688.*

**Planche 2.** Schéma d'activation de la voie des MAPK et des PKC dans les oligodendrocytes.

une kinase activatrice de CDK. Afin de pouvoir réguler de manière fine l'activité des CDK, il existe des voies d'inhibition. Ceci peut se faire par des inhibiteurs de CDK (CKI) dont il existe deux familles, les ink et les kip. Les CKI interagissent directement avec le complexe cycline/CDK ou entrent en compétition avec les cyclines pour la fixation sur la CDK.

La protéine p27<sup>kip1</sup> (p27) est une CKI impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à des signaux externes ; elle permet l'induction de la différenciation des neuroblastomes (Polyak et al., 1994; Kranenburg et al., 1995). Durant la phase de prolifération, il y a un ralentissement de sa dégradation par la voie du protéasome (Pagano et al., 1995), entraînant son accumulation (Durand et al., 1997; Friessen et al., 1997). Lorsque la p27 est présente en quantité suffisante, elle induit l'arrêt du cycle cellulaire.

Tout changement de l'expression de p27 induit des perturbations du développement des oligodendrocytes. En culture, des cellules issues de souris "knock-out" pour le gène de p27 se différencient plus tardivement et prolifèrent plus longtemps (Durand et al., 1998). D'autre part, la surexpression de p27 par les oligodendrocytes induit l'arrêt précoce de la prolifération en inhibant l'activité de la CDK2, mais en aucun cas il n'est observé une induction de la différenciation (Tang et al., 1999).

Le niveau de p27 est contrôlé par des facteurs extrinsèques connus pour moduler la prolifération et la différenciation cellulaire. L'application de noradrénaline ou de kaïnate sur des précurseurs induit une accumulation de p27 et p21<sup>cip</sup> (une autre CKI), suivie de l'arrêt de la prolifération (kaïnate et NA) et l'activation de la différenciation (NA) (Ghiani et al., 1999a; Ghiani et al., 1999b). Le PDGF quant à lui maintient à un niveau faible la quantité de p27 alors que la suppression du PDGF conduit à une accumulation plus rapide (Durand et al., 1997).

#### ***3.6.4. Voie des MAPK (planche 2)***

Les MAPK sont une famille de protéines constituée de l'"extracellular signal-regulated protein kinase" (ERK), de la "stress-activated c-jun N-terminal kinase" (JNK) et de la protéine p38. La plus connue et la plus étudiées de ces kinases est ERK. Il en existe 2 isoformes, ERK1 et ERK2. ERK peut être activée par une cascade de phosphorylation induite par la fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur. Deux voies majeures permettent l'activation de ERK dans les oligodendrocytes. La première implique une cascade de nombreuses kinases dont les plus importantes sont Ras, Raf, MEK. La seconde voie d'activation se fait par l'intermédiaire de la PKC qui, une fois activée, peut phosphoryler Raf, ce qui aboutit à l'activation de ERK (Kanashiro et Khalil, 1998). Dans

## Etude bibliographique

les oligodendrocytes, une fois activée, ERK peut phosphoryler de nombreux substrats comme la MBP ou des facteurs de transcription comme c-fos (Vartanian et al., 1986; Bhat et al., 1992). Le deuxième membre de la famille MAPK est la JNK qui est activée en réponse à un stress, à l'irradiation aux U.V, à l'acide okadaïque. JNK peut aussi être activée par les récepteurs du TNF- $\alpha$ , les interleukines et les neurotrophines. JNK active alors des facteurs de transcription tels que c-jun (Stariha et Kim, 2001a). Le troisième membre de cette famille est la p38 qui peut être activée par les mêmes agents que JNK mais aussi en réponse à un changement d'osmolarité (Stariha et Kim, 2001a).

ERK est impliquée dans la régulation de la prolifération des OLP. Le traitement des OLP avec la neurotrophine 3 (NT3) induit la prolifération cellulaire ainsi que la phosphorylation de ERK. Les effets de NT3 seraient dus à l'activation de ERK2 plutôt que ERK1 (Kumar et al., 1998). En présence du facteur de croissance nerveux (NGF), Althaus et al. ont pu induire la prolifération des oligodendrocytes matures, qui dans ces conditions, est accompagnée d'une activation de ERK1 (Althaus et al., 1992; Althaus et al., 1997). De ce fait, ERK1 semble impliquée dans la prolifération des OL matures et ERK2 dans celle des OLP. Comme nous l'avons décrit précédemment, la PKC joue un rôle important lors de l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires. La PKC induit la croissance par l'intermédiaire d'une augmentation de calcium intracellulaire, l'activation de MMP-9 et de ERK (Stariha et al., 1997; Uhm et al., 1998; Yoo et al., 1999). La stimulation des OLP par un ester de phorbol qui stimule la croissance des prolongements, active ERK1 et ERK2 et induit leur translocation du cytoplasme vers le noyau. Au contraire, l'utilisation d'un inhibiteur de la MEK, empêche l'activation de ERK et bloque la croissance des prolongements (Stariha et al., 1997).

Des travaux récents réalisés au laboratoire permettent d'envisager qu'un autre paramètre tel que le pH intracellulaire peut être impliqué dans le contrôle de la physiologie des oligodendrocytes. En culture primaire, une augmentation de  $\text{pH}_i$  d'environ 0,15 unité pH intervient au début de la différenciation des cellules précurseurs. Cette augmentation de  $\text{pH}_i$  est due à la perte d'activité d'un des mécanismes ioniques régulant le  $\text{pH}_i$ , l'échangeur anionique  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Le pH intracellulaire qui fait l'objet d'une régulation très fine dans la majorité des cellules pourrait ainsi servir de signal permettant le contrôle de la différenciation des OLP. Les principales caractéristiques de cette régulation sont exposées dans le chapitre suivant.

## ***C. pH***

Le pH est la représentation de la concentration apparente en proton d'une solution. Comme la pression sanguine, la glycémie, la température corporelle et bien d'autres paramètres physiologiques, le pH représente une grandeur physiologique très finement régulée au sein de l'organisme. Le métabolisme produit de manière continue des équivalents acides que l'organisme devra neutraliser ou évacuer pour maintenir constant le pH dans le sang, la lymphe, l'espace interstitiel et le milieu intracellulaire. Il existe donc des mécanismes de régulation, permettant le transport d'équivalents acide ou base à travers la membrane plasmique.

Le pH extra et intracellulaire, ne sont pas des grandeurs figées, fixées de manière absolue à une certaine valeur. En effet, l'activité neuronale, l'action de neurotransmetteurs, d'hormones, de facteurs de croissance ou d'autres signaux peuvent induire des variations rapides et transitoires du pH intra ou extracellulaire, comme pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{K}^+$ .

Des changements de concentration calcique sont généralement considérés comme un signal lié directement à la transduction d'un message au niveau intracellulaire alors que les changements de pH intracellulaire sont souvent considérés comme un épiphénomène. Par plusieurs exemples, nous verrons dans ce chapitre qu'il n'en est rien et qu'il existe au sein de la cellule une signalisation liée au pH permettant de moduler la physiologie cellulaire.

### ***1. Régulation du pH intracellulaire***

Le pH est une variable hautement régulée permettant ainsi son maintien à des valeurs dites physiologiques. Pour cela, au sein de la cellule, il existe des systèmes tampons et des mécanismes de transport.

#### ***1.1. Pouvoir tampon***

Ce pouvoir tampon est constitué par des systèmes permettant de rétablir le pH intracellulaire ( $\text{pH}_i$ ) à des valeurs de consignes à la suite de variation. Ces systèmes sont constitués de substances titrables, capable de consommer (bases) ou de donner (acides) des protons lorsque le  $\text{pH}_i$  varie. Leur activité peut être évaluée par l'observation des variations de  $\text{pH}_i$  suite à l'addition d'un acide ou d'une base faible.

### ***1.1.1. Origine des mécanismes tampons***

Les réactions impliquées dans la titration des protons sont de nature ionique à l'exception majeure de la réaction d'hydratation du CO<sub>2</sub> qui est en grande partie d'ordre enzymatique. Les mécanismes tampons potentiels sont les suivants :

- Les tampons chimiques, c'est-à-dire les sels des acides et des bases faibles : c'est le système le plus important, capable de minimiser les variations de pH<sub>i</sub> par une liaison des ions H<sup>+</sup> libres en formant des constituants chimiques dissociables.
- Dans la gamme des pH physiologiques, au moins 80% des propriétés de titration sont dues aux groupes imidazole des résidus histidyls des protéines, le reste se répartissant essentiellement entre α-amines et cystéines.
- Le mouvement des acides et des bases. Certaines organelles peuvent séquestrer des acides et des bases faibles cytoplasmiques, leur saturation en protons limitant leur rôle dans la titration du cytoplasme. Ce rôle tampon est considéré d'une part comme une partie intégrale du pouvoir tampon intrinsèque (β<sub>i</sub>), et d'autre part comme un pouvoir tampon propre à ces organelles.

### ***1.1.2. Quantification du pouvoir tampon cellulaire***

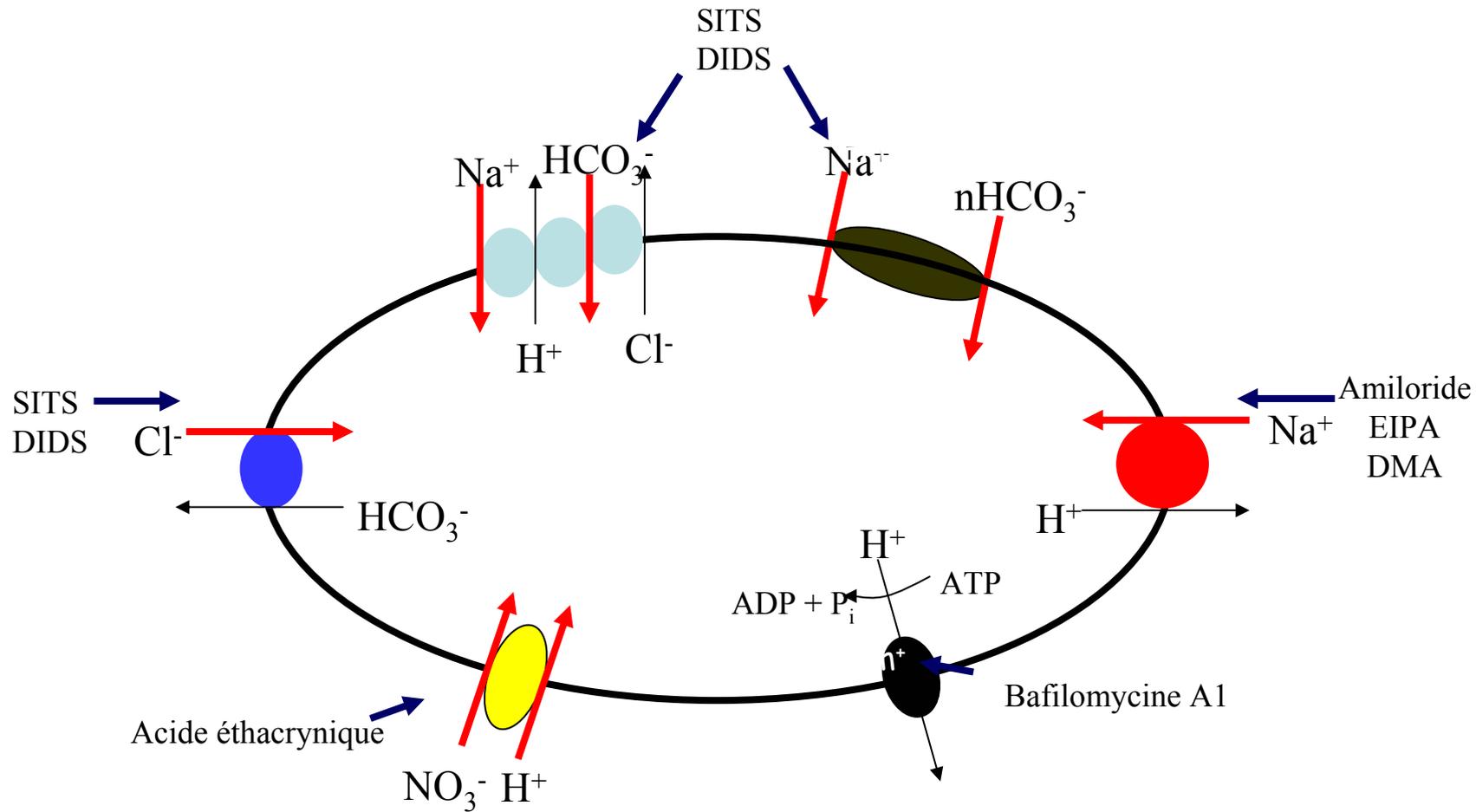
En 1922, Van Slyke a été le premier à donner une définition et à développer la méthode utilisée jusqu'à présent dans la quantification du pouvoir tampon cellulaire, d'après l'équation :

$$\beta_i = \Delta C / \Delta pH$$

β<sub>i</sub> : valeur du pouvoir tampon intrinsèque en absence du système CO<sub>2</sub>/ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en mmol.l<sup>-1</sup>.pH<sup>-1</sup>.

C : concentration totale de la base ou de l'acide utilisé en mmol. l<sup>-1</sup>.

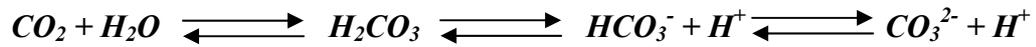
ΔpH : variation de pH avant et après addition de la base ou de l'acide.



**Figure 1.** Mécanismes de régulation du pH intracellulaire.

→  $\text{Em}^+$  : dépendant du potentiel de membrane.  
→ : Gradient permettant le fonctionnement.

Le pouvoir tampon d'une cellule est plus important en présence de CO<sub>2</sub>. En effet, l'anhydrase carbonique catalyse la réaction d'hydratation du CO<sub>2</sub>, produisant des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et H<sup>+</sup> :



Pour une valeur donnée de pression partielle de CO<sub>2</sub> (P<sub>CO2</sub>), le système CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exerce au niveau des cellules un pouvoir tampon (β<sub>CO2</sub>) égal à :

$$\beta_{CO2} = ([\Delta HCO_3^-]_i / [\Delta pH_i])$$

$$\beta_{CO2} \text{ en mmol.l}^{-1}.\text{pH}^{-1}.$$

[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>i</sub> : concentration intracellulaire de bicarbonate en mmol.l<sup>-1</sup>.

ΔpH<sub>i</sub> : variation de pH avant et après addition de la base ou de l'acide.

Le pouvoir tampon total d'une cellule (β<sub>t</sub>) dépend est la somme du pouvoir tampon intrinsèque (β<sub>i</sub>) et du pouvoir tampon du CO<sub>2</sub> (β<sub>CO2</sub>) :

$$\beta_t = \beta_i + \beta_{CO2}$$

### ***1.2. Mécanismes de transport des ions H<sup>+</sup>***

L'activité de certains organelles intracellulaires comme les mitochondries et les lysosomes est impliquée dans la régulation de pH<sub>i</sub> par la séquestration des ions H<sup>+</sup> libres. Cette activité permet d'éviter des variations trop importantes de la concentration des ions H<sup>+</sup> et augmente aussi le pouvoir tampon intracellulaire. En plus de l'action des systèmes tampons, l'activité de mécanismes présents sur la membrane plasmique est impliquée directement dans la régulation de pH<sub>i</sub> par leur capacité de transport d'équivalents acides ou bases.

Les mécanismes identifiés jusqu'à présent sont (figure 1):

- l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.
- l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
- l'échangeur Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
- le co-transporteur Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
- le co-transporteur NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-H<sup>+</sup>.
- la pompe H<sup>+</sup>-ATPase

### **1.2.1. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$**

#### **1.2.1.1. Fonctionnement**

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est une protéine transmembranaire capable de transporter d'un côté à l'autre de la membrane des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}^+$ . L'activité de l'échangeur, décrite pour la première fois par Thomas en 1976, permet dans les conditions physiologiques l'extrusion des acides sous formes de  $\text{H}^+$  couplée à l'entrée d'un ion  $\text{Na}^+$  (fig 1) (Thomas, 1976). Cet échange nécessite l'existence d'un gradient entrant sodique de part et d'autre de la membrane cellulaire qui fournit l'énergie indispensable à la sortie des ions  $\text{H}^+$  (Boron et De Weer, 1976; Grinstein et Rothstein, 1986; Madshus, 1988). Dans la plupart des cellules, le gradient sodique est établi grâce à l'activité de la pompe membranaire  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase qui assure l'efflux de trois ions  $\text{Na}^+$  contre l'influx de deux ions  $\text{K}^+$ . En absence de  $\text{Na}^+$  extracellulaire il peut être observé une inversion du fonctionnement de l'échangeur provoquant alors une acidification intracellulaire (Aickin et Thomas, 1977; Paris et Pouysségur, 1983; Cassel et al., 1984; Grinstein et Rothstein, 1986). La variation de la concentration de l'un des deux ions provoquera une variation du taux et de la vitesse de transport de l'autre. Des expériences menées sur des quantifications d'influx et d'efflux des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}^+$  ont montré que la stoechiométrie de cet échangeur est de 1, son activité est électroneutre. L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est un des mécanismes de transport impliqué dans la régulation de  $\text{pH}_i$  des oligodendrocytes. Au cours de la différenciation des OLP, l'expression et les propriétés de l'échangeur ne sont pas modifiées (Boussouf et al., 1997; Boussouf et Gaillard, 2000)

#### **1.2.1.2. Les différentes isoformes (NHE1-NHE6)**

Le clonage de l'isoforme NHE1 chez l'homme a beaucoup aidé à la découverte des autres isoformes (Sardet et al., 1989). La variabilité des caractéristiques pharmacologiques et fonctionnelles de l'échangeur NHE a laissé penser qu'il existe d'autres isoformes que NHE1. La sensibilité de l'échangeur NHE vis-à-vis d'inhibiteurs spécifiques varie d'un type cellulaire à un autre (Noël et Pouysségur, 1995); la réponse de l'échangeur à une activation par des protéines kinases change en nature et en amplitude suivant l'origine des cellules considérées (Tse et al., 1994); les caractéristiques cinétiques et l'affinité de l'échangeur pour les ions  $\text{H}^+$  changent selon le type de cellules testées (Paris et Pouysségur, 1984). Actuellement, 6 isoformes ont été identifiées, allant de NHE1 à NHE6. NHE1-2-3-4 et 5 possèdent une homologie de séquence comprise entre 34 et 60%. NHE1 est exprimé dans tout l'organisme alors que les isoformes NHE2 à NHE5 ont une

distribution limitée à certains tissus. NHE2, NHE3 et NHE4 sont exprimés majoritairement dans les reins et l'appareil digestif (Orlowski et al., 1992; Tse et al., 1993; Bai et al., 1999; Moe, 1999). NHE5 est majoritairement exprimé dans le cerveau. NHE6 est la dernière isoforme caractérisée et aussi celle qui présente le moins d'homologie avec les autres isoformes (20%). Cette isoforme est exprimée dans les mitochondries et son expression est plus importante dans les organes possédant un métabolisme élevé comme le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau (Numata et al., 1998).

### ***1.2.1.3. Régulation de l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$***

▪ **Site pH sensible :** dans le compartiment intracellulaire il existe un site régulateur (Aronson et al., 1982; Aronson, 1985), proche du site de transport interne des  $\text{H}^+$ , qui agit suivant une loi d'allostérie sur le taux d'échange (Paris et Pouysségur, 1984). Ce site agit en fonction de son état de protonation et constitue un site sensible au pH capable d'adapter l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en fonction de  $\text{pH}_i$ . Ce site régulateur se trouve dans un état protoné lorsque la concentration des ions  $\text{H}^+$  dans le cytoplasme est élevée et dans un état déprotoné à un pH de consigne. La présence de ce site explique pourquoi l'activité de ce type d'échange est pratiquement nulle entre pH 7,00 et 7,40 malgré l'important déséquilibre ionique permanent en faveur du gradient entrant de  $\text{Na}^+$ . En agissant comme un interrupteur, le site empêche l'échangeur d'imposer un  $\text{pH}_i$  alcalin. En effet, l'équilibre thermodynamique de l'échangeur serait atteint lorsque  $[\text{Na}^+]_o/[\text{Na}^+]_i = [\text{H}^+]_o/[\text{H}^+]_i$  ce qui représenterait un  $\text{pH}_i$  de 8,40 ( $\text{pH}_e = 7,40$  et  $[\text{Na}^+]_e = 140$  mM et  $[\text{Na}^+]_i = 14$  mM). Inversement, une acidification intracellulaire va induire l'activation de l'échangeur. Ce mode de régulation rend donc l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  parfaitement adapté à la régulation de  $\text{pH}_i$ , en particulier pour le ramener à une valeur de consigne.

▪ **Par des facteurs exogènes :** De nombreux facteurs peuvent stimuler l'activité de l'échangeur, on peut citer les facteurs de croissance (EGF, PDGF...), le sérum, la vasopressine ou le phorbol 12-myristate 13-acétate (Grinstein et Rothstein, 1986; Noël et Pouysségur, 1995). La stimulation de l'échangeur se traduit par une alcalinisation du cytoplasme. Il est généralement admis que la phosphorylation de l'échangeur est l'événement permettant son changement d'activité (Pouysségur et al., 1982; Sardet et al., 1991; Noël et Pouysségur, 1995). L'activation peut se faire par :

1) la voie des récepteurs couplés aux protéines G, qui induit une activation des PKC et la phosphorylation de l'échangeur

## Etude bibliographique

(Dhanasekaran et al., 1994). Il existe aussi une voie PKC indépendante passant par l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la  $Ca^{2+}$ -calmoduline qui interagit directement avec l'échangeur en en modifiant la conformation et l'activité (Bertrand et al., 1994). Il a aussi pu être montré qu'une des protéines G ( $G_{\alpha 13}$ ) induit l'activation de l'échangeur par l'intermédiaire de RhoA (petite protéine G) (Hooley et al., 1996).

2) la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase, par l'intermédiaire de Ras et de la voie des MAPK ERK1/2 (Hagag et al., 1987; Maly et al., 1989). Takahashi et al. ont démontré que la phosphorylation de NHE1 par cette voie se fait par l'intermédiaire de la protéine ribosomique S6 p90 qui est une sérine thréonine kinase activée par les MAPK ERK1/2 (Takahashi et al., 1999). Il a été montré que d'autres voies telles que celles des phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et de la kinase interagissant avec le Nck (NIK) participent à l'activation de NHE1 via la phosphorylation de sites situés au niveau C-terminal (Ma et al., 1994; Yan et al., 2001).

3) un stress hyperosmotique. L'activation de l'échangeur est dans ce cas dépendante de la taille de la cellule (Krump et al., 1997). Cette activation n'est due ni à l'activation des voies classiques (MAPK, Nck, PI3K) ni à la phosphorylation de NHE1 (Grinstein et al., 1992). Sachant que NHE1 se fixe sur des protéines associées au filaments d'actine (les ERM) (Denker et al., 2000), une des hypothèses serait que l'organisation du cytosquelette participe à la régulation de l'activité de l'échangeur (Kurashima et al., 1999).

▪ **L'amiloride et ses dérivés** : Les résultats obtenus dans ce domaine montrent que l'amiloride, un agent diurétique, et ses dérivés (diméthyl- et éthylisopropyl-amiloride) sont capables de stopper l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$  (Benos, 1982; Aronson, 1985). L'inactivation de l'échangeur par l'amiloride et ses dérivés peut varier d'un type cellulaire à l'autre et en fonction de l'isoforme de l'échangeur exprimée (Noël et Pouysségur, 1995). L'action inhibitrice de l'amiloride et de ses dérivés passe par sa liaison avec le site spécifique de transport des ions  $Na^+$  sur la surface externe de la membrane ; cette liaison empêche celle des ions  $Na^+$  et entraîne l'arrêt de l'échange de ces derniers contre des protons. Ce blocage provoque une acidification intracellulaire par une accumulation de protons dans le cytoplasme, cet effet est réversible après élimination de l'amiloride (Paris et Pouysségur, 1983; Grinstein et Furuya, 1984; Grinstein et Rothstein, 1986). Pour des

études *in vitro*, l'application d'amiloride est devenue un test indispensable dans l'identification et la caractérisation de l'échangeur natif et de ses isoformes.

### **1.2.2. L'échangeur $Na^+/H^+/HCO_3^-/Cl^-$**

#### **1.2.2.1. Fonctionnement**

Différentes études ont montré que certains types de neurones et de cellules gliales du SNC expriment cet échangeur (Moser, 1985; Schlue et Thomas, 1985; Szatkowski et Schlue, 1992). L'activité de cet échangeur est impliquée dans la régulation de  $pH_i$  par sa capacité à transporter les ions  $HCO_3^-$  et les ions  $H^+$  (fig 1). Ce transport s'accompagne d'un transfert d'ions  $Na^+$  et  $HCO_3^-$  extracellulaires vers le cytoplasme, contre une extrusion équivalente d'ions  $H^+$  et  $Cl^-$  (Russell et Boron, 1976; Boron, 1977; Boron et Boulpaep, 1983). L'analyse des caractéristiques cinétiques spécifiques aux flux respectifs des ions montre que la stoechiométrie de l'échangeur est de 1 et donc que son fonctionnement est électroneutre (Thomas, 1978). De ce fait, l'activité de l'échangeur ne va pas affecter le potentiel de membrane. Le transport des ions  $Na^+$  suivant leur gradient électrochimique est considéré comme l'unique source d'énergie qui alimente le transport des autres ions concernés contre leurs gradients respectifs (Boron, 1977; Thomas, 1977).

#### **1.2.2.2. Régulation de l'activité de l'échangeur $Na^+/H^+/HCO_3^-/Cl^-$**

Les études pharmacologiques montrent que ce mode de transport ionique peut être inhibé par des dérivés du stilbène, le SITS<sup>8</sup> ou DIDS<sup>9</sup> (Cabantchik et al., 1978; Cabantchik et Greger, 1992). La sensibilité de l'échangeur à ces deux inhibiteurs varie d'un type cellulaire à l'autre. L'inhibition de l'échangeur se fait pour des concentrations de SITS et de DIDS comprise entre 0,2 et 0,5 mM et induit une acidification intracellulaire due à l'accumulation des ions  $H^+$  et à la diminution de l'entrée de  $HCO_3^-$  (Hoffmann, 1986). Le SITS et le DIDS se lient de manière compétitive au site externe de transport des ions  $HCO_3^-$  (Hoffmann, 1986). Cet échangeur n'est pas exprimé par les oligodendrocytes, quel que soit leur stade de différenciation (Boussouf et al., 1997; Boussouf et Gaillard, 2000)

---

<sup>8</sup> 4 acétamido-4'-isothiocyanatostilbène-2,2' disulfonic acid

<sup>9</sup> 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2' disulfonic acid

### **1.2.3. L'échangeur $Cl^-/HCO_3^-$**

#### **1.2.3.1. Fonctionnement**

L'échangeur anionique  $Cl^-/HCO_3^-$  (AE) est une protéine membranaire dont l'activité est impliquée dans la régulation de  $pH_i$ . AE permet le transport des ions  $HCO_3^-$  d'un côté à l'autre de la membrane et un transport dans l'autre sens d'ions  $Cl^-$ , indépendamment des ions  $Na^+$  (Boron et De Weer, 1976) (fig 1). La combinaison des gradients électrochimiques des anions  $Cl^-$  et  $HCO_3^-$  est à l'origine du fonctionnement de l'échangeur. Dans les conditions physiologiques, le transfert des ions bicarbonate s'effectue vers le milieu extracellulaire. Une inversion du gradient de l'un de ces ions stimule le fonctionnement inverse de l'échangeur, entraînant une alcalinisation du cytoplasme (Reuss, 1984). L'analyse des flux respectifs des ions  $Cl^-$  et  $HCO_3^-$  montre que l'activité de l'échangeur est électroneutre avec une stoechiométrie de 1. Les travaux de Boussouf et al. réalisés au laboratoire ont permis de montrer que les OLP expriment cet échangeur mais aucune activité n'a pu être mise en évidence sur des pré-oligodendrocytes ou des oligodendrocytes matures. De ce fait, une augmentation significative de  $pH_i$  est enregistrée à ces deux derniers stades (Boussouf et al., 1997; Boussouf et Gaillard, 2000).

#### **1.2.3.2. Les différentes isoformes (AE1-3)**

Trois gènes différents codent chacun une des isoformes de l'échangeur anionique (Alper, 1991). Le gène codant AE1 est le plus exprimé et code pour la plupart des protéines intrinsèques de la membrane appelées bande 3 par les érythrocytes ; ces protéines sont spécialisées dans le transport des anions  $Cl^-$  et  $HCO_3^-$  (Kopito et Lodish, 1985; Wang, 1994). Une forme tronquée de AE1 est exprimée au niveau du coeur (Pucéat et al., 1995) et des reins (Brosius et al., 1989). Le gène codant AE2 est exprimé par de nombreux organes et notamment les reins, et les cellules lymphatiques (Alpern et al., 1988; Wang et al., 1996). AE3 est fortement exprimé dans le tissu cardiaque des vertébrés et dans le SNC des mammifères (Kopito et al., 1989; Raley-Susman et al., 1993).

#### **1.2.3.3. Régulation de l'activité de l'échangeur $Cl^-/HCO_3^-$**

▪ **Site pH sensible** : Il existe une dépendance entre la valeur de  $pH_i$  et l'activité de l'échangeur (Lacoste et al., 1991). L'activité de AE1 augmente jusqu'à un  $pH_i$  de 7 et atteint un plateau entre  $pH_i$  7 et 11. AE2 et AE3 ont une dépendance envers le  $pH_i$  pour des valeurs de pH entre 7 et 9. Ces résultats démontrent l'existence d'un site pH sensible au niveau de l'échangeur (pour revue voir (Pucéat, 1999)).

▪ **Par des facteurs exogènes :** De nombreux facteurs peuvent moduler l'activité de l'échangeur, on peut citer la prostaglandine, l'angiotensine II, l'aldostérone, l'acide okadaïque ou une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Oberleithner et al., 1990; Yanaka et al., 1992; Camilion de Hurtado et al., 1998; de La Rosa et al., 2002). Ces facteurs vont induire une stimulation de l'échangeur qui va augmenter la sortie de  $\text{HCO}_3^-$  et induire une acidification du cytoplasme.

L'activation peut se faire par :

1) la voie de l'AMP cyclique et de la PKA, notamment par le glucagon dans les hépatocytes ou une stimulation  $\beta$ -adrénergique pour les cardiomyocytes (Desilets et al., 1994; Alvaro et al., 1995).

2) la voie des tyrosines kinases. La séquence de l'échangeur AE1 possède en effet plusieurs sites de phosphorylation par des tyrosine kinases (Yannoukakos et al., 1991). Des études réalisées *in vitro* ont confirmé que AE1 est un substrat de phosphorylation de diverses tyrosine kinases et en particulier du récepteur de l'EGF. Une transmission purinergique peut aussi induire la stimulation de l'échangeur AE1 par l'intermédiaire de l'induction des tyrosine kinases Fyn et Src (Pucéat et al., 1998).

▪ **Les dérivés du stilbène :** Comme les autres transporteurs anioniques, l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  est sensible soit au SITS, soit au DIDS, soit au deux. Les isoformes AE1 et AE3 sont fortement inhibées par le DIDS avec un  $\text{EC}_{50}$  compris entre 1 et 10  $\mu\text{M}$ , alors que AE2 est peu sensible, avec un  $\text{EC}_{50}$  d'environ 1 mM (Lee et al., 1991). La propriété du DIDS ou du SITS d'inhiber l'activité de l'échangeur s'explique par leur liaison compétitive avec le site spécifique du transport des ions bicarbonate.

#### ***1.2.4. Le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC)***

##### ***1.2.4.1. Fonctionnement***

Le co-transporteur NBC a été décrit pour la première fois dans la membrane des cellules du tube rénal de la salamandre où il participe à la régulation du pH intra- et extracellulaire (Boron et Boulpaep, 1983). Dans ces cellules, l'activité de NBC est électrogénique et présente une stoechiométrie de 3 ions  $\text{HCO}_3^-$  pour 1 ion  $\text{Na}^+$  (Yoshitomi et al., 1985; Grassl et Aronson, 1986) (fig 1). Plusieurs études ont mis en évidence que ce

co-transporteur est exprimé dans de nombreux tissus et notamment dans le cerveau (Astion et al., 1989; Bevensee et al., 2000), les neurones et les oligodendrocytes (Boussouf et al., 1997; Schmitt et al., 2000). Il existe une différence importante entre les propriétés du NBC rénal et celles du NBC des autres tissus. Dans les conditions physiologiques, l'activité de l'échangeur rénal permet la sortie d'ions  $\text{HCO}_3^-$  alors que le fonctionnement est inverse dans les autres tissus (Boron et Boulpaep, 1983; Grassl et Aronson, 1986; Camilion de Hurtado et al., 1996; Boussouf et al., 1997; Boussouf et Gaillard, 2000). Il existe de plus des changements de la stoechiométrie en fonction du tissu analysé. Dans le coeur, le co-transporteur permet l'échange de 2  $\text{HCO}_3^-$  pour 1  $\text{Na}^+$  (Camilion de Hurtado et al., 1996), dans les oligodendrocytes matures la stoechiométrie est de 3  $\text{HCO}_3^-$  pour 1  $\text{Na}^+$  (Boussouf et al., 1997). Ces différences importantes dans le fonctionnement du NBC peuvent s'expliquer par : i) la dépendance du fonctionnement de NBC vis-à-vis du potentiel de membrane des cellules, ii) l'existence de différentes isoformes de ce co-transporteur.

#### ***1.2.4.2. Régulation de l'activité du co-transporteur $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$***

Le co-transporteur peut être stimulé par un changement de pH, un changement de concentration d'ions  $\text{HCO}_3^-$  extra- ou intracellulaire, ou encore par des modifications du potentiel de membrane (Brune et al., 1994).

▪ **Par des facteurs exogènes :** de nombreux facteurs peuvent moduler l'activité du co-transporteur, on peut citer l'angiotensine II (reins), des agonistes cholinergiques (reins),  $\alpha$  et  $\beta$ -adrénergiques (cœur) (Lagadic-Gossman et al., 1992; Terzic et al., 1992; Robey et al., 2001; Robey et al., 2002). Ces différents facteurs agissent sur le NBC notamment en le phosphorylant. Suivant le type cellulaire, et certainement les propriétés des isoformes exprimées, un même signal peut soit activer, soit inhiber l'activité de l'échangeur : l'AMPC et la PKA stimulent NBC dans le colon (Bachmann et al., 2003) et l'inhibe dans les reins (Ruiz et Arruda, 1992). Des études récentes ont permis de montrer que l'activité de NBC pouvait être contrôlée par l'intermédiaire de voies impliquant les MAPK ERK1/2 (Baetz et al., 2002) et les tyrosine kinases de la famille src (Robey et al., 2002).

▪ **Inhibition par des agents pharmacologiques :** l'activité du co-transporteur est inhibée par des dérivés du stilbène comme le SITS et le DIDS. A l'exception des cellules rénales, une inactivation du co-transporteur provoque une acidification intracellulaire. La

capacité de chacun de ces inhibiteurs de bloquer le co-transporteur dépend de leur affinité pour le site spécifique des ions  $\text{HCO}_3^-$ , le degré de cette inhibition pouvant varier d'un type cellulaire à l'autre (Hughes et al., 1989). Une inhibition totale du co-transporteur des cellules gliales par le SITS et le DIDS a été enregistrée pour des doses de 0.3 à 0.5 mM (Chesler, 1990). Sur les OLP issus du cervelet de rat, une inhibition par le DIDS est enregistrée contrairement aux OL matures (Boussouf et al., 1997; Boussouf et Gaillard, 2000).

#### ***1.2.4.3. Les différentes isoformes (NBC1-4)***

▪ **NBC1** : NBC1 est le premier co-transporteur à avoir été séquencé à partir de cellules rénales humaines (Burnham et al., 1997). Dans la littérature on trouve souvent cette isoforme sous l'appellation kNBC1 (pour kidney NBC1) par opposition à la forme pancréatique (pNBC1) qui diffère de 85 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Abuladze et al., 1998). En plus des reins et du pancréas, cette isoforme est exprimée dans la prostate, le colon, l'estomac, la thyroïde, le cerveau et la moelle épinière (Abuladze et al., 1998). L'activité de NBC1 est électrogène et l'étude de l'expression de cette isoforme par des cellules rénales montre une stoechiométrie de 3  $\text{HCO}_3^-$  pour 1  $\text{Na}^+$ . Cette même isoforme exprimée par des cellules pancréatiques présente une stoechiométrie de 2  $\text{HCO}_3^-$  pour 1  $\text{Na}^+$  (Gross et al., 2001). Ces résultats démontrent que la stoechiométrie de NBC1 dépend du tissu dans lequel il est exprimé. Récemment, les travaux de Gross et al. ont mis en évidence que la stoechiométrie du co-transporteur peut être modulé par la PKA. La phosphorylation se produit sur des résidus sérine en position 982 et 1026 (Gross et al., 2002; Gross et al., 2003).

▪ **NBC2** : une première isoforme de ce co-transporteur (NBC2a) a été isolée et identifiée à partir d'une banque d'ADN complémentaire obtenue à partir de rétine humaine (Ishibashi et al., 1998). NBC2a est largement exprimé dans différents organes : testicules, rate, colon, ovaires, thymus, cœur. Le clonage de NBC2a a permis de révéler l'existence de deux autres isoformes produites par épissage alternatif. Une isoforme a été clonée à partir de muscle squelettique humain (NBC2c) et l'autre à partir de rétine (NBC2b) (Pushkin et al., 1999). Des analyses fonctionnelles effectuées par expression dans des ovocytes de xénope ont démontré que l'isoforme NBC2c est résistante à l'inhibition par le DIDS mais sensible à l'amiloride et ses dérivés (Pushkin et al., 1999). Il est à noter que, chez le rat, cette isoforme n'est pas sensible à l'amiloride et est inhibée par le DIDS (Choi et al.,

2000), démontrant encore une fois que les propriétés de ces co-transporteurs dépendent du type cellulaire où ils sont exprimés. Ces études ont montré que l'activité des isoformes humaine et murine de NBC2c sont électroneutres, et présentent une stoechiométrie de 1 (Pushkin et al., 1999; Choi et al., 2000).

- **NBC3** : cette isoforme a été originellement caractérisée dans une lignée cellulaire humaine (NT-2). Trois différents transcrits ont pu être identifiés et leur expression tissulaire est spécifique. Un long transcrit ( $\approx 9$  kb) est exprimé dans le cerveau et la moelle épinière. Un transcrit de taille intermédiaire ( $\approx 4,5$  kb) est fortement exprimé dans le cerveau, le placenta et le rein. Un troisième transcrit de petite taille ( $\approx 3$  kb) n'est trouvé que dans les tissus nerveux (Amlal et al., 1999). Des études fonctionnelles ont montré que l'activité de ce co-transporteur est électroneutre et présente une stoechiométrie de 1 (Wang et al., 2001).

- **NBC4** : cette isoforme est la dernière à avoir été caractérisée. Dans un premier temps, deux transcrits de ce transporteur ont été découverts. NBC4a est exprimé dans le foie, les testicules, la rate, alors que NBC4b est fortement exprimé dans le cœur (Pushkin et al., 2000). Par criblage d'une banque humaine d'ADN complémentaire, une nouvelle isoforme appelée NBC4c a été identifiée (Sassani et al., 2002). NBC4c est exprimé dans le cerveau, le cœur, les reins, les testicules. L'expression de cette isoforme dans des cellules HEK293 ou des ovocytes de xénope a permis de montrer que l'activité de ce co-transporteur est sensible au DIDS et est électrogène. Par contre en ce qui concerne la stoechiométrie, deux résultats différents ont été rapportés. Une première équipe a trouvé une stoechiométrie de  $3 \text{ Na}^+$  pour  $1 \text{ HCO}_3^-$  (Sassani et al., 2002) et l'autre de  $2 \text{ Na}^+$  pour  $1 \text{ HCO}_3^-$  (Virkki et al., 2002). Cette divergence peut s'expliquer par le fait que ces études ont été réalisées dans deux types cellulaires différents (ovocytes et HEK293).

### ***1.2.5. Le co-transporteur $\text{NO}_3^-$ - $\text{H}^+$***

#### ***1.2.5.1. Fonctionnement***

L'activité de ce co-transporteur est impliquée dans la régulation du  $\text{pH}_i$  par sa capacité de transport d'équivalents acides sous la forme de protons à travers la membrane. Cette activité s'accompagne d'un transport unidirectionnel de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), produit de dégradation du NO. Dans les conditions physiologiques normales, ce mécanisme est responsable d'une acidification intracellulaire induite par l'entrée des protons. Le

changement du gradient électrochimique de l'une des espèces ioniques peut induire le fonctionnement inverse du co-transporteur. L'analyse des flux d'équivalents acides et de nitrates a permis de montrer que l'échangeur possède une stoechiométrie de 1, et que son activité est donc électroneutre (Chow et al., 1997) (fig 1).

#### ***1.2.5.2. Structure et expression du co-transporteur $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$***

La structure exacte de la protéine responsable de ce co-transport reste inconnue. Son activité a été décrite dans une variété de lignées de cellules de mammifères comme les cellules WT5 (un sous-type de la lignée des cellules CHO), les cellules AP1 (lignée dérivée de WT5 n'exprimant pas NHE1), les cellules HEK293 et la lignée J774 (monocytes/macrophages de mollusque) (Chow et al., 1997). Cette activité n'a pas été démontrée dans les cellules gliales du SNC des mammifères.

#### ***1.2.5.3. Régulation de l'activité du co-transporteur $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$***

L'activité de ce mécanisme peut être stimulée par une variation du  $\text{pH}_i$  ou une augmentation des  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu extracellulaire mais les voies par lesquelles l'activité de la molécule est stimulée restent inconnues. Par ailleurs, l'activité de ce co-transporteur est inhibée totalement par l'acide éthacrynique et l' $\alpha$ -cyano-hydroxycénamique. Le DIDS induit une diminution de 86% de son activité.

### ***1.2.6. La pompe $\text{H}^+$ -ATPase***

#### ***1.2.6.1. Fonctionnement***

La pompe  $\text{H}^+$ -ATPase appartient à la catégorie des pompes dites vacuolaires (V-type ATPase) (Brown et al., 1987; Forgac, 1989). Cette pompe peut aussi être localisée au niveau de la membrane cellulaire, son activité permet la régulation de  $\text{pH}_i$  par la translocation des ions  $\text{H}^+$  vers le milieu extracellulaire (Forgac et al., 1983; Van Dyke et al., 1985; Brown et al., 1987) (fig 1). L'activité de la pompe provoque une alcalinisation intracellulaire. Les études cinétiques montrent que l'extrusion d'un proton est accompagnée de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Cette réaction produit l'énergie indispensable au fonctionnement de la pompe (Gluck et Al-Awqati, 1984; Andersen et al., 1985). L'activité de la pompe génère un efflux de charges positives qui provoque un changement du potentiel de membrane, l'activité est électrogène (Steinmetz et Andersen, 1982; Gluck et Al-Awqati, 1984). La pompe est constituée de deux structures essentielles très distinctes : un canal spécifique où transit les ions  $\text{H}^+$  et une unité catalytique

permettant l'hydrolyse de l'ATP régulant l'activité de la pompe (Andersen et al., 1985; Forgac, 1989). La vitesse de la translocation dépend de la concentration des  $H^+$  libres et de la différence du potentiel électrique au niveau du canal. En ce qui concerne l'unité catalytique, la translocation des ions  $H^+$  dépend surtout de la concentration intracellulaire en molécules d'ATP, d'ADP et de  $P_i$ . Cette pompe est très exprimée dans les cellules épithéliales (Gluck et al., 1982b; Gluck et al., 1982a; Andersen et al., 1985). Cette pompe est retrouvée exprimée au niveau de gliomes de rat (C6) et humains ainsi que sur les astrocytes de rat (U87MG et T98G) (Pappas et Ransom, 1993; Volk et al., 1998; Philippe et al., 2002; Nishiguchi et al., 2003).

#### ***1.2.6.2. Modulation pharmacologique de la pompe $H^+$ -ATPase***

L'activité de la pompe  $H^+$ -ATPase peut être inhibée par la N-éthylmaléimide (NEM), le dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) et la bafilomycine A1. L'inactivation de la pompe est suivie d'une acidification intracellulaire importante due à une accumulation des protons libres (Diaz-Diaz et al., 1986; Bowman et al., 1988; Forgac, 1989).

### ***2. pH et fonctions cellulaires***

Les variations du pH ont de multiples conséquences sur le fonctionnement du SNC en déclenchant ou en inhibant un grand nombre d'activités biologiques.

#### ***2.1. Effets sur les conductances ioniques***

Les fluctuations de pH modifient certaines caractéristiques de l'activité des canaux ioniques comme la conductance, la durée d'ouverture ou de fermeture du canal ou encore en bloquant le passage des ions par la liaison des protons avec des sites ioniques du canal (Konnerth et al., 1987; Ueno et al., 1992; Daumas et Andersen, 1993).

Les cellules gliales expriment toute une variété de canaux ioniques (Sontheimer et al., 1989b; Sontheimer et al., 1989a) et l'activité de ces canaux dépend de la concentration de protons dans le milieu (Deitmer et Rose, 1996). Des résultats obtenus *in vitro* montrent qu'une acidification intracellulaire provoque une activation des courants sodiques dans les OLP (Sontheimer et al., 1989b; Sontheimer et al., 1989a) et sur les astrocytes. Une acidification extracellulaire inhibe le flux entrant des ions  $K^+$  en réduisant la conductance des canaux potassiques (Walz et Hinks, 1987; Hoppe et al., 1989). D'autres résultats obtenus sur plusieurs préparations neuronales montrent qu'une acidification inhibe l'entrée

des ions  $\text{Ca}^{2+}$  se traduisant par une diminution de la perméabilité ionique et une diminution du temps d'ouverture des canaux calciques (Drapeau et Nachshen, 1988)

## ***2.2. Effets sur la transmission synaptique***

La transmission synaptique dépend de l'état acide-base des milieux extra- et intracellulaires. Au niveau de la jonction neuromusculaire, une acidification réduit la libération d'acétycholine (Landau et Nachshen, 1975). Sur des synaptosomes obtenus à partir de cerveaux de rats, une acidification intracellulaire, concomitante d'une dépolarisation membranaire, inhibe la libération de dopamine en bloquant les canaux calciques dépendants du potentiel (Drapeau et Nachshen, 1988). Les transmissions glutamatergique et GABAergique sont, quant à elles, particulièrement sensibles aux ions  $\text{H}^+$ . Au niveau postsynaptique, une acidification extracellulaire diminue les courants induits par le NMDA alors qu'une alcalinisation les augmente (Tang et al., 1990; Vyklicky et al., 1990; Traynelis et Cull-Candy, 1991). Ces effets sont principalement dus à un changement conformationnel du récepteur canal par titration (Traynelis et al., 1995). D'autres auteurs ont montré que des variations de pH pouvaient moduler la transmission GABAergique :

- sur des neurones hypothalamiques, une acidification diminue la probabilité d'ouverture des récepteurs canaux  $\text{GABA}_A$  alors qu'une alcalinisation l'augmente (Huang et Dillon, 1999).
- à l'inverse, sur des neurones de la corne dorsale, une acidification facilite la réponse GABAergique (Gallagher et al., 1983).

La présence de nombreux sites titrables par les protons sur la face extracellulaire du récepteur  $\text{GABA}_A$  rend celui-ci plus sensible au pH extracellulaire qu'au pH intracellulaire. Cette sensibilité du récepteur  $\text{GABA}_A$  aux ions  $\text{H}^+$  extracellulaires peut se traduire par un rôle protecteur dans des situations pathologiques comme l'anoxie ou l'ischémie. En effet, une protonation du récepteur  $\text{GABA}_A$  sur sa face extracellulaire potentialise la perméabilité du récepteur aux ions  $\text{Cl}^-$ , inhibant ainsi le relarguage d'acides aminés excitateurs et diminuant le métabolisme cellulaire (Lutz, 1992).

### ***2.3. Effets sur l'excitabilité neuronale***

Les ions  $H^+$  provoquent par protonation ou déprotonation des changements conformationnels des protéines. C'est ainsi que la structure quaternaire de certains récepteurs, récepteurs canaux et canaux peut être modulée et en conséquence induire des modifications des conductances, des courants et des résistances membranaires (Gruol et al., 1980; Chesler, 1990; Kaila, 1994). Pour exemples :

- une acidification extracellulaire (0,1-0,2 unité pH) est capable de réduire aussi bien la taille que la durée des potentiels d'action que la forme des décharges épileptiques des neurones (Kaila, 1994). Une alcalinisation d'une amplitude comparable stimule l'apparition de ces mêmes phénomènes (Aram et Lodge, 1987; Balestrino et Somjen, 1988; Church, 1992).
- les photorécepteurs subissent une réduction de sensibilité à la lumière lors d'une acidification intracellulaire. Une acidification interstitielle de 0,2 unité pH réduit l'amplitude des courants post-synaptiques et inactive les courants potassiques dépendants du potentiel (Meyertholen et al., 1980, 1986; Barnes et al., 1993; Kurenyy et Barnes, 1994).

### ***2.4. Effets sur la conductance intergliale***

Les cellules gliales peuvent communiquer entre elles par des jonctions communicantes qui assurent un couplage électrique et l'échange de molécules de faible poids moléculaires (Ransom et al., 1986; Kettenmann et Ransom, 1988; Dermietzel et al., 1991; Giaume et al., 1991; Rose et Ransom, 1997). La longueur de ces jonctions communicantes peut atteindre 100 à 300  $\mu m$  (Kettenmann et al., 1983; Kettenmann et Ransom, 1988).

Les canaux ioniques des jonctions communicantes des cellules gliales participent essentiellement à l'homéostasie du  $K^+$  extracellulaire (Walz et Hertz, 1983; Walz, 1989). Leur conductance est régulée par un second messager : le  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Sanderson et al., 1994). Sur des cellules gliales, des variations intracellulaires du pH modulent aussi le fonctionnement de ces jonctions communicantes :

- sur des ostéoblastes une diminution de 0,3 unité pH inhibe la synthèse de connexine qui constitue les jonctions communicantes.

Ceci à pour effet de diminuer le nombre de jonctions (Yamaguchi et al., 1995).

- dans les cellules cardiaques une diminution de 0,3 unité pH réduit considérablement la probabilité d'ouverture des jonctions communicantes et une diminution de 0,7 unité pH en induit la fermeture complète (Hermans et al., 1995).
- sur des neurones et des astrocytes, une diminution du  $\text{pH}_i$  diminue aussi la probabilité d'ouverture des jonctions communicantes (Connors et al., 1984).

### ***2.5. Effets sur le métabolisme des cellules gliales***

Les vertébrés utilisent le glucose comme principal substrat pour fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement du cerveau. Chez les mammifères, les cellules gliales jouent un rôle important dans l'apport énergétique aux neurones (Dringen et al., 1994; Lieberman et al., 1994). Ces cellules sont considérées comme les seuls et uniques fournisseurs des neurones en substrats métaboliques (Tsacopoulos et Magistretti, 1996). Les signaux responsables de la régulation de la production et de l'acheminement de ces substrats vers les neurones restent encore en partie inconnus. Les astrocytes répondent aux changements d'activité neuronale en détectant la libération de neurotransmetteurs. Par exemple, le glutamate libéré dans la fente synaptique est capturé par des transporteurs dépendant du  $\text{Na}^+$  présents sur les astrocytes. L'activité de ces transporteurs résulte en une entrée de  $\text{Na}^+$  et en l'activation de la pompe  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  qui consomme de l'ATP. La dégradation de l'ATP stimule alors la capture de glucose et la production de lactate (Magistretti et al., 2003). Parmi les autres signaux susceptibles de moduler ce transfert énergétique le pH pourrait jouer un rôle car la plupart des enzymes impliquées dans la dégradation du glucose sont sensibles au pH (Paudel et Carlson, 1987; Pawelczyk et al., 1992; Pawelczyk et Olson, 1992).

L'activité neuronale est donc le facteur majeur qui influence le métabolisme des cellules gliales en partie en induisant des variations de pH intracellulaire. Les mécanismes responsables de ces variations de pH sont considérés dans ce cas comme des signaux métaboliques. Par exemple :

- l'augmentation de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  à la suite du déclenchement de l'activité neuronale, entraîne une dépolarisation des cellules gliales et stimule l'entrée des ions  $\text{Na}^+$  et

$\text{HCO}_3^-$  extracellulaires à travers le co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ . Une entrée massive de  $\text{Na}^+$  stimule à nouveau la pompe  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  puis la capture de glucose (Brookes, 1992a, b). En même temps, l'entrée d'ions  $\text{HCO}_3^-$  provoque une alcalinisation intracellulaire qui stimule à son tour les enzymes métaboliques sensibles au pH, en particulier la glucose déshydrogénase qui favorise la dégradation du glucose (Busa et Nuccitelli, 1984; Busa, 1986).

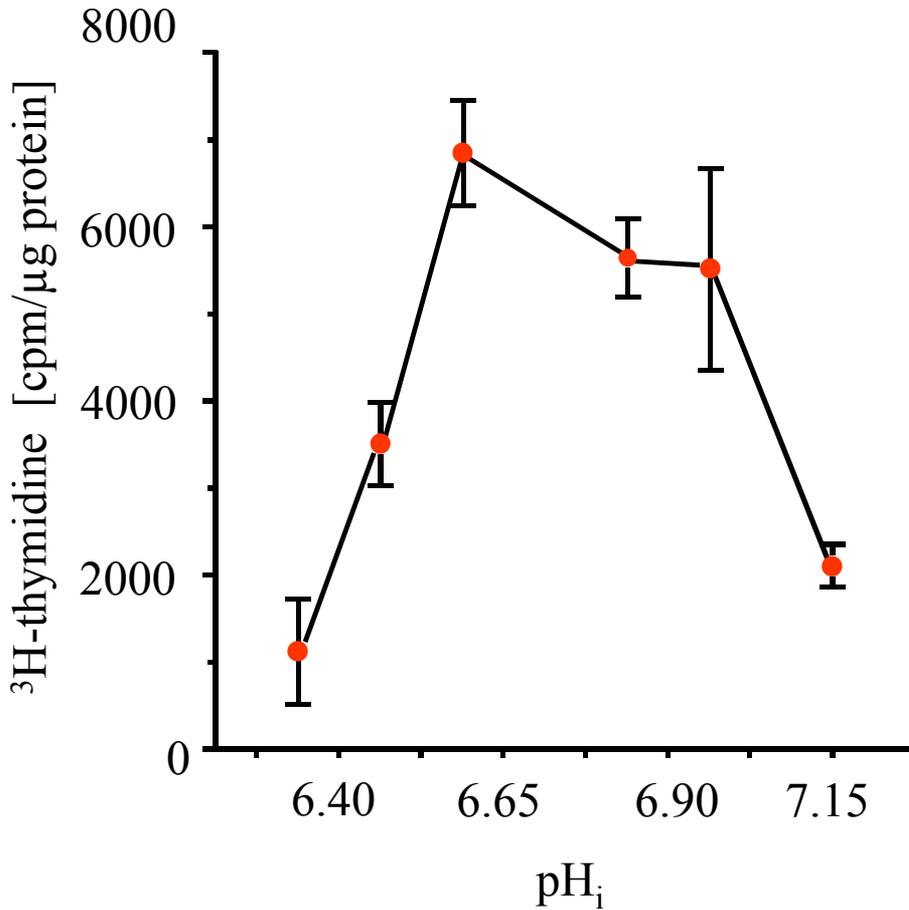
- le glutamate, recapturé par les cellules gliales, permet en présence d'ammonium la synthèse de glutamine. Ce mécanisme a été décrit comme un processus dépendant du pH intracellulaire (Brookes et Turner, 1993).

### ***3. Rôle de $\text{pH}_i$ dans les grandes étapes du développement cellulaire***

Le développement des cellules s'accompagne *in vivo* et *in vitro* de changements dans l'expression d'une variété de récepteurs et de canaux ioniques (Sontheimer et al., 1989b; Sontheimer et al., 1989a) dont les récepteurs des facteurs de croissance font partie (Hosli et Hosli, 1993; Hosli et al., 1993). Les études montrent que la transduction du signal par les différents récepteurs spécifiques de ces facteurs s'accompagne souvent d'une variation de pH intracellulaire. Cette alcalinisation ou cette acidification intracellulaire participe à la régulation et au déclenchement des réactions biologiques liées à la prolifération, la migration, la différenciation et la mort cellulaire. Par la présentation de données bibliographiques, je vais exposer dans la partie suivante le rôle du  $\text{pH}_i$  lors du déclenchement de ces phénomènes physiologiques.

#### ***3.1. Prolifération cellulaire***

Le rôle du  $\text{pH}_i$  dans le contrôle ou l'initiation de la prolifération cellulaire a été suggéré par le fait que la plupart des agents mitogéniques activent l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  induisant une alcalinisation intracellulaire. Plusieurs travaux ont montré que la synthèse d'ADN en réponse à des facteurs mitogéniques est dépendante de  $\text{pH}_i$ . C'est ainsi que l'inhibition de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  par des dérivés de l'amiloride inhibe la prolifération de divers type cellulaires en réponse à des facteurs mitogéniques (Koch et Leffert, 1979a, b; Pieri et al., 1984; Pieri et al., 1985). De plus, des fibroblastes mutés n'exprimant pas l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ne répondent plus à des applications de mitogènes, confirmant ainsi l'importance de cet échangeur (Pouysségur et al., 1985). D'autres travaux ont montré que



*D'après Pappas et al., (1994), Neuroreport; 6, 193-196*

**Figure 2.** Effet de pH<sub>i</sub> sur la prolifération des astrocytes en culture. La prolifération cellulaire est quantifiée par l'incorporation de thymidine tritiée.

la synthèse d'ADN induite par différents facteurs mitogéniques et précédant la division cellulaire est contrôlée par le  $pH_i$  dans les lymphocytes murins (Gerson, 1981), des fibroblastes humain (Moolenaar et al., 1983; Moolenaar et al., 1984), et des fibroblastes de hamster (Pouysségur et al., 1985). Les démonstrations les plus probantes du rôle de  $pH_i$  furent obtenues en imposant de manière expérimentale des variations de  $pH_i$  (en utilisant des bases faibles ou en manipulant le pH extracellulaire). C'est ainsi que Zetterberg et Engstrom ont démontré qu'une augmentation du  $pH_i$  est suffisante pour induire la synthèse d'ADN et la prolifération de fibroblastes (Zetterberg et Engstrom, 1981). De la même manière, les travaux de Pappas et al. ont démontré l'existence d'une dépendance entre la valeur de  $pH_i$  et la prolifération des astrocytes de rat (Pappas et al., 1994). Dans ce cas, il existe une gamme de valeurs de  $pH_i$  permettant la prolifération (fig 2). Il est généralement admis que l'application de mitogènes induit une alcalinisation intracellulaire mais pour certains types cellulaires, des acidifications peuvent aussi être enregistrées. Les travaux de l'équipe de Leboeuf réalisés sur des cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE) ont démontré que le PDGF A/B et le sérum fœtal de veau induisent une diminution du  $pH_i$ . Cette acidification est indispensable au déclenchement de la prolifération. En bloquant tout changement de  $pH_i$  après l'application de PDGF A/B, ces cellules ne prolifèrent plus (Isfort et al., 1995). Les mécanismes par lesquels ces changements de  $pH_i$  peuvent contrôler la prolifération cellulaire sont encore inconnus. Néanmoins, sur des cellules SHE, une acidification intracellulaire déclenche la prolifération des cellules SHE et induit l'expression de gènes précoces (*c-fos* et *c-myc*) (Isfort et al., 1993). Sur des cellules PC12, une acidification est aussi responsable de l'induction de la prolifération (Thomas et al., 1996). Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une valeur de  $pH_i$  permissive (optimale) pour la prolifération.

### **3.2. Migration cellulaire**

L'association des filaments d'actine avec la membrane plasmique permet de stabiliser, de maintenir et de réguler la morphologie et de promouvoir la migration cellulaire. Un certain nombre de protéines transmembranaires permettent de faire le lien entre les filaments d'actine et la membrane plasmique. Ces protéines appartiennent à deux groupes différents : les molécules d'adhésion et les échangeurs et transporteurs d'ions. Le rôle des transporteurs ioniques dans l'ancrage du cytosquelette a été démontré pour la première fois sur des cellules érythrocytaires dont l'échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$  (AE1) se lie au réseau sous-membranaire de spectrine-actine au moyen de protéines intermédiaires

(protéine 4.1 ou ankyrine) (Denker et Barber, 2002a). L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est lui aussi lié aux filaments d'actine par l'intermédiaire de protéines de la famille ERM (pour Ezrine/Radixine/Moésine) (Denker et al., 2000). De récents travaux de l'équipe de D. Barber ont permis de montrer le rôle de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  lors de la migration des fibroblastes (Denker et Barber, 2002a, b). Leurs expériences ont montré l'importance de l'échangeur en tant que molécule d'ancrage du cytosquelette mais ont aussi mis en évidence l'importance de l'activité d'échange ionique. Ces travaux ont été réalisés à partir de fibroblastes exprimant soit un échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dont le site de liaison aux ERM est muté "ERM-", soit un échangeur non fonctionnel pour le transport des ions "ions-". Normalement l'échangeur est localisé sur toute la membrane plasmique avec une concentration plus importante au niveau des lamellipodes. Sur les cellules "ERM-" l'échangeur est distribué de manière uniforme dans la membrane, et les filaments d'actine qui s'étendent au niveau terminal des lamellipodes ne sont plus observables, ni les points focaux d'adhésion (FAK). La polarité cellulaire est perdue entraînant une diminution de la migration. Les cellules "ions-" présentent quant à elles une polarité normale, avec un réseau d'actine présent au niveau des lamellipodes permettant la formation des points de contacts focaux. Mais dans ce cas, la migration est aussi inhibée car les cellules ne peuvent se détacher du substrat et donc se rétracter pour pouvoir avancer. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par d'autres auteurs et notamment par Simchowicz (Simchowicz et Cragoe, 1986a, b). Il démontra sur des neutrophiles que le FMLP<sup>10</sup> (un peptide chémoattracteur) induit une alcalinisation intracellulaire via l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Si cette alcalinisation est bloquée en utilisant des inhibiteurs de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , les effets chémoattracteurs du FMLP disparaissent.

Les mécanismes par lesquels l'activité des transporteurs ioniques régule la migration cellulaire restent encore inconnus. La polymérisation de l'actine semble être suffisante pour produire la force nécessaire à la mise en mouvement. Néanmoins des flux d'ions localisés pourraient modifier l'activité de protéines impliquées dans la polymérisation/dépolymérisation de l'actine telles que la cofiline ou la gelsoline dont les activités sont dépendantes du calcium et du pH (Carlier et al., 1999).

---

<sup>10</sup> N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine

### ***3.3. Différenciation cellulaire***

La majorité des données bibliographiques se rapportent à l'étude du pH et de la différenciation des précurseurs de cellules sanguines. Sur les précurseurs érythrocytaires, il existe un pH optimal permettant la différenciation des cellules. Une augmentation de  $\text{pH}_i$  stimule la différenciation des précurseurs alors qu'une acidification l'inhibe (McAdams et al., 1997, 1998). Les cellules de la lignée cellulaire HL60 peuvent, suivant les conditions, se différencier en basophiles ou en éosinophiles. Si ces cellules sont cultivées dans un milieu alcalin (pH de 7,20 à 7,80) elles se différencient exclusivement en basophiles. Dans des conditions de pH acide (6,60 à 7,00) ces cellules se différencient en éosinophiles (Muroi et al., 1989). Une variation de pH peut donc complètement modifier l'expression du programme génétique contrôlant la différenciation des cellules HL60. Comme nous le verrons un peu plus tard, l'acide rétinoïque (AR), un puissant inducteur de la différenciation cellulaire, peut aussi induire des changements de  $\text{pH}_i$  sur ces mêmes cellules HL60, en activant l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Ladoux et al., 1988a; Ladoux et al., 1988b).

### ***3.4. Apoptose***

Plusieurs études ont rapporté l'existence d'un lien entre  $\text{pH}_i$  et apoptose. Des variations de  $\text{pH}_i$  et notamment une acidification intracellulaire sont souvent des événements précédant ou accompagnant l'apoptose. C'est ainsi que le  $\text{pH}_i$  des cellules HL60 en apoptose diminue de 0,2 à 0,3 unité pH (Barry et Eastman, 1992), et celui d'une lignée cellulaire de lymphocytes T (CTLL-2) diminue de  $\text{pH}_i$  7,50 à 7,00 (Rebollo et al., 1995). Avec des cellules CTLL-2, HL60 et des fibroblastes, il a pu être montré que l'inhibition de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (accumulation de  $\text{H}^+$  intracellulaire) ou de la PKC est suffisante à induire l'apoptose. Inversement, l'activation de la PKC et le maintien du  $\text{pH}_i$  à une valeur constante protègent ces cellules de l'apoptose (Perez-Sala et al., 1995; Rebollo et al., 1995; Boyle et al., 1997). Sur des cellules Jurkat (lymphoblastes) entrant en apoptose, l'utilisation d'une base faible (empêchant la diminution de  $\text{pH}_i$ ) inhibe la mort cellulaire (Gottlieb et al., 1996). Ces études ont aussi permis de montrer l'existence d'un lien entre le  $\text{pH}_i$  et l'activité de dégradation de l'ADN par la DNAase II lors de l'apoptose (Barry et Eastman, 1992; Perez-Sala et al., 1995). Il existe une controverse car l'activité maximale de la DNAase II se situe à un pH très acide de 5,00 or dans ces conditions extraphysiologiques, les cellules meurent par nécrose (Barry et Eastman, 1992; Park, 1995). Pour expliquer cela, il faut considérer les variations physiologiques de  $\text{pH}_i$  non pas comme un événement global affectant toute la cellule mais plutôt comme des événements

## Etude bibliographique

localisés en microdomaines dans lesquels des variations de  $\text{pH}_i$  importantes s'opèrent et permettent d'induire des cascades de signalisations intracellulaires. Néanmoins, même si tous les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés, il est clair que le  $\text{pH}_i$  joue un rôle dans l'apoptose cellulaire. En effet, dans les cellules CHO et Jurkat, la surexpression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, entraîne une inhibition de l'acidification et de l'apoptose (Meisenholder et al., 1996; Reynolds et al., 1996). Sur une lignée de cellules sanguines il a pu être montré qu'une alcalinisation intracellulaire est responsable de l'induction de l'apoptose par le changement de conformation et l'activation de Bax qui est une molécule pro-apoptotique (Belaud-Rotureau et al., 2000).

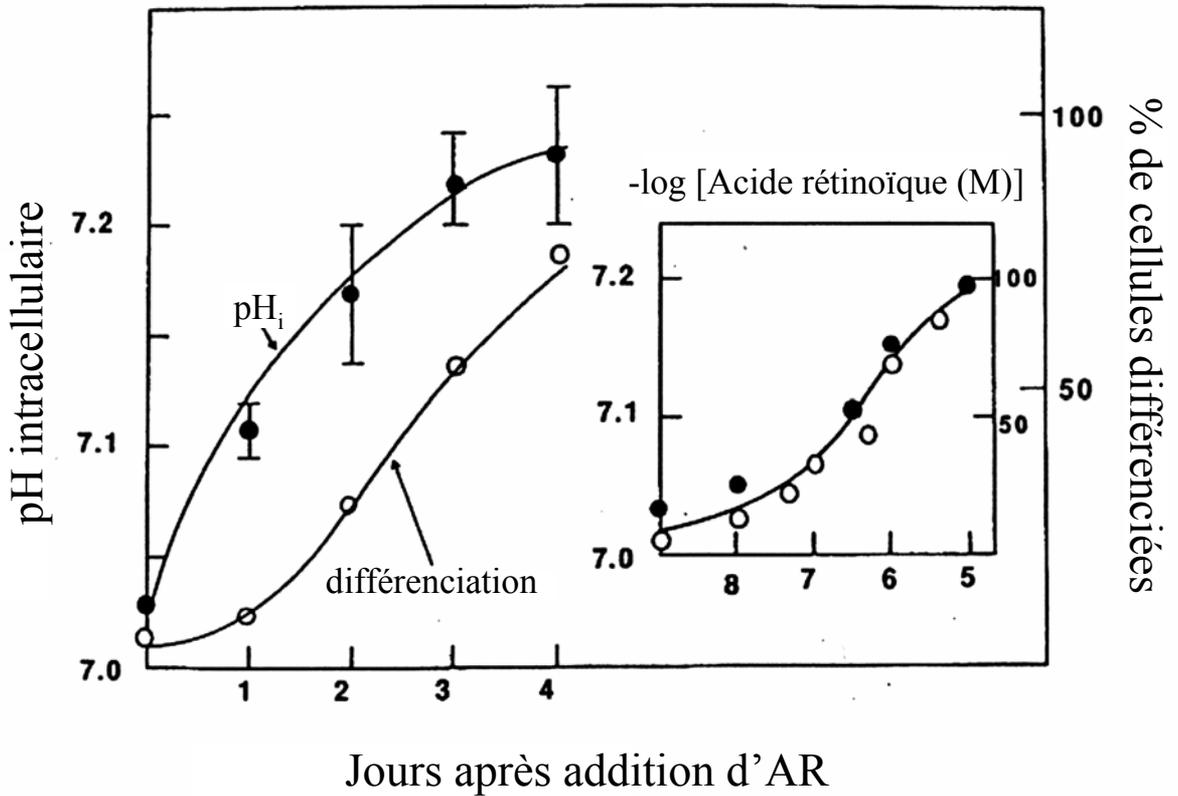
Afin d'analyser le rôle exact du  $pH_i$  dans le contrôle de la différenciation des oligodendrocytes, une des premières approches a consisté à étudier les effets de l'acide rétinoïque (AR) un puissant inducteur de la différenciation cellulaire. Nous avons choisi d'étudier les effets de l'AR car d'une part il induit la différenciation des OLP *in vitro* et d'autre part il entraîne des variations importantes de  $pH_i$ . Pour autant il n'a jamais été montré de lien direct entre le  $pH_i$  et l'état de différenciation de ces cellules.

## ***1. Contrôle de la différenciation cellulaire par l'acide rétinoïque***

### ***1.1. Synthèse et mécanismes d'action***

L'AR est dérivé de la vitamine A (rétinol) apportée par l'alimentation. Le rétinol qui est stocké dans le foie et les reins peut être mobilisé et libéré dans la circulation sanguine, couplé à une protéine appelée protéine liant le rétinol (Retinol Binding Protein (RBP)). Le passage du rétinol du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire nécessite des récepteurs aux RBP. Ces récepteurs permettent le transfert du rétinol dans le cytoplasme et son association à un autre vecteur, la protéine cellulaire liant le rétinol (CRBP) (Sundaram et al., 1998). C'est là que le rétinol couplé aux CRBP va être transformé en AR par la rétinol déshydrogénase et la rétinol déshydrogénase. Ces enzymes permettent la synthèse de deux stéréoisomères de l'AR, le all-trans-AR et le 9-cis-AR. La présence de CRBP et d'autres protéines de la même famille se complexant à l'AR permettent de le stabiliser et de le maintenir à l'intérieur de la cellule. La régulation spatiale et temporelle du niveau d'AR se fait par l'intermédiaire du contrôle de l'expression et de l'activité des enzymes de synthèse et par la présence de protéines liant l'AR (McCaffery et Drager, 2000).

Les effets de l'AR s'exercent par l'intermédiaire de deux familles de récepteurs nucléaires, les récepteurs de l'AR (RAR) et les récepteurs X rétinoïdes (RXR) qui font partie de la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes. Il existe trois isoformes de RAR,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Petkovich et al., 1987; Benbrook et al., 1988; Krust et al., 1989) et trois isoformes de RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Mangelsdorf et al., 1990; Mangelsdorf et al., 1992). Les RAR et RXR diffèrent par leur spécificité de liaison aux différents ligands. Les RAR peuvent lier indifféremment le 9-cis-AR et le all-trans-AR alors que les RXR ne lient que le 9-cis-AR (Durand et al., 1992; Heyman et al., 1992). Les RAR et les RXR une fois liés à l'AR vont, sous forme de complexes homo- ou hétérodimériques, former des facteurs de transcription et contrôler l'expression de gènes possédant une séquence ADN spécifique de reconnaissance par ces facteurs (Evans, 1988; Green et Chambon, 1988).



*D'après Ladoux et al. (1988), Eur. J. Biochem; 175, 455 - 460*

**Figure 3.** La différenciation des cellules HL60 induite par l'acide rétinoïque est précédée d'une alcalinisation intracellulaire.

### ***1.2. Acide rétinoïque et différenciation cellulaire***

L'AR permet de promouvoir la différenciation de nombreuses cellules. Parmi les plus étudiées, on peut citer les cellules embryonnaires de carcinome (P19, F9) (Alonso et al., 1991; McBurney, 1993), les précurseurs des cellules hématopoïétiques (cellules promyélocytiques, HL60) (Drexler et al., 1995) et les précurseurs neuronaux (PC12, LAN-5) (Matsuoka et al., 1989; Hill et Robertson, 1998). Concernant la différenciation des cellules oligodendrocytaires, elle est induite en réponse à 0,5  $\mu\text{M}$  d'AR avec les OLP de nerf optique de rat (P0 à P7) (Tokumoto et al., 1999) alors qu'elle est inhibée avec des précurseurs issus de la moelle épinière de rat embryonnaire (E14, E16, E18) ou de cortex de rats nouveau-nés (Noll et Miller, 1994). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des différences entre les protocoles expérimentaux et/ou entre les modèles étudiés. Malgré cela, l'AR est considéré comme un inducteur puissant et universel de la différenciation cellulaire. L'AR par l'intermédiaire de ses récepteurs nucléaires peut réguler directement l'expression d'un nombre limité de gènes. Ces gènes contiennent l'élément de réponse à l'AR dans leur promoteur. Les variations d'expression de ces gènes vont permettre l'activation d'une ou plusieurs cascades de signalisation.

### ***1.3. Acide rétinoïque et pH intracellulaire***

L'AR qui induit la différenciation des cellules HL60 en granulocytes produit aussi une alcalinisation intracellulaire de 0,34 unité pH, non observée en présence d'un dérivé synthétique non actif. L'effet de l'AR sur le  $\text{pH}_i$  se développe lentement et précède la différenciation cellulaire (fig 3). Il a été montré que cette alcalinisation consécutive à l'application d'AR est due à une augmentation de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Ladoux et al., 1987). Rao et al. ont aussi pu démontrer que, lors de la différenciation des cellules HL60 par l'AR, il y a une augmentation très importante du niveau d'expression de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Rao et al., 1992). Les résultats les plus probants ont été obtenus par l'équipe de Larry Fliegel à partir de cellules P19 (carcinome embryonnaire). En présence d'un inhibiteur de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ces cellules ne se différencient plus en réponse à l'AR. Dans le but d'analyser le rôle de cet échangeur et du  $\text{pH}_i$  lors de la différenciation des cellules P19, les auteurs ont développé une lignée cellulaire appelée G20, dérivée des P19, n'exprimant plus l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Dans ces conditions, les cellules G20 ne se différencient plus en présence d'AR et leur  $\text{pH}_i$  est de 6,90 contre 7,20 pour les P19. Si les cellules G20 sont transfectées avec un vecteur contenant le gène de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , elles vont à nouveau se différencier en réponse à l'AR (Wang et al., 1997). Ces résultats

démontrent que l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et/ou la valeur du  $\text{pH}_i$  est indispensable à la cascade de signalisation induite par l'AR. Dans le contexte de notre étude il est important de noter que ces cellules P19, en présence d'AR, se différencient en oligodendrocytes (Staines et al., 1996).

Sur les OLP nous avons analysé et quantifié les effets de l'AR sur le  $\text{pH}_i$  et la différenciation. En présence d'AR, des variations de  $\text{pH}_i$  ont été enregistrées, liées à une augmentation de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Grâce à notre travail exposé dans ce manuscrit, il est maintenant démontré, pour la première fois, que la différenciation des cellules oligodendrocytaires est dépendante et très finement contrôlée par des changements de  $\text{pH}_i$ . Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes régulant le développement des OLP. Les données expérimentales seront exposées plus en détails dans le chapitre consacré aux résultats.

## ***2. Effets des molécules de guidage***

Plusieurs études réalisées sur différents types cellulaires ont montré que certaines molécules de la matrice extracellulaire pouvaient induire des variations de  $\text{pH}_i$ . Ainsi la ténascine, une molécule de la matrice extracellulaire qui inhibe en culture la prolifération des fibroblastes, induit en même temps une acidification intracellulaire (Crossin, 1991). Il existe plusieurs isoformes de ténascine obtenues par épissage alternatif, pouvant inhiber ou stimuler l'adhésion cellulaire. L. Krushel et al. ont utilisé deux isoformes inhibant l'adhésion cellulaire et deux autres la stimulant. Sur des fibroblastes, les protéines inhibitrices induisent une diminution du  $\text{pH}_i$  et les protéines stimulant l'adhésion cellulaire entraînent une alcalinisation. La PKC joue un rôle important dans la réponse des cellules aux différentes isoformes de la ténascine. En présence des protéines stimulant l'adhésion, l'inhibition de la PKC bloque l'augmentation du  $\text{pH}_i$  et empêche l'adhésion cellulaire. Inversement, en présence des protéines anti-adhésives, l'activation de la PKC par un ester de phorbol induit une augmentation du  $\text{pH}_i$  et permet l'adhésion des cellules (Krushel et al., 1994). Sur des fibroblastes, la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire, active l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Son inhibition par l'amiloride bloque la prolifération des fibroblastes (Schwartz et al., 1991).

Comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes de transport ionique et le  $\text{pH}$  jouent un rôle important dans l'élaboration de la morphologie cellulaire et dans la migration. De ce fait, on peut se demander si les effets d'autres molécules actives sur la



morphologie des oligodendrocytes peuvent s'expliquer par des variations du  $pH_i$ ? J'ai donc recherché l'implication de changements de  $pH_i$  sur les oligodendrocytes lors de la transduction du signal déclenché par des molécules de guidage. Ces facteurs, d'abord décrits pour leurs rôles inhibiteurs ou promoteurs de la croissance axonale (Tessier-Lavigne et Goodman, 1996), sont également capables d'influencer la croissance des extensions des oligodendrocytes ce qui est d'un grand intérêt dans le cas d'études de la régénération du SNC compte tenu de l'importance de la remyélinisation pour une restauration fonctionnelle totale. C'est le cas d'une famille de molécules, les sémaphorines et plus particulièrement la sémaphorine 3A (Sema3A). Cette molécule, exprimée durant le développement, permet la mise en place des connexions neuronales et conditionne partiellement les phénomènes de régénération. En effet, les cellules formant la cicatrice gliale expriment des taux élevés de Sema3A, empêchant ainsi la régénération alors que dans le système nerveux périphérique, la régénération neuronale potentiellement observée est associée à une baisse des ARNm de Sema3A. De manière intéressante, les oligodendrocytes expriment la Neuropiline-1 (NRP-1), un des composants essentiels du complexe récepteur de Sema3A (Castellani et Rougon, 2002). D'un point de vue fonctionnel, ces cellules sont également sensibles à la Sema3A qui inhibe totalement l'émission de leurs prolongements (Ricard et al., 2001). Par ailleurs, une autre équipe a récemment démontré au niveau du nerf optique en développement, que la sémaphorine 3F et la Netrine-1 (une autre molécule de guidage) ont un effet attracteur sur les oligodendrocytes, alors que Sema3A inhibe leur migration (Spassky et al., 2002). J'ai donc choisi d'étudier les effets de la Sema3A sur l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires.

### ***2.1. Les sémaphorines***

Les sémaphorines constituent une famille de molécules sécrétées ou associées à la membrane. Initialement, les sémaphorines ont été caractérisées pour leurs effets inhibiteurs de la croissance axonale et répulsifs (Luo et al., 1995). Des études récentes ont permis de démontrer qu'elles peuvent aussi avoir un effet attracteur (Bagnard et al., 1998). Il existe 23 sémaphorines différentes réparties en 8 classes définies sur la base de leurs caractéristiques structurales (fig 4). Les sémaphorines sont constituées en moyenne de 750 acides aminés (AA) et définies par l'existence d'un domaine bien conservé de 500 AA : le domaine sémaphorine. La Sema3A est une sémaphorine sécrétée qui possède un domaine immunoglobuline et une région c-terminale de 70-120 AA contenant une série d'AA

fortement basiques. La Sema3A agit sous forme de dimère grâce à un pont disulfure (Klostermann et al., 1998; Koppel et Raper, 1998).

## ***2.2. Récepteurs des sémaphorines et transduction du signal***

Les voies de transduction des sémaphorines sont encore peu connues mais deux familles de récepteurs au moins sont impliquées dans cette signalisation, les plexines (Plex) (Tamagnone et al., 1999) et les neuropilines (NRP) (He et Tessier-Lavigne, 1997). Les neuropilines sont aux nombres de 2, NRP-1 et NRP-2 et sont des molécules d'adhésion cellulaire transmembranaires. Elles sont constituées d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique de 40 AA (Fujisawa et Kitsukawa, 1998). Ces molécules ne peuvent, à elles seules, assurer la transduction du signal. Pour cela, la neuropiline qui représente la sous-unité de liaison de la Sema3A doit recruter des co-récepteurs. Plusieurs familles de molécules sont maintenant connues pour être impliquées en tant que co-récepteurs avec NRP : les plexines (Winberg et al., 1998), le récepteur du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGFR) (Soker et al., 1998; Bagnard et al., 2001) et d'autres molécules d'adhésion cellulaire comme L1 (Castellani et al., 2000). Par leur activité tyrosine kinase et tyrosine phosphatase, ces récepteurs une fois activés vont pouvoir phosphoryler ou déphosphoryler des petites protéines liant le GTP, les RhoGTPases, comme RhoA, Rac et Cdc42 (Castellani et Rougon, 2002). Ces RhoGTPases permettent de contrôler le cytosquelette d'actine (Hall, 1998). Il est ainsi montré que l'activation de RhoA permet le contrôle des fibres de stress alors que Rac régule l'élaboration des lamellipodes et Cdc42 celui des filopodes. L'ensemble de ces structures est impliqué dans le contrôle et le guidage de la migration, et de la croissance des prolongements cellulaires, notamment des axones (Nikolic, 2002). Ces phénomènes mettent en jeu des voies de signalisation complexes, aboutissant au contrôle des protéines responsables de la polymérisation ou de la dépolymérisation des microfilaments d'actine (Liu et Strittmatter, 2001). Une de ces protéines, la cofiline participe au renouvellement des monomères d'actine et il est à noter que son activité est dépendante du pH (Carlier et al., 1997; Carlier et al., 1999).

Nous avons montré que la Sema3A contrôle l'élaboration des prolongements oligodendrocytaire. Pour la première fois, nous avons mis en évidence que les oligodendrocytes, quelque soit le stade de développement, expriment de manière fonctionnelle la plexine-A1. Nous avons aussi démontré de manière inédite qu'une des

voies de signalisation induite par la Sema3A est le  $pH_i$ . Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes impliqués dans le contrôle des processus de guidage. Ces données sont exposées en détails dans le chapitre consacré aux résultats mettent en évidence que le  $pH_i$  est aussi impliqué dans le contrôle de la croissance morphologique des OLP.

### ***3. Analyse quantitative de la morphologie oligodendrocytaire***

Les travaux exposés dans ce manuscrit ont été réalisés à partir de précurseurs oligodendrocytaires issus de cultures primaires ou secondaires. Dans le but de n'étudier que ces cellules, il nous fallait pouvoir déterminer avec précision leur stade de différenciation. Une approche classique, utilisant des techniques immunocytochimiques, ne permet pas de travailler sur des cellules vivantes. De ce fait, il nous a fallu développer un outil d'analyse permettant de déterminer de manière fiable le stade de différenciation de cellules vivantes. Notre approche s'est basée sur la quantification de la morphologie des cellules par l'utilisation de la géométrie fractale. La mise au point d'un tel outil nous permet maintenant de déterminer le stade de différenciation des cellules et de quantifier de manière précise les effets de différentes conditions sur l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires qui, *in vivo*, iront myéliniser les axones. La partie suivante de ce manuscrit est consacrée en détail à la mise au point de cet outil d'analyse. L'ensemble de ce travail est volontairement exposé en dehors de notre étude des effets du  $pH_i$  sur la différenciation des OLP et est présenté sous la forme de l'article original :

Bernard F, Bossu JL, Gaillard S (2001) Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. J Neurosci Res 65:439-445.

## ***A. Cultures cellulaires et marquages immunocytochimiques***

### ***1. Cultures primaires d'oligodendrocytes***

#### ***1.1. Préparation des boîtes***

Les boîtes de Pétri en plastique (Falcon 35 mm ou 100 mm de diamètre) sont préalablement tapissées par un film de poly-lysine (P7886, Sigma) afin d'augmenter l'adhésion des cellules sur le fond de la boîte. Pour cela la poly-lysine est déposée dans les boîtes à une concentration de 0,1 mg/ml dans de l'eau ultra pure stérile, et laissée au moins une heure à 37°C. Après rinçage avec du DMEM<sup>11</sup> (tableau 1), le milieu de culture est ajouté dans chaque boîte (tableau 2). Les boîtes sont placées à 37°C, dans un environnement saturé en vapeur d'eau et équilibré par 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>.

#### ***1.2. Mise en culture des cellules de cervelet***

Les cultures d'oligodendrocytes sont obtenues à partir de cervelets de rats Wistar nouveau-nés, pris entre 0 et 1 jour. Ceux-ci sont tués par décapitation. On pratique deux incisions de part et d'autre du crâne à partir du trou occipital, le scalp et l'os sont découpés puis retirés. A ce stade, le cervelet, qui a un développement surtout post-natal se présente sous la forme d'une barrette d'environ 5 mm juxtaposée aux tubercules quadrijumeaux. Le cervelet est prélevé après section des pédoncules cérébelleux. Le cervelet est déposé dans le milieu de dissection (tableau 1), débarrassé des méninges, et coupé en 5 ou 6 fragments qui sont transférés dans un tube à hémolyse contenant du milieu de dissection neuf. Les cellules sont dissociées mécaniquement à l'aide d'une pipette Pasteur en verre, par une succession d'aspirations et de refoulements, jusqu'à l'obtention d'une préparation homogène. Le tube à hémolyse est placé dans de la glace pendant 10 minutes, dans le but de limiter l'activité des enzymes de dégradation, puis le tube est mis à centrifuger à 500 tr/min pendant 7 minutes. La centrifugation permet de séparer les cellules intactes (qui se retrouvent dans le culot), des débris cellulaires restés dans le surnageant. Le culot est resuspendu dans 2 ml de milieu de culture pour permettre l'ensemencement des boîtes de Pétri à raison de 10<sup>5</sup> cellules par boîte de 35 mm.

---

<sup>11</sup> Milieu de Eagle modifié par Dubelco

Constituants	Concentration finale	Provenance
Milieu synthétique DMEM		GIBCO
D-glucose monohydraté	4.6 g/l	Merck
Imidazole	0.06 g/l	SIGMA

**Tableau 1** : Milieu de dissection.

Constituants	Concentration finale	Provenance
Milieu synthétique DMEM		GIBCO
Sérum de cheval décomplémenté	10 % volume	Biological.Ind
D-glucose monohydraté	4.6 g/l	MERCK
Insuline humaine	$5.10^{-7}$ M	SIGMA
L-glutamine	$286.10^{-3}$ g/l	SIGMA
NaHCO <sub>3</sub>	2 g/l	SIGMA
Gentamycine	0.05 g/l	SIGMA

**Tableau 2** : Milieu de culture avec sérum de cheval.

Constituants	Concentration	Provenance
Milieu synthétique DMEM		GIBCO
Sérum albumine bovine (BSA)	100 µg/ml	GIBCO
Pénicilline Streptomycine	50 UI – 50µg/ml	SIGMA
Progestérone	20 nM	SIGMA
Insuline	$5.10^{-7}$ M	SIGMA
Transférine	100 µg/ml	SIGMA
Putrescine	100 µM	SIGMA
Triiodothyronine (T3)	10 nM	SIGMA
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	30 nM	SIGMA

**Tableau 3** : Milieu de culture défini, sans sérum.

### ***1.3. Orientation du développement des cellules***

L'utilisation d'un milieu de culture contenant du sérum de cheval stimule très peu la prolifération des oligodendrocytes, et induit la différenciation des cellules précurseurs vers la lignée astrocytaire de type 2 (Raff et al., 1983). Afin d'obtenir une culture riche en oligodendrocytes, le milieu de culture standard est remplacé après trois jours par un milieu chimiquement défini, sans sérum (tableau 3), (Gaillard et Bossu, 1995). Il est à noter que ces milieux n'étant pas enrichis en potassium, ils ne permettent pas la survie des neurones (Gallo et al., 1987b).

### ***2. Cultures secondaires d'oligodendrocytes***

Pour des raisons de quantité de matériel, les cultures secondaires sont préparées à partir d'hémisphères cérébraux de rats Wistar nouveau-nés. Le protocole et les milieux utilisés lors de la mise en culture des hémisphères sont identiques à ceux utilisés pour les cervelets excepté l'utilisation de sérum de veau à la place de sérum de cheval. Les cellules sont dissociées mécaniquement à l'aide d'une seringue par passages répétés à travers une aiguille puis sont réparties dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre à raison de 2 hémisphères pour 3 boîtes. Les cultures sont ensuite placées dans une étuve humide à 37°C. Le milieu nutritif est renouvelé au quatrième jour, puis tous les 2 jours.

Les cellules très dispersées au début forment vers le huitième jour un tapis continu composé d'une couche inférieure d'astrocytes sur laquelle se développent les OLP. Ils forment une population quasi homogène jusqu'au douzième jour de culture puis se différencient lentement en oligodendrocytes, une population de précurseurs subsistant toujours.

A partir de ces cultures primaires mixtes, entre 10 et 12 jours après la mise en culture, les précurseurs peuvent être détachés du support astrocytaire par aspersion de milieu à la seringue munie d'une aiguille de 2 mm de diamètre (Besnard et al., 1989). Environ 80% des précurseurs sont ainsi détachés, puis soumis à plusieurs pré-adhésions différentielles (préplating) de 1 heure dans des boîtes de Pétri non traitées à la poly-lysine. Ces étapes permettent d'éliminer les contaminants cellulaires tels que les macrophages ou les astrocytes qui adhèrent plus fortement et plus rapidement au plastique que les OLP. Ces OLP sont ensuite détachés sélectivement par des chocs mécaniques appliqués sur le côté de la boîte. Les OLP sont remis en sous-culture dans des boîtes de Pétri traitées à la poly-lysine. Après adhésion des cellules (environ 1 heure), le milieu est remplacé par un mélange constitué de 50% de milieu chimiquement défini (tableau 3) et de 50% de milieu

## Matériels et méthodes

conditionné par des clones de neuroblastomes humains (B104) (Louis et al., 1992), plus 5 ng/ml de bFGF. Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures. Ces conditions de culture empêchent la différenciation des OLP tout en favorisant leur prolifération. En quelques jours, les OLP arrivent à confluence et forment une monocouche. A ce stade, les cellules peuvent être détachées du support de poly-lysine par digestion enzymatique à la trypsine et réensemencées à plus faible densité dans de nouvelles boîtes. Pour la digestion enzymatique, les cellules sont d'abord rincées au PBS<sup>12</sup> afin d'éliminer au maximum le calcium dans le milieu de culture, puis incubées quelques instants à température ambiante dans une solution de PBS contenant de la trypsine à 0,02% et de l'EDTA à 1 mM. Au moment où les cellules se détachent, la trypsine est inactivée par ajout de 3 à 4 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau. Le milieu contenant les cellules est récupéré et réparti dans plusieurs boîtes. Les différentes expériences sont réalisées sur des boîtes de Pétri de 35 mm contenant 250 000 cellules (en vue de marquages immunocytochimiques et mesures du pH<sub>i</sub>) ou sur des boîtes de Pétri de 100 mm contenant 2x10<sup>6</sup> de cellules pour l'analyse d'expression de protéines par western blot.

### ***3. Marquages immunocytochimiques***

Le développement des oligodendrocytes peut être suivi par l'expression de marqueurs. Nous allons nous attacher à l'analyse du stade caractérisé par l'expression du Gal-C. D'autres marquages ont été réalisés dans le but d'étudier l'expression de la plexine-A1, un des constituants du complexe récepteur de sémaphorine. Le marquage des microfilaments d'actine a été effectué en utilisant de la phalloïdine couplée à de la rhodamine. Toutes les étapes des marquages sont réalisées à température ambiante (20°C).

#### ***3.1. Fixation et perméabilisation des cellules***

Les cellules sont mises à incuber durant 20 minutes dans une solution de PBS filtrée contenant 4% de formaldéhyde (pH 7,4). Cette opération est suivie de 3 rinçages de 5 minutes au PBS filtré (pH 7,4), afin d'éliminer l'excès de formaldéhyde. La perméabilisation, nécessaire pour les antigènes situés au niveau intracellulaires, est réalisée en incubant les cellules 5 minutes dans du méthanol pur. Après incubation, on procède à 3 rinçages au PBS filtré (pH 7,4).

---

<sup>12</sup> Solution tampon phosphate

Antigène	Expression	Anticorps	Hôte	Type	Dilution	Provenance
Galacto-cérébrosides	Antigènes de surface	anti-Gal-C	Souris	Monoclonal (IgG <sub>3</sub> ) Surnageant D'hybridome	5 µg/ml	Boehringer Mannheim
Plexine A1	Protéine Transmembranaire	Anti-Plex-A1	Lapin	Polyclonal	1/400 <sup>ème</sup>	Dr. G. Roussel INSERM U575 Strasbourg

**Tableau 4.** Origine et caractéristiques des anticorps primaires.

Antigènes	Couplé à	Origine	Dilutions	Provenance
IgG de souris	Alexa 488	Chèvre	1/400 <sup>ème</sup>	Jackson immunoresearch
IgG de lapin	Cy3	Chèvre	1/400 <sup>ème</sup>	Molecular Probes

**Tableau 5.** Origine et caractéristiques des anticorps secondaires.

### ***3.2. Blocage des sites non spécifiques***

Les cellules sont incubées pendant une heure dans une solution de PBS contenant 3% de BSA<sup>13</sup>. Cette étape est réalisée dans le but de saturer les sites antigéniques à la surface des cellules, afin que les anticorps primaires et secondaires ne puissent se fixer sur des sites non spécifiques.

### ***3.3. Incubation avec les anticorps primaires***

Les cellules sont incubées en présence des différents anticorps primaires pendant 1 h 30 (tableau 4). Ces anticorps sont utilisés dilués dans du PBS + 3% de BSA. Après incubation les cellules sont rincées 3 fois 5 minutes dans des bains de PBS afin d'éliminer l'excès d'anticorps non fixés.

### ***3.4. Incubation avec les anticorps secondaires***

Les cellules sont incubées pendant 1 h 30 en présence des différents anticorps secondaires, utilisés dilués dans du PBS (tableau 5). Les anticorps secondaires étant couplés à des fluorophores, ceci permet de révéler la présence des complexes sites antigéniques spécifiques/anticorps primaires. Les cellules sont rincées 3 fois 5 minutes au PBS après incubation.

Pour l'observation, un mélange de PBS/glycérol (50% v/v) est déposé sur le fond de la boîte et recouverte d'une lamelle de verre.

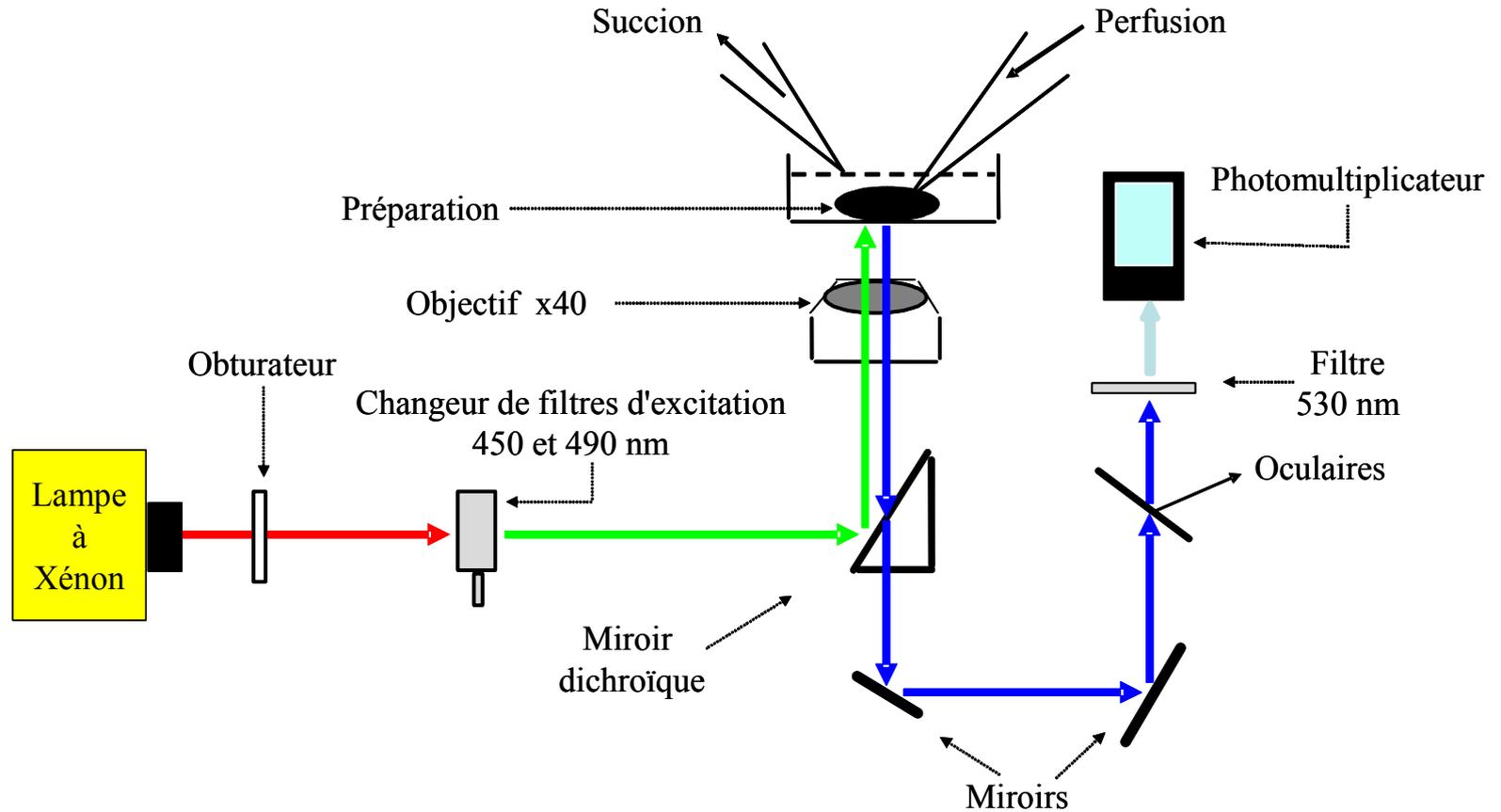
## ***4. Détection de la fluorescence***

### ***4.1. Principe de la fluorescence***

Le principe de la fluorescence repose sur la propriété de certaines molécules d'absorber de l'énergie sous forme de photons après avoir été excitées par de la lumière. Cette énergie permet à ces molécules de passer à un état énergétique plus élevé et instable. Le retour au niveau énergétique de base se fait par la libération de l'énergie sous forme lumineuse. La propriété de ce genre de molécules est que la longueur d'onde de la lumière émise ( $\lambda_{em}$ ) est supérieure à la longueur d'onde de la lumière excitatrice ( $\lambda_{ex}$ ), selon la loi de Stokes.

---

<sup>13</sup> Bovin serum albumin



**Figure 5.** Dispositif permettant soit l'observation de la fluorescence (en l'absence des filtres d'excitation à 490 et 450 nm et d'émission à 530 nm) soit la mesure par microfluorimétrie du  $pH_i$  en utilisant la sonde BCECF.

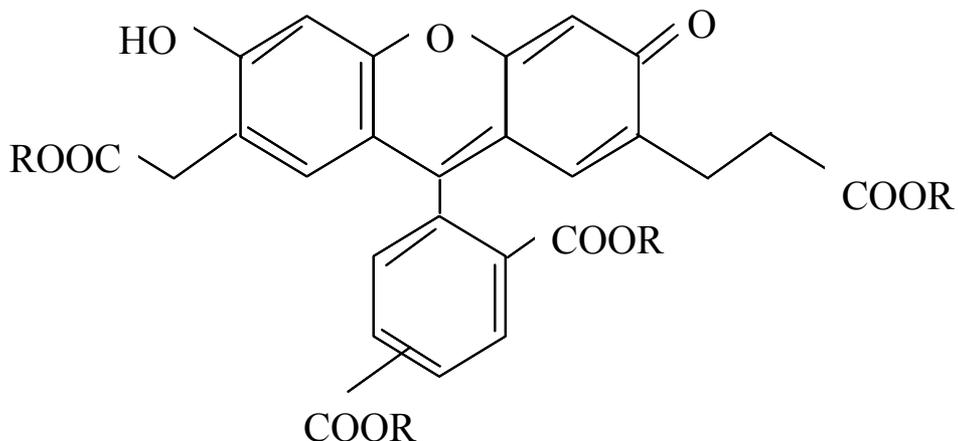
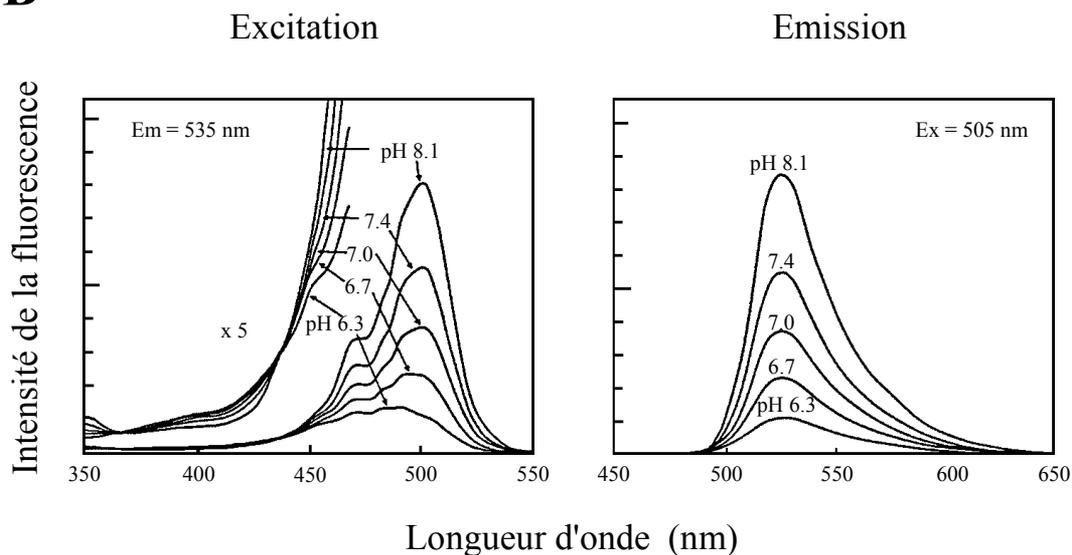
## ***5. Dispositif expérimental***

### ***5.1. Système optique***

Le microscope à épifluorescence de type Olympus IMT-2 repose sur une table antivibratoire afin de stabiliser l'ensemble. Le dispositif (fig 5) se compose d'une lampe à xénon, comme source de lumière, permettant l'excitation des fluorophores à travers l'objectif, par le biais de l'épi-illuminateur. La lumière d'excitation traverse ensuite un bloc filtre/miroir servant à filtrer les lumières d'excitation et d'émission. Pour chacun des fluorophores un bloc filtre/miroir avec des caractéristiques spécifiques est utilisé (pour l'Alexa 488 : IMT2-DMB, pour le Cy3 : IMT2-DMG). Un premier filtre est placé sur le trajet lumineux, et permet de réduire la gamme des longueurs d'ondes d'excitation (pour l'Alexa 488,  $350 \text{ nm} < \lambda_{\text{exc}} < 500 \text{ nm}$  avec le filtre BP 490, pour le Cy3  $450 \text{ nm} < \lambda_{\text{exc}} < 550 \text{ nm}$  avec le filtre BP 545). Après filtration, cette lumière tombe sur un miroir dichroïque (DM500 pour l'Alexa 488 et DM580 pour le Cy3). Les longueurs d'ondes inférieures ou égales à une certaine valeur limite (500 nm pour l'Alexa 488 et 580 nm pour le Cy3) sont réfléchies, et passent à travers l'objectif (Olympus, DApo  $\times 40$  à huile, ouverture numérique = 0,17) pour exciter directement la préparation. Les fluorophores une fois excités vont émettre de la lumière qui est récupérée par l'objectif. Cette lumière retombe sur le miroir dichroïque et n'est pas réfléchi, car les longueurs d'ondes émises par les fluorophores sont supérieures à la valeur limite en dessous de laquelle la lumière est réfléchi. Une barrière filtrante (O515 pour l'Alexa 488 et O590 pour le Cy3) placée à la suite du miroir dichroïque, ne laissant passer que des longueurs d'ondes supérieures à une valeur limite (515 nm pour l'Alexa 488 et 590 nm pour le Cy3) permet de filtrer les longueurs d'ondes d'émission. La lumière est alors réfléchi soit vers les binoculaires pour l'observation visuelle, soit vers une sortie caméra pour l'acquisition de l'image.

### ***5.2. Système d'acquisition***

L'acquisition des images se fait par l'intermédiaire d'une caméra numérique (Apogee Instruments Inc de type KX 85) fixée sur une sortie du microscope. Cette caméra est reliée à un ordinateur (processeur pentium II de 1,3 MHz) par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition (Matrox). La caméra est contrôlée par un logiciel de capture d'images (CAPTURE de la Sté C.R.I). L'image se projette sur une matrice constituée de  $1300 \times 1030$  pixels, la taille des pixels est de  $6,7 \mu\text{m} \times 6,7 \mu\text{m}$ . Le système optique (objectif  $\times 40$  et lentille  $\times 2,5$ ) permet alors une résolution maximale de  $0,067 \mu\text{m}$ . Les temps de pose

**A****B**

**Figure 6.** Caractéristiques spécifiques du BCECF. **A** : Structure de la molécule de BCECF. La présence de radicaux carboxyliques confère à la molécule un pK proche de 7.00. Sous sa forme perméante, les radicaux R sont des groupes acétoxy-méthyl-esters. **B** : Le spectre d'excitation représente la variation d'intensité de la fluorescence en fonction du pH. On remarque que l'amplitude maximale de la réponse est obtenue pour une excitation à 490 nm. Le spectre d'émission fait apparaître que l'intensité de la lumière émise augmente également en fonction du pH. C'est vers 530 nm que cette variation est la plus grande.

moyens sont de l'ordre de 500 millisecondes. Les images obtenues sont enregistrées en format TIFF.

## ***B. Mesure de $pH_i$ par microfluorimétrie***

Les caractéristiques spécifiques aux différentes molécules fluorescentes sont actuellement exploitées pour la mesure de plusieurs grandeurs :

- au niveau membranaire avec l'utilisation par exemple de l'oxonol pour mesurer le potentiel de membrane.
- au niveau intracellulaire avec l'utilisation du Fura-2, Quin-2, Indo-1 et Fluo-3 pour mesurer le calcium ; le BCECF, les SNAFL et les SNARL pour la mesure de la concentration en  $H^+$  et le SBFI et le SPQ pour la mesure des concentrations en ions  $Na^+$  et  $Cl^-$  intracellulaires respectivement.

### ***1. La molécule BCECF : un indicateur majeur du pH intracellulaire***

#### ***1.1. Caractéristiques générales***

La sonde 2',7'-bis(carboxyéthyle)-5(6)-carboxyfluoréscéine (BCECF) dérivée de la fluoréscéine est utilisée comme indicateur de pH (fig 6A). La molécule de BCECF pénètre dans les cellules sous sa forme liposoluble acétoxyméthyle ester 'AM-BCECF' (Rink et al., 1982). La structure chimique ( $C_{27}H_{20}O_{11}$ ) du BCECF est caractérisée par l'existence de trois groupes carboxyliques externes responsables de l'augmentation de son hydrophilie, deux d'entre eux ne sont liés que par des chaînes alkyles courtes et sont impliqués dans l'augmentation du pKa de la sonde de 6,40 à 6,97.

Chimiquement, le BCECF est très soluble à un pH alcalin, dans le méthanol (5%), ainsi que dans la plupart des solvants organiques polaires. La forme AM-BCECF ( $C_{42}H_{40}O_{21}$ ) est soluble dans des solvants moins polaires comme l'acétone et le diméthylesulfoxyde et ne l'est pas dans l'eau. Cette structure est électroneutre, hydrophobe et liposoluble, ce qui permet son passage à travers la membrane cellulaire. Le contact entre les estérases non spécifiques dans le cytoplasme et la forme AM-BCECF permet la libération du BCECF suite à une réaction d'hydrolyse. Le BCECF redevient alors une molécule polyanionique et hydrophile et ses caractéristiques empêchent la molécule de quitter la cellule.

### ***1.2. Spécificité de la fluorescence du BCECF***

L'intensité de fluorescence de la sonde BCECF atteint un plateau lorsqu'elle est appliquée à une concentration de  $10^{-5}$  M. A une concentration plus élevée on observe une diminution irréversible de cette intensité. Certains auteurs ont montré qu'une application de la sonde à une concentration de 0,1 mM et plus provoque une altération des cellules (Nett et Deitmer, 1996). D'autre part, des applications à trop faibles concentrations (de l'ordre de  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M) rendent instable l'intensité de fluorescence du BCECF. La concentration extracellulaire de BCECF recommandée est comprise entre 2 et 10  $\mu$ M. Dans cet intervalle, le plateau d'intensité de fluorescence et le rapport R (voir ci-dessous) sont les plus constants.

Les caractéristiques du spectre d'émission du BCECF après excitation *in vitro* avec plusieurs longueurs d'ondes sont rapportées sur la figure 6B. L'intensité de fluorescence de la sonde dépend de la valeur de pH, et elle atteint une amplitude maximale lorsque la sonde est excitée à environ 490 nm. Parallèlement, l'analyse du spectre d'émission de la sonde montre que l'intensité de fluorescence est, elle aussi, sensible au pH et que cette intensité est maximale lorsque la longueur d'onde d'émission est égale à 530 nm.

L'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation (490 nm) ne permet pas d'obtenir un signal d'émission indiquant que les variations de fluorescence enregistrées sont uniquement et directement liées à un changement de  $pH_i$ . La diminution d'intensité de fluorescence peut être le résultat d'un affaiblissement (bleaching) de la sonde à la suite d'excitations répétées, ou une conséquence directe de la diminution de la concentration du BCECF due à des phénomènes de fuite. Afin de n'enregistrer que des variations de fluorescence dues à des variations de pH, on utilise une seconde longueur d'onde d'excitation, à 450 nm. L'intensité de fluorescence, est à cette longueur d'onde, indépendante du pH et reflète la concentration intracellulaire de sonde (cette longueur d'onde est prise comme référence ; figure 6B). De ce fait, l'utilisation du rapport des fluorescences ( $R = F_{490}/F_{450}$ ) permet de s'affranchir de toutes variations de fluorescence indépendantes du pH. Nous verrons ci dessous comment transformer ces rapports de fluorescence en valeur de pH.

Sels (mM)	Solutions Bicarbonate	HEPES standard	HEPES 0 Na <sup>+</sup>	Solutions d'étalonnage
NaCl	111.9	136.9		
D <sup>+</sup> -Galactose	5.0	5.0	5.0	5.0
D-Glucose	10.0	10.0	10.0	10.0
HEPES		20.0	20.0	20.0
NMDG			136.9	
NaHCO <sub>3</sub>	25.0			
HCl			136.9	
KCl	5.4	5.4	2.8	135
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	0.4	0.4	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			1.3	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.3	1.3		1.3
CaCl <sub>2</sub>	1.0	1.0	1.0	1.0
MgCl <sub>2</sub>	1.0	1.0	1.0	1.0
MgSO <sub>4</sub>	0.8	0.8	0.8	0.8

**Tableau 6.** Solutions utilisées. La solution de bicarbonate est ajustée à pH 7.40 en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°C. Les solutions tamponées avec l'HEPES sont ajustées à pH 7.40 avec NaOH (1N) ou HCl (1N) à 37°C. Les solutions d'étalonnage sont ajustées à pH 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 8.00 avec KOH (1N) ou HCl (1N) en présence de 3 µM de nigéricine.

### ***1.3. Introduction de la sonde BCECF***

L'incubation est effectuée dans une solution saline tamponnée à l'HEPES<sup>14</sup> ou par du bicarbonate (tableau 6). La sonde est utilisée à une concentration de 5  $\mu$ M durant 60 minutes à 37°C, elle diffuse à l'intérieur des cellules sous la forme AM-BCECF. La préparation est ensuite rincée puis déposée sur la platine du microscope à fluorescence (Olympus IMT-2) et l'acquisition commence après la sélection dans les champs observés d'une cellule isolée, en diminuant l'ouverture du diaphragme de champs. Contrairement à l'introduction des sondes par microélectrodes, la méthode par incubation de la sonde sous forme AM-BCECF est idéale pour préserver au maximum l'intégrité cellulaire (Nett et Deitmer, 1996).

## ***2. Dispositif expérimental de mesure de $pH_i$***

### ***2.1. Système optique***

Un microscope Olympus IMT-2 est utilisé pour la visualisation des cellules. Mis à part l'utilisation de filtres différents, le système optique est identique à celui utilisé pour l'observation des marquages immunocytochimiques (fig 5). Un obturateur, placé devant la lampe à Xénon, permet de limiter la durée d'excitation de la sonde. Au delà de l'obturateur, la lumière traverse un filtre interférentiel passe-bande (successivement 450 et 490 nm) situé sur un porte-filtres. Après filtration, la lumière tombe sur un miroir dichroïque (IMT2-DMB) équipé d'un filtre (DM500) qui réfléchit vers l'objectif toute les longueurs d'ondes inférieures ou égales à 500 nm. La lumière passe à travers un objectif 40 X de type LWD-CD Plan (ouverture numérique 0,60, distance de travail 1,9 mm) et est acheminée sur la préparation. La lumière émise par la sonde excitée traverse à nouveau l'objectif puis retombe sur le miroir dichroïque, la barrière filtrante de type O515 ne laisse passer que les longueurs d'ondes supérieures ou égales à 515 nm et passe au travers d'un filtre passe bande (530 nm). Une fois filtrée, la lumière est collectée par un tube photomultiplicateur qui transforme les signaux lumineux reçus en un courant électrique. Les données sont acquises à 0,8 Hz, puis stockées sur un PC. L'obturateur et le porte-filtres est piloté par un logiciel d'acquisition qui impose la durée d'exposition à la source lumineuse. Ce programme d'acquisition a été développé par Jean-Luc Rodeau (CR1, CNRS, UMR 7519). Les caractéristiques spécifiques aux paramètres d'acquisition du BCECF sont reprises dans le tableau 7.

---

<sup>14</sup> acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthane sulfonique

Excitation			Miroir dichroïque		Emission	
Longueur d'onde (nm)	Type de filtre	Marque	Longueur d'onde (nm)	Modèle	Longueur d'onde (nm)	Type de filtre
450	Passe bande 6.0 nm	Ealing	≥ 515	IMT2-DMB (filtre dichroïque DM500 et une barrière filtrante O515)	530	Passe-bande
490	passé bande 6.0 nm	Ealing				

**Tableau 7.** Caractéristiques de mesure du pH intracellulaire avec la sonde BCECF.

### ***2.2. Bruit de fond***

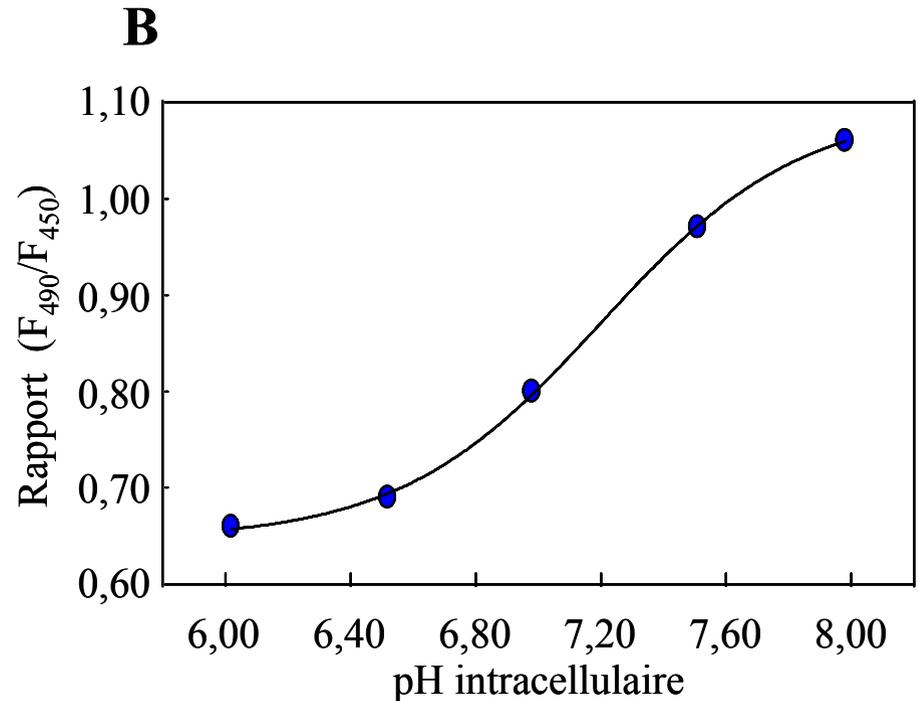
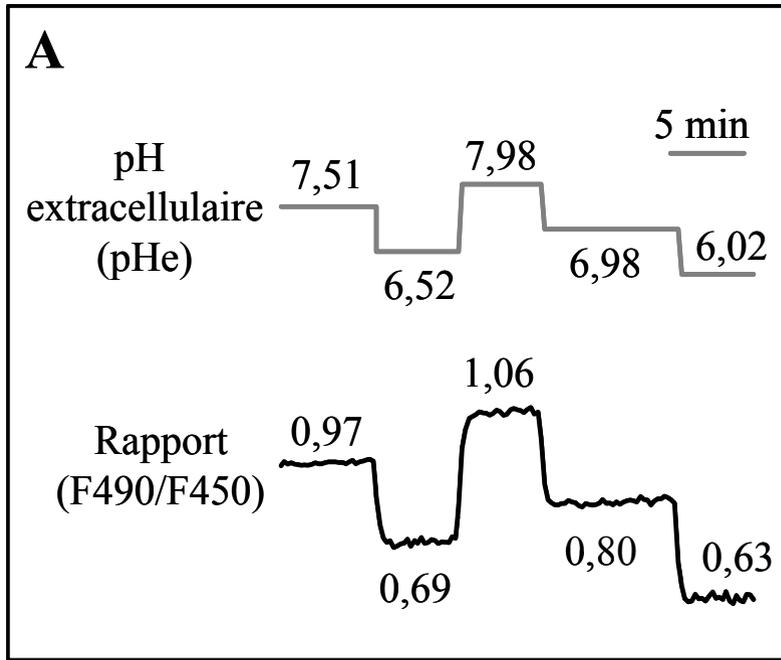
Le bruit de fond est enregistré avant chaque expérimentation sur une préparation qui n'a pas été traitée au BCECF. La valeur moyenne du bruit de fond est obtenue à partir de cinq mesures successives pour chaque longueur d'onde d'excitation (490 et 450 nm). Cette valeur est automatiquement soustraite de l'acquisition, ce qui permet d'obtenir un signal dû uniquement à la fluorescence de BCECF. Le bruit de fond est environ 100 fois plus faible que le signal.

### ***2.3. Acquisition des données***

Le fonctionnement de l'obturateur et du porte-filtres électromagnétique est commandé par des sorties "TTL" du système d'acquisition. Le cycle d'acquisition se décompose de la façon suivante :

- l'obturateur est ouvert, le filtre à 450 nm est sur le trajet optique.
- l'acquisition est réalisée à cette longueur d'onde et le système calcule la valeur moyenne d'un échantillonnage de 50 fois 2 ms.
- le porte-filtres électromagnétique tourne et met en place le filtre à 490 nm sur le trajet optique.
- l'acquisition à cette longueur d'onde est réalisée en moyennant un échantillonnage de 50 fois 2 ms.
- l'obturateur se referme et le porte-filtres revient en position initiale avec le filtre à 450 nm sur le trajet optique.

La fréquence d'acquisition, c'est-à-dire le laps de temps entre chaque cycle peut être réglée. Pour nos travaux, nous avons choisi une fréquence de 1 acquisition toutes les 10 secondes.



**Figure 7.** Transformation du rapport d'intensité de fluorescence R en pH<sub>i</sub>. **A** : Enregistrement des rapports d'intensité de fluorescence durant la perfusion des cellules avec les solutions d'étalonnage. 5 solutions à différents pH sont utilisées pendant environ 5 minutes chacune. **B** : Cette courbe est obtenue à partir des rapports d'intensité de fluorescence enregistrés pour chaque valeur de pH. Un programme de régression non linéaire permet de tracer à partir des valeurs expérimentales (points bleus) la courbe de titration selon l'équation :  $R = a + b/(1+10^{(pK-pH)})$ . Après avoir déterminé les paramètres a, b et pK de la courbe sigmoïdale, ces valeurs sont utilisées pour transformer les rapports d'intensité de fluorescence en valeurs de pH. Un étalonnage de ce type est réalisé systématiquement après chaque enregistrement.

#### **2.4. Visualisation des paramètres**

Le programme d'acquisition permet à tout moment de visualiser les différents paramètres spécifiques à l'expérimentation en cours :

- la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence à chaque longueur d'onde, avant et après soustraction du bruit de fond.
- la valeur du rapport ( $R = 490/450$ ).
- le numéro du cycle d'acquisition.

### **3. Calcul du pH intracellulaire**

#### **3.1. Etalonnage des rapports de fluorescence**

Cet étalonnage consiste à imposer le  $pH_i$  à des valeurs connues et à déterminer pour chacune de ces valeurs le rapport des fluorescences (fig 7A). Pour imposer le  $pH_i$ , nous utilisons plusieurs solutions à différents pH dans lesquelles 3  $\mu M$  de nigéricine sont ajoutés. La nigéricine est un antibiotique capable de perméabiliser les membranes cellulaires, il joue le rôle d'un ionophore spécifique aux ions  $H^+$  et  $K^+$ . Pour ne pas modifier la concentration intracellulaire de  $K^+$ , les solutions sont préparées avec une concentration de  $K^+$  proche de la concentration intracellulaire (135 mM) (Boussouf et Gaillard, 2000). L'équilibre entre les concentrations intra et extracellulaire de  $H^+$  est atteint en quelques minutes lorsque :

$$[K^+]_i / [K^+]_e = [H^+]_i / [H^+]_e = 10^{-pH_i} / 10^{-pH_e}$$

Dans ces conditions, la valeur de  $pH_i$  est égale à la valeur de  $pH_e$ . Cette méthode permet d'imposer une valeur de  $pH_i$  égale à celle de la solution extracellulaire contenant la nigéricine. L'étalonnage se fait après exposition des cellules à différentes solutions titrées. Le passage d'une valeur de  $pH_e$  à une autre s'accompagne d'une variation correspondante du rapport d'intensité des fluorescences  $R$  (fig 7A). A chaque valeur de pH d'une solution correspond un rapport d'intensité des fluorescences permettant de construire la courbe :  $R = f(pH \text{ extracellulaire})$ . Cette courbe de titration sigmoïdale est caractérisée par une équation de type :  $R = a + b/(1+10^{(pK-pH)})$ , et les paramètres  $a$ ,  $b$  et  $pK$  sont calculés par un programme de régression non linéaire (fig 7B).

Dans ce travail, 5 solutions d'étalonnage ont été utilisées (tableau 6). Le pH de ces solutions a été ajusté avec KOH ou HCl (1 N) à 5 valeurs différentes de pH: 6,00, 6,50, 7,00, 7,50 et 8,00.

## ***C. Système et solutions de perfusion***

### ***1. Perfusion des cellules***

Pour effectuer les enregistrements de pH sur le microscope inversé, les boîtes de culture sont déposées sur une platine chauffée à 37 °C à l'aide d'un thermostat (modèle HAAK F3). Durant toute la période d'expérimentation, la cellule enregistrée est perfusée de manière directe et régulière avec des solutions salines par un système de perfusion à gravité. Un robinet à deux voies est placé à 5 cm de l'extrémité du tuyau et permet de changer rapidement de solution en cours de manipulation. Le débit est réglé à une vitesse de 0,5 ml/min et la solution arrive à la cellule par une aiguille en plastique (203 G Drummond Scientific Co. U.S.A). La pointe de cette aiguille est positionnée à environ 50 µm de la cellule enregistrée. Le niveau de liquide dans la boîte de culture est maintenu constant durant toute l'expérimentation par une pompe aspirante.

### ***2. Solutions de perfusion***

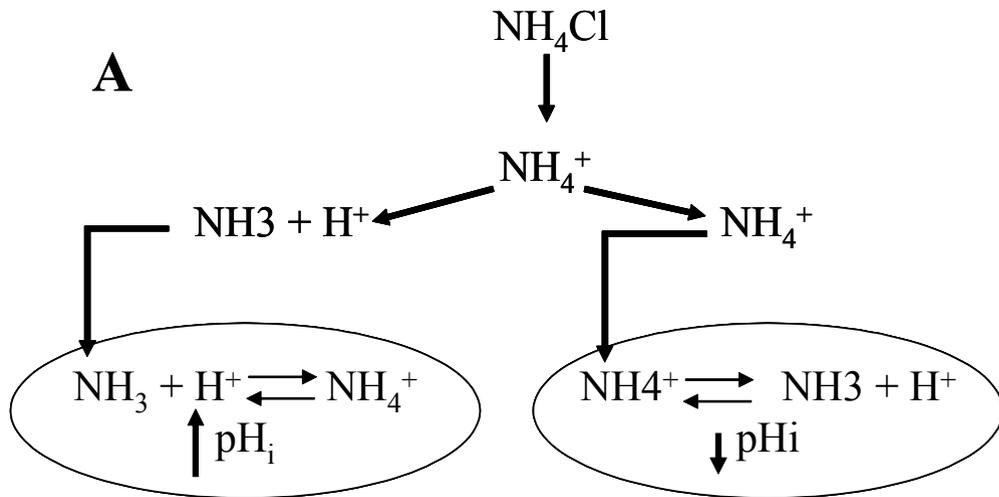
Comme nous avons pu le voir, il existe deux grandes catégories de mécanismes de régulation de  $\text{pH}_i$  :

- dépendant de la présence du système  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  (situation physiologique).
- actif même en absence d'ions  $\text{HCO}_3^-$ .

C'est pourquoi deux solutions standards sont utilisées pour analyser, identifier et déterminer les effets des variations de  $\text{pH}_i$  des OLP :

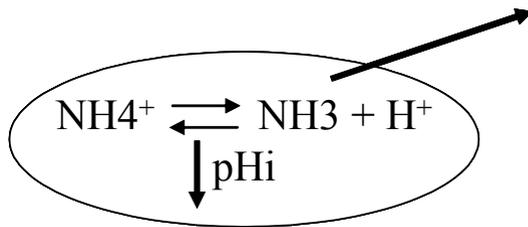
- une solution tamponnée avec 25 mM de bicarbonate à pH 7.40 en présence de 5% de  $\text{CO}_2$  à 37 °C.
- une solution tamponnée avec de l'HEPES en présence de 100% de  $\text{O}_2$  (sans  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ ). En absence de bicarbonate extracellulaire, le  $\text{pH}_i$  des OLP augmente (Boussouf et Gaillard, 2000). Afin de contrecarrer ce changement, pour que le  $\text{pH}_i$  reste le même entre les expériences menées en présence ou en absence de bicarbonate, le pH du milieu est ajusté à 7,25 avec NaOH ou KOH à 37°C.

Pour déterminer quels sont les mécanismes impliqués dans les changements de  $\text{pH}_i$  suite à l'application de différentes molécules, une des approches consiste à utiliser des variantes de ces milieux de base (voir tableau 6) pour lesquels il y a :

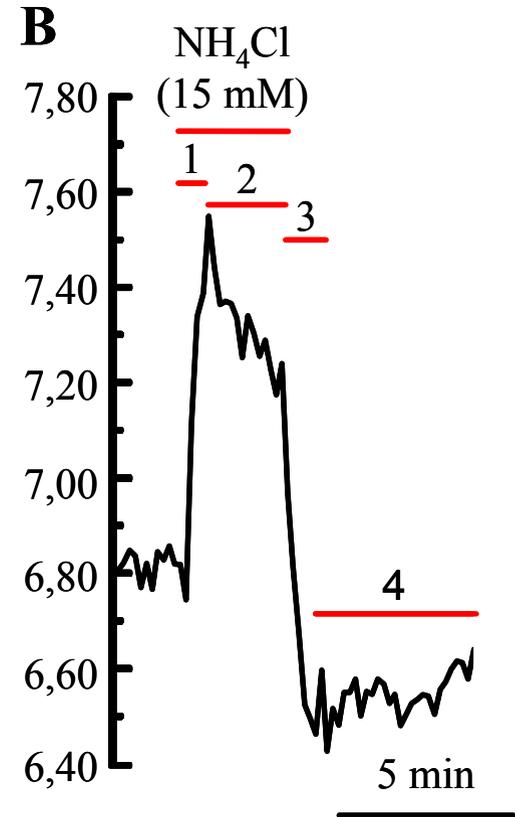


Phase 1 : Addition de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .  
L'entrée de la molécule neutre  $\text{NH}_3$  induit une alcalinisation

Phase 2 : L'entrée de  $\text{NH}_4^+$  par les canaux cationiques induit une faible acidification.



Phase 3 : Le retrait du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  est suivi d'une sortie de la molécule neutre  $\text{NH}_3$  provoquant alors une large acidification.



**Figure 8.** Principe d'acidification par le retrait du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (d'après Boron et de Weer, 1976).

**A :** Principe. **B :** Enregistrement original d'une acidification intracellulaire. La phase 4 représente la récupération du  $\text{pH}_i$  grâce à l'activité des différents mécanismes d'échanges ioniques.

- suppression de l'un ou l'autre des constituants ioniques de la solution, compensée par l'addition d'une concentration similaire d'un autre ion équivalent (par ex : le  $\text{Na}^+$  peut être remplacé par le N-méthyl-D-glucamine (NMDG)).
- ajout d'un inhibiteur spécifique (par ex : inhibition de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  par l'amiloride).

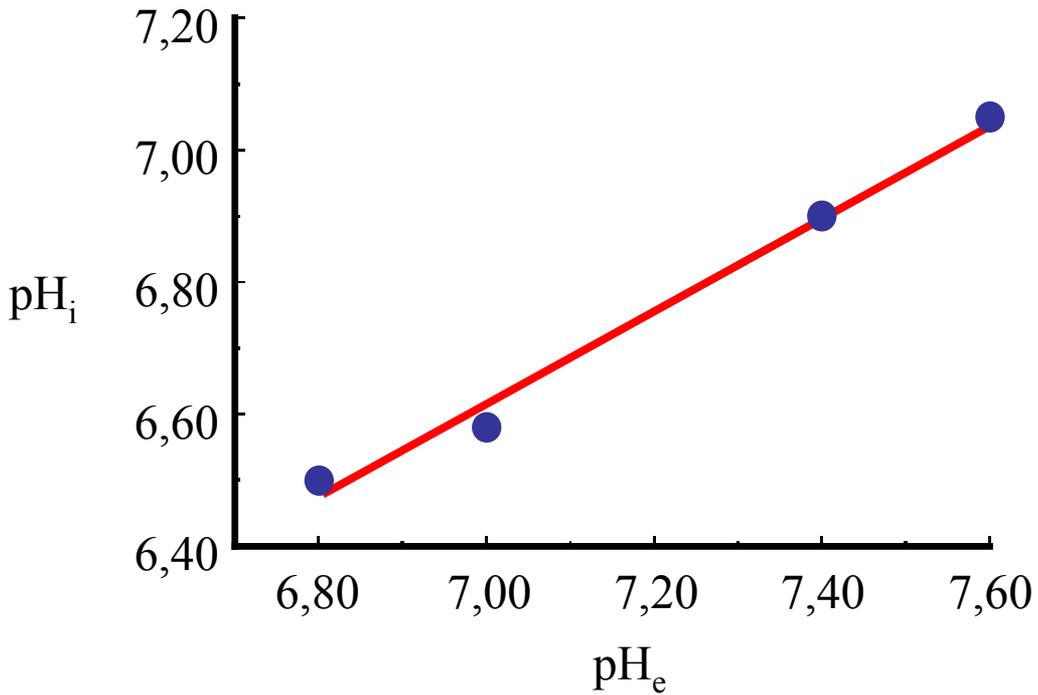
### ***3. Technique d'acidification par le $\text{NH}_4^+$***

Cette méthode a été utilisée pour la première fois par Boron et De Weer (Boron et De Weer, 1976). Elle consiste à acidifier le milieu intracellulaire et à observer le retour de  $\text{pH}_i$  à son état initial. L'analyse de la vitesse de récupération de  $\text{pH}_i$  est directement dépendante de l'activité des mécanismes de transport des acides et des bases. De ce fait, en fonction des solutions utilisées, présence d'inhibiteur ou absence de certaines espèces ioniques, cette analyse permet de déterminer et de quantifier l'activité des transporteurs. Une solution de perfusion contenant 15 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  est appliquée sur les cellules durant quelques minutes. Le retrait rapide de cette solution va alors induire une importante acidification intracellulaire (fig 8).

### ***4. Manipulation expérimentale du $\text{pH}_i$***

Il existe une dépendance du  $\text{pH}_i$  vis-à-vis du  $\text{pH}_e$ , celle-ci est constatée avec différents types de cellules gliales. C'est le cas des astrocytes du cortex de rats nouveau-nés (Møllergaard et Siesjö, 1991; Møllergaard et al., 1992; Brune et Deitmer, 1995) sur lesquels une diminution de  $\text{pH}_e$  de 0,1-0,2 unité provoque une acidification intracellulaire du même ordre. Une acidification de 0,5 unité  $\text{pH}$  a été enregistrée dans les oligodendrocytes matures de la moelle épinière de souris après une diminution de  $\text{pH}_e$  de 0,6 unité (Kettenmann et Schlue, 1988). C'est ainsi que A. Boussouf et al ont pu mettre en évidence sur les oligodendrocytes matures issus du cervelet de rats nouveau-nés l'existence d'une relation entre  $\text{pH}_i$  et  $\text{pH}_e$  (Boussouf et al., 1997). Les oligodendrocytes en cours de différenciation n'expriment plus l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , la dépendance du  $\text{pH}_i$  envers le  $\text{pH}_e$  n'est pas tout à fait la même que pour les OLP. Nous avons déterminé cette relation pour les OLP (fig 9). Les milieux de culture sont préparés aux différents  $\text{pH}$  testés en modifiant la concentration de bicarbonate.

$$\text{pH}_i = 0,7100 \times \text{pH}_e + 1,6455$$



**Figure 9.** Le pH intracellulaire des OLP peut être imposé à une valeur fixe en contrôlant le pH du milieu de culture (pH<sub>e</sub>). Pour fixer le pH<sub>i</sub> à une valeur donnée, il suffit de calculer le pH<sub>e</sub> par la relation exposée ci-dessus.

Cette concentration pour un pH donné peu être calculée par la relation d'Henderson-Hasselbach :

$$pH = pK + \log ([HCO_3^-]/\alpha P_{CO_2})$$

pK du couple  $CO_2/HCO_3^- = 6,10$  à  $37^\circ C$

$\alpha$  (coefficient de solubilité du  $CO_2$ ) =  $0,0301$  mM/mmHg

$P_{CO_2}$  (Pression partielle de  $CO_2$ ) est dépendante de la pression atmosphérique et du

taux de  $CO_2$  :  $P_{CO_2} = 5\%$  de la pression atmosphérique

$[HCO_3^-]$  = concentration en mM

La relation existant entre le  $pH_i$  et le  $pH_e$  peut être expliquée par la dépendance entre le  $pH_e$  et l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$ . Il a été démontré que plus le  $pH_e$  est élevé plus l'activité de l'échangeur augmente et inversement. Il existe au niveau extracellulaire des groupements ionisables contrôlant de manière allostérique l'accessibilité du  $Na^+$  sur son site de transport. Il a de plus été montré que la titration de ce site extracellulaire contrôle l'activité du site régulateur intracellulaire contrôlant le  $pH_i$  stationnaire (Aronson, 1985; Jean et al., 1985).

#### ***D. Implication fonctionnelle des MAPK ERK1/2***

##### ***1. Préparation des cellules***

Les cellules sontensemencées à raison de  $2 \times 10^6$  cellules par boîtes de Pétri de 100mm de diamètre et sont placées dans un milieu chimiquement défini durant 12 heures.

##### ***1.1. Effets du $pH_i$***

Le but de cette expérience est de déterminer si des variations de  $pH_i$  peuvent induire des changements de phosphorylation et donc d'activité de ERK1/2. Au temps  $t_0$ , le milieu défini est remplacée par des solutions tamponées à l'HEPES à un pH 6,88 et 7,13 contenant  $5 \mu M$  de la nigéricine et  $130$  mM de  $K^+$ . Dans ces conditions le pH du milieu intracellulaire est très rapidement ramené à celui de la solution extracellulaire. Ces conditions permettent de contrôler finement le  $pH_i$  et d'imposer un changement très rapide grâce à la nigéricine. Les cellules sont récupérées après 15 et 30 minutes d'incubation. Pour chaque temps nous avons les 2 conditions de pH :

## Matériels et méthodes

- une condition dans laquelle le pH<sub>i</sub> est imposé à 6,88, mimant celui des OLP dans les conditions contrôle en culture primaire.
- pH 7,13 mimant le pH<sub>i</sub> atteint sur des OLP en culture primaire en présence d'AR.

### ***1.2. Sema3A et ERK1/2***

Au temps t<sub>0</sub>, le milieu défini est remplacé par un milieu défini contenant 100 ng/ml de Sema3A. Les cellules sont récupérées après 0, 15, 30, 45 et 60 minutes d'incubation.

### ***2. Lyse cellulaire***

Les cellules sont rincées au PBS (pH 7,40) froid et récupérées par grattage dans un tampon PBS (pH 7,40) contenant 0,1% de SDS et un cocktail d'inhibiteurs de sérine-cystéine protéases et de métallo-protéases (Roche), et 5 mM d'orthovanadate. La solubilisation des protéines se fait à 4°C pendant ½ heure sous agitation, puis les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation.

### ***3. Dosage des protéines***

Les protéines sont dosées par utilisation de l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay, PIERCE) à partir d'une gamme étalon réalisée avec des concentrations de BSA comprises entre 0 et 2000 µg/ml. Les fractions à tester sont diluées dans du tampon de lyse. L'absorbance est ensuite lue à 562 nm.

### ***4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes***

Les échantillons sont préparés pour l'électrophorèse par addition de tampon de Laemmli : Tris-HCl 62,5 mM pH 6,80, glycérol 10%, SDS 2%, DTT, bleu de bromophénol 0,05%. Les échantillons sont ensuite chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Les extraits cellulaires, à raison de 10 µg de protéines sont déposés sur un gel de polyacrylamide SDS-PAGE (10%). L'électrophorèse est effectuée à ampérage constant (250mA) et à température ambiante.

### ***5. Western Blot***

Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le transfert s'effectue à 4°C dans un tampon méthanol 20%, Tris 0,025 M, Glycine 0,192 M, SDS 0,01% pendant 2 h 30 à 500 mA dans une cuve de transfert semi-sec.

## Matériels et méthodes

La membrane est ensuite bloquée dans du PBS-lait 5% pendant 2 heures à température ambiante.

Après rinçage au PBS-0.2% de Tween, la membrane est incubée 2 heures sous agitation à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-0,2% Tween + 5% lait demi écrémé :

- anti-actine (Cell Signaling Technology) au 1/5000<sup>ème</sup>.
- anti-ERK1/2 phosphorylée (monoclonal, Cell Signaling Technology) au 1/5000<sup>ème</sup>.
- anti-ERK1/2 totale (monoclonal, Sigma-Aldrich) au 1/2000<sup>ème</sup>.

Après 3 rinçages de 5 minutes au PBS-0,2% Tween, la membrane est incubée 1 heure dans ce même tampon en présence de protéine A/G couplée à la peroxydase (Pierce) diluée au 1/100000<sup>ème</sup>. Cette protéine A/G reconnaît le fragment constant des anticorps primaires restés fixés sur la membrane. Après 3 lavages de 10 minutes au PBS, la révélation s'effectue par chimioluminescence (kit super signaling, Pierce). La quantification de l'expression des protéines est effectuée à l'aide du logiciel ScionImage.

### ***E. Calculs***

#### ***1. Calcul du pouvoir tampon***

Nous utilisons la méthode de Roos et Boron pour calculer le pouvoir tampon intrinsèque ( $\beta_i$ ) des cellules, en absence totale du système  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  (Roos et Boron, 1981):

$$\beta_i = \Delta[\text{base}]_{\text{totale}} / \Delta\text{pH} \text{ (mmol.l}^{-1}\text{.unité pH}^{-1}\text{)}$$

Le terme  $\Delta[\text{base}]$  représente la concentration intracellulaire en  $\text{NH}_3$  qui résulte de l'addition de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dans le milieu extracellulaire. Cette concentration est calculée en fonction de la concentration totale de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ajoutée, du pK du système ammonium/ammoniaque et des valeurs de  $\text{pH}_i$  et  $\text{pH}_e$ . Le terme  $\Delta\text{pH}$  représente l'amplitude de l'alcalinisation correspondante.

## ***2. Calcul du flux de protons***

L'acidification par application de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  permet, lors de la récupération, de déterminer le flux sortant de protons ( $J_{\text{H}^+}$ ) :

$$J_{\text{H}^+} = \Delta\text{pH}/\Delta t \times \beta_t$$

$\Delta\text{pH}/\Delta t$  : vitesse de récupération en unité  $\text{pH} \cdot \text{min}^{-1}$

$\beta_t$  : valeur du pouvoir tampon total en  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{unité pH}^{-1}$

$J_{\text{H}^+}$  : flux de protons en  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

La quantification du flux de protons commence lorsque le pic de l'acidification est atteint. Le pH est alors quantifié toutes les 10 secondes. Le flux représente une quantification directe de l'activité des mécanismes de régulation de pH.

## ***3. Statistiques***

Les différents comptages de cellules sont réalisés au hasard sur 10 champs d'observation par boîte de culture. En moyenne ces 10 champs permettent de dénombrer une centaine de cellules. Toutes les valeurs rapportées sont exprimées sous forme d'une moyenne  $\pm$  écart type à la moyenne (S.E.M). Pour les analyses quantitatives permettant la comparaison des moyennes, le test 't' bidirectionnel de Student non apparié a été utilisé. Pour les analyses quantitatives exprimées en pourcentage du contrôle nous utilisons un test 't' bidirectionnel de Student apparié. Pour les analyses qualitatives, nous utilisons le test de Khidoux. Les effets sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque la probabilité est inférieure à 0,05.

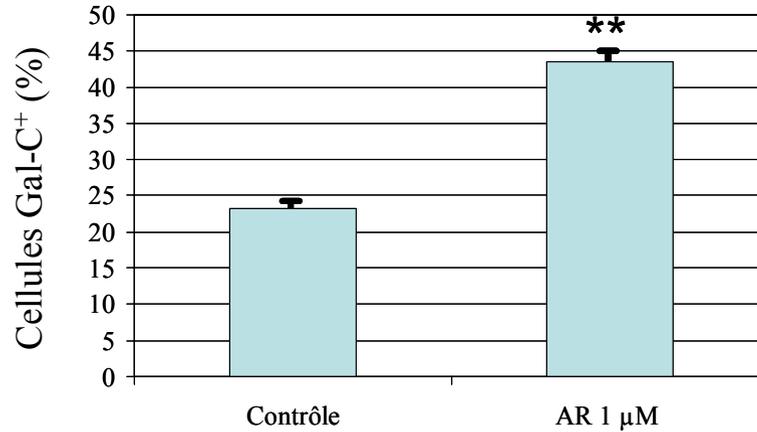
## ***A. Rôle de $pH_i$ lors de la différenciation des OLP induite par l'AR***

### ***1. Stimulation de la différenciation par l'AR***

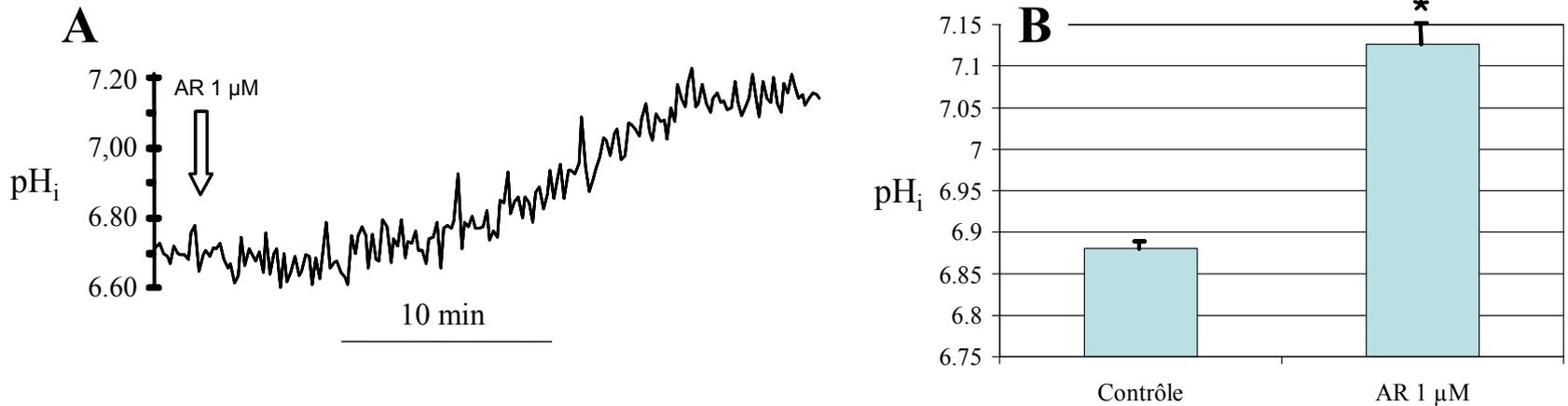
Comme nous l'avons vu précédemment, l'AR induit la différenciation de nombreux types cellulaires et notamment des OLP issus du nerf optique de rat (Tokumoto et al., 1999). Dans un premier temps nous avons examiné l'effet de l'AR sur la différenciation des OLP issus du cervelet de rats nouveaux-nés (P0) dans nos conditions de culture. Après trois jours de culture, les cellules sont passées dans un milieu défini contenant 1  $\mu$ M d'AR. Trois jours plus tard, nous constatons que l'AR augmente d'un facteur 2 la proportion de cellules différenciées (exprimant le galactocérébroside (Gal-C<sup>+</sup>)). Dans les témoins, seulement **23,23%**  $\pm 1$  (n = 574) des OLP sont différenciés et expriment le Gal-C<sup>+</sup> contre **43,48%**  $\pm 1,351$  (n = 773) en présence d'AR (fig 10). Cette augmentation significative (p<0,05) du nombre de cellules différenciées démontre que l'AR stimule la différenciation des OLP en culture primaire.

### ***2. L'acide rétinoïque induit une alcalinisation intracellulaire des OLP***

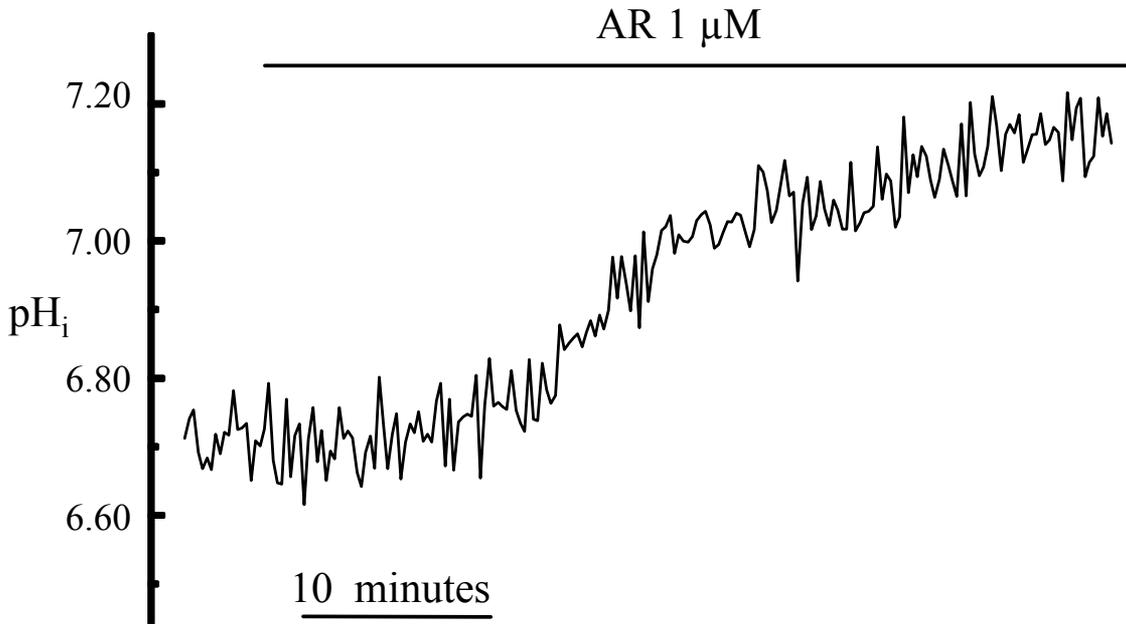
La différenciation induite par l'AR est souvent accompagnée de l'activation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, entraînant une alcalinisation intracellulaire (Ladoux et al., 1988a). Nous avons voulu savoir si un tel phénomène se produisait aussi avec les OLP. Nous avons mesuré le pH intracellulaire par microfluorimétrie de la sonde BCECF. Les enregistrements ont été réalisés sur des cellules uniques dans une solution saline tamponnée par le couple CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, à un pH de 7,40. Après environ 10 minutes d'application d'AR, on constate une augmentation du pH<sub>i</sub> jusqu'à atteindre un plateau après environ 20 minutes (fig 11A). La valeur moyenne de pH<sub>i</sub> en présence d'AR est de **7,13**  $\pm 0,02$  pour 166 cellules analysées, cette valeur est significativement différente (p = 0,0016) de celle des témoins, **6,88**  $\pm 0,01$  pour 80 cellules analysées (fig 11B). Cette alcalinisation persiste aussi longtemps que l'AR est présent. Quels que soient les temps d'incubation en présence d'AR (1 h, 2 h, 3 h, 12 h, 24 h, 48 h et 72 h) nous obtenons la même valeur moyenne de pH<sub>i</sub>.



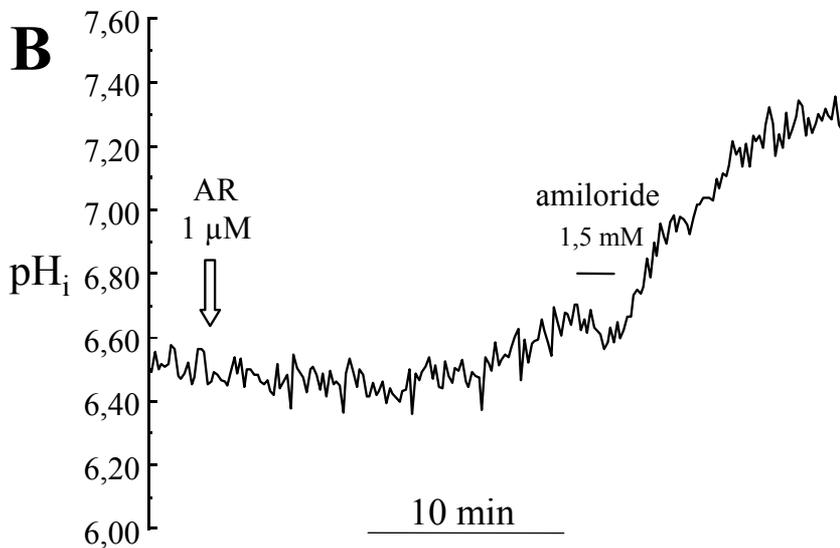
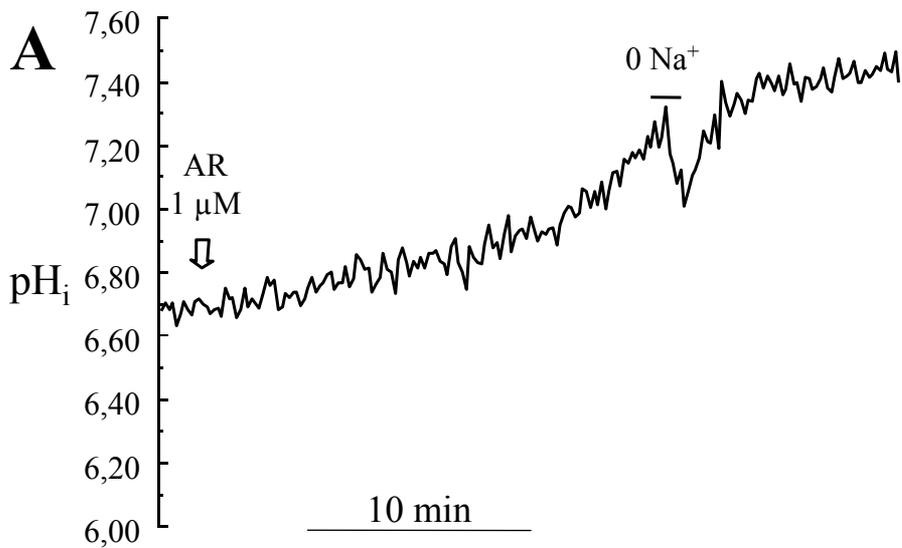
**Figure 10.** La présence durant 3 jours de 1  $\mu\text{M}$  d'AR dans un milieu de culture chimiquement défini stimule la différenciation des OLP quantifiée par le pourcentage de cellules Gal-C+.



**Figure 11.** (A) L'application de 1  $\mu\text{M}$  d'AR à partir d'une solution saline contenant du bicarbonate, induit après 10 minutes une augmentation progressive du pH<sub>i</sub>. Après 20 minutes, le pH<sub>i</sub> atteint un plateau avec pour moyenne un pH de 7,13 contre 6,88 sans AR (B).



**Figure 12.** L'application de 1  $\mu$ M d'AR à partir d'une solution saline tamponnée à l'HEPES induit une augmentation du  $pH_i$  des OLP.



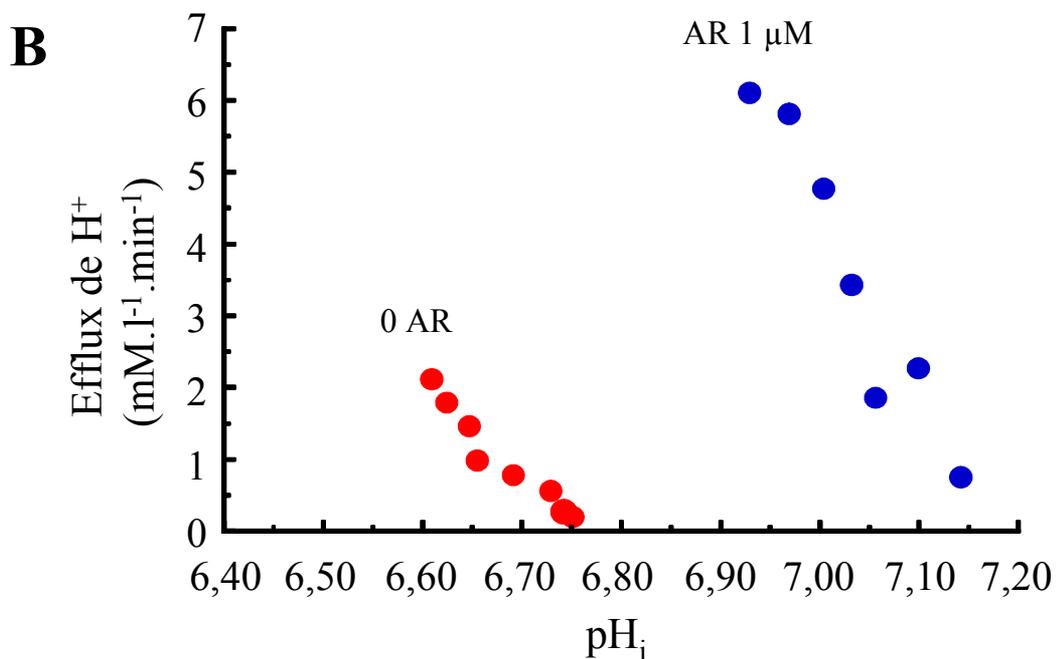
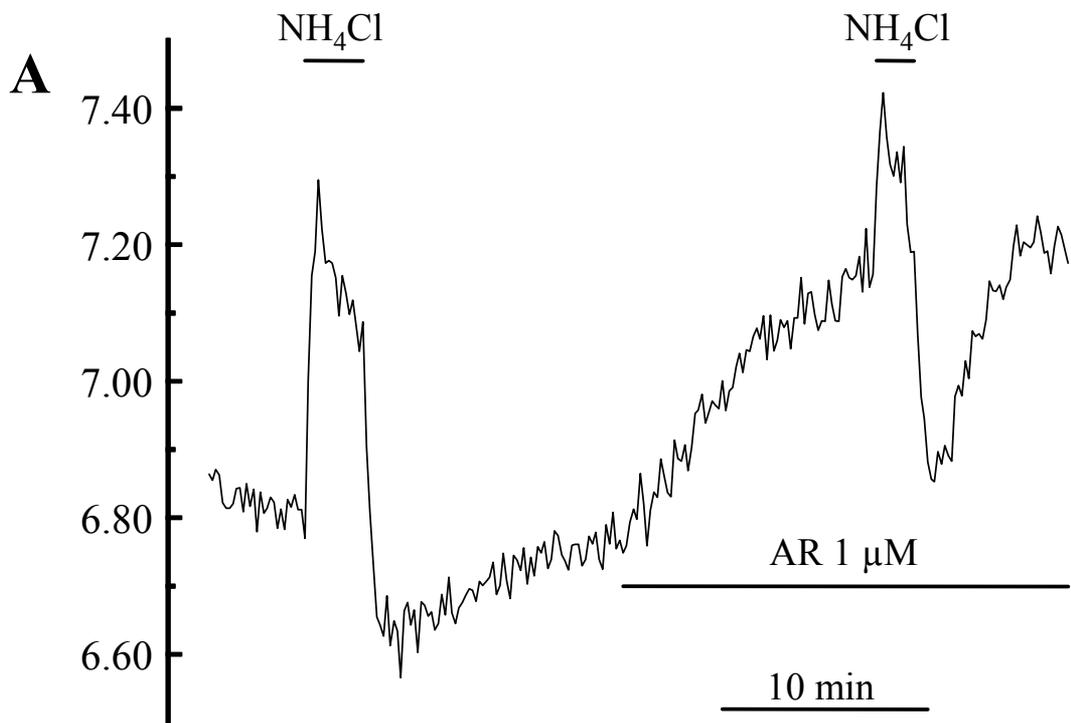
**Figure 13.** Ces expériences sont réalisées en absence de bicarbonate dans un milieu tamponné à l'HEPES (A) La suppression des ions Na<sup>+</sup> du milieu extracellulaire ou (B) l'addition de 1,5 mM d'amiloride entraînent une inhibition de l'alcalinisation induite par l'AR, démontrant le rôle de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.

### ***3. Activation par l'AR de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$***

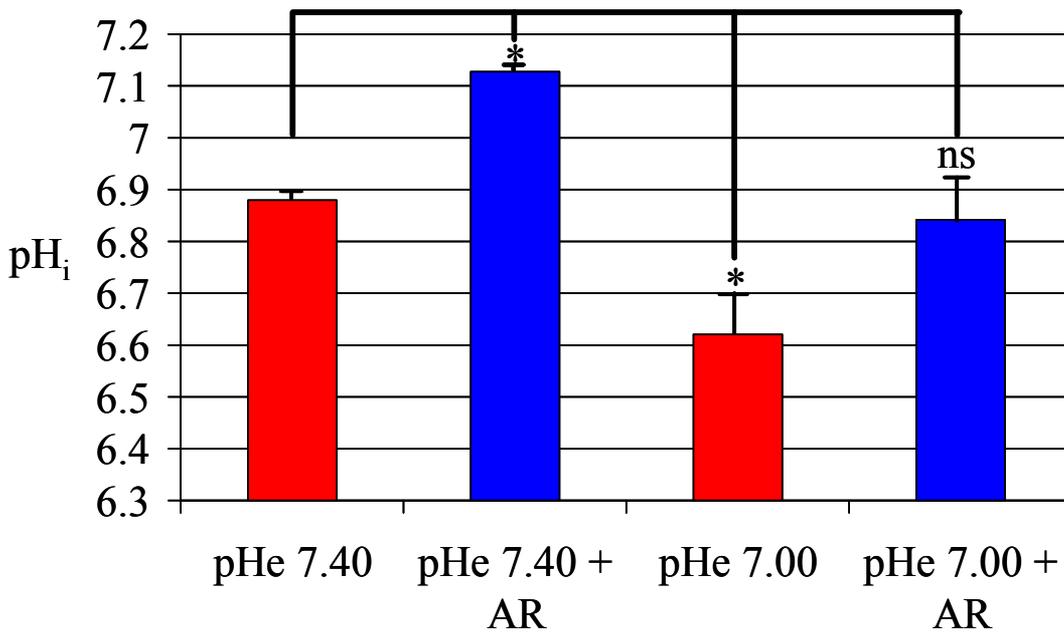
Les OLP disposent de plusieurs mécanismes pour assurer la régulation de  $\text{pH}_i$  mais seule l'activité de deux d'entre eux est capable d'induire une alcalinisation, il s'agit de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et du co-transporteur  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  (Boussouf et Gaillard, 2000), ce dernier n'étant actif qu'en présence de  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ .

Pour savoir si l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est impliqué dans l'alcalinisation intracellulaire observée en réponse à l'AR, une série d'expériences a été réalisée en absence de bicarbonate dans une solution saline tamponnée à l'HEPES. Dans ces conditions expérimentales, nous observons toujours une alcalinisation intracellulaire avec les mêmes caractéristiques (délai de réponse, cinétique) qu'en présence de bicarbonate (fig 12). Ce résultat démontre que les mécanismes impliqués dans l'augmentation de  $\text{pH}_i$  en réponse à l'AR ne sont pas dépendants du bicarbonate et suggère un rôle de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Pour vérifier cette hypothèse, le  $\text{Na}^+$  extracellulaire a été éliminé et un inhibiteur de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (l'amiloride) a été appliqué pendant la phase d'alcalinisation. L'application d'une solution d'HEPES dépourvue de  $\text{Na}^+$  durant quelques minutes a pour effet d'induire une chute réversible du  $\text{pH}_i$  (fig 13A). De même, l'application de 1,5 mM d'amiloride induit elle aussi une acidification, due au blocage réversible de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  par l'amiloride (fig 13B). Ces résultats démontrent que l'AR induit une alcalinisation intracellulaire en agissant sur l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

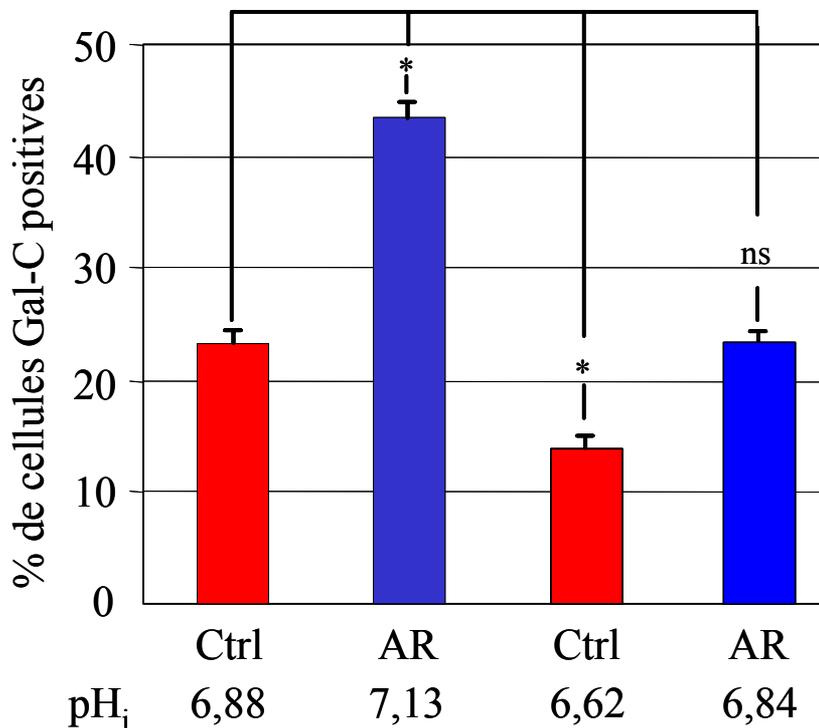
Dans une solution d'HEPES, les flux d'équivalents d'acides enregistrés reflètent directement l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Dans ces conditions, nous avons analysé les flux d'acides sur une même cellule avant et après addition d'AR. Cette expérience permet alors de quantifier l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Pour cela, nous analysons la récupération du  $\text{pH}_i$  après une acidification intracellulaire expérimentale induite par l'application de 15 mM de chlorure d'ammonium (fig 14A). On mesure la vitesse de retour de  $\text{pH}_i$  à sa valeur initiale. Cette vitesse d'alcalinisation représente le flux de proton ( $J_{\text{H}^+}$ ) dû à l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (en  $\text{mmole.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) (fig 14B). La quantification des flux de protons en fonction de la valeur de  $\text{pH}_i$  montre l'existence d'une dépendance entre ces deux variables. La courbe d'activité démontre que le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est dépendante du  $\text{pH}_i$ . En présence d'AR, la courbe d'activité est déplacée vers des valeurs de  $\text{pH}_i$  plus alcalines (fig 14B). La valeur de  $\text{pH}_i$  pour laquelle le flux net de protons est nul représente la valeur stationnaire de  $\text{pH}_i$ . Avant application d'AR, la valeur stationnaire de  $\text{pH}_i$  est de **6,76** puis atteint **7,17** après incubation avec l'AR (fig 14B). Ces



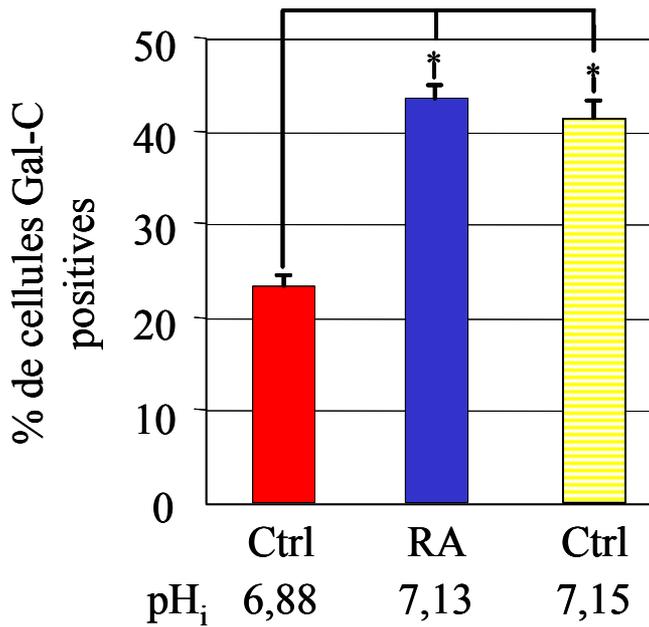
**Figure 14.** (A) l'application de 15 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induit une acidification intracellulaire transitoire. (B) la quantification de la vitesse de récupération du  $\text{pH}_i$  dans ces conditions (absence de bicarbonate) reflète alors l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .



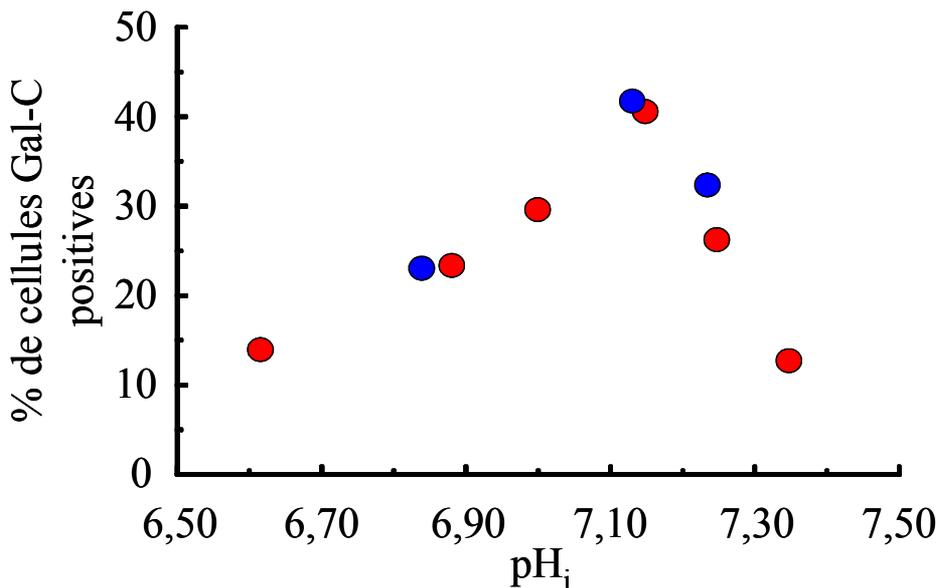
**Figure 15.** Effet de changements de  $pH_e$  sur le  $pH_i$  des OLP en présence ou en absence d'AR.



**Figure 16.** Effet du  $pH_i$  sur la différenciation des OLP. L'inhibition de l'alcalinisation induite par l'AR inhibe aussi la différenciation des OLP.



**Figure 17.** Effet du pH<sub>i</sub> sur la différenciation des OLP. En mimant l'effet alcalinisant de l'AR, les OLP sont induits à se différencier dans les mêmes proportions qu'en présence d'AR.



**Figure 18.** En présence ( ● ) ou en absence d'AR ( ● ), la différenciation des OLP est dépendante de la valeur de pH intracellulaire.

## Résultats

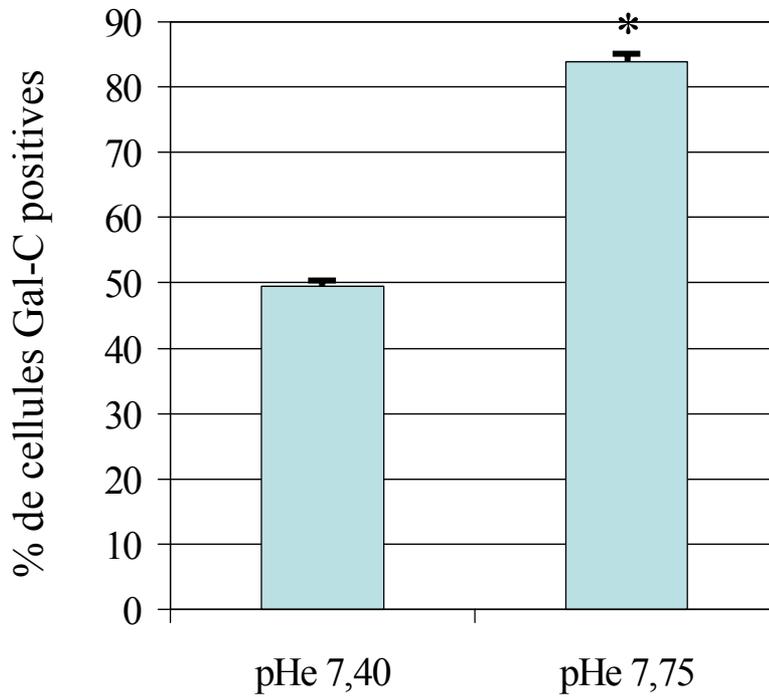
résultats démontrent que l'AR contrôle l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en agissant sur son site intracellulaire sensible au pH.

L'AR induit la différenciation des OLP en culture primaire et cet effet s'accompagne d'une augmentation du pH intracellulaire. Des manipulations expérimentales du  $\text{pH}_i$  vont permettre de déterminer plus précisément la relation entre  $\text{pH}_i$  et différenciation. Le  $\text{pH}_i$  est imposé par des manipulations de la valeur de  $\text{pH}_e$ .

### ***4. $\text{pH}_i$ et différenciation des OLP***

Une première série d'expériences est réalisée dans le but d'inhiber l'alcalinisation intracellulaire induite par l'AR. Ceci est réalisé en utilisant un milieu de culture plus acide. Le  $\text{pH}_i$  des OLP dans un milieu de culture à pH 7,00 est de **6,62**  $\pm$  0,09 (n=166), valeur significativement différente de celle du contrôle (p=0,014) (fig 15). A cette valeur de  $\text{pH}_i$  seulement **13,83%**  $\pm$  0,932 (n = 343) des cellules sont Gal-C<sup>+</sup>, valeur significativement plus faible que dans les conditions contrôle (p < 0,05). (fig 16). Dans ce même milieu de culture à pH 7,00, en présence d'AR, le  $\text{pH}_i$  des OLP est de **6,84**  $\pm$  0,08 (n = 73). Cette valeur est comparable au  $\text{pH}_i$  des OLP dans les conditions contrôle (**6,88**  $\pm$  0,01) (p=0,071) (fig 15). Le pourcentage de cellules Gal-C<sup>+</sup> est alors de **23,43%**  $\pm$  0,731 (n=691) et n'est pas significativement différent du taux de différenciation obtenu sans d'AR (**23,23%**) (p>0,05) (fig 16). En empêchant le  $\text{pH}_i$  d'augmenter jusqu'à 7,13, l'induction de la différenciation des OLP par l'AR est donc complètement inhibée.

Ces résultats démontrent pour la première fois l'existence d'un lien direct entre la valeur de  $\text{pH}_i$  et la différenciation des OLP. Pour mettre en évidence encore plus précisément cette relation, le taux de différenciation des OLP a été déterminé en fonction des valeurs de  $\text{pH}_i$  imposées. En absence d'AR et en reproduisant son effet alcalinisant ( $\text{pH}_i$  7.15), **41,19 %**  $\pm$  1,756 (n = 552) des OLP sont Gal-C<sup>+</sup> (fig 17). Il n'existe pas de différence significative (p > 0,05) entre les taux de différenciation observés en présence d'AR ou en mimant l'alcalinisation, **43,48%** contre **41,19%**. Il est donc possible de reproduire les effets pro-différenciant de l'AR en augmentant artificiellement la valeur de  $\text{pH}_i$  des OLP. D'autres valeurs de  $\text{pH}_i$  ont été testées, en présence ou en absence d'AR (fig 18). C'est ainsi que des OLP en culture avec un  $\text{pH}_i$  imposé à **7,01** présentent un taux de différenciation de **29,63%**  $\pm$  1,21 (n = 189). Pour un  $\text{pH}_i$  imposé à **7,23**, **32,82%**  $\pm$  1,05 (n = 420) des OLP se sont différenciés. A  $\text{pH}_i$  **7,25**, le taux de différenciation est de **26,28%**  $\pm$  1,14 (n = 156) et chute à **13,45%** (n=573) pour un  $\text{pH}_i$  de **7,35**. La figure 18 présente les



**Figure 19.** Effet du pH sur la différenciation des OLP en culture secondaire.

## Résultats

résultats de ces expériences. Le taux le plus élevé de différenciation des OLP est obtenu pour un  $pH_i$  de 7,15 et si l'on s'éloigne de part et d'autre de cette valeur optimale, que se soit en présence ou en absence d'AR, le taux de différenciation diminue.

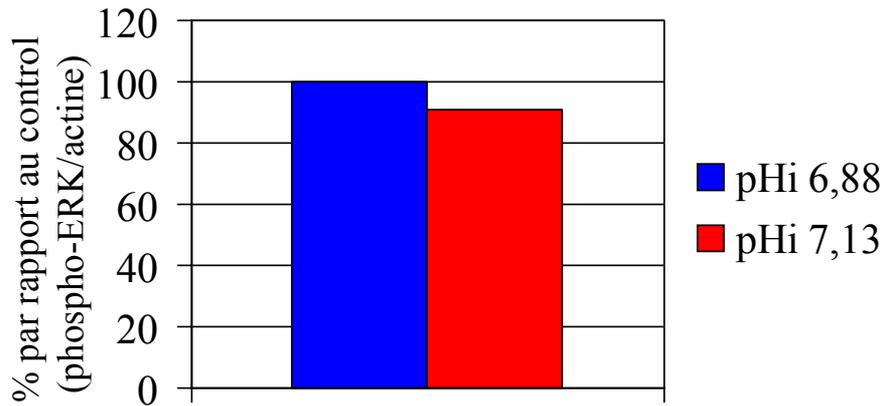
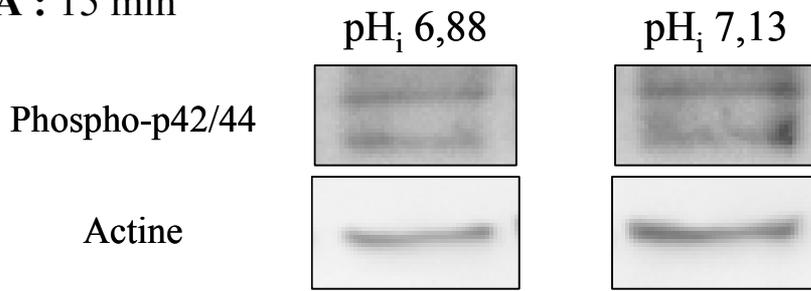
Ces résultats démontrent que des variations de  $pH_i$  contrôlent la différenciation des OLP en culture primaire. De ce fait, l'alcalinisation intracellulaire spontanée observée suite à la perte de l'activité de l'échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$  pourrait constituer un signal permettant le déclenchement de la différenciation des OLP.

Nous avons ensuite déterminé si une alcalinisation intracellulaire pouvait générer une modification de la signalisation intracellulaire. Sur des cellules HL60, l'activation de ERK1/2 est nécessaire à l'induction de la différenciation en réponse à l'AR (Yen et al., 1998) et ces effets s'accompagnent d'une alcalinisation intracellulaire (Ladoux et al., 1988). Sur des cellules 3T3, des variations de  $pH_i$  modulent aussi l'activation de ERK (Xue et al., 1997). Le contrôle de la différenciation et de la croissance des prolongements des OLP nécessite aussi l'activation de la voie de ERK1/2 (Stariha et al., 1997 et 2001). Nous avons donc choisi d'étudier le rôle du  $pH_i$  sur le contrôle de cette voie de signalisation.

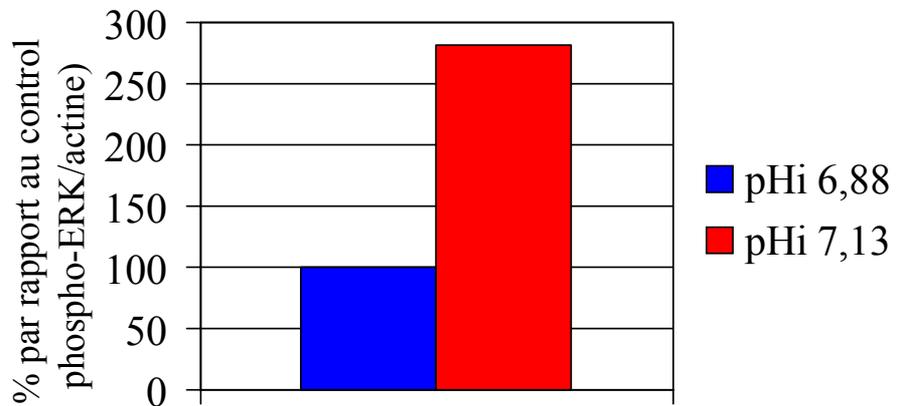
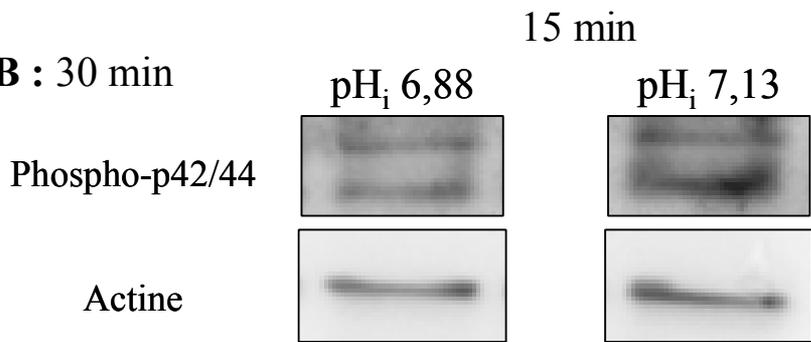
### ***5. $pH_i$ et signalisation intracellulaire***

Pour déterminer par une approche quantitative (Western-blot) les effets de  $pH_i$  sur les voies de signalisation intracellulaires lors de la différenciation des OLP il fallait pouvoir disposer d'une quantité très importante d'OLP purs. Les cultures primaires de cervelet ne permettant pas d'obtenir un matériel en quantité suffisante, j'ai effectué cette analyse à partir de cultures secondaires d'OLP issues d'hémisphères de rat nouveau-nés. Dans un premier temps, il était indispensable de déterminer si la différenciation des OLP en cultures secondaires est dépendante de  $pH_i$ . Pour cela, après trois jours de culture en milieu défini à des  $pH_e$  différents (7,40 et 7,75), le pourcentage d'OLP s'étant différenciés a été déterminé. Pour un  $pH_e$  de 7.40, **49,42 %  $\pm$  1,12** (n= 141) des OLP se sont différenciées contre **83,90%  $\pm$  1,02** (n = 128) pour un  $pH_e$  de 7,75 (fig 19). Un effet significatif du  $pH_i$  ( $p < 0,05$ ) sur la différenciation des OLP en culture secondaire issus d'hémisphères de rats est aussi observé. Les OLP issus de cultures secondaires sont placés 12 heures dans un milieu chimiquement défini puis ce milieu est remplacé par deux solutions d'HEPES à pH 6,88 et à pH 7,13, contenant de la nigéricine. Le  $pH_i$  est quasi instantanément imposé à la valeur du pH de la solution (voir matériels et méthodes). Les cellules sont récupérées après 15 et

A : 15 min



B : 30 min



30 min

**Figure 20.** Effet de changements du  $\text{pH}_i$  sur l'activation de la voie des MAPK ERK1/2 après 15 (A) et 30 min (B). Le western-blot et sa quantification présentés ci-dessus sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## Résultats

30 minutes pour analyser l'expression de ERK1/2 phosphorylées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et celle illustrée sur la figure 20 est représentative. Pour un  $\text{pH}_i$  alcalin de 7,13, il apparaît à partir de 30 minutes une augmentation de 285% de ERK1/2 phosphorylées par rapport à la situation contrôle ( $\text{pH}_i$  de 6,88) (fig 20). Sur les OLP, une faible variation de  $\text{pH}_i$  peut donc totalement modifier l'état d'activation d'une des voies majeures de la signalisation intracellulaire.

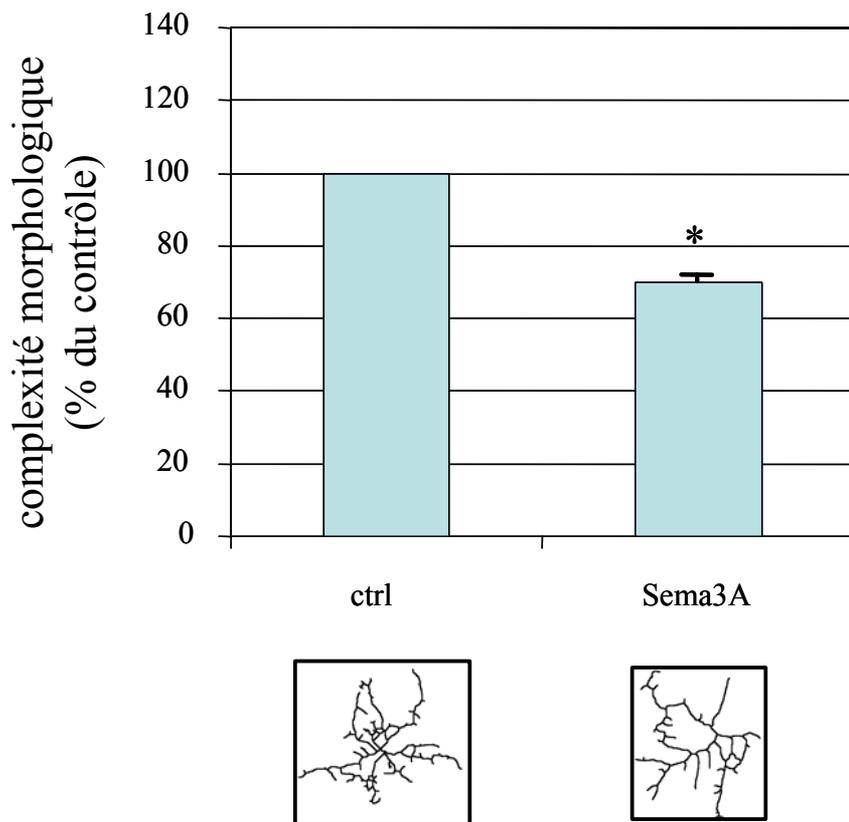
### ***B. Contrôle de l'élaboration de la morphologie cellulaire par le $\text{pH}_i$***

Les expériences menées durant cette étude ont été entièrement réalisées à partir de cultures secondaires d'OLP issues d'hémisphères cérébraux de rats nouveau-nés.

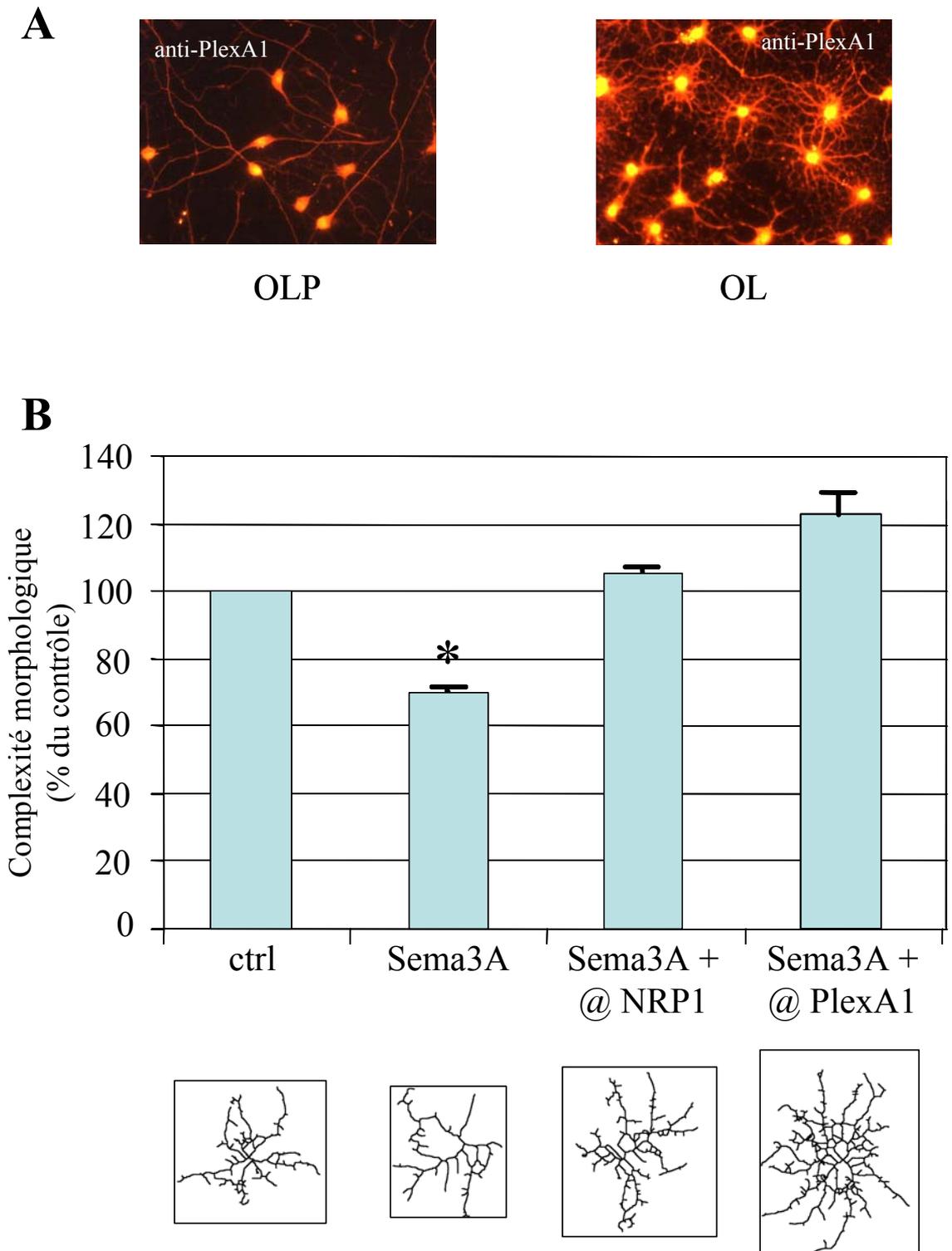
#### ***1. Sémaforine 3A et élaboration de la morphologie oligodendrocytaire***

##### ***1.1. Inhibition de la croissance par la Sema3A***

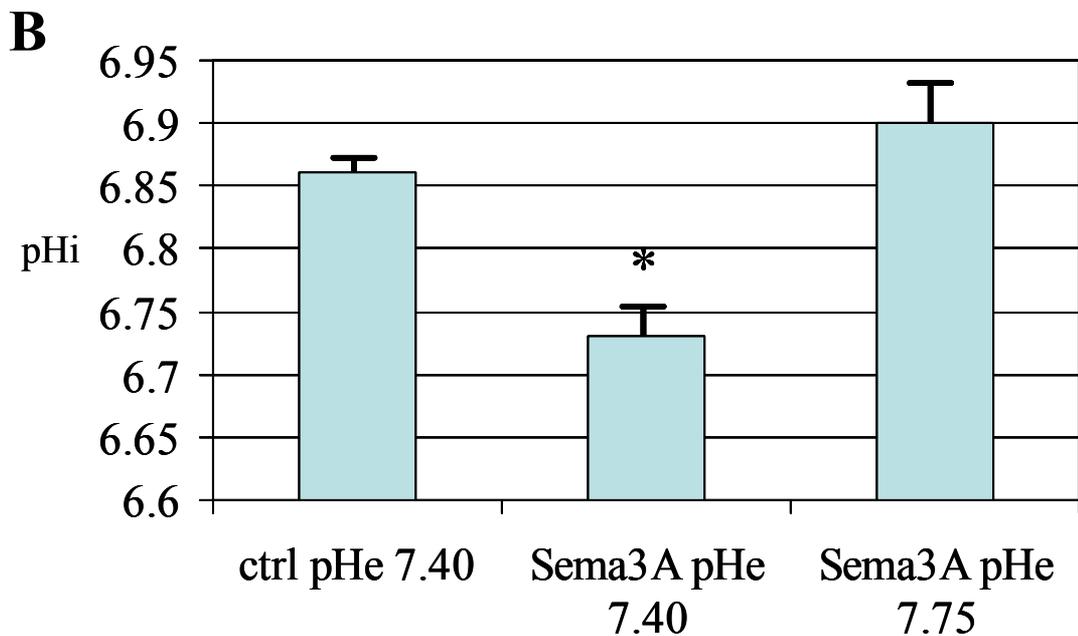
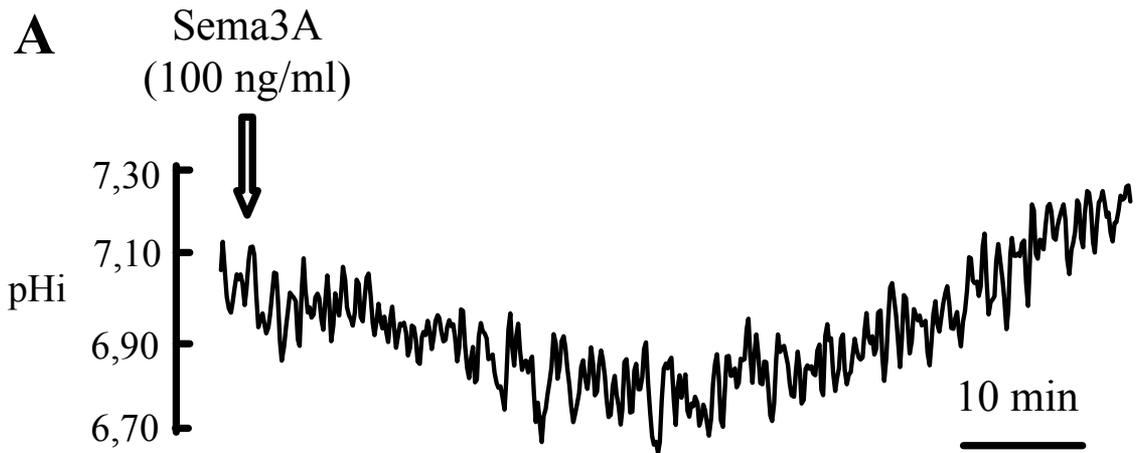
Nous avons d'abord analysé les effets de la Sema3A sur la morphologie oligodendrocytaire. Pour cela, les cellules ont été mises en culture dans un milieu défini durant 48 heures. Dans ces conditions, les cellules vont commencer à acquérir une morphologie plus complexe. Après ces 2 jours, un milieu neuf contenant 100 ng/ml de Sema3A remplace l'ancien milieu. 48 heures plus tard, les effets de la Sema3A sur la morphologie cellulaire sont analysés en déterminant la dimension fractale des cellules dans chaque condition. La dimension fractale moyenne dans les conditions contrôle est de **1,256**  $\pm$  0,05 (n = 57) et passe à **1,181**  $\pm$  0,09 (n = 48) en présence de Sema3A. Par définition la dimension fractale d'un objet en 2 dimensions ne peut prendre que des valeurs comprises entre 1,000 et 1,999. La comparaison statistique est donc réalisée en ne prenant en compte que les valeurs décimales (Reichenbach et al., 1992). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la valeur contrôle, de ce fait la variation de 1,256 à 1,181 représente une diminution de **30%** de la complexité morphologique des oligodendrocytes, c'est à dire **70% du contrôle** (0,181/0,256) (fig 21A). L'utilisation du test 't' de Student apparié fait apparaître une différence significative entre ces deux valeurs ( $p < 0,05$ ). L'application de Sema3A induit une diminution de la complexité morphologique. En présence de Sema3A, de nombreux corps cellulaires (sans aucun prolongement) adhérant difficilement sur le fond de la boîte sont retrouvés (fig 21B). De plus, la densité cellulaire est divisée par un facteur 2 en présence de Sema3A. La rétraction extrême des prolongements, en réponse à la Sema3A, pourrait entraîner le détachement d'une partie des

**A****B**

**Figure 21.** Effet de la Sema3A sur la morphologie oligodendrocytaire. (A) Les effets sont quantifiés en analysant la dimension fractale des cellules en absence et en présence de Sema3A. Les résultats sont exprimés en % de complexité morphologique par rapport au contrôle. La Sema3A induit 30% de diminution de la complexité des cellules. Les images squelettisées représentent de manière simplifiée la morphologie des cellules. (B) De nombreux corps cellulaires dépourvus de prolongements sont observés après traitement à la Sema3A.



**Figure 22.** (A) Les OLP et les OL en culture expriment la plexine A1. (B) L'utilisation d'anticorps bloquants a permis de démontrer l'implication de la plexine-A1 et de la neuropiline-1 dans la transduction du signal induit par Sema3A.



**Figure 23.** L'application de Sema3A sur des OLP en culture secondaire induit en 30 minutes une acidification transitoire (A). En moyenne, le  $pH_i$  des OLP passe de 6,86 à 6,73 (B). Dans un milieu à pH 7.75 l'acidification transitoire induite par Sema3A est inhibée; Le  $pH_i$  est alors identique à celui des cellules dans les conditions du témoin.

## Résultats

cellules en raison d'une diminution de leur adhésion au substrat. Ces cellules n'ont pas été prises en compte pour l'analyse et de ce fait, les effets de la Sema3A sont certainement sous-estimés.

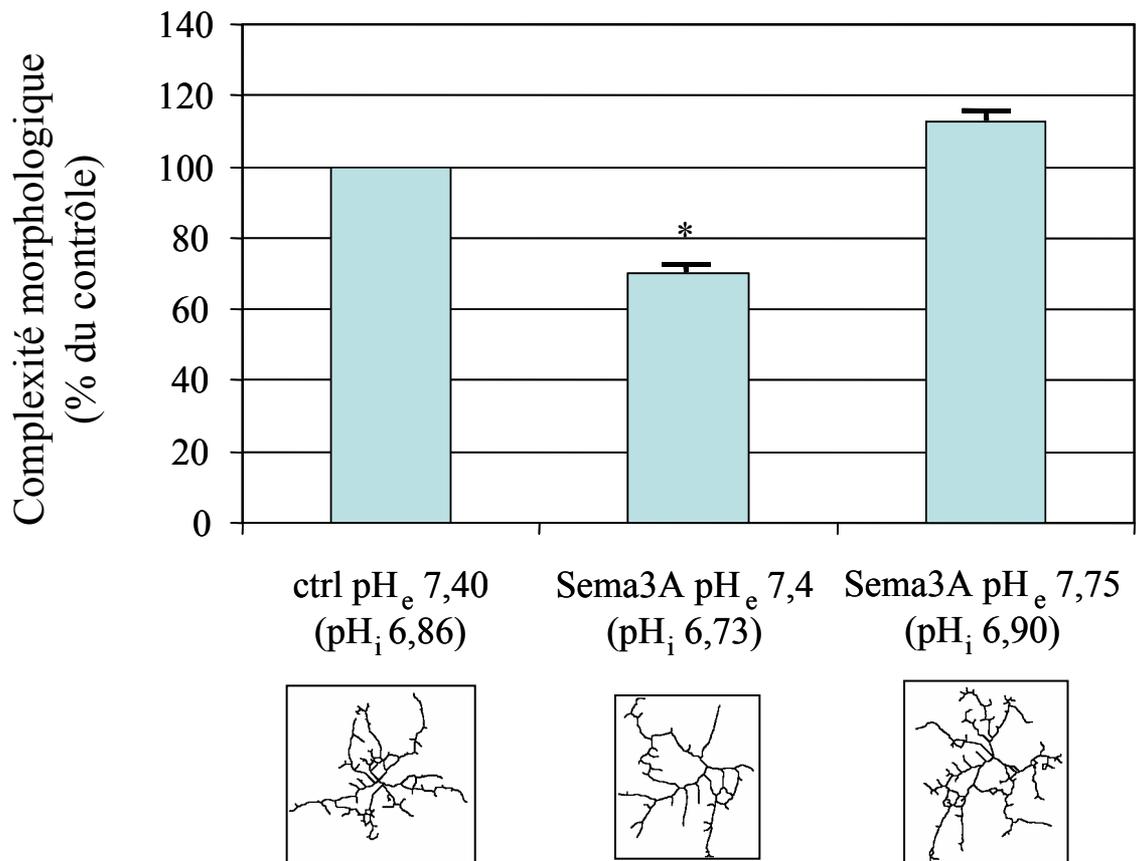
### **1.2. Les oligodendrocytes expriment la plexine-A1 (Plex-A1)**

Plusieurs études avaient déjà rapporté que les OLP expriment la Neuropiline-1 (NRP-1), la sous unité de fixation du complexe récepteur de Sema3A. Or, la transduction du signal de la Sema3A nécessite aussi le recrutement d'un autre type de molécule, les Plexines. De ce fait, nous avons analysé l'expression de la Plexine-A1 au cours du développement des oligodendrocytes. Cette étude est rendue possible par le développement au laboratoire d'un anticorps dirigé contre la Plexine-A1. Les oligodendrocytes en culture, expriment à tous les stades de leur différenciation la Plex-A1 (fig 22A). De ce fait, en culture, à n'importe quel moment de leur développement les cellules sont sensibles à la Sema3A, permettant alors une certaine plasticité morphologique. Des expériences ont été menées en présence d'anticorps bloquants dirigés contre NRP-1 ou Plex-A1 afin d'analyser leur rôle dans la liaison de la Sema3A et la transduction du signal. En présence de Sema3A, l'addition de l'un ou l'autre de ces anticorps bloquants inhibe les effets de la Sema3A. En présence de l'anti-NRP-1 (1 µg/ml), la dimension fractale moyenne est de **1,269 ± 0,11** (n=63) (**105% du contrôle**) et la différence est non significative par rapport au contrôle (p>0,05). Il en est de même en présence de l'anti-Plex-A1 (2 µg/ml), une dimension fractale moyenne de **1,312 ± 0,14** (n=65) (**122% du contrôle**) est mesurée (p>0,05) (fig 22B). Ces résultats démontrent que sur les oligodendrocytes, le récepteur de la Sema3A est composé de 2 sous unités, NRP-1 et Plex-A1. En empêchant soit la fixation de la Sema3A sur NRP-1 soit la transduction du signal par Plex-A1, il est possible de prévenir les effets sur la morphologie cellulaire. L'intégrité de chacune des sous unité du récepteur est donc indispensable au déclenchement de la signalisation induite par la Sema3A.

## **2. Sema3A et signalisation pH**

### **2.1. Contrôle du développement morphologique par le pH<sub>i</sub>**

L'addition de 100 ng/ml de Sema3A induit une acidification intracellulaire transitoire avec la valeur de pH<sub>i</sub> la plus basse observée entre 25 et 35 minutes après l'application (fig 23A). Une valeur moyenne de pH<sub>i</sub> de **6,73 ± 0,022** (n=28) mesurée au pic de l'acidification a été déterminée. Cette valeur de pH<sub>i</sub> après addition de Sema3A est



**Figure 24.** L'effet inhibiteur de la Sema3A sur l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires est bloqué lorsque l'on empêche l'acidification intracellulaire

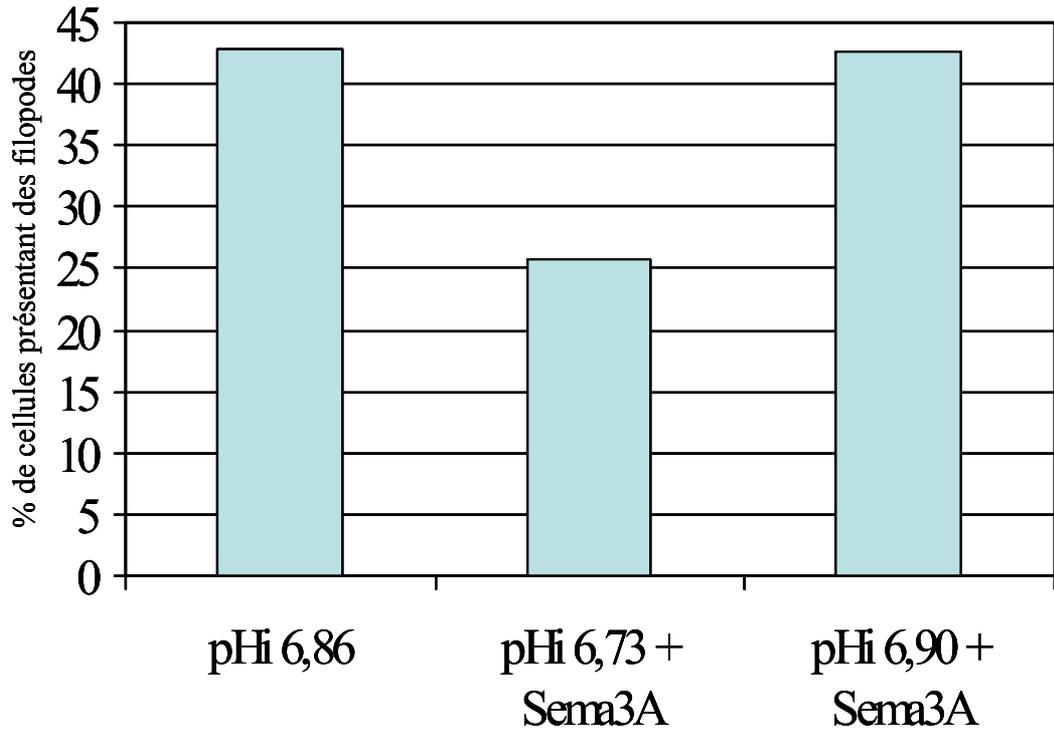
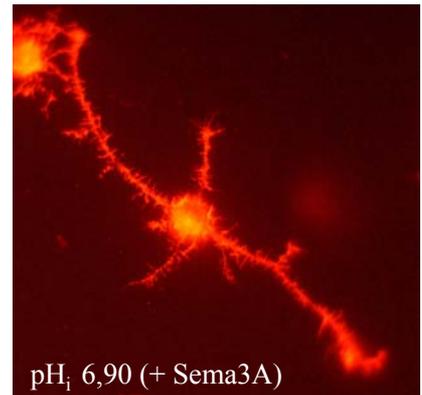
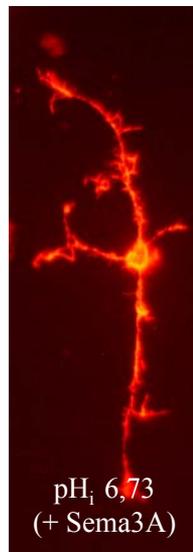
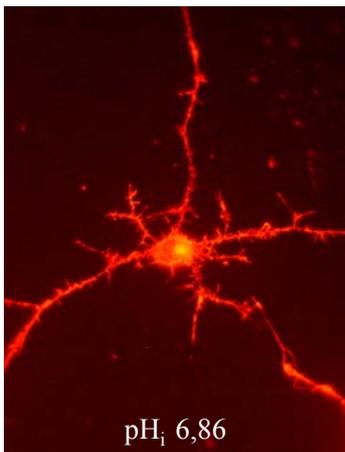
## Résultats

significativement différente de  $6,86 \pm 0,038$  (n=15) dans les conditions contrôle (p = 0,037) (fig 23B). Cette acidification est suivie d'un retour du  $\text{pH}_i$  proche de sa valeur initiale au bout de 60 minutes. Nous avons vu que des changements de  $\text{pH}_i$  modulent la différenciation des OLP. Cette différenciation cellulaire est entre autres caractérisée par l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires qui, comme nous l'avons vu, se traduit par une complexification morphologique. Nous avons donc recherché le rôle potentiel de cette signalisation  $\text{pH}_i$  en réponse à la Sema3A.

Afin de déterminer le rôle de cette acidification transitoire induite par Sema3A, des manipulations expérimentales du  $\text{pH}_i$  ont été pratiquées. Dans le but de prévenir l'acidification, les cellules ont été cultivées dans un milieu à pH 7,75. Dans ces conditions, en présence de Sema3A le  $\text{pH}_i$  des cellules est de  $6,90 \pm 0,032$  (n=34), valeur comparable à celle du contrôle (p = 0,104) (fig 24). Les cellules ont une dimension fractale moyenne de  $1,295 \pm 0,12$  (n=71) (**115% du contrôle**) (fig 24) et il n'y a pas de différence significative (p>0,05) avec la situation contrôle. Ces résultats démontrent que le  $\text{pH}_i$  contrôle l'élaboration morphologique des OLP et représente un maillon de la signalisation intracellulaire induite par Sema3A.

### ***2.2. Effets de la Sema3A sur le cytosquelette***

Les molécules de guidage et notamment celles de la famille des sémaphorines contrôlent l'élaboration du cytosquelette d'actine. Cette signalisation met en jeu des petites protéines de la famille Rho telle que Rac1, RhoA et Cdc42 dont l'activité va finalement réguler l'élaboration des filaments d'actine (Liu et Strittmatter, 2001; Nikolic, 2002). Nous avons effectué un marquage du réseau d'actine à la phalloïdine couplée à la rhodamine dans les conditions suivantes : sans Sema3A ( $\text{pH}_e$  7,40 et  **$\text{pH}_i$  6,86**), avec Sema3A ( $\text{pH}_e$  7,40 et  **$\text{pH}_i$  6,73**) et avec Sema3A ( $\text{pH}_e$  7,75 et  **$\text{pH}_i$  6,90**). Les cellules ont été fixées après 6 heures de traitement. Un tel marquage permet de mettre en évidence trois différentes structures : les lamellipodes, les filopodes et les fibres de stress. Les fibres de stress qui se situent dans les corps cellulaires sont difficilement observables sur les OLP qui présentent un petit corps cellulaire. Concernant la formation des lamellipodes en fonction des différentes conditions de culture, aucun changement n'a été observé. Par contre, l'application de 100 ng/ml de Sema3A induit une baisse très importante du nombre de cellules présentant des filopodes (fig 25). Dans les conditions contrôles (sans Sema3A,  $\text{pH}_e$  7,40,  $\text{pH}_i$  6,86), 42,85% (n=63) des cellules présentent des filopodes (fig 25). En présence de Sema3A ( $\text{pH}_e$  7,40,  $\text{pH}_i$  6,73), seulement 25,67% (n=74) des cellules présentent des

**A****B**

**Figure 25.** (A) Il existe une relation entre le pH<sub>i</sub> et le nombre de cellules présentant des filopodes. La Sema3A qui diminue le pH<sub>i</sub> induit aussi une inhibition de l'élaboration des filopodes. En empêchant l'acidification induite par Sema3A, celle-ci n'a plus aucun effet sur les filopodes. (B) Exemple de cellules dans les différentes conditions avec ou sans Sema3A et marquées à la phalloïdine rhodamine. En présence de Sema3A certaines cellules présentent encore de rares filopodes.

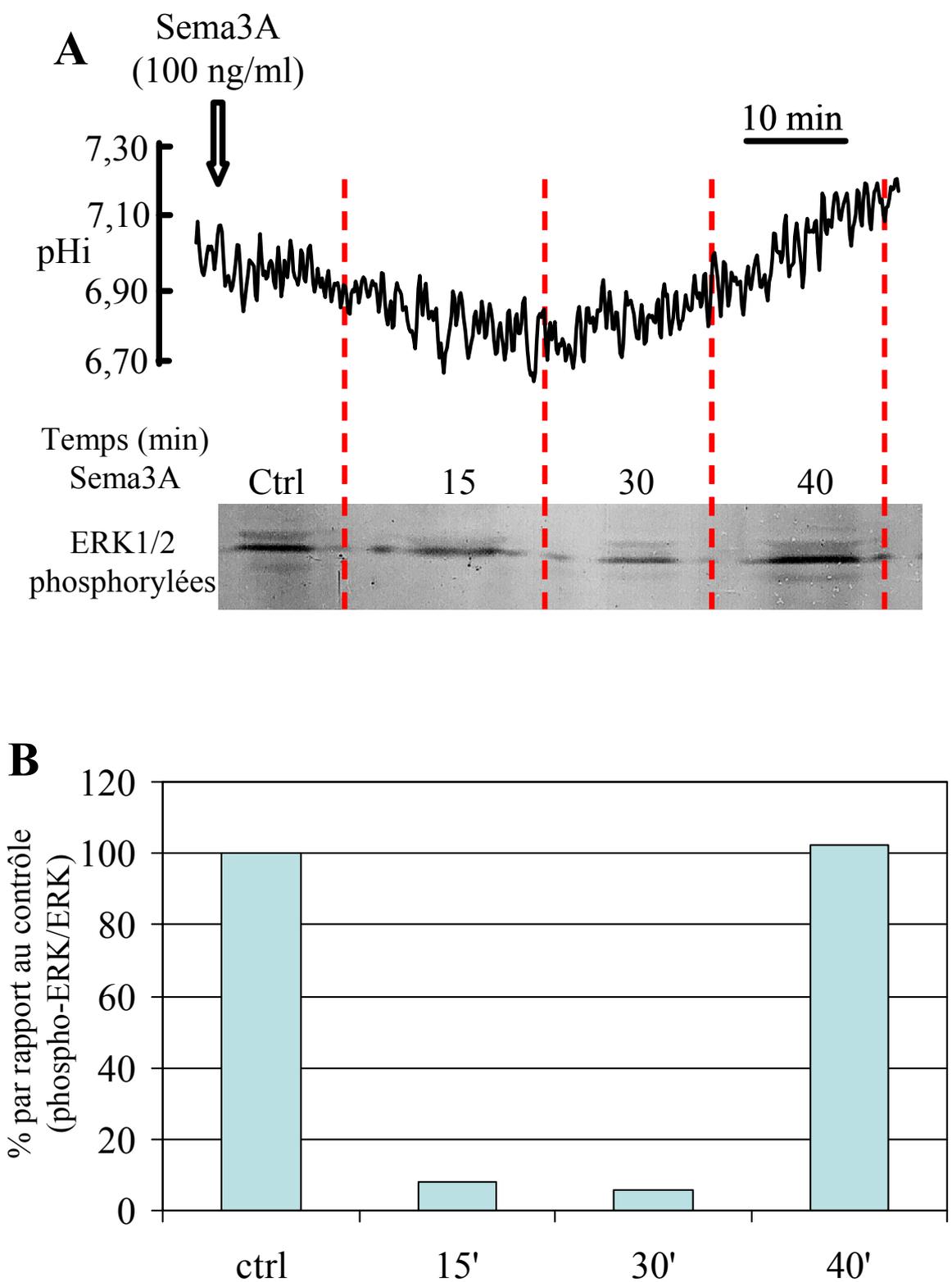
## Résultats

filopodes (fig 25). Lorsque Sema3A est appliquée dans des conditions expérimentales permettant d'empêcher l'acidification intracellulaire de se produire ( $pH_e$  7,75,  $pH_i$  6,90), le taux de cellules présentant des filopodes remonte à 42,64% (n=68), valeur qui n'est pas significativement différente de celle mesurée dans les conditions contrôles (fig 25). Il est donc possible, en contrôlant la valeur de  $pH_i$ , de réguler le cytosquelette d'actine.

Concernant cette partie du travail, nos résultats mettent en évidence pour la première fois sur les oligodendrocytes : 1) que le contrôle de la croissance des prolongements par la Sema3A nécessite le recrutement de la plexine-A1 et 2) que des changements de  $pH_i$  participent à la signalisation intracellulaire en réponse à la Sema3A.

### ***2.3. La Sema3A et les voies de signalisation intracellulaires***

Des expériences réalisées au laboratoire sur des précurseurs neuronaux ont montré que les effets inhibiteurs de croissance de la Sema3A passent par une modulation des voies de signalisation des MAPK ERK1/2 (D. Bagnard, communication personnelle). L'application de Sema3A sur des OLP induit une diminution de l'état de phosphorylation de ERK1/2 (P-ERK1/2) (fig 26A). Il est à noter que cette diminution de P-ERK est concomitante de l'acidification intracellulaire induite par Sema3A. En effet, la diminution très importante de la quantité de P-ERK1/2 a lieu dès le début de l'application de Sema3A et jusqu'à 30 minutes, c'est à ce moment que le  $pH_i$  est le plus bas. Après 30 minutes la quantité de P-ERK1/2 augmente constamment, de manière concomitante à celle de  $pH_i$  (fig 26A). Il existe des similitudes entre les cinétiques de variations de  $pH_i$  et l'état de phosphorylation de ERK1/2, suggérant l'existence d'un lien étroit entre ces deux voies. Le western blot et sa quantification (fig 26B) présentés dans cette partie sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. L'addition de Sema3A entraîne à 15 et 30 minutes une importante diminution de P-ERK1/2, respectivement 83 et 85% d'inhibition par rapport au contrôle (fig 26B). A 40 minutes le taux de P-ERK1/2 est à nouveau identique à celui du contrôle (fig 26B). Des expériences complémentaires devront être menées pour démontrer définitivement le lien entre les variations de  $pH_i$  induites par la Sema3A et l'activité de ERK1/2.



**Figure 26.** (A) La quantité de ERK1/2 phosphorylées varie de manière concomitante aux changements de  $pH_i$ . (B) La Sema3A induit entre 15 et 30 minutes une diminution très importante de la forme active de ERK1/2. Le western-blot et sa quantification représentés ci-dessus sont représentatifs de 3 expériences différentes.

### ***A. L'AR induit la différenciation par une voie dépendante du $pH_i$***

En culture primaire, l'addition d'1  $\mu\text{M}$  d'AR induit la différenciation des OLP. Nous observons un doublement du taux de cellules différenciées, passant de **23,23%** à **43,48%** (cellules Gal-C<sup>+</sup>). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par le groupe de M. Raff (Tokumoto et al., 1999) sur les OLP du nerf optique. Dans leurs conditions expérimentales, après addition de 0,5  $\mu\text{M}$  d'AR, ils enregistrent une augmentation de 6 fois du taux de cellules différenciées passant de 5% à 30% (cellules Gal-C<sup>+</sup>). Ces résultats suggèrent que l'effet pro-différenciant de l'AR sur les OLP du nerf optique est plus important que sur ceux du cervelet. Cependant il est à noter que dans nos conditions expérimentales, l'AR est appliqué durant 3 jours alors que Tokumoto et al. analysent les effets après 5 jours. De ce fait, 2 jours supplémentaires en présence d'AR permettent vraisemblablement à un plus grand nombre de cellules de se différencier. D'autre part, il faut prendre garde à comparer des résultats obtenus à partir de cellules qui peuvent ne pas présenter les mêmes propriétés physiologiques, car issues de régions différentes du système nerveux. Ceci est renforcé par l'existence, *in vivo*, dès les stades les plus précoces du développement, de deux 2 populations cellulaires différentes capables de générer des oligodendrocytes (Spassky et al., 1998; Spassky et al., 2001).

La détermination préalable des effets de l'AR, dans nos conditions de culture, était rendue d'autant plus nécessaire que certains travaux avaient mis en évidence une inhibition de la différenciation par l'AR (Laeng et al., 1994; Noll et Miller, 1994). Les travaux de Laeng et al. ont été effectués sur des OLP purs issus des hémisphères cérébraux de rats. Dans leurs conditions, l'application de 8  $\mu\text{M}$  d'AR bloque la différenciation des précurseurs. Plusieurs différences majeures entre nos conditions expérimentales et celles de Laeng et al. peuvent expliquer des effets diamétralement opposés. L'origine des cellules (hémisphères cérébraux vs cervelet), que nous avons déjà discuté précédemment. Mais surtout dans ce cas, la concentration d'AR utilisée (8 $\mu\text{M}$ ). Il a en effet été démontré qu'à des doses pharmacologiques d'AR comprises entre 10 et 50  $\mu\text{M}$ , on observe une inhibition de la PKC $\alpha$ . A ces concentrations, l'AR empêche la fixation de la phosphatidylsérine sur le domaine catalytique C2 de la PKC $\alpha$  et bloque son activation (Radomska-Pandya et al., 2000). Or sur les oligodendrocytes, l'activation de la PKC $\alpha$  est nécessaire à l'induction de la différenciation morphologique des oligodendrocytes (Yong et al., 1994). Une telle inhibition de la PKC $\alpha$  pourrait être envisagée en présence de 8  $\mu\text{M}$  d'AR.

## Discussion

Les travaux de Noll et al. ont quant à eux été réalisés à partir de moelle épinière d'embryons de rats E14, au moment où apparaissent les premières cellules PDGFR<sup>+</sup> et donc les premiers OLP. Il est concevable qu'à ce stade de développement précoce, les voies de signalisation impliquées en réponse à l'AR soient différentes et ne permettent pas l'induction de la différenciation cellulaire.

Sur les OLP une augmentation de pH<sub>i</sub> de **6,88** à **7,13** est observée en réponse à l'application d'1 μM d'AR. Cette alcalinisation est observée en présence et en absence de bicarbonate dans le milieu. De ce fait, il n'y a que l'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> qui puisse induire une alcalinisation, en l'absence de bicarbonate dans le milieu. Une augmentation de pH<sub>i</sub> suite à l'application d'AR est un phénomène déjà décrit sur les cellules HL60 et les mécanismes responsables d'une telle variation résultent d'une activation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Ladoux et al., 1987; Ladoux et al., 1988a; Ladoux et al., 1988b). Pour tester le rôle de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> sur les OLP, nous avons, dans un premier temps en absence de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, éliminé le Na<sup>+</sup> extracellulaire. Dans ces conditions, le gradient de Na<sup>+</sup> ne permet plus la sortie de protons par l'échangeur. Nous enregistrons alors une inhibition de l'alcalinisation induite par l'AR. L'application d'amiloride, un inhibiteur spécifique de l'échangeur, bloque aussi l'alcalinisation. L'ensemble de ces résultats démontrent que l'AR induit une augmentation de pH<sub>i</sub> en stimulant l'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Une activation de cet échangeur en réponse à de nombreux facteurs a pu être décrite sur divers types cellulaires. L'addition de PDGF ou de sérum sur les cellules NR6 (lignée de fibroblastes) induit une alcalinisation intracellulaire de 0,10 unité pH (Cassel et al., 1983). Sur des cellules folliculaires, l'EGF induit une augmentation de 0,25 à 0,30 unité pH (Li et al., 1991). Le pH<sub>i</sub> de cellules FRTL-5 (lignée cellulaires de la thyroïde de rat) augmente de 7,26 à 7,89 en présence d'insuline suite à l'activation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Wood et al., 1992).

La stimulation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> est dépendante de très nombreuses voies, la PKC, la Ca<sup>2+</sup>-calmoduline, la RhoA, les MAPK ERK1/2 (Bertrand et al., 1994; Dhanasekaran et al., 1994; Takahashi et al., 1999). Ces différentes voies induisent un changement d'activité par la modulation du site régulateur intracellulaire sensible à la concentration de protons (Soltoff et Cantley, 1988). La quantification de l'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, en fonction du pH<sub>i</sub>, fait apparaître un décalage de sa courbe d'activité vers des valeurs de pH<sub>i</sub> plus élevées après addition d'AR. Au repos, dans l'exemple illustré sur la figure 14B, l'échangeur est dans un état inactif à partir d'un pH<sub>i</sub> de 6.76 et l'addition

d'AR permet d'enregistrer une activité pour des valeurs plus importantes allant jusqu'à un  $\text{pH}_i$  7,17. Ces résultats démontrent que l'activation de l'échangeur résulte d'une augmentation de l'affinité du site régulateur envers les protons intracellulaires.

Il serait intéressant de pouvoir déterminer sur les OLP quelles sont les voies et les mécanismes impliqués dans l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en réponse à l'AR. Sur plusieurs lignées cellulaires tumorales, l'AR induit une augmentation de l'expression de l'isoforme  $\alpha$  de la PKC, qui peut être impliquée dans le contrôle de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Kindregan et al., 1994; Khuri et al., 1996). L'induction de l'expression est due à l'activation du promoteur du gène de la PKC par la fixation d'un hétérodimère de RAR-RXR (Desai et al., 1999). D'autre part, toutes les isoformes de PKC possèdent un site de liaison à l'AR (Radomska-Pandya et al., 2000). De ce fait, il est possible que l'AR puisse directement activer certaines isoformes de la PKC qui à leur tour pourraient activer l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Une autre voie d'activation de l'échangeur pourrait être celle des MAPK. L'équipe de J. Pouyssegur a démontré sur une lignée de fibroblastes que l'inhibition des MAPK ERK1/2 induit une diminution de 50 à 60 % de l'activité de l'échangeur normalement enregistrée en réponse à divers facteurs. Cette étude démontre de manière intéressante que les MAPK ERK1/2, dans ce cas, ne sont qu'en partie responsable de l'activation de l'échangeur (Bianchini et al., 1997). De ce fait, l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sur les OLP en réponse à l'AR pourrait nécessiter d'autres voies intracellulaires. Dans ce contexte, une série d'expériences préliminaires sur les OLP (non détaillées dans le présent manuscrit) montre que l'inhibition des PKC par la staurosporine diminue de moitié l'alcalinisation normalement observée en présence d'AR. Cet effet résiduel, persistant à la staurosporine, suggère qu'une partie au moins du signal pourrait mettre en jeu les PKC et que la convergence de plusieurs voies peut être nécessaire à l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

### ***B. Le $\text{pH}_i$ contrôle la différenciation des OLP***

L'analyse du rôle du pH est rendue possible par l'utilisation de manipulations expérimentales du  $\text{pH}_i$  lors de l'induction de la différenciation des OLP par l'AR. De cette façon, nous avons pu montrer qu'une inhibition de l'alcalinisation intracellulaire induite par l'AR empêche la différenciation des OLP qui passe alors de **43,48 %** à **23,43 %** (à  $\text{pH}_e$  7,00). Dans ces deux conditions, pour des valeurs de  $\text{pH}_i$  très proches, **6,88** (contrôle) et **6,84** ( $\text{pH}_e = 7,00 + \text{AR}$ ), les taux de différenciation, respectifs **23,23%** et **23,43%**, ne sont

## Discussion

pas statistiquement différents. Ces résultats démontrent qu'une augmentation de  $pH_i$  est indispensable pour permettre la différenciation des OLP en réponse à l'AR. Alors que des changements de  $pH_i$  ont souvent été observés suite à l'application d'AR, il s'agit là de la première démonstration directe du rôle de cette voie de signalisation dans la différenciation cellulaire.

En imposant une alcalinisation intracellulaire du même ordre que celle observée en présence d'AR, les OLP sont induits à se différencier. Dans ce cas pour des conditions différentes, présence ou absence d'AR mais pour un  $pH_i$  comparable, les taux de différenciation sont identiques. En augmentant expérimentalement la valeur de  $pH_i$  il est donc possible d'induire la différenciation des OLP dans les mêmes proportions que l'AR qui est un des plus puissants agents différenciant connus. En utilisant plusieurs autres valeurs de  $pH_i$  nous avons pu observer une relation stricte entre le taux de différenciation et le  $pH_i$ , avec un maximum de cellules différenciées pour un  $pH_i$  de **7,15** (fig 18). Des variations très faibles de  $pH_i$  d'un côté ou de l'autre de ce maximum entraînent une diminution du taux de différenciation. Par exemple, en passant de  $pH_i$  7,15 à 7,22 qui représente un changement de 0,07 unité pH, correspondant à une variation de la concentration en protons de **11nM**, on observe une diminution de 20% du nombre de cellules différenciées. De très faibles variations de  $pH_i$  peuvent avoir des conséquences très importantes sur la physiologie des OLP. Cette étroite dépendance entre le  $pH_i$  et la physiologie des OLP explique certainement pourquoi cette grandeur physiologique est hautement régulée, et ce par de nombreux mécanismes. Ces mécanismes sont simples, peu coûteux en énergie et sont exprimés par toutes les cellules et permettent une sensibilité à de multiples facteurs contrôlant la physiologie cellulaire. Cette grande sensibilité et la haute régulation de ce système pH en font une voie de signalisation intracellulaire idéale impliquée dans le contrôle de différents processus physiologiques. En effet, des variations de  $pH_i$  en réponse au PDGF sur des cellules embryonnaires d'hamster syrien (SHE) ont pu être rapportées. Sur ces cellules, le PDGF stimule la prolifération et induit une acidification intracellulaire d'environ 0,1 unité pH. Le passage des cellules dans un milieu plus alcalin lors de l'addition du PDGF permet d'inhiber l'acidification intracellulaire et la prolifération qui s'en suit (Isfort et al., 1995). L'ensemble de ces résultats met en évidence la puissance de cette voie de signalisation dans le contrôle de grandes étapes de la physiologie cellulaire.

Ces observations amènent au concept d'un pH optimal, pouvant être différent d'un type cellulaire à l'autre, et permettant l'induction d'une réponse physiologique. Dans cette

## Discussion

optique, des travaux réalisés sur des fibroblastes (Chambard et Pouysségur, 1986) et sur des astrocytes (Pappas et al., 1994) mettent aussi en évidence cette relation. Sur les fibroblastes, le contrôle de la prolifération par le  $pH_i$  est un système tout ou rien. Entre  $pH_i$  6,60 et 7,10, aucune prolifération n'est observée alors qu'en passant de 7,10 à 7,30 ( $\Delta[H^+] = 29 \text{ nM}$ ) on induit une prolifération maximale. L'effet de  $pH_i$  sur la prolifération des astrocytes est plus comparable à celui observé sur la différenciation des OLP. Il existe une valeur optimale de  $pH_i$  permettant le maximum de prolifération.

L'arrêt préalable de la prolifération est nécessaire au déclenchement de la différenciation cellulaire. Pour cela, l'activité de protéines, comme les inhibiteurs de CDK (CKI), est très importante dans le contrôle du cycle cellulaire. C'est le cas des CKI  $p21^{cip}$  (p21) et  $p27^{kip}$  (p27) qui permettent l'arrêt de la prolifération et le début de la différenciation des OLP (Ghiani et al., 1999a). Sur les OLP, l'AR induit l'accumulation de p21 et de p27 par l'intermédiaire d'une voie mettant en jeu les protéines de la famille p53 (suppresseur de tumeurs) (Tokumoto et al., 2001). Or des études réalisées sur des glioblastomes humains ont démontré que l'activation de p53 est dépendante du pH (Ohtsubo et al., 1997). De ce fait, l'alcalinisation intracellulaire induite en réponse à l'application d'AR ou mimée de manière expérimentale pourrait permettre le contrôle du cycle cellulaire par l'intermédiaire des CKI p21 et p27. D'autre part, une série de publications du groupe de V. Gallo a permis de montrer un rôle des canaux potassiques dans la régulation des voies de signalisation impliquant p21 et p27. Le glutamate, suite au blocage des canaux potassiques, inhibe la prolifération et la différenciation des OLP (Gallo et al., 1996). Ce blocage induit une cascade intracellulaire conduisant à l'accumulation de p21 et p27 et à l'arrêt du cycle cellulaire des OLP (Ghiani et al., 1999a). Il existe de nombreuses études démontrant que les canaux potassiques sont très sensibles aux changements de pH et notamment les sous unités Kv1 (Padanilam et al., 2002) et Kir4.1 (Xu et al., 2000; Pessia et al., 2001) dont le rôle est très important durant le développement des oligodendrocytes (Neusch et al., 2001; Chittajallu et al., 2002). Il est donc possible que des variations de pH intracellulaire puissent également moduler le cycle cellulaire et la différenciation des OLP en modifiant l'activité de certains des canaux potassiques qui permettent le contrôle du cycle cellulaire.

Très récemment, le groupe de D. Barber a publié un travail sur le rôle du  $pH_i$  lors de la prolifération cellulaire. Leurs travaux sont réalisés sur des lignées de fibroblastes exprimant soit l'échangeur NHE1 natif soit une forme tronquée ne pouvant transporter les ions. Une augmentation spontanée du  $pH_i$ , en phase S, avant l'entrée des cellules en phase

## Discussion

G2/M du cycle cellulaire est enregistrée. Cette augmentation de  $pH_i$  de 7,33 à 7,48 est due à la stimulation de l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$ . Sur les cellules exprimant la forme tronquée de l'échangeur une augmentation plus faible du  $pH_i$  (de 7,10 à 7,27) est enregistrée. L'inhibition de l'alcalinisation intracellulaire bloque le passage des cellules en phase G2/M et donc la prolifération. Le passage de la phase S à la phase G2/M est sous le contrôle de l'expression de la cycline B1 et de l'activité de la kinase Cdc2. Leur expression et leur activité accrue permet le passage en phase G2/M. Sur les cellules, exprimant la forme non fonctionnelle de l'échangeur, l'expression de la cycline B1 et l'activité de la kinase Cdc2 sont diminuées. De plus, l'expression de la kinase Wee1, sur ces cellules, est largement augmentée et permet l'inhibition de l'activité de Cdc2. De ce fait, en bloquant l'alcalinisation observée durant la phase S, le passage des cellules en phase G2/M est impossible. Au contraire, en mimant l'alcalinisation intracellulaire, en l'absence de l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$ , l'expression de la cycline B1 et l'activité de Cdc2 sont restaurées, permettant ainsi le passage des cellules en phase S (Putney et Barber, 2003). Ces résultats démontrent que des variations de  $pH_i$  peuvent jouer sur l'expression et l'activité des protéines du cycle cellulaire. Il serait donc intéressant d'analyser, à différents  $pH_i$ , l'activité des protéines du cycle cellulaire p27<sup>Kip</sup>, cdk2 et -5 dont nous savons qu'elles sont impliquées dans le contrôle de la différenciation des OLP.

### ***C. Le $pH_i$ contrôle l'activité des voies de signalisation***

#### *Voie des MAPK*

L'étude des effets du  $pH_i$  sur la voie ERK1/2 a été réalisée à partir de cultures pures d'OLP. Dans ces conditions, une alcalinisation du milieu de pH 7,40 à 7,75 induit une augmentation du taux de cellules différenciées, passant de **49,42%** à **83,90%**. Ces valeurs sont différentes de celles obtenues sur les cultures primaires (**23,23%** pour un  $pH_e$  de 7,40 contre **41,20%** à  $pH_e$  7,75). Ces résultats démontrent que la sensibilité des OLP en cultures secondaires envers le pH n'est pas la même qu'un cultures primaires mais qu'elle existe. Il serait donc intéressant de déterminer sur des cultures pures d'OLP si les mécanismes de régulation du  $pH_i$  sont les mêmes que pour des cultures primaires. Une telle étude permettrait aussi d'établir quelle est la relation qui existe pour ces cellules entre  $pH_i$  et  $pH_e$ . Cette analyse permettrait d'apporter une explication concernant la sensibilité différente des cellules en cultures mixtes ou pures envers le pH. Néanmoins, même sur des cultures d'OLP pures une dépendance existe entre pH et différenciation.

## Discussion

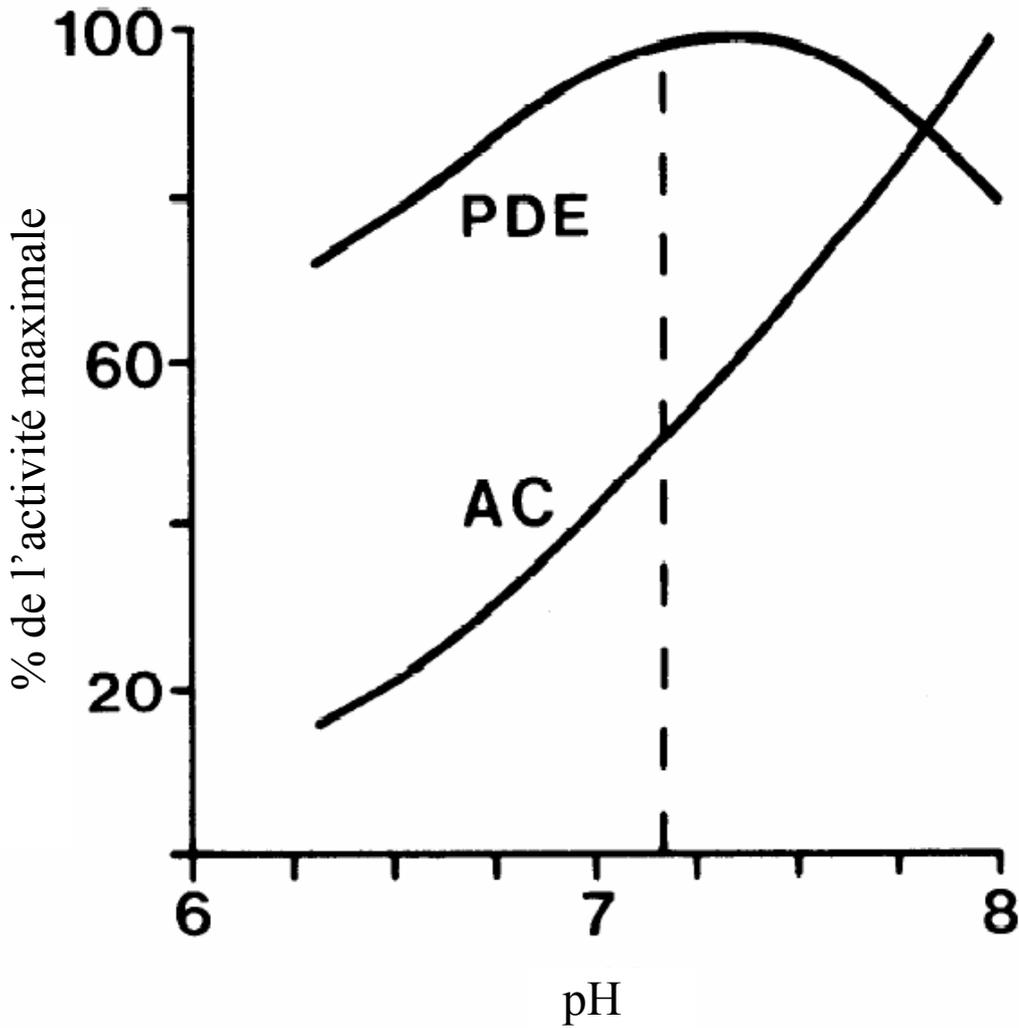
Nous avons démontré que des variations de  $\text{pH}_i$  contrôlent la différenciation des OLP. Il est donc d'un grand intérêt d'affiner cette analyse et de déterminer quelles sont les cibles intracellulaires sensibles à ces variations. Potentiellement, de très nombreuses molécules peuvent être la cible de changements de  $\text{pH}_i$ . Les protéines et les lipides peuvent être titrés et ainsi faire l'objet de changements de conformation et de modification d'activité. Il existe des résultats démontrant un rôle de  $\text{pH}_i$  dans le contrôle de l'expression et de l'activité de protéines impliquées dans la régulation des voies de signalisation intracellulaires telles que les MAPK, l'AMPc et la PKC, toutes trois impliquées dans le développement des OLP. Notre analyse s'est portée sur la voie des MAPK et plus particulièrement sur ERK1/2. Les travaux de Stariha et al. ont mis en évidence qu'une activation de la voie ERK1/2 est indispensable pour permettre la différenciation des OLP et induire la croissance des prolongements oligodendrocytaires (Stariha et al., 1997; Stariha et Kim, 2001a, b). L'activation de la voie ERK1/2 permet, non seulement le déclenchement d'un programme génétique propre autorisant la différenciation, mais aussi la différenciation morphologique et fonctionnelle (phosphorylation de substrats tels que la MBP). En produisant une alcalinisation intracellulaire de 0,25 unité pH, il est possible d'induire une activation de ERK1/2 de l'ordre de 300%. Une simple variation de la quantité de  $\text{H}^+$  intracellulaire de **57 nM** permet d'activer une des voies majeures permettant le contrôle de la différenciation des OLP. Sur certains autres types cellulaires, un tel effet a aussi pu être établi. Il est en effet démontré, sur les cellules HL60 que l'AR, qui induit une alcalinisation intracellulaire de 0,34 unité pH, stimule aussi l'activation de ERK2. De plus, ces travaux ont mis en évidence que l'activation de ERK2 est nécessaire pour permettre l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'initiation de la différenciation (Yen et al., 1998; Hong et al., 2001). De la même manière, la vitamine D3, un autre inducteur de la différenciation cellulaire, induit aussi une alcalinisation intracellulaire de 0,13 unité pH (Hazav et al., 1989). La différenciation des cellules HL60, en présence de vitamine D3, s'accompagne aussi d'une activation de ERK1/2 (Wang et Studzinski, 2001). Hazav et al. ont aussi démontré que la différenciation des cellules HL60 est dépendante du  $\text{pH}_i$ . En effet, en imposant une alcalinisation intracellulaire, la différenciation de ces cellules est stimulée (Hazav et al., 1989). Nos résultats démontrent qu'un changement de  $\text{pH}_i$  peut moduler l'activation de la voie de signalisation impliquant les MAPK. C'est ainsi qu'une alcalinisation intracellulaire, promotrice de la différenciation des OLP, induit aussi l'activation de ERK1/2. Un résultat semblable au notre a été observé avec les cellules U937. L'induction par l'AR de la différenciation de ces cellules s'accompagne d'une

## Discussion

alcalinisation de 0,20 unité pH (Ladoux et al., 1988b). Sur ces mêmes cellules, une alcalinisation ( $\Delta\text{pH}_i = 0,40$ ), entraîne une importante activation des MAPK telles que les SAPK/JNK et p38 (Shrode et al., 1997). Ces résultats suggèrent que sur ces cellules, l'AR pourrait contrôler l'activité des MAPK par l'intermédiaire d'une voie dépendante du  $\text{pH}_i$ .

Les mécanismes d'action du  $\text{pH}_i$  permettant le contrôle de l'activité des MAPK commencent à être étudiés. Les MAPK pour être actives doivent être phosphorylées sur deux acides aminés, la thréonine 188 et la tyrosine 190 situés au niveau du segment d'activation (Tokmakov et al., 2000). La phosphorylation de ces résidus se fait par les MEK ou par autophosphorylation, phénomène beaucoup plus lent. Sous sa forme non phosphorylée, le segment d'activation bloque l'activité du site catalytique. Des expériences ont été menées sur des MAPK purifiées de xénopes et ont démontré que pour des pH de 5,50 à 6,00 il apparaît une importante autophosphorylation des MAPK (Tokmakov et al., 2000). Contrairement à ce qui est attendu, cette autophosphorylation n'est pas suivie d'une augmentation très importante de l'activité de la kinase. De plus, dans ces conditions de pH il est impossible d'activer les MAPK par les MEK. Au contraire, pour un pH de 8,00 très peu d'autophosphorylation est observable mais il apparaît une importante activité des MAPK pouvant alors phosphoryler différents substrats cellulaires (Tokmakov et al., 2000). Une autre conséquence des changements de pH est la diminution de moitié de l'affinité des MAPK pour l'ATP à pH 5,50 par rapport à pH 8,00 (Tokmakov et al., 2000). De ce fait, le  $\text{pH}_i$  module l'état d'activation et l'activité des MAPK et peut donc contrôler une des voies de signalisation intracellulaires majeure. Un tel mécanisme peut être à l'origine des effets observés sur la différenciation des OLP en fonction de  $\text{pH}_i$ . En effet nous observons sur les OLP une augmentation de la forme active de ERK1/2 pour des valeurs alcalines de  $\text{pH}_i$ .

Il n'existe pas de schéma général décrivant l'activation de ces voies par le pH mais chaque type cellulaire possède sa propre sensibilité envers le pH. Les changements de  $\text{pH}_i$  que nous effectuons concernent l'ensemble du cytoplasme, ce qui rend très difficile l'identification de la ou des cibles. D'autre part il serait très intéressant d'étudier de manière plus fine les voies impliquées dans l'activation de ERK1/2 et qui peuvent être dépendantes du  $\text{pH}_i$ . Parmi ces voies nous retrouvons la PKC qui peut induire l'activation de ERK1/2 par l'intermédiaire de Raf puis de la MEK. Les PKC comme nous l'avons déjà vu jouent un rôle important lors du développement des OLP mais elles peuvent aussi voir leur activité modulée en fonction des conditions de  $\text{pH}_i$ . Le schéma général d'activation



*D'après Busa W.B. et Nuccitelli R. (1984). Am. J. Physiol. 246: R409-R438.*

**Figure 27.** Courbes d'activité de l'adénylate cyclase (AC) et de la nucléotide cyclique phosphodiesterase (PDE) qui respectivement synthétise et dégrade l'AMPc. Ces deux enzymes sont issues du foie de rat et leurs activités sont déterminées *in vitro*.

## Discussion

des PKC est le recrutement de la forme soluble dans la membrane cellulaire où elle est alors activée par différents mécanismes (certains nécessitent du  $\text{Ca}^{2+}$ , et/ou du diacylglycérol, d'autres non). Sur des pinéaloctes de rats, l'application d'une base faible induit une alcalinisation intracellulaire (de 7,10 à 7,17). A la suite de cette alcalinisation, les PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  sont transloquées du cytoplasme à la membrane plasmique, permettant ainsi leur activation. Si cette alcalinisation est inhibée en présence d'un acide faible, les PKC ne sont plus transloquées au niveau membranaire et ne sont donc plus activées (Ho et Chik, 1994; Ho et al., 2000). Sur ces mêmes cellules, l'application de noradrénaline induit une augmentation de  $\text{pH}_i$  de 7,10 à 7,15. Si cette alcalinisation est inhibée, les PKC  $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  ne seront pas activées (Ho et al., 2000). Dans le cadre d'une étude des facteurs pouvant induire des changements de  $\text{pH}_i$  nous avons pu mettre en évidence que la noradrénaline qui stimule la différenciation des OLP (Ghiani et al., 1999a), induit aussi sur ces cellules une augmentation de  $\text{pH}_i$  de **6,88 à 7,07** par l'intermédiaire des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (résultats personnels non détaillés dans ce manuscrit). De ce fait, il est fort possible que la noradrénaline, active aussi dans les OLP différentes isoenzymes de la PKC et ce de manière dépendante du  $\text{pH}_i$ . Ce mécanisme pourrait être impliqué lors de l'activation de la voie de ERK1/2 en réponse à une alcalinisation.

### *Voie de l'AMPC*

Une autre voie importante dans le contrôle de la différenciation des OLP est celle de l'AMPC. Le taux d'AMPC cellulaire peut être régulé soit au niveau de sa synthèse par l'adénylate cyclase (AC) soit au niveau de sa dégradation par la nucléotide cyclique phosphodiesterase (PDE). Des études enzymatiques ont permis d'établir les profils d'activité de ces deux enzymes issues de foie de rat, en fonction du pH (fig 27). Autour de pH 7,20, qui est le pH physiologique des cellules du foie, la PDE est au maximum de son activité et de faibles changements de pH ne vont pas beaucoup moduler son activité. L'AC possède, quant à elle, une sensibilité beaucoup plus importante vis-à-vis du pH, et de très faibles variations vont changer de manière très importante son activité. Une variation de pH 7,00 à pH 6,80 induit une diminution de moitié son activité (Roos et Boron, 1981). Des mesures du niveau d'AMPC ont été réalisées sur des foies de rats en alcalose ou en acidose. Si le rat est en alcalose, comme le prédisent les courbes d'activité, le taux d'AMPC est très élevé. Au contraire le taux d'AMPC d'un rat en acidose est beaucoup plus faible (Yajima et Ui, 1975). La stimulation des adipocytes de rats par la noradrénaline conduit à la lipolyse et induit la synthèse d'AMPC qui peut soit être inhibée en diminuant le pH ou

alors stimulée en augmentant le  $\text{pH}_i$  (Hjemdahl et Fredholm, 1977). Il en est de même sur des pinéaloctes de rats après application d'isoprotérénol (agoniste  $\beta$ -adénergique). L'isoprotérénol induit la synthèse d'AMPc, cette synthèse peut être augmentée en ajoutant une base faible (alcalinisation intracellulaire) ou alors inhibée par l'addition d'un acide faible (acidification intracellulaire) (Ho et al., 1992).

Ces quelques exemples ne sont pas exhaustifs, il existe très probablement d'autres voies, d'autres mécanismes ainsi que d'autres fonctions physiologiques régulées par le  $\text{pH}_i$ . Nous discuterons ci-dessous un dernier exemple impliquant la régulation du cytosquelette.

### ***D. $\text{pH}_i$ et contrôle du cytosquelette***

Sur des cultures pures d'OLP, l'addition de 100 ng/ml de Sema3A a pour effet d'induire une dépolymérisation massive et transitoire du cytosquelette d'actine, le collapsus, induisant la rétraction des prolongements. Cet effet se traduit sur les OLP par la diminution de 33 % de la complexité morphologique. Les travaux de Ricard et al. et de Cohen et al. ont permis de montrer que les OLP expriment de manière fonctionnelle NRP-1, permettant ainsi la liaison de la Sema3A (Ricard et al., 2001; Cohen et al., 2003). Nous avons alors analysé par immunocytochimie l'expression de la Plex-A1, la sous unité permettant la transduction du signal. En culture, Plex-A1 est exprimée à tous les stades de développement. L'utilisation d'anticorps bloquants inhibant l'activité de la Plexine-A1 nous a permis de démontrer, sur les OLP, que cette protéine permet la transduction du signal induit par la Sema3A. Peu de travaux jusqu'à maintenant ont été menés pour déterminer *in vivo* les effets de la Sema3A sur les oligodendrocytes. Récemment, l'équipe de B. Zalc a démontré, dans le nerf optique en développement, que la Sema3F, une autre molécule de la classe 3, a un effet attracteur sur les oligodendrocytes, alors que Sema3A inhibe leur migration (Spassky et al., 2002). Nos conditions expérimentales permettent l'étude des mécanismes induits par la Sema3A. Néanmoins, d'autres types d'expériences devront être menées pour permettre de déterminer le rôle de la Sema3A sur la migration et le guidage cellulaire. En effet, pour pouvoir observer des effets de Sema3A sur la migration, les cellules doivent être exposées à un gradient de molécules attractives ou répulsives comme c'est le cas *in vivo*.

## Discussion

Certaines molécules de la matrice extracellulaire induisent des changements de  $pH_i$ . Sur des fibroblastes en culture, la présence de fibronectine induit une augmentation du  $pH_i$  de 0,18 unité. En bloquant cette augmentation de  $pH_i$  (addition d'amiloride), les cellules ne prolifèrent plus en réponse à la fibronectine (Ingber et al., 1990). La ténascine, une molécule de la matrice extracellulaire contrôle la migration et l'adhésion cellulaire. Deux isoformes de la ténascine ont été testées sur des fibroblastes, l'une pour son activité inhibitrice de l'adhésion l'autre pour son activité promotrice. L'inhibition de l'adhésion s'accompagne d'une diminution du  $pH_i$  de 0,8 unité. Au contraire, une augmentation de 0,10 unité  $pH$  est enregistrée suite à l'adhésion des cellules (Krushel et al., 1994). Schwartz et al. ont montré sur des cellules endothéliales que la fibronectine induit une augmentation du  $pH_i$  de 0,15 unité. Cette augmentation de  $pH_i$  est due à la fixation de ces molécules sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  induisant alors l'activation de l'échangeur  $Na^+/H^+$  (Schwartz et al., 1991). Des changements de  $pH_i$  sont aussi enregistrés en réponse à des stimuli contrôlant la migration cellulaire. Le FMLP est un peptide induisant la migration des lymphocytes. Sur ces cellules, en réponse au FMLP, une augmentation de  $pH_i$  de 7,25 à 7,75 est enregistrée suite à l'activation de l'échangeur  $Na^+/H^+$ . L'inhibition de l'échangeur bloque la migration des lymphocytes en réponse au FMLP (Simchowicz et Cragoe, 1986a, b; Naccache et al., 1989). Au regard de ces différents résultats, nous avons émis l'hypothèse que la Sema3A, une molécule informative de la matrice extracellulaire peut induire des changements du  $pH_i$ .

### *Sema3A et signalisation pH*

L'application en perfusion d'une solution de Sema3A (100 ng/ml) sur cellule isolée induit une acidification transitoire avec une amplitude maximale moyenne de 0,13 unité  $pH$ . Cette variation de  $pH_i$  est comparable à celles observées en présence d'autres molécules comme l'AR (0,25) sur les OLP ou la fibronectine (0,18) sur fibroblastes. En présence de Sema3A, si cette acidification intracellulaire est prévenue, plus aucune diminution de la complexité morphologique des OLP n'est observable. Ces résultats démontrent que la Sema3A induit une voie de signalisation intracellulaire dépendante du  $pH_i$  et contrôlant la morphologie cellulaire. Ces résultats permettent d'élargir le champ d'étude des mécanismes d'action en réponse aux sémaphorines. Il serait de ce fait intéressant d'analyser les effets sur les OLP d'une sémaphorine attractive, la Sema3F. Une molécule informative de la matrice extracellulaire et présentant un effet attracteur pourrait-elle induire une augmentation du  $pH_i$  ?

## Discussion

Les voies conduisant à une diminution de  $\text{pH}_i$  sur les OLP en présence de la Sema3A n'ont pas encore été étudiées. Un mécanisme pouvant permettre une acidification intracellulaire est l'inhibition de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Une des voies fait intervenir un cofacteur inhibant de manière dépendante de l'AMPc l'échangeur. Ce facteur a été nommé NHERF pour "Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor" (Weinman et al., 1995). Les mécanismes par lesquels agit ce facteur ne sont pas encore totalement élucidés. Il a pu être montré sur des fibroblastes que NHERF n'est pas phosphorylé suite à une augmentation d'AMPc mais que sa présence est nécessaire à la phosphorylation responsable de l'inhibition de l'échangeur  $\text{NH}_3$  (Zizak et al., 1999). Cette même équipe a montré à partir de cellules de l'épithélium intestinal que NHERF possède des sites de phosphorylation par la PKA. De manière contradictoire à leurs précédents résultats, le niveau d'inhibition de NHE est dans ce cas dépendant du degré de phosphorylation de NHERF (Weinman et al., 1998). NHERF pourrait être recruté suite à l'addition de Sema3A et ainsi inhiber l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

Peu de molécules ont été décrites pour induire l'inhibition de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Parmi celles-ci on trouve la dopamine, l'adrénaline et la somatostatine. En fonction du type de récepteurs exprimés par les cellules, l'application de l'une de ces molécules peut induire une acidification intracellulaire. L'application de somatostatine sur des cellules entériques en culture induit une diminution du  $\text{pH}_i$  de 0,08 unité pH suite à l'activation des récepteurs SSTR1, -3 et -4 (Barber et al., 1989). L'activation des récepteurs  $\alpha_{2B}$  de l'adrénaline sur des cellules HEK293 induit une acidification intracellulaire de 0,15 unité pH (Lin et al., 2003). La dopamine, quant à elle, en activant le récepteur  $\text{D}_2$ , sur des cellules GH3 (tumeur de l'hypophyse) et Ltk<sup>-</sup> (lignée de fibroblastes), induit une inhibition de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  entraînant une diminution du  $\text{pH}_i$  (Neve et al., 1992). Ces valeurs sont très semblables à celles que nous pouvons enregistrer en réponse à une application de Sema3A ( $\Delta \text{pH}_i = 0,13$ ). Des travaux ont été menés afin de déterminer quels peuvent être les mécanismes impliqués lors d'une diminution du  $\text{pH}_i$ . Lin et al. du groupe de D. Barber ont analysé la structure des récepteurs connus pour être impliqués dans une inhibition de l'activité de NHE. SSTR1, SSTR 3, SSTR 4,  $\alpha_{2B}$  et  $\text{D}_2$  appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires. Le but a été de déterminer si il existe une homologie de structure entre des récepteurs induisant un même effet. Sur tous ces récepteurs, 2 motifs conservés sont trouvés au niveau des segments transmembranaires 2 et 3. Ces motifs ne sont pas trouvés sur les récepteurs SSTR2, SSTR5 et  $\alpha_{2A}$  adrénergique qui eux n'induisent pas une

## Discussion

inhibition de NHE. Les segments transmembranaires 2 et 3 sont importants lors du recrutement des protéines G. De ce fait, en fonction de la structure des segments, différentes protéines G peuvent être recrutées (Lin et al., 2003). Il a pu être montré, sur des fibroblastes et des cellules HEK293, que la sous unité  $G\alpha_{12}$  induit une inhibition de l'échangeur  $Na^+/H^+$  de type 1. Au contraire l'expression de la sous unité  $G\alpha_{13}$  active NHE1. Les effets de ces sous unités sont spécifiques et dépendent aussi des isoformes de NHE exprimées. C'est ainsi que  $G\alpha_{12}$  qui inhibe l'activité de NHE1 stimule celle de NHE2 et NHE3 (Lin et al., 1996).

Les RhoGTPases agissent en aval des protéines G. Liées au GTP, elles sont sous forme active alors que liées au GDP elles sont inactives. Cette famille de GTPases est constituée de 3 classes différentes, Rac, Rho et Cdc42 et sont capables de réguler le cytosquelette (Kjoller et Hall, 1999). Rac, Rho et Cdc42 contrôlent respectivement l'élaboration des lamellipodes, des fibres de stress et des filopodes. Le récepteur de la sémaphorine et plus particulièrement la plexine qui permet la transduction du signal, a la capacité de réguler l'activité des RhoGTPases (Castellani et Rougon, 2002). Plusieurs résultats ont mis en évidence que l'activation des RhoGTPases peut moduler l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$ . Cette voie pourrait aussi être impliquée dans le contrôle de l'activité de l'échangeur  $Na^+/H^+$  en réponse à la Sema3A.

L'activation de la sous-unité  $G\alpha_{13}$  active la Cdc42 qui à son tour va stimuler ERK par l'intermédiaire de la MEK (Hooley et al., 1996). L'activation de cette cascade induit alors l'activation de NHE1 probablement par sa phosphorylation par ERK. L'activation de  $G\alpha_{13}$  stimule aussi la voie de RhoA qui aboutit à la stimulation de NHE1 mais dans ce cas, par une voie indépendante de MEK (Hooley et al., 1996). L'activation de NHE1 par RhoA pourrait se faire par l'intermédiaire de changement du cytosquelette comme il a pu l'être montré pour NHE3. En effet, RhoA active une protéine kinase p160ROK qui va phosphoryler la chaîne légère de la myosine et moduler le cytosquelette d'actine et l'activité de NHE3 (Szaszi et al., 2000). Un tel effet de RhoA sur NHE1 par l'intermédiaire de p160ROK a aussi pu être mis en évidence (Tominaga et Barber, 1998). Des travaux complémentaires ont permis de montrer qu'en réponse à l'activation de RhoA, la stimulation de NHE1, contrairement à NHE3, se fait par la phosphorylation directe de l'échangeur par la p160ROK (Tominaga et al., 1998). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par le groupe de S. Grinstein, démontrant que l'activité de NHE3 mais pas de NHE1 est contrôlable par le cytosquelette d'actine (Kurashima et al., 1999). L'application de somatostatine sur des fibroblastes entraîne l'activation des récepteurs SSTR1 qui

## Discussion

diminue l'activation des RhoGTPases, conduisant alors à une inhibition de NHE1 (Buchan et al., 2002). Un tel mécanisme pourrait être responsable de l'acidification intracellulaire que nous enregistrons en réponse à la Sema3A. Cette hypothèse est renforcée par le fait que nous avons pu mettre en évidence sur les OLP une modulation de l'activité des voies contrôlées par les RhoGTPases en réponse à la Sema3A et notamment par Cdc42.

Les changements morphologiques impliquent la réorganisation du cytosquelette et les sémaphorines font partie des molécules induisant de tels effets. L'application de Sema3A sur un axone en croissance induit la dépolymérisation des microfilaments d'actine, la perte des filopodes et des lamellipodes et entraîne un collapsus (Fan et al., 1993). Par un marquage à la phalloïdine rhodamine, nous avons examiné sur les OLP, les changements du cytosquelette induits par une application de Sema3A. En présence de Sema3A il y a une réduction très importante du nombre de cellules présentant des filopodes, **25,6 %** contre **42,85%** dans les conditions contrôles. Les filopodes sont des structures impliquées dans les processus de guidage, permettant au cône de croissance de définir la direction d'élongation en polarisant le cytosquelette d'actine (Bentley et O'Connor, 1994). En présence de Sema3A et en bloquant le  $pH_i$  à une valeur proche de celles des OLP dans les conditions contrôle, **42,64%** des OLP présentent des filopodes, valeur comparable à celle obtenue en absence de Sema3A. Ces résultats démontrent que la Sema3A module la morphologie cellulaire en jouant sur le cytosquelette, très certainement en jouant sur la voie des RhoGTPases et en particulier sur Cdc42, qui régule la formation des filopodes (Nobes et al., 1995). Mais ces résultats démontrent aussi l'existence d'un lien entre l'élaboration des filopodes et le  $pH_i$  des cellules. Ces résultats peuvent être interprétés de 3 manières différentes. En effet, la transduction du signal par la Plex-A1 peut 1) agir directement sur le  $pH_i$  qui à son tour régule l'activité des RhoGTPases et l'élaboration des filpodes. 2) agir directement sur les RhoGTPases qui peuvent comme nous l'avons vu moduler le  $pH_i$  qui va alors directement réguler la morphologie cellulaire et 3) agir sur les deux voies. Au vu des données bibliographiques, il est hautement probable qu'un changement d'activité de l'une ou plusieurs des RhoGTPases soit à l'origine de l'acidification intracellulaire enregistrée en présence de Sema3A. Les effets de variations de  $pH_i$  font très certainement partie des voies de signalisation induites par les RhoGTPases permettant le contrôle du cytosquelette d'actine. Néanmoins, des études devront être menées pour déterminer précisément le mécanisme impliqué. Dans cette optique il serait nécessaire d'analyser si des variations de  $pH_i$  peuvent moduler l'activité des RhoGTPases.

## Discussion

L'activation du complexe récepteur Plex-A1/NRP-1, après l'application de Sema3A, induit l'activation des RhoGTPases et la phosphorylation de la cofiline, une protéine régulant la polymérisation de l'actine (Aizawa et al., 2001). La cofiline sous sa forme non phosphorylée induit la dépolymérisation des filaments d'actine au niveau – pour assurer le recyclage des monomères d'actine à l'extrémité +. Ce mécanisme permet d'induire l'élongation des filaments d'actine. Sous sa forme phosphorylée la cofiline ne permet plus la dépolymérisation et réduit le recyclage des monomères d'actine nécessaires à l'assemblage à l'extrémité + des filaments (Carlier et al., 1999; Kuhn et al., 2000). La Sema3A peut induire la phosphorylation de la cofiline par l'intermédiaire d'une sérine/thréonine kinase, la LIM kinase induisant alors le collapsus au niveau axonal (Aizawa et al., 2001). Cette LIM kinase peut, quant à elle, être activée par Cdc42 (Sumi et al., 1999). Aizawa et coll ont pu démontrer que l'activation de la LIM kinase est nécessaire mais n'est pas suffisante pour induire le collapsus et suggèrent l'intervention d'autres protéines. Une des autres voies impliquées dans la régulation de la cofiline est le pH. En effet, il a pu être montré que la cofiline est plus active et permet une dépolymérisation plus rapide des filaments d'actine à pH 8.00 qu'à pH 7.00 assurant une croissance soutenue des filaments d'actine à l'autre extrémité (Moon et Drubin, 1995; Carlier et al., 1997; Du et Frieden, 1998; Ressad et al., 1998; Carlier et al., 1999). Le renouvellement des monomères d'actine induit par la cofiline est trois fois plus important à pH 8,00 qu'à pH 7,00 (Carlier et al., 1999). Ces observations sont en accord avec les résultats présentés dans ce travail. En effet, l'acidification intracellulaire enregistrée en présence de Sema3A sur les OL pourrait permettre d'inhiber l'activité de la cofiline et ainsi empêcher l'élongation des filaments d'actine. Cette hypothèse est concevable compte tenu de la diminution du nombre de filopodes observée en présence de Sema3A. Lorsque l'acidification enregistrée en présence de Sema3A est inhibée, le nombre de filopodes revient au niveau du contrôle.

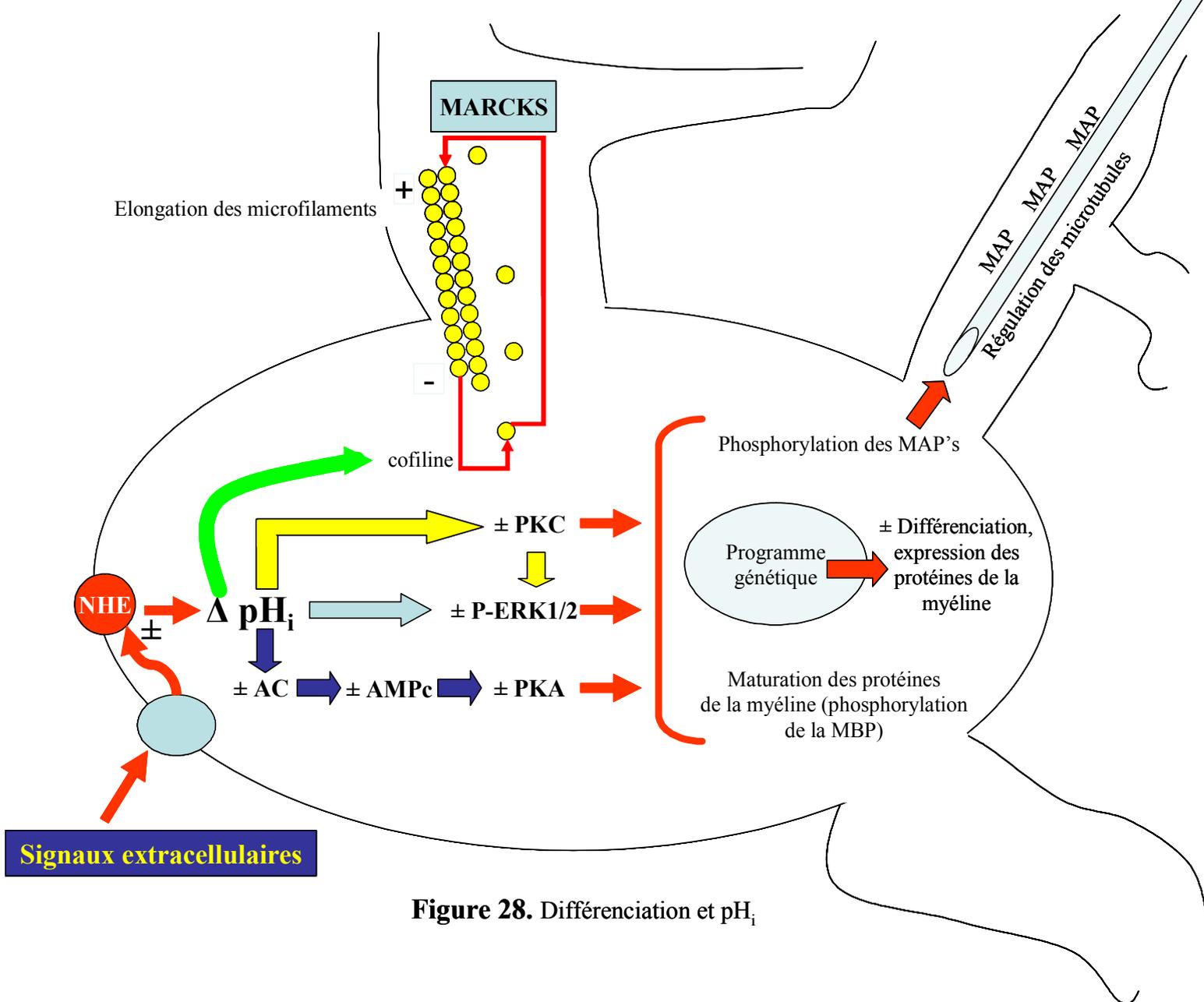
Des études réalisées dans notre équipe ont permis de montrer que, sur des précurseurs neuronaux, les effets de la Sema3A sur la migration passent par la modulation de la voie des MAPK ERK1/2 (D. Bagnard, communication personnelle). Il a de plus été possible de montrer sur des cellules PC12 qu'une diminution du  $pH_i$  permet l'induction de la prolifération de ces cellules et l'inhibition de leur différenciation par l'activation de ERK1/2 (Thomas et al., 1996). Nos résultats montrent que la Sema3A induit une diminution transitoire de la forme active de ERK1/2 jusqu'à 30 minutes après l'application de Sema3A, suivie d'une réaugmentation progressive. Il est tout à fait remarquable de constater que les variations de  $pH_i$  et de l'état de phosphorylation de ERK1/2 évoluent en

## Discussion

parallèle. Ces résultats suggèrent fortement que la Sema3A contrôle l'activation de ERK1/2 par l'intermédiaire de changements de  $\text{pH}_i$ . Des expériences supplémentaires devront démontrer définitivement un tel rôle du  $\text{pH}_i$  dans la signalisation ERK1/2 induite par la Sema3A. Pour cela, il faudra inhiber l'acidification induite par la Sema3A et analyser les effets sur ERK1/2. D'autres expériences pourront être menées en appliquant en même temps que la Sema3A, les anticorps bloquants anti-Plex-A1 et/ou anti-NRP-1 et en déterminant les effets sur le  $\text{pH}_i$  et sur ERK1/2.

Ces mêmes mécanismes pourraient également être mis en jeu lors de l'induction de la différenciation des OLP suite à une alcalinisation intracellulaire. Dans ces deux cas, une augmentation de  $\text{pH}_i$  pourrait permettre stimuler l'activité de la cofiline, induisant alors le renouvellement des monomères d'actine nécessaire à l'élaboration des filaments d'actine durant la différenciation morphologique des OLP. Les voies permettant le contrôle des filaments d'actine sont très nombreuses et présentent chacune de nombreux intermédiaires. L'activité de chacun de ces intermédiaires est potentiellement modulable par le  $\text{pH}_i$ . De ce fait, le rôle du  $\text{pH}_i$  est certainement multiple dans les mécanismes contrôlant l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires et la différenciation des OLP.

Les travaux menés lors de cette étude ont permis de montrer l'importance de variations du  $\text{pH}_i$  dans le contrôle de la physiologie des OLP. Pour cela, je me suis attaché à analyser les effets de deux molécules, l'acide rétinoïque et la sémaphorine 3A respectivement impliqués dans la différenciation et l'élaboration des prolongements des OLP. Il a ainsi été montré que l'AR induit une augmentation du  $\text{pH}_i$  de 0,25 unité suite à l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Il a pu être montré que cette augmentation de  $\text{pH}_i$  est nécessaire à l'induction de la différenciation en réponse à l'AR. De manière plus générale, il a été établi que la différenciation des OLP est dépendante du  $\text{pH}_i$  et permet l'activation de la voie des MAP Kinases ERK1/2. D'autre part, ce travail a permis de montrer que le contrôle de l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires en réponse à la Sema3A implique aussi une signalisation dépendante du  $\text{pH}_i$ . La Sema3A induit une rétraction des prolongements et une acidification intracellulaire de 0,13 unité pH. En empêchant cette acidification les effets de Sema3A ne sont plus observables. Il semble aussi exister un lien, qui reste à confirmer, entre le  $\text{pH}_i$  et l'activation de ERK1/2 suite à l'application de la Sema3A.



**Figure 28.** Différenciation et  $\text{pH}_i$

## Discussion

Nos résultats démontrent ainsi que des variations de  $\text{pH}_i$  permettent de contrôler la différenciation et l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires. De plus, comme nous en avons discuté ci-dessus, l'activité ou l'expression de différentes molécules ou protéines connues pour être impliquées dans les voies de signalisation (AMPc, PKA, PKC, cofiline) présente aussi une sensibilité vis-à-vis du  $\text{pH}_i$ . De ces résultats nous pouvons essayer d'établir un schéma général, qui n'est en rien exhaustif, impliquant ces différentes voies (fig 28). Des variations de  $\text{pH}_i$ , comme nous l'avons montré, induisent des changements du niveau d'activation de ERK1/2 par un mécanisme non déterminé. ERK1/2 comme nous l'avons vu est impliquée dans les mécanismes permettant de réguler la physiologie des oligodendrocytes. L'activation de ERK1/2 permet la différenciation en induisant l'expression et la maturation de protéines de la myéline et l'élaboration de prolongements oligodendrocytaires (Stariha et al., 1997; Stariha et Kim, 2001a, b). L'activation de ERK1/2 pourrait aussi permettre l'élaboration des prolongements par l'intermédiaire de la stabilisation des microtubules. Il a pu être montré, sur des neurones, que l'élaboration des dendrites est sous le contrôle de ERK1/2. Ce contrôle se fait au niveau de l'expression et de la phosphorylation des protéines associées aux microtubules (MAP) qui permettent la stabilisation des microtubules (Audesirk et al., 1997; Dashiell et al., 2002; Vaillant et al., 2002). Comme discuté ci-dessus, l'activation de la PKC peut, elle aussi, être dépendante du  $\text{pH}_i$ . Dans ce cas, la PKC peut activer la voie de ERK1/2 mais, comme nous l'avons vu précédemment (cf étude bibliographique), peut aussi moduler le cytosquelette en phosphorylant la MARCKS (ancrage des microfilaments d'actine). La PKC peut aussi jouer sur la stabilité des microtubules en phosphorylant elle aussi les MAP (Audesirk et al., 1997). L'activité de l'adénylate cyclase, comme exposé ci-dessus, est aussi dépendante du pH. De ce fait des changements de taux d'AMPc peuvent moduler l'activité de la PKA. Ces changements peuvent à leur tour moduler la physiologie des oligodendrocytes, l'expression de protéines de la myéline, la maturation de ces protéines, et la phosphorylation des MAP (Audesirk et al., 1997). Il est à noter que chacune des voies décrites ci-dessus peut, comme nous l'avons vu précédemment, moduler l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . La PKC en phosphorylant l'échangeur directement ou indirectement (via ERK), peut stimuler son activité. Au contraire l'accumulation de l'AMPc est souvent décrite comme inhibant l'activité l'échangeur. De ce fait, il peut exister un mécanisme complexe de contrôle et de rétrocontrôle mettant en jeu le  $\text{pH}_i$  et les différentes voies de signalisation intracellulaires. C'est très probablement la balance entre les différents niveaux d'activation de ces voies qui permet une réponse globale au niveau cellulaire.

## Perspectives

La disparition de l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  observée au début de la différenciation des OLP (Boussouf et Gaillard, 2000) représente certainement un signal permissif pour la différenciation. Pour étudier plus précisément le rôle de cet échangeur et du  $\text{pH}_i$ , différentes stratégies pourront être employées :

- faire exprimer cet échangeur de manière continue par les oligodendrocytes (transfections) et analyser les effets sur la différenciation.
- inhiber de manière précoce l'expression de l'échangeur en faisant exprimer l'ARNm antisens et analyser les effets sur la différenciation.
- il serait aussi très important de pouvoir déterminer *in vivo* le rôle du  $\text{pH}_i$  lors de la différenciation des OLP. Dans un premier temps des OLP pourraient être transfectés dans le but de sur- ou sous-exprimer l'un des mécanismes impliqués dans la régulation du  $\text{pH}_i$ . Ces OLP seraient injectés *in vivo* et grâce à un gène rapporteur (Green Fluorescent Protein (GFP) ou du LacZ) leur devenir pourraient être analysés.
- suivant les résultats de ce type d'études, d'autres stratégies pourraient être employées comme l'utilisation d'animaux transgéniques. Des expériences de "knock-out" et/ou de "knock-in" conditionnelle inductible permettraient de pouvoir déterminer plus précisément le rôle l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  en activant ou inactivant son expression au niveau des OLP. Ces expériences permettraient aussi d'analyser les effets du  $\text{pH}_i$  de manière beaucoup plus précoce durant le développement, dès le début de l'apparition des premiers OLP.

Il est important de connaître et de comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la régénération des connexions neuronales lors de lésions du SNC. Dans un premier temps, des lésions électrolytiques ou mécaniques stéréotaxiques pourraient être pratiquées chez le rat adulte dans le corps calleux et la moelle épinière. Des OLP obtenus à partir de cultures secondaires pourraient être alors greffés dans ces sites de lésion. Deux stratégies pourraient être employées pour évaluer les capacités de remyélinisation :

- soit en modifiant le phénotype des OLP (modifications des récepteurs aux molécules de guidages).
- soit par modification de l'environnement (variations d'expression des sémaphorines).

***Modifications phénotypiques des Oligodendrocytes.***

Sema3A étant sur-exprimée dans les sites de lésion, une première étape consisterait à utiliser des anticorps bloquants (injectés directement dans le site de lésion) dirigés contre Sema3A ou ses récepteurs. Il existe déjà un anticorps anti-Sema3A capable de favoriser la survie neuronale (Shirvan et al., 2002). Les études se focaliseraient sur le blocage des récepteurs à Sema3A en utilisant des anticorps anti-NRP-1 et anti-Plex-A1. Les OLP greffés seraient soit marqués par des colorants lipophiliques (DiI) ou des colorants vitaux (PKH26) soit transfectés de manière classique par un vecteur contenant le gène de la GFP ou du LacZ afin de pouvoir suivre leur devenir. A différents temps après la greffe, des coupes et des marquages au niveau des sites de lésions par des anticorps O4, anti-Gal-C et anti-MBP permettraient de déterminer la morphologie et l'état de différenciation des oligodendrocytes greffés pour évaluer les capacités de remyélinisation.

Cette approche pourrait être complétée par l'utilisation d'OLP pour lesquels l'expression des récepteurs de Sema3A serait modulée. Ceci pourrait se faire par transfection de gènes codant pour des formes inactives des récepteurs comme des dominants négatifs pour Plexine-A1 ou Neuropiline-1. Le devenir de ces progéniteurs serait à nouveau analysé par l'utilisation d'anticorps identifiant les stades de maturation des cellules oligodendrocytaires.

Sur la base de mes résultats montrant l'influence de la valeur de  $pH_i$  sur la différenciation et l'élaboration des prolongements oligodendrocytaires, il pourrait à nouveau être développé des outils de transfection capables d'interférer avec ces variations de  $pH_i$ . Le but serait d'imposer le  $pH_i$  des OLP afin d'empêcher l'acidification transitoire induite par Sema3A. Pour cela, un vecteur pourrait être développé, permettant l'expression d'un dominant négatif de l'échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$ . L'échangeur  $Cl^-/HCO_3^-$  étant un mécanisme acidifiant, l'inactivation induite par le dominant négatif induirait alors une augmentation de  $pH_i$ . Le devenir de ces cellules greffées pourrait être déterminé sur coupes histologiques en utilisant les techniques immunocytochimiques.

Ces premiers travaux seraient donc axés sur l'inhibition du signal induit par Sema3A dans les oligodendrocytes. Une autre approche consisterait à moduler dans la lésion elle-même, l'impact des signaux inhibiteurs tels que Sema3A en favorisant l'expression de facteurs promoteurs de la croissance comme Sema3F et Netrine-1.

***Modification du microenvironnement de la lésion***

Cette approche consisterait à induire au niveau de la cicatrice gliale l'expression de facteurs promoteurs de la croissance tels que Sema3F et Netrine-1, dans le but de créer un environnement le plus favorable possible à la croissance des oligodendrocytes. Il faudrait tout d'abord développer des vecteurs permettant l'expression de ces signaux dans la lésion. La transfection *in vivo* au sein du SNC est difficile car les taux de réussite et la reproductibilité sont faibles. Ce problème pourrait être résolu en utilisant des adénovirus comme vecteur de transfection. Cette méthode, plus fiable et reproductible permet la transfection des cellules post-mitotique du SNC (Ruitenberg et al., 2002a; Ruitenberg et al., 2002b). Des adénovirus contenant les gènes codants soit pour Sema3F soit pour Netrine-1 pourraient, dans un premier temps, être injectés au niveau de la lésion, puis après transfection, les OLP y seraient greffés. Ceci permettrait de sur-exprimer au niveau de la cicatrice gliale les facteurs promoteurs de la croissance. La migration et la croissance des OLP seraient analysées sur coupes.

## Bibliographie

- Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, Kurtz I (1998) Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem* 273:17689-17695.
- Aguayo AJ, Attiwell M, Trecarten J, Perkins S, Bray GM (1977a) Abnormal myelination in transplanted Trembler mouse Schwann cells. *Nature* 265:73-75.
- Aguayo AJ, Kasarjian J, Skamene E, Kongshavn P, Bray GM (1977b) Myelination of mouse axons by Schwann cells transplanted from normal and abnormal human nerves. *Nature* 268:753-755.
- Aickin CC, Thomas RC (1977) An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J Physiol* 273:295-316.
- Aizawa H, Wakatsuki S, Ishii A, Moriyama K, Sasaki Y, Ohashi K, Sekine-Aizawa Y, Sehara-Fujisawa A, Mizuno K, Goshima Y, Yahara I (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* 4:367-373.
- Alonso A, Breuer B, Steuer B, Fischer J (1991) The F9-EC cell line as a model for the analysis of differentiation. *Int J Dev Biol* 35:389-397.
- Alper SL (1991) The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol* 53:549-564.
- Alpern RJ, Star R, Seldin DW (1988) Hepatic renal interrelations in acid-base regulation. *Am J Physiol* 255:F807-809.
- Althaus HH, Kloppner S, Schmidt-Schultz T, Schwartz P (1992) Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. *Neurosci Lett* 135:219-223.
- Althaus HH, Schroter J, Spoerri P, Schwartz P, Kloppner S, Rohmann A, Neuhoff V (1991) Protein kinase C stimulation enhances the process formation of adult oligodendrocytes and induces proliferation. *J Neurosci Res* 29:481-489.
- Althaus HH, Hempel R, Kloppner S, Engel J, Schmidt-Schultz T, Kruska L, Heumann R (1997) Nerve growth factor signal transduction in mature pig oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 50:729-742.
- Alvaro D, Della Guardia P, Bini A, Gigliozzi A, Furfaro S, La Rosa T, Piat C, Capocaccia L (1995) Effect of glucagon on intracellular pH regulation in isolated rat hepatocyte couplets. *J Clin Invest* 96:665-675.
- Amiguet P, Gardinier MV, Zanetta JP, Matthieu JM (1992) Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 58:1676-1682.
- Amlal H, Burnham CE, Soleimani M (1999) Characterization of Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter isoform NBC-3. *Am J Physiol* 276:F903-913.
- Andersen OS, Silveira JE, Steinmetz PR (1985) Intrinsic characteristics of the proton pump in the luminal membrane of a tight urinary epithelium. The relation between transport rate and delta mu H. *J Gen Physiol* 86:215-234.
- Aram JA, Lodge D (1987) Epileptiform activity induced by alkalosis in rat neocortical slices: block by antagonists of N-methyl-D-aspartate. *Neurosci Lett* 83:345-350.
- Aronson PS (1985) Properties of the renal Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Ann N Y Acad Sci* 456:220-228.
- Aronson PS, Nee J, Suhm MA (1982) Modifier role of internal H<sup>+</sup> in activating the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299:161-163.
- Asotra K, Macklin WB (1993) Protein kinase C activity modulates myelin gene expression in enriched oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 34:571-588.

## Bibliographie

- Asotra K, Macklin WB (1994) Developmental expression of protein kinase C isozymes in oligodendrocytes and their differential modulation by 4 beta-phorbol-12,13-dibutyrate. *J Neurosci Res* 39:273-289.
- Astion ML, Obaid AL, Orkand RK (1989) Effects of barium and bicarbonate on glial cells of Necturus optic nerve. Studies with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. *J Gen Physiol* 93:731-744.
- Audesirk G, Cabell L, Kern M (1997) Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 102:247-260.
- Avossa D, Pfeiffer SE (1993) Transient reversion of O4+ GalC- oligodendrocyte progenitor development in response to the phorbol ester TPA. *J Neurosci Res* 34:113-128.
- Baas D, Bourbeau D, Sarlieve LL, Ittel ME, Dussault JH, Puymirat J (1997) Oligodendrocyte maturation and progenitor cell proliferation are independently regulated by thyroid hormone. *Glia* 19:324-332.
- Baas D, Fressinaud C, Ittel ME, Reeber A, Dalencon D, Puymirat J, Sarlieve LL (1994) Expression of thyroid hormone receptor isoforms in rat oligodendrocyte cultures. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Neurosci Lett* 176:47-51.
- Bachmann O, Rossmann H, Berger UV, Colledge WH, Ratcliff R, Evans MJ, Gregor M, Seidler U (2003) cAMP-mediated regulation of murine intestinal/pancreatic Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter subtype pNBC1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284:G37-45.
- Baetz D, Haworth RS, Avkiran M, Feuvray D (2002) The ERK pathway regulates Na<sup>(+)</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> cotransport activity in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2102-2109.
- Bagnard D, Lohrum M, Uziel D, Puschel AW, Bolz J (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125:5043-5053.
- Bagnard D, Vaillant C, Khuth ST, Dufay N, Lohrum M, Puschel AW, Belin MF, Bolz J, Thomasset N (2001) Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci* 21:3332-3341.
- Bai L, Collins JF, Muller YL, Xu H, Kiela PR, Ghishan FK (1999) Characterization of cis-elements required for osmotic response of rat Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger-2 (NHE-2) gene. *Am J Physiol* 277:R1112-1119.
- Balestrino M, Somjen GG (1988) Concentration of carbon dioxide, interstitial pH and synaptic transmission in hippocampal formation of the rat. *J Physiol* 396:247-266.
- Bansal R, Pfeiffer SE (1997) Regulation of oligodendrocyte differentiation by fibroblast growth factors. *Adv Exp Med Biol* 429:69-77.
- Bansal R, Warrington AE, Gard AL, Ranscht B, Pfeiffer SE (1989) Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J Neurosci Res* 24:548-557.
- Bansal R, Kumar M, Murray K, Morrison RS, Pfeiffer SE (1996) Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Mol Cell Neurosci* 7:263-275.
- Barber DL, McGuire ME, Ganz MB (1989) Beta-adrenergic and somatostatin receptors regulate Na-H exchange independent of cAMP. *J Biol Chem* 264:21038-21042.
- Barnes D, Munro PM, Youl BD, Prineas JW, McDonald WI (1991) The longstanding MS lesion. A quantitative MRI and electron microscopic study. *Brain* 114 ( Pt 3):1271-1280.

## Bibliographie

- Barnes S, Merchant V, Mahmud F (1993) Modulation of transmission gain by protons at the photoreceptor output synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10081-10085.
- Baron W, de Jonge JC, de Vries H, Hoekstra D (1998) Regulation of oligodendrocyte differentiation: protein kinase C activation prevents differentiation of O2A progenitor cells toward oligodendrocytes. *Glia* 22:121-129.
- Baron W, de Vries EJ, de Vries H, Hoekstra D (1999) Protein kinase C prevents oligodendrocyte differentiation: modulation of actin cytoskeleton and cognate polarized membrane traffic. *J Neurobiol* 41:385-398.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992a) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992b) Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* 23:1221-1230.
- Barry MA, Eastman A (1992) Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and pH. *Biochem Biophys Res Commun* 186:782-789.
- Bartsch U (1996) Myelination and axonal regeneration in the central nervous system of mice deficient in the myelin-associated glycoprotein. *J Neurocytol* 25:303-313.
- Bartsch U, Faissner A, Trotter J, Dorries U, Bartsch S, Mohajeri H, Schachner M (1994) Tenascin demarcates the boundary between the myelinated and nonmyelinated part of retinal ganglion cell axons in the developing and adult mouse. *J Neurosci* 14:4756-4768.
- Baumann N, Maurin Y, Puech A, Chauvel P, Simon P (1980) [Biochemical and pharmacological approach to the functional disorders observed in demyelination mutants (GABAergic and noradrenergic systems)]. *C R Seances Soc Biol Fil* 174:437-445.
- Belachew S, Malgrange B, Rigo JM, Rogister B, Coucke P, Mazy-Servais C, Moonen G (1998) Developmental regulation of neuroligand-induced responses in cultured oligodendroglia. *Neuroreport* 9:973-980.
- Belachew S, Malgrange B, Rigo JM, Rogister B, Leprince P, Hans G, Nguyen L, Moonen G (2000) Glycine triggers an intracellular calcium influx in oligodendrocyte progenitor cells which is mediated by the activation of both the ionotropic glycine receptor and Na<sup>+</sup>-dependent transporters. *Eur J Neurosci* 12:1924-1930.
- Belaud-Rotureau MA, Leducq N, Macouillard Poullietier de Gannes F, Diolez P, Lacoste L, Lacombe F, Bernard P, Belloc F (2000) Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. *Apoptosis* 5:551-560.
- Benbrook D, Lernhardt E, Pfahl M (1988) A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature* 333:669-672.
- Benos DJ (1982) Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* 242:C131-145.
- Bentley D, O'Connor TP (1994) Cytoskeletal events in growth cone steering. *Curr Opin Neurobiol* 4:43-48.
- Bernier L, Alvarez F, Norgard EM, Raible DW, Mentaberry A, Schembri JG, Sabatini DD, Colman DR (1987) Molecular cloning of a 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: mRNAs with different 5' ends encode the same set of proteins in nervous and lymphoid tissues. *J Neurosci* 7:2703-2710.
- Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouysségur J, Shigekawa M (1994) The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem* 269:13703-13709.

## Bibliographie

- Besnard F, Perraud F, Sensenbrenner M, Labourdette G (1989) Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on proliferation and maturation of cultured rat oligodendrocytes. *Int J Dev Neurosci* 7:401-409.
- Bevenssee MO, Schmitt BM, Choi I, Romero MF, Boron WF (2000) An electrogenic Na(+)-HCO<sub>3</sub>(-) cotransporter (NBC) with a novel COOH-terminus, cloned from rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C1200-1211.
- Bhat NR (1991) Phosphorylation of MARCKS (80-kDa) protein, a major substrate for protein kinase C in oligodendroglial progenitors. *J Neurosci Res* 30:447-454.
- Bhat NR, Hauser KF, Kindy MS (1992) Cell proliferation and protooncogene induction in oligodendroglial progenitors. *J Neurosci Res* 32:340-349.
- Bhat NR, Zhang P, Bhat AN (1995) The expression of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate in oligodendrocytes is developmentally regulated. *Dev Neurosci* 17:256-263.
- Bianchini L, L'Allemain G, Pouyssegur J (1997) The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem* 272:271-279.
- Black JA, Waxman SG, Hildebrand C (1985) Axo-glial relations in the retina-optic nerve junction of the adult rat: freeze-fracture observations on axon membrane structure. *J Neurocytol* 14:887-907.
- Blaschuk KL, Frost EE, French-Constant C (2000) The regulation of proliferation and differentiation in oligodendrocyte progenitor cells by alphaV integrins. *Development* 127:1961-1969.
- Bogler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6368-6372.
- Bongarzone ER, Howard SG, Schonmann V, Campagnoni AT (1998) Identification of the dopamine D3 receptor in oligodendrocyte precursors: potential role in regulating differentiation and myelin formation. *J Neurosci* 18:5344-5353.
- Borges K, Ohlemeyer C, Trotter J, Kettenmann H (1994) AMPA/kainate receptor activation in murine oligodendrocyte precursor cells leads to activation of a cation conductance, calcium influx and blockade of delayed rectifying K<sup>+</sup> channels. *Neuroscience* 63:135-149.
- Boron WF (1977) Intracellular pH transients in giant barnacle muscle fibers. *Am J Physiol* 233:C61-73.
- Boron WF, De Weer P (1976) Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and metabolic inhibitors. *J Gen Physiol* 67:91-112.
- Boron WF, Boulpaep EL (1983) Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport. *J Gen Physiol* 81:53-94.
- Boussouf A, Gaillard S (2000) Intracellular pH changes during oligodendrocyte differentiation in primary culture. *J Neurosci Res* 59:731-739.
- Boussouf A, Lambert RC, Gaillard S (1997) Voltage-dependent Na(+)-HCO<sub>3</sub>-cotransporter and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger are involved in intracellular pH regulation of cultured mature rat cerebellar oligodendrocytes. *Glia* 19:74-84.
- Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7972-7976.
- Boyle KM, Irwin JP, Humes BR, Runge SW (1997) Apoptosis in C3H-10T1/2 cells: roles of intracellular pH, protein kinase C, and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *J Cell Biochem* 67:231-240.

## Bibliographie

- Braun PE, Sandillon F, Edwards A, Matthieu JM, Privat A (1988) Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain. *J Neurosci* 8:3057-3066.
- Brookes N (1992a) Regulation of the glutamine content of astrocytes by cAMP and hydrocortisone: effect of pH. *Neurosci Lett* 147:139-142.
- Brookes N (1992b) Effect of pH on glutamine content derived from exogenous glutamate in astrocytes. *J Neurochem* 59:1017-1023.
- Brookes N, Turner RJ (1993) Extracellular potassium regulates the glutamine content of astrocytes: mediation by intracellular pH. *Neurosci Lett* 160:73-76.
- Brosius FC, 3rd, Alper SL, Garcia AM, Lodish HF (1989) The major kidney band 3 gene transcript predicts an amino-terminal truncated band 3 polypeptide. *J Biol Chem* 264:7784-7787.
- Brown A, McFarlin DE, Raine CS (1982) Chronologic neuropathology of relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the mouse. *Lab Invest* 46:171-185.
- Brown D, Gluck S, Hartwig J (1987) Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H<sup>+</sup>ATPase. *J Cell Biol* 105:1637-1648.
- Brune T, Deitmer JW (1995) Intracellular acidification and Ca<sup>2+</sup> transients in cultured rat cerebellar astrocytes evoked by glutamate agonists and noradrenaline. *Glia* 14:153-161.
- Brune T, Fetzer S, Backus KH, Deitmer JW (1994) Evidence for electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in cultured rat cerebellar astrocytes. *Pflugers Arch* 429:64-71.
- Brunner C, Lassmann H, Waehnelndt TV, Matthieu JM, Linington C (1989) Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52:296-304.
- Buchan AM, Lin CY, Choi J, Barber DL (2002) Somatostatin, acting at receptor subtype 1, inhibits Rho activity, the assembly of actin stress fibers, and cell migration. *J Biol Chem* 277:28431-28438.
- Burnham CE, Amlal H, Wang Z, Shull GE, Soleimani M (1997) Cloning and functional expression of a human kidney Na<sup>+</sup>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter. *J Biol Chem* 272:19111-19114.
- Busa WB (1986) Mechanisms and consequences of pH-mediated cell regulation. *Annu Rev Physiol* 48:389-402.
- Busa WB, Nuccitelli R (1984) Metabolic regulation via intracellular pH. *Am J Physiol* 246:R409-438.
- Cabantchik ZI, Greger R (1992) Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am J Physiol* 262:C803-827.
- Cabantchik ZI, Knauf PA, Rothstein A (1978) The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of 'probes'. *Biochim Biophys Acta* 515:239-302.
- Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1998) Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20:869-882.
- Camilion de Hurtado MC, Alvarez BV, Perez NG, Cingolani HE (1996) Role of an electrogenic Na<sup>(+)</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in determining myocardial pH<sub>i</sub> after an increase in heart rate. *Circ Res* 79:698-704.

## Bibliographie

- Camilion de Hurtado MC, Alvarez BV, Perez NG, Ennis IL, Cingolani HE (1998) Angiotensin II activates Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange in ventricular myocardium. *Circ Res* 82:473-481.
- Cammer W (1998) Glial-cell cultures from brains of carbonic anhydrase II-deficient mutant mice: delay in oligodendrocyte maturation. *Neurochem Res* 23:407-412.
- Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D (1999) Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem* 274:33827-33830.
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 136:1307-1322.
- Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA (1993) Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 10:729-740.
- Cassel D, Zhuang YX, Glaser L (1984) Vanadate stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 118:675-681.
- Cassel D, Rothenberg P, Zhuang YX, Deuel TF, Glaser L (1983) Platelet-derived growth factor stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and induces cytoplasmic alkalinization in NR6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6224-6228.
- Castellani V, Rougon G (2002) Control of semaphorin signaling. *Curr Opin Neurobiol* 12:532-541.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.
- Chambard JC, Pouyssegur J (1986) Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G<sub>0</sub>---G<sub>1</sub> transition of fibroblasts. *Exp Cell Res* 164:282-294.
- Chesler M (1990) The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog Neurobiol* 34:401-427.
- Chintala SK, Kyritsis AP, Mohan PM, Mohanam S, Sawaya R, Gokslan Z, Yung WK, Steck P, Uhm JH, Aggarwal BB, Rao JS (1999) Altered actin cytoskeleton and inhibition of matrix metalloproteinase expression by vanadate and phenylarsine oxide, inhibitors of phosphotyrosine phosphatases: modulation of migration and invasion of human malignant glioma cells. *Mol Carcinog* 26:274-285.
- Chittajallu R, Chen Y, Wang H, Yuan X, Ghiani CA, Heckman T, McBain CJ, Gallo V (2002) Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G<sub>1</sub>/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2350-2355.
- Choi I, Aalkjaer C, Boulpaep EL, Boron WF (2000) An electroneutral sodium/bicarbonate cotransporter NBCn1 and associated sodium channel. *Nature* 405:571-575.
- Chow CW, Kapus A, Romanek R, Grinstein S (1997) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-induced pH changes in mammalian cells. Evidence for an NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-H<sup>+</sup> cotransporter. *J Gen Physiol* 110:185-200.
- Church J (1992) A change from HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-CO<sub>2</sub> to hepes-buffered medium modifies membrane properties of rat CA1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 455:51-71.
- Cohen RI, Almazan G (1994) Rat oligodendrocytes express muscarinic receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis and adenylyl cyclase. *Eur J Neurosci* 6:1213-1224.
- Cohen RI, Chandross KJ (2000) Fibroblast growth factor-9 modulates the expression of myelin related proteins and multiple fibroblast growth factor receptors in developing oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 61:273-287.

## Bibliographie

- Cohen RI, Molina-Holgado E, Almazan G (1996) Carbachol stimulates c-fos expression and proliferation in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res Mol Brain Res* 43:193-201.
- Cohen RI, Rottkamp DM, Maric D, Barker JL, Hudson LD (2003) A role for semaphorins and neuropilins in oligodendrocyte guidance. *J Neurochem* 85:1262-1278.
- Connors BW, Benardo LS, Prince DA (1984) Carbon dioxide sensitivity of dye coupling among glia and neurons of the neocortex. *J Neurosci* 4:1324-1330.
- Crossin KL (1991) Cytotactin binding: inhibition of stimulated proliferation and intracellular alkalinization in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11403-11407.
- Curtis R, Cohen J, Fok-Seang J, Hanley MR, Gregson NA, Reynolds R, Wilkin GP (1988) Development of macroglial cells in rat cerebellum. I. Use of antibodies to follow early in vivo development and migration of oligodendrocytes. *J Neurocytol* 17:43-54.
- Dashiell SM, Tanner SL, Pant HC, Quarles RH (2002) Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. *J Neurochem* 81:1263-1272.
- Daumas P, Andersen OS (1993) Proton block of rat brain sodium channels. Evidence for two proton binding sites and multiple occupancy. *J Gen Physiol* 101:27-43.
- de La Rosa A, Vilarino N, Vieytes R, Botana M (2002) Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, stimulates the activity of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-independent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers in human lymphocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365:74-81.
- DeBellard ME, Tang S, Mukhopadhyay G, Shen YJ, Filbin MT (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol Cell Neurosci* 7:89-101.
- Deitmer JW, Rose CR (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* 48:73-103.
- Deloulme JC, Janet T, Au D, Storm DR, Sensenbrenner M, Baudier J (1990) Neuromodulin (GAP43): a neuronal protein kinase C substrate is also present in 0-2A glial cell lineage. Characterization of neuromodulin in secondary cultures of oligodendrocytes and comparison with the neuronal antigen. *J Cell Biol* 111:1559-1569.
- Denker SP, Barber DL (2002a) Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 14:214-220.
- Denker SP, Barber DL (2002b) Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol* 159:1087-1096.
- Denker SP, Huang DC, Orłowski J, Furthmayr H, Barber DL (2000) Direct binding of the Na-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Mol Cell* 6:1425-1436.
- Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11:1421-1432.
- Desai DS, Hirai S, Karnes WE, Jr., Niles RM, Ohno S (1999) Cloning and characterization of the murine PKC alpha promoter: identification of a retinoic acid response element. *Biochem Biophys Res Commun* 263:28-34.
- Desilets M, Pucéat M, Vassort G (1994) Chloride dependence of pH modulation by beta-adrenergic agonist in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 75:862-869.

## Bibliographie

- Dhanasekaran N, Prasad MV, Wadsworth SJ, Dermott JM, van Rossum G (1994) Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger by G alpha 12 class of G proteins. *J Biol Chem* 269:11802-11806.
- Diaz-Diaz FD, LaBelle EF, Eaton DC, DuBose TD, Jr. (1986) ATP-dependent proton transport in human renal medulla. *Am J Physiol* 251:F297-302.
- Dickinson PJ, Fanarraga ML, Griffiths IR, Barrie JM, Kyriakides E, Montague P (1996) Oligodendrocyte progenitors in the embryonic spinal cord express DM-20. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22:188-198.
- Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R (1998) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *Embo J* 17:4213-4225.
- Drapeau P, Nachshen DA (1988) Effects of lowering extracellular and cytosolic pH on calcium fluxes, cytosolic calcium levels, and transmitter release in presynaptic nerve terminals isolated from rat brain. *J Gen Physiol* 91:305-315.
- Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RA, Uphoff CC, Hu ZB (1995) Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res* 19:681-691.
- Dringen R, Bergbauer K, Wiesinger H, Hamprecht B (1994) Utilization of mannose by astroglial cells. *Neurochem Res* 19:23-30.
- Du J, Frieden C (1998) Kinetic studies on the effect of yeast cofilin on yeast actin polymerization. *Biochemistry* 37:13276-13284.
- Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA (1986) Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102:384-392.
- Durand B, Gao FB, Raff M (1997) Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* 16:306-317.
- Durand B, Fero ML, Roberts JM, Raff MC (1998) p27Kip1 alters the response of cells to mitogen and is part of a cell-intrinsic timer that arrests the cell cycle and initiates differentiation. *Curr Biol* 8:431-440.
- Durand B, Saunders M, Leroy P, Leid M, Chambon P (1992) All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 71:73-85.
- Dyer CA, Benjamins JA (1988) Antibody to galactocerebroside alters organization of oligodendroglial membrane sheets in culture. *J Neurosci* 8:4307-4318.
- Dyer CA, Matthieu JM (1994) Antibodies to myelin/oligodendrocyte-specific protein and myelin/oligodendrocyte glycoprotein signal distinct changes in the organization of cultured oligodendroglial membrane sheets. *J Neurochem* 62:777-787.
- Eisenbarth GS, Walsh FS, Nirenberg M (1979) Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4913-4917.
- Ellison JA, de Vellis J (1994) Platelet-derived growth factor receptor is expressed by cells in the early oligodendrocyte lineage. *J Neurosci Res* 37:116-128.
- Engel J, Bohn MC (1992) Effects of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF) on glial precursor cell proliferation: age dependency and brain region specificity. *Dev Biol* 152:363-372.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Fan J, Mansfield SG, Redmond T, Gordon-Weeks PR, Raper JA (1993) The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol* 121:867-878.

## Bibliographie

- Farsetti A, Desvergne B, Hallenbeck P, Robbins J, Nikodem VM (1992) Characterization of myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter. *J Biol Chem* 267:15784-15788.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 ( Pt 3):393-399.
- Ffrench-Constant C, Miller RH, Burne JF, Raff MC (1988) Evidence that migratory oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells are kept out of the rat retina by a barrier at the eye-end of the optic nerve. *J Neurocytol* 17:13-25.
- Filbin MT (1996) The muddle with MAG. *Mol Cell Neurosci* 8:84-92.
- Fok-Seang J, Miller RH (1994) Distribution and differentiation of A2B5+ glial precursors in the developing rat spinal cord. *J Neurosci Res* 37:219-235.
- Forgac M (1989) Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* 69:765-796.
- Forgac M, Cantley L, Wiedenmann B, Altstiel L, Branton D (1983) Clathrin-coated vesicles contain an ATP-dependent proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1300-1303.
- Frail DE, Braun PE (1984) Two developmentally regulated messenger RNAs differing in their coding region may exist for the myelin-associated glycoprotein. *J Biol Chem* 259:14857-14862.
- Fressinaud C, Vallat JM, Labourdette G (1995) Basic fibroblast growth factor down-regulates myelin basic protein gene expression and alters myelin compaction of mature oligodendrocytes in vitro. *J Neurosci Res* 40:285-293.
- Friessen AJ, Miskimins WK, Miskimins R (1997) Cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 is expressed at high levels in cells that express a myelinating phenotype. *J Neurosci Res* 50:373-382.
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1999) Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126:457-467.
- Fujisawa H, Kitsukawa T (1998) Receptors for collapsin/semaphorins. *Curr Opin Neurobiol* 8:587-592.
- Gaillard S, Bossu JL (1995) Voltage-gated ionic currents in mature oligodendrocytes isolated from rat cerebellum. *Neurosci Lett* 190:191-194.
- Gallagher JP, Nakamura J, Shinnick-Gallagher P (1983) The effects of temperature, pH and Cl-pump inhibitors on GABA responses recorded from cat dorsal root ganglia. *Brain Res* 267:249-259.
- Gallo V, Bertolotto A, Levi G (1987a) The proteoglycan chondroitin sulfate is present in a subpopulation of cultured astrocytes and in their precursors. *Dev Biol* 123:282-285.
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS (1987b) The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7:2203-2213.
- Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC (1996) Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K<sup>+</sup> channel block. *J Neurosci* 16:2659-2670.
- Gard AL, Pfeiffer SE (1989) Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage: myelinogenic potential in a defined environment. *Development* 106:119-132.
- Gard AL, Pfeiffer SE (1993) Glial cell mitogens bFGF and PDGF differentially regulate development of O4+GalC- oligodendrocyte progenitors. *Dev Biol* 159:618-630.

## Bibliographie

- Gerson DF (1981) The relation between intracellular pH and DNA synthesis rate in proliferating lymphocytes. *Kroc Found Ser* 15:375-383.
- Ghandour MS, Skoff RP (1991) Double-labeling in situ hybridization analysis of mRNAs for carbonic anhydrase II and myelin basic protein: expression in developing cultured glial cells. *Glia* 4:1-10.
- Ghandour MS, Vincendon G, Gombos G, Limozin N, Filippi D, Dalmaso C, Laurent G (1980a) Carbonic anhydrase and oligodendroglia in developing rat cerebellum: a biochemical and immunohistological study. *Dev Biol* 77:73-83.
- Ghandour MS, Langley OK, Vincendon G, Gombos G, Filippi D, Limozin N, Dalmaso D, Laurent G (1980b) Immunochemical and immunohistochemical study of carbonic anhydrase II in adult rat cerebellum: a marker for oligodendrocytes. *Neuroscience* 5:559-571.
- Ghiani CA, Eisen AM, Yuan X, DePinho RA, McBain CJ, Gallo V (1999a) Neurotransmitter receptor activation triggers p27(Kip1) and p21(CIP1) accumulation and G1 cell cycle arrest in oligodendrocyte progenitors. *Development* 126:1077-1090.
- Ghiani CA, Yuan X, Eisen AM, Knutson PL, DePinho RA, McBain CJ, Gallo V (1999b) Voltage-activated K<sup>+</sup> channels and membrane depolarization regulate accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1) and p21(CIP1) in glial progenitor cells. *J Neurosci* 19:5380-5392.
- Giaume C, Fromaget C, el Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D (1991) Gap junctions in cultured astrocytes: single-channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* 6:133-143.
- Gilbert P, Kettenmann H, Schachner M (1984) gamma-Aminobutyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. *J Neurosci* 4:561-569.
- Girard PR, Mazzei GJ, Kuo JF (1986) Immunological quantitation of phospholipid/Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase and its fragments. Tissue levels, subcellular distribution, and ontogenetic changes in brain and heart. *J Biol Chem* 261:370-375.
- Gluck S, Al-Awqati Q (1984) An electrogenic proton-translocating adenosine triphosphatase from bovine kidney medulla. *J Clin Invest* 73:1704-1710.
- Gluck S, Kelly S, Al-Awqati Q (1982a) The proton translocating ATPase responsible for urinary acidification. *J Biol Chem* 257:9230-9233.
- Gluck S, Cannon C, Al-Awqati Q (1982b) Exocytosis regulates urinary acidification in turtle bladder by rapid insertion of H<sup>+</sup> pumps into the luminal membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:4327-4331.
- Goddard DR, Berry M, Butt AM (1999) In vivo actions of fibroblast growth factor-2 and insulin-like growth factor-I on oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system. *J Neurosci Res* 57:74-85.
- Goldman JE, Hirano M, Yu RK, Seyfried TN (1984) GD3 ganglioside is a glycolipid characteristic of immature neuroectodermal cells. *J Neuroimmunol* 7:179-192.
- Goretzki L, Burg MA, Grako KA, Stallcup WB (1999) High-affinity binding of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-AA to the core protein of the NG2 proteoglycan. *J Biol Chem* 274:16831-16837.
- Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM (1996) Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:654-658.
- Goujet-Zalc C, Guerci A, Dubois G, Zalc B (1986) Schwann cell marker defined by a monoclonal antibody (224-58) with species cross-reactivity. II. Molecular characterization of the epitope. *J Neurochem* 46:435-439.

## Bibliographie

- Grako KA, Ochiya T, Barritt D, Nishiyama A, Stallcup WB (1999) PDGF (alpha)-receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. *J Cell Sci* 112 ( Pt 6):905-915.
- Grassl SM, Aronson PS (1986) Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-co-transport in basolateral membrane vesicles isolated from rabbit renal cortex. *J Biol Chem* 261:8778-8783.
- Green S, Chambon P (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 4:309-314.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280:1610-1613.
- Grinstein S, Furuya W (1984) Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in human neutrophils: mechanism of activation by chemotactic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 122:755-762.
- Grinstein S, Rothstein A (1986) Mechanisms of regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Membr Biol* 90:1-12.
- Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Rotin D (1992) Activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem* 267:23823-23828.
- Gross E, Pushkin A, Abuladze N, Fedotoff O, Kurtz I (2002) Regulation of the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 function: role of Asp(986), Asp(988) and kNBC1-carbonic anhydrase II binding. *J Physiol* 544:679-685.
- Gross E, Fedotoff O, Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Kurtz I (2003) Phosphorylation-induced modulation of pNBC1 function: distinct roles for the amino- and carboxy-termini. *J Physiol*.
- Gross E, Hawkins K, Abuladze N, Pushkin A, Cotton CU, Hopfer U, Kurtz I (2001) The stoichiometry of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBC1 is cell-type dependent. *J Physiol* 531:597-603.
- Gruol DL, Barker JL, Huang LY, MacDonald JF, Smith TG, Jr. (1980) Hydrogen ions have multiple effects on the excitability of cultured mammalian neurons. *Brain Res* 183:247-252.
- Hagag N, Lacal JC, Graber M, Aaronson S, Viola MV (1987) Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol Cell Biol* 7:1984-1988.
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.
- Hall A, Giese NA, Richardson WD (1996) Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* 122:4085-4094.
- Hardy R, Reynolds R (1991) Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development* 111:1061-1080.
- Hart IK, Richardson WD, Bolsover SR, Raff MC (1989) PDGF and intracellular signaling in the timing of oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biol* 109:3411-3417.
- Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356:618-622.
- Hashimoto T, Ase K, Sawamura S, Kikkawa U, Saito N, Tanaka C, Nishizuka Y (1988) Postnatal development of a brain-specific subspecies of protein kinase C in rat. *J Neurosci* 8:1678-1683.
- Hazav P, Shany S, Moran A, Levy R (1989) Involvement of intracellular pH elevation in the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on HL-60 cells. *Cancer Res* 49:72-75.

## Bibliographie

- He Z, Tessier-Lavigne M (1997) Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90:739-751.
- Hermans MM, Kortekaas P, Jongasma HJ, Rook MB (1995) pH sensitivity of the cardiac gap junction proteins, connexin 45 and 43. *Pflugers Arch* 431:138-140.
- Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C (1992) 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68:397-406.
- Hill DP, Robertson KA (1998) Differentiation of LA-N-5 neuroblastoma cells into cholinergic neurons: methods for differentiation, immunohistochemistry and reporter gene introduction. *Brain Res Brain Res Protoc* 2:183-190.
- Hjemdahl P, Fredholm BB (1977) Direct antilipolytic effect of acidosis in isolated rat adipocytes. *Acta Physiol Scand* 101:294-301.
- Ho AK, Chik CL (1994) Acute elevation of intracellular pH translocates protein kinase C activities in rat pinealocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 200:569-576.
- Ho AK, Ling A, Chik CL (2000) Intracellular pH on translocation of protein kinase C isozymes in rat pinealocytes. *J Neurochem* 75:1845-1851.
- Ho AK, O'Brien L, Girard M, Chik CL (1992) Intracellular pH on protein kinase C and ionomycin potentiation of isoproterenol-stimulated cyclic AMP and cyclic GMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem* 59:2304-2310.
- Hoffmann EK (1986) Anion transport systems in the plasma membrane of vertebrate cells. *Biochim Biophys Acta* 864:1-31.
- Hong HY, Varvayanis S, Yen A (2001) Retinoic acid causes MEK-dependent RAF phosphorylation through RARalpha plus RXR activation in HL-60 cells. *Differentiation* 68:55-66.
- Hooley R, Yu CY, Symons M, Barber DL (1996) G alpha 13 stimulates Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange through distinct Cdc42-dependent and RhoA-dependent pathways. *J Biol Chem* 271:6152-6158.
- Hoppe D, Kettenmann H (1989) GABA triggers a Cl<sup>-</sup> efflux from cultured mouse oligodendrocytes. *Neurosci Lett* 97:334-339.
- Hoppe D, Lux HD, Schachner M, Kettenmann H (1989) Activation of K<sup>+</sup> currents in cultured Schwann cells is controlled by extracellular pH. *Pflugers Arch* 415:22-28.
- Hosli E, Hosli L (1993) Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 40:477-506.
- Hosli L, Hosli E, Winter T, Kaser H (1993) Electrophysiological evidence for the presence of receptors for cholecystokinin and bombesin on cultured astrocytes of rat central nervous system. *Neurosci Lett* 163:145-147.
- Huang RQ, Dillon GH (1999) Effect of extracellular pH on GABA-activated current in rat recombinant receptors and thin hypothalamic slices. *J Neurophysiol* 82:1233-1243.
- Huff RM (1996) Signal transduction pathways modulated by the D2 subfamily of dopamine receptors. *Cell Signal* 8:453-459.
- Hughes BA, Adorante JS, Miller SS, Lin H (1989) Apical electrogenic NaHCO<sub>3</sub> cotransport. A mechanism for HCO<sub>3</sub> absorption across the retinal pigment epithelium. *J Gen Physiol* 94:125-150.
- Ingber DE, Prusty D, Frangioni JV, Cragoe EJ, Jr., Lechene C, Schwartz MA (1990) Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 110:1803-1811.
- Isfort RJ, Stuard SB, Cody DB, Ridder GM, LeBoeuf RA (1995) Modulation of the platelet-derived-growth-factor-induced calcium signal by extracellular/intracellular pH in Syrian hamster embryo cells. Implications for the role of calcium in mitogenic signalling. *Eur J Biochem* 234:801-810.

## Bibliographie

- Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB, LeBoeuf RA (1993) Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. *Eur J Biochem* 213:349-357.
- Ishibashi K, Sasaki S, Marumo F (1998) Molecular cloning of a new sodium bicarbonate cotransporter cDNA from human retina. *Biochem Biophys Res Commun* 246:535-538.
- Ishizuka I, Inomata M, Ueno K, Yamakawa T (1978) Sulfated glyceroglycolipids in rat brain. Structure sulfation in vivo, and accumulation in whole brain during development. *J Biol Chem* 253:898-907.
- Jameson L, Frey T, Zeeberg B, Dalldorf F, Caplow M (1980) Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 19:2472-2479.
- Jaramillo ML, Afar DE, Almazan G, Bell JC (1994) Identification of tyrosine 620 as the major phosphorylation site of myelin-associated glycoprotein and its implication in interacting with signaling molecules. *J Biol Chem* 269:27240-27245.
- Jean T, Frelin C, Vigne P, Barbry P, Lazdunski M (1985) Biochemical properties of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in rat brain synaptosomes. Interdependence of internal and external pH control of the exchange activity. *J Biol Chem* 260:9678-9684.
- Jensen NA, Smith GM, Garvey JS, Shine HD, Hood L (1993) Cyclic AMP has a differentiative effect on an immortalized oligodendrocyte cell line. *J Neurosci Res* 35:288-296.
- Johnson PW, Abramow-Newerly W, Seilheimer B, Sadoul R, Tropak MB, Arquint M, Dunn RJ, Schachner M, Roder JC (1989) Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. *Neuron* 3:377-385.
- Kaila K (1994) Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog Neurobiol* 42:489-537.
- Kanashiro CA, Khalil RA (1998) Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:974-985.
- Kanfer J, Parenty M, Goujet-Zalc C, Monge M, Bernier L, Campagnoni AT, Dautigny A, Zalc B (1989) Developmental expression of myelin proteolipid, basic protein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase transcripts in different rat brain regions. *J Mol Neurosci* 1:39-46.
- Kerlero de Rosbo N, Honegger P, Lassmann H, Matthieu JM (1990) Demyelination induced in aggregating brain cell cultures by a monoclonal antibody against myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 55:583-587.
- Kettenmann H, Ransom BR (1988) Electrical coupling between astrocytes and between oligodendrocytes studied in mammalian cell cultures. *Glia* 1:64-73.
- Kettenmann H, Schlue WR (1988) Intracellular pH regulation in cultured mouse oligodendrocytes. *J Physiol* 406:147-162.
- Kettenmann H, Orkand RK, Schachner M (1983) Coupling among identified cells in mammalian nervous system cultures. *J Neurosci* 3:506-516.
- Kettenmann H, Gilbert P, Schachner M (1984) Depolarization of cultured oligodendrocytes by glutamate and GABA. *Neurosci Lett* 47:271-276.
- Khuri FR, Cho Y, Talmage DA (1996) Retinoic acid-induced transition from protein kinase C beta to protein kinase C alpha in differentiated F9 cells: correlation with altered regulation of proto-oncogene expression by phorbol esters. *Cell Growth Differ* 7:595-602.

## Bibliographie

- Kindregan HC, Rosenbaum SE, Ohno S, Niles RM (1994) Characterization of conventional protein kinase C (PKC) isotype expression during F9 teratocarcinoma differentiation. Overexpression of PKC alpha alters the expression of some differentiation-dependent genes. *J Biol Chem* 269:27756-27761.
- Kirchhoff F, Hofer HW, Schachner M (1993) Myelin-associated glycoprotein is phosphorylated by protein kinase C. *J Neurosci Res* 36:368-381.
- Kjoller L, Hall A (1999) Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 253:166-179.
- Klostermann A, Lohrum M, Adams RH, Puschel AW (1998) The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J Biol Chem* 273:7326-7331.
- Knapp PE, Itkis OS, Zhang L, Spruce BA, Bakalkin G, Hauser KF (2001) Endogenous opioids and oligodendroglial function: possible autocrine/paracrine effects on cell survival and development. *Glia* 35:156-165.
- Koch KS, Leffert HL (1979a) Ionic landmarks along the mitogenic route. *Nature* 279:104-105.
- Koch KS, Leffert HL (1979b) Increased sodium ion influx is necessary to initiate rat hepatocyte proliferation. *Cell* 18:153-163.
- Kondo K, Hashimoto H, Kitanaka J, Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T, Baba A (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci Lett* 188:140-142.
- Konnerth A, Lux HD, Morad M (1987) Proton-induced transformation of calcium channel in chick dorsal root ganglion cells. *J Physiol* 386:603-633.
- Kopito RR, Lodish HF (1985) Primary structure and transmembrane orientation of the murine anion exchange protein. *Nature* 316:234-238.
- Kopito RR, Lee BS, Simmons DM, Lindsey AE, Morgans CW, Schneider K (1989) Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* 59:927-937.
- Koppel AM, Raper JA (1998) Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J Biol Chem* 273:15708-15713.
- Kottis V, Thibault P, Mikol D, Xiao ZC, Zhang R, Dergham P, Braun PE (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem* 82:1566-1569.
- Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Zantema A (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 131:227-234.
- Krump E, Nikitas K, Grinstein S (1997) Induction of tyrosine phosphorylation and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activation during shrinkage of human neutrophils. *J Biol Chem* 272:17303-17311.
- Krushel LA, Prieto AL, Edelman GM, Crossin KL (1994) Differential effects of cytotactin/tenascin fusion proteins on intracellular pH and cell morphology. *J Cell Physiol* 161:508-518.
- Krust A, Kastner P, Petkovich M, Zelent A, Chambon P (1989) A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5310-5314.
- Kuhn TB, Meberg PJ, Brown MD, Bernstein BW, Minamide LS, Jensen JR, Okada K, Soda EA, Bamburg JR (2000) Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J Neurobiol* 44:126-144.
- Kumar S, Kahn MA, Dinh L, de Vellis J (1998) NT-3-mediated TrkC receptor activation promotes proliferation and cell survival of rodent progenitor oligodendrocyte cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 54:754-765.

## Bibliographie

- Kundu SK, Pleatman MA, Redwine WA, Boyd AE, Marcus DM (1983) Binding of monoclonal antibody A2B5 to gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun* 116:836-842.
- Kurashima K, D'Souza S, Szaszi K, Ramjeesingh R, Orlowski J, Grinstein S (1999) The apical Na(+)/H(+) exchanger isoform NHE3 is regulated by the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 274:29843-29849.
- Kureny DE, Barnes S (1994) Proton modulation of M-like potassium current (IKx) in rod photoreceptors. *Neurosci Lett* 170:225-228.
- Lacoste I, Harvey BJ, Ehrenfeld J (1991) Cl<sup>-</sup> permeability of the basolateral membrane of the *Rana esculenta* epithelium: activation of Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange by alkaline intracellular pH. *Biochim Biophys Acta* 1063:103-110.
- Ladoux A, Cragoe EJ, Jr., Geny B, Abita JP, Frelin C (1987) Differentiation of human promyelocytic HL 60 cells by retinoic acid is accompanied by an increase in the intracellular pH. The role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system. *J Biol Chem* 262:811-816.
- Ladoux A, Damais C, Krawice I, Abita JP, Frelin C (1988a) An increase in intracellular pH is a general response of promonocytic cells to differentiating agents. *FEBS Lett* 234:353-356.
- Ladoux A, Miglierina R, Krawice I, Cragoe EJ, Jr., Abita JP, Frelin C (1988b) Single-cell analysis of the intracellular pH and its regulation during the monocytic differentiation of U937 human leukemic cells. *Eur J Biochem* 175:455-460.
- Laeng P, Decimo D, Pettmann B, Janet T, Labourdette G (1994) Retinoic acid regulates the development of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *J Neurosci Res* 39:613-633.
- Lagadic-Gossmann D, Vaughan-Jones RD, Buckler KJ (1992) Adrenaline and extracellular ATP switch between two modes of acid extrusion in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 458:385-407.
- Lai C, Watson JB, Bloom FE, Sutcliffe JG, Milner RJ (1987) Neural protein 1B236/myelin-associated glycoprotein (MAG) defines a subgroup of the immunoglobulin superfamily. *Immunol Rev* 100:129-151.
- Landau EM, Nachshen DA (1975) The interaction of pH and divalent cations at the neuromuscular junction. *J Physiol* 251:775-790.
- Lauder JM (1993) Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* 16:233-240.
- Lebar R, Vincent C, Fischer-le Boubennec E (1979) Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig--III. A comparative study of two autoantigens of central nervous system myelin. *J Neurochem* 32:1451-1460.
- Lebar R, Boutry JM, Vincent C, Robineaux R, Voisin GA (1976) Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor. *J Immunol* 116:1439-1446.
- Lee BS, Gunn RB, Kopito RR (1991) Functional differences among nonerythroid anion exchangers expressed in a transfected human cell line. *J Biol Chem* 266:11448-11454.
- Levi G, Gallo V, Ciotti MT (1986) Bipotential precursors of putative fibrous astrocytes and oligodendrocytes in rat cerebellar cultures express distinct surface features and "neuron-like" gamma-aminobutyric acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1504-1508.

## Bibliographie

- Levi G, Aloisi F, Wilkin GP (1987) Differentiation of cerebellar bipotential glial precursors into oligodendrocytes in primary culture: developmental profile of surface antigens and mitotic activity. *J Neurosci Res* 18:407-417.
- Levine JM, Nishiyama A (1996) The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells. *Perspect Dev Neurobiol* 3:245-259.
- Li C, Tropak MB, Gerlai R, Clapoff S, Abramow-Newerly W, Trapp B, Peterson A, Roder J (1994) Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* 369:747-750.
- Li M, Morley P, Tsang BK (1991) Epidermal growth factor elevates intracellular pH in chicken granulosa cells by activating protein kinase C. *Endocrinology* 129:2957-2964.
- Li X, Alvarez B, Casey JR, Reithmeier RA, Fliegel L (2002) Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Biol Chem* 277:36085-36091.
- Lieberman EM, Hargittai PT, Grossfeld RM (1994) Electrophysiological and metabolic interactions between axons and glia in crayfish and squid. *Prog Neurobiol* 44:333-376.
- Lin CY, Varma MG, Joubel A, Madabushi S, Lichtarge O, Barber DL (2003) Conserved motifs in somatostatin, D2-dopamine, and alpha 2B-adrenergic receptors for inhibiting the Na-H exchanger, NHE1. *J Biol Chem* 278:15128-15135.
- Lin X, Voyno-Yasenetskaya TA, Hooley R, Lin CY, Orlowski J, Barber DL (1996) Galpha12 differentially regulates Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger isoforms. *J Biol Chem* 271:22604-22610.
- Linington C, Lassmann H (1987) Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol* 17:61-69.
- Liu BP, Strittmatter SM (2001) Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13:619-626.
- Liu HN, Almazan G (1995) Glutamate induces c-fos proto-oncogene expression and inhibits proliferation in oligodendrocyte progenitors: receptor characterization. *Eur J Neurosci* 7:2355-2363.
- Liu HN, Larocca JN, Almazan G (1999) Molecular pathways mediating activation by kainate of mitogen-activated protein kinase in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res Mol Brain Res* 66:50-61.
- Louis JC, Magal E, Muir D, Manthorpe M, Varon S (1992) CG-4, a new bipotential glial cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. *J Neurosci Res* 31:193-204.
- Luo Y, Shepherd I, Li J, Renzi MJ, Chang S, Raper JA (1995) A family of molecules related to collapsin in the embryonic chick nervous system. *Neuron* 14:1131-1140.
- Lutz PL (1992) Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. *Annu Rev Physiol* 54:601-618.
- Ma YH, Reusch HP, Wilson E, Escobedo JA, Fantl WJ, Williams LT, Ives HE (1994) Activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by platelet-derived growth factor involves phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C gamma. *J Biol Chem* 269:30734-30739.
- Madshus IH (1988) Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J* 250:1-8.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Chatton JY, Pierre K (2003) Energy on demand: a mechanism for astrocyte-neuron metabolic coupling. *J Neurochem* 85 Suppl 2:2.

## Bibliographie

- Maly K, Uberall F, Loferer H, Doppler W, Oberhuber H, Groner B, Grunicke HH (1989) Ha-ras activates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter by a protein kinase C-independent mechanism. *J Biol Chem* 264:11839-11842.
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM (1990) Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345:224-229.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM (1992) Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6:329-344.
- Matsuoka I, Mizuno N, Kurihara K (1989) Cholinergic differentiation of clonal rat pheochromocytoma cells (PC12) induced by retinoic acid: increase of choline acetyltransferase activity and decrease of tyrosine hydroxylase activity. *Brain Res* 502:53-60.
- Matthieu JM, Amiguet P (1990) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein expression during development in normal and myelin-deficient mice. *Dev Neurosci* 12:293-302.
- Matthieu JM, Omlin FX, Ginalski-Winkelmann H, Cooper BJ (1984) Myelination in the CNS of mld mutant mice: comparison between composition and structure. *Brain Res* 315:149-158.
- McAdams TA, Miller WM, Papoutsakis ET (1997) Variations in culture pH affect the cloning efficiency and differentiation of progenitor cells in ex vivo haemopoiesis. *Br J Haematol* 97:889-895.
- McAdams TA, Miller WM, Papoutsakis ET (1998) pH is a potent modulator of erythroid differentiation. *Br J Haematol* 103:317-325.
- McBurney MW (1993) P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol* 37:135-140.
- McCaffery P, Drager UC (2000) Regulation of retinoic acid signaling in the embryonic nervous system: a master differentiation factor. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:233-249.
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5:603-614.
- McMorris FA (1983) Cyclic AMP induction of the myelin enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in rat oligodendrocytes. *J Neurochem* 41:506-515.
- McMorris FA, Dubois-Dalcq M (1988) Insulin-like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment in rat glial progenitor cells developing in vitro. *J Neurosci Res* 21:199-209.
- McMorris FA, McKinnon RD (1996) Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease. *Brain Pathol* 6:313-329.
- Meisenholder GW, Martin SJ, Green DR, Nordberg J, Babior BM, Gottlieb RA (1996) Events in apoptosis. Acidification is downstream of protease activation and BCL-2 protection. *J Biol Chem* 271:16260-16262.
- Mellergard PE, Siesjo BK (1991) Astrocytes fail to regulate intracellular pH at moderately reduced extracellular pH. *Neuroreport* 2:695-698.
- Mellergard PE, Ouyang YB, Siesjo BK (1992) The regulation of intracellular pH in cultured astrocytes and neuroblastoma cells, and its dependence on extracellular pH in a HCO<sub>3</sub>-free solution. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S293-300.
- Meyertholen EP, Wilson MJ, Ostroy SE (1980) Removing bicarbonate/CO<sub>2</sub> reduces the cGMP concentration of the vertebrate photoreceptor to the levels normally observed on illumination. *Biochem Biophys Res Commun* 96:785-792.
- Meyertholen EP, Wilson MJ, Ostroy SE (1986) The effects of hepes, bicarbonate and calcium on the cGMP content of vertebrate rod photoreceptors and the isolated electrophysiological effects of cGMP and calcium. *Vision Res* 26:521-533.

## Bibliographie

- Mikol DD, Stefansson K (1988) A phosphatidylinositol-linked peanut agglutinin-binding glycoprotein in central nervous system myelin and on oligodendrocytes. *J Cell Biol* 106:1273-1279.
- Mikol DD, Gulcher JR, Stefansson K (1990) The oligodendrocyte-myelin glycoprotein belongs to a distinct family of proteins and contains the HNK-1 carbohydrate. *J Cell Biol* 110:471-479.
- Milner R, Edwards G, Streuli C, Ffrench-Constant C (1996) A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J Neurosci* 16:7240-7252.
- Milner RJ, Lai C, Nave KA, Montag D, Farber L, Sutcliffe JG (1990) Organization of myelin protein genes: myelin-associated glycoprotein. *Ann N Y Acad Sci* 605:254-261.
- Moe OW (1999) Acute regulation of proximal tubule apical membrane Na/H exchanger NHE-3: role of phosphorylation, protein trafficking, and regulatory factors. *J Am Soc Nephrol* 10:2412-2425.
- Molina-Holgado E, Khorchid A, Liu HN, Almazan G (2003) Regulation of muscarinic receptor function in developing oligodendrocytes by agonist exposure. *Br J Pharmacol* 138:47-56.
- Monge M, Kadiiski D, Jacque CM, Zalc B (1986) Oligodendroglial expression and deposition of four major myelin constituents in the myelin sheath during development. An in vivo study. *Dev Neurosci* 8:222-235.
- Montag D, Giese KP, Bartsch U, Martini R, Lang Y, Bluthmann H, Karthigasan J, Kirschner DA, Wintergerst ES, Nave KA, et al. (1994) Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13:229-246.
- Moolenaar WH, Tertoolen LG, de Laat SW (1984) The regulation of cytoplasmic pH in human fibroblasts. *J Biol Chem* 259:7563-7569.
- Moolenaar WH, Tsien RY, van der Saag PT, de Laat SW (1983) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 304:645-648.
- Moon A, Drubin DG (1995) The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol Biol Cell* 6:1423-1431.
- Moser H (1985) Intracellular pH regulation in the sensory neurone of the stretch receptor of the crayfish (*Astacus fluviatilis*). *J Physiol* 362:23-38.
- Mu QQ, Dyer C (1994) Developmental expression of MOSP in cultured oligodendrocytes. *Neurochem Res* 19:1033-1038.
- Muller R, Heinrich M, Heck S, Blohm D, Richter-Landsberg C (1997) Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell Tissue Res* 288:239-249.
- Muroi K, Sasaki R, Miura Y, Ohyashiki K (1989) Medium pH determines the differentiation of human promyelocytic leukemia cells to basophils or eosinophils by culturing in a protein- and serum-free medium. *Leuk Res* 13:157-163.
- Naccache PH, Therrien S, Caon AC, Liao N, Gilbert C, McColl SR (1989) Chemoattractant-induced cytoplasmic pH changes and cytoskeletal reorganization in human neutrophils. Relationship to the stimulated calcium transients and oxidative burst. *J Immunol* 142:2438-2444.
- Nave KA (1994) Neurological mouse mutants and the genes of myelin. *J Neurosci Res* 38:607-612.

## Bibliographie

- Nave KA, Lai C, Bloom FE, Milner RJ (1987) Splice site selection in the proteolipid protein (PLP) gene transcript and primary structure of the DM-20 protein of central nervous system myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5665-5669.
- Nett W, Deitmer JW (1996) Simultaneous measurements of intracellular pH in the leech giant glial cell using 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein and ion-sensitive microelectrodes. *Biophys J* 71:394-402.
- Neusch C, Rozengurt N, Jacobs RE, Lester HA, Kofuji P (2001) Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J Neurosci* 21:5429-5438.
- Neve KA, Kozlowski MR, Rosser MP (1992) Dopamine D2 receptor stimulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange assessed by quantification of extracellular acidification. *J Biol Chem* 267:25748-25753.
- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, Rogister B, Leprince P, Moonen G (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305:187-202.
- Nikolic M (2002) The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. *Int J Biochem Cell Biol* 34:731-745.
- Nishiguchi M, Tokugawa K, Yamamoto K, Akama T, Nozawa Y, Chaki S, Ueki T, Kameo K, Okuyama S (2003) Increase in secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor from glial cell lines by inhibitors of vacuolar ATPase. *Neurochem Int* 42:493-498.
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB (1996a) Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *J Neurosci Res* 43:299-314.
- Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB (1996b) Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J Neurosci Res* 43:315-330.
- Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A (1995) Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell Sci* 108 ( Pt 1):225-233.
- Noël J, Pouyssegur J (1995) Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms. *Am J Physiol* 268:C283-296.
- Noll E, Miller RH (1994) Regulation of oligodendrocyte differentiation: a role for retinoic acid in the spinal cord. *Development* 120:649-660.
- Numata M, Petrecca K, Lake N, Orłowski J (1998) Identification of a mitochondrial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *J Biol Chem* 273:6951-6959.
- Nurcombe V, Ford MD, Wildschut JA, Bartlett PF (1993) Developmental regulation of neural response to FGF-1 and FGF-2 by heparan sulfate proteoglycan. *Science* 260:103-106.
- Oberleithner H, Vogel U, Kersting U, Steigner W (1990) Madin-Darby canine kidney cells. II. Aldosterone stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange. *Pflugers Arch* 416:533-539.
- Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, Werb Z, Yong VW (1999) Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci* 19:8464-8475.
- Ohtsubo T, Wang X, Takahashi A, Ohnishi K, Saito H, Song CW, Ohnishi T (1997) p53-dependent induction of WAF1 by a low-pH culture condition in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 57:3910-3913.
- Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE (1992) Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence,

## Bibliographie

- and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* 267:9331-9339.
- Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C (1998) Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5672-5677.
- Oumesmar BN, Vignais L, Baron-Van Evercooren A (1997) Developmental expression of platelet-derived growth factor alpha-receptor in neurons and glial cells of the mouse CNS. *J Neurosci* 17:125-139.
- Padanilam BJ, Lu T, Hoshi T, Padanilam BA, Shibata EF, Lee HC (2002) Molecular determinants of intracellular pH modulation of human Kv1.4 N-type inactivation. *Mol Pharmacol* 62:127-134.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682-685.
- Pappas CA, Ransom BR (1993) A depolarization-stimulated, bafilomycin-inhibitable H<sup>+</sup> pump in hippocampal astrocytes. *Glia* 9:280-291.
- Pappas CA, Ullrich N, Sontheimer H (1994) Reduction of glial proliferation by K<sup>+</sup> channel blockers is mediated by changes in pHi. *Neuroreport* 6:193-196.
- Paris S, Pouyssegur J (1983) Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 258:3503-3508.
- Paris S, Pouyssegur J (1984) Growth factors activate the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H<sup>+</sup>. *J Biol Chem* 259:10989-10994.
- Park HJ (1995) Effects of intracellular pH on apoptosis in HL-60 human leukemia cells. *Yonsei Med J* 36:473-479.
- Paspalas CD, Papadopoulos GC (1996) Ultrastructural relationships between noradrenergic nerve fibers and non-neuronal elements in the rat cerebral cortex. *Glia* 17:133-146.
- Paudel HK, Carlson GM (1987) Inhibition of the catalytic subunit of phosphorylase kinase by its alpha/beta subunits. *J Biol Chem* 262:11912-11915.
- Pawelczyk T, Olson MS (1992) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase activity from pig kidney cortex. *Biochem J* 288 ( Pt 2):369-373.
- Pawelczyk T, Easom RA, Olson MS (1992) Effect of ionic strength and pH on the activity of pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney cortex. *Arch Biochem Biophys* 294:44-49.
- Pende M, Fisher TL, Simpson PB, Russell JT, Blenis J, Gallo V (1997) Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway. *J Neurosci* 17:1291-1301.
- Perez-Sala D, Collado-Escobar D, Mollinedo F (1995) Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J Biol Chem* 270:6235-6242.
- Perkins CS, Bray GM, Aguayo AJ (1981) Ongoing block of Schwann cell differentiation and deployment in dystrophic mouse spinal roots. *Brain Res* 227:213-220.
- Pessia M, Imbrici P, D'Adamo MC, Salvatore L, Tucker SJ (2001) Differential pH sensitivity of Kir4.1 and Kir4.2 potassium channels and their modulation by heteropolymerisation with Kir5.1. *J Physiol* 532:359-367.
- Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.

## Bibliographie

- Peyron F, Timsit S, Thomas JL, Kagawa T, Ikenaka K, Zalc B (1997) In situ expression of PLP/DM-20, MBP, and CNP during embryonic and postnatal development of the jimpy mutant and of transgenic mice overexpressing PLP. *J Neurosci Res* 50:190-201.
- Pfeiffer SE, Barbarese E, Bhat S (1981) Noncoordinate regulation of myelinogenic parameters in primary cultures of dissociated fetal rat brain. *J Neurosci Res* 6:369-380.
- Philippe JM, Dubois JM, Rouzaine-Dubois B, Cartron PF, Vallette F, Morel N (2002) Functional expression of V-ATPases in the plasma membrane of glial cells. *Glia* 37:365-373.
- Pieri C, Lustyik G, Giuli C, Bertoni-Freddari C (1984) Amiloride inhibition of triiodothyronine stimulated hepatocyte proliferation in vivo, and involvement of the intracellular Na<sup>+</sup> content in mitotic regulation: an X-ray microanalytic study. *Cytobios* 41:71-83.
- Pieri C, Muzzioli M, Giuli C, Bertoni-Freddari C (1985) Amiloride inhibits the PHA-evoked mouse splenic lymphocyte proliferation. *Boll Soc Ital Biol Sper* 61:175-181.
- Pleasure D, Parris J, Stern J, Grinspan J, Kim SU (1986) Incorporation of tritiated galactose into galactocerebroside by cultured rat oligodendrocytes: effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate analogues. *J Neurochem* 46:300-302.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9-22.
- Pouly S, Storch MK, Matthieu JM, Lassmann H, Monnet-Tschudi F, Honegger P (1997) Demyelination induced by protein kinase C-activating tumor promoters in aggregating brain cell cultures. *J Neurosci Res* 49:121-132.
- Pouysségur J, Franchi A, L'Allemain G, Paris S (1985) Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Lett* 190:115-119.
- Pouysségur J, Chambard JC, Franchi A, Paris S, Van Obberghen-Schilling E (1982) Growth factor activation of an amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in quiescent fibroblasts: coupling to ribosomal protein S6 phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3935-3939.
- Powell PP, Klagsbrun M (1993) Regulation of basic fibroblast growth factor mRNA expression in rat C6 glioma cells. *Exp Cell Res* 209:224-230.
- Pringle NP, Richardson WD (1993) A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 117:525-533.
- Pringle NP, Yu WP, Guthrie S, Roelink H, Lumsden A, Peterson AC, Richardson WD (1996) Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* 177:30-42.
- Privat A, Leblond CP (1972) The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *J Comp Neurol* 146:277-302.
- Privat A, Jacque C, Bourre JM, Dupouey P, Baumann N (1979) Absence of the major dense line in myelin of the mutant mouse "shiverer". *Neurosci Lett* 12:107-112.
- Pucéat M (1999) pHi regulatory ion transporters: an update on structure, regulation and cell function. *Cell Mol Life Sci* 55:1216-1229.
- Pucéat M, Roche S, Vassort G (1998) Src family tyrosine kinase regulates intracellular pH in cardiomyocytes. *J Cell Biol* 141:1637-1646.

## Bibliographie

- Pucéat M, Korichneva I, Cassoly R, Vassort G (1995) Identification of band 3-like proteins and Cl-/HCO<sub>3</sub>- exchange in isolated cardiomyocytes. *J Biol Chem* 270:1315-1322.
- Pukel CS, Lloyd KO, Travassos LR, Dippold WG, Oettgen HF, Old LJ (1982) GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *J Exp Med* 155:1133-1147.
- Pushkin A, Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Kurtz I (1999) Cloning, tissue distribution, genomic organization, and functional characterization of NBC3, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family. *J Biol Chem* 274:16569-16575.
- Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Lee I, Xu G, Kurtz I (2000) Two C-terminal variants of NBC4, a new member of the sodium bicarbonate cotransporter family: cloning, characterization, and localization. *IUBMB Life* 50:13-19.
- Putney LK, Barber DL (2003) Na-H exchange-dependent increase in intracellular pH times G2/M entry and transition. *J Biol Chem*.
- Quarles RH, Trapp BD (1984) Localization of myelin-associated glycoprotein. *J Neurochem* 43:1773-1777.
- Radhakrishna M, Almazan G (1994) Protein kinases mediate basic fibroblast growth factor's stimulation of proliferation and c-fos induction in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res Mol Brain Res* 24:118-128.
- Radomska-Pandya A, Chen G, Czernik PJ, Little JM, Samokyszyn VM, Carter CA, Nowak G (2000) Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem* 275:22324-22330.
- Raff MC (1989) Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* 243:1450-1455.
- Raff MC, Lillien LE (1988) Differentiation of a bipotential glial progenitor cell: what controls the timing and the choice of developmental pathway? *J Cell Sci Suppl* 10:77-83.
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396.
- Raff MC, Lillien LE, Richardson WD, Burne JF, Noble MD (1988) Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture. *Nature* 333:562-565.
- Raff MC, Mirsky R, Fields KL, Lisak RP, Dorfman SH, Silberberg DH, Gregson NA, Leibowitz S, Kennedy MC (1978) Galactocerebroside is a specific cell-surface antigenic marker for oligodendrocytes in culture. *Nature* 274:813-816.
- Raible DW, McMorris FA (1989) Cyclic AMP regulates the rate of differentiation of oligodendrocytes without changing the lineage commitment of their progenitors. *Dev Biol* 133:437-446.
- Raible DW, McMorris FA (1990) Induction of oligodendrocyte differentiation by activators of adenylate cyclase. *J Neurosci Res* 27:43-46.
- Raible DW, McMorris FA (1993) Oligodendrocyte differentiation and progenitor cell proliferation are independently regulated by cyclic AMP. *J Neurosci Res* 34:287-294.
- Raine CS, Traugott U (1984) Experimental autoimmune demyelination. Chronic relapsing models and their therapeutic implications for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 436:33-51.
- Raine CS, Cross AH (1989) Axonal dystrophy as a consequence of long-term demyelination. *Lab Invest* 60:714-725.

## Bibliographie

- Raley-Susman KM, Sapolsky RM, Kopito RR (1993) Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange function differs in adult and fetal rat hippocampal neurons. *Brain Res* 614:308-314.
- Ransom BR, Carlini WG, Connors BW (1986) Brain extracellular space: developmental studies in rat optic nerve. *Ann N Y Acad Sci* 481:87-105.
- Rao GN, Sardet C, Pouysségur J, Berk BC (1992) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene expression increases during retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL60 cells. *J Cell Physiol* 151:361-366.
- Rebollo A, Gomez J, Martinez de Aragon A, Lastres P, Silva A, Perez-Sala D (1995) Apoptosis induced by IL-2 withdrawal is associated with an intracellular acidification. *Exp Cell Res* 218:581-585.
- Reichenbach A, Siegel A, Senitz D, Smith TG, Jr. (1992) A comparative fractal analysis of various mammalian astroglial cell types. *Neuroimage* 1:69-77.
- Ressad F, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D, Carlier MF (1998) Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins. Comparison of plant and human ADFs and effect of phosphorylation. *J Biol Chem* 273:20894-20902.
- Reuss L (1984) Independence of apical membrane Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> entry in *Necturus* gallbladder epithelium. *J Gen Physiol* 84:423-445.
- Reynolds JE, Li J, Craig RW, Eastman A (1996) BCL-2 and MCL-1 expression in Chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine. *Exp Cell Res* 225:430-436.
- Reynolds R, Wilkin GP (1988a) Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development* 102:409-425.
- Reynolds R, Wilkin GP (1988b) Expression of GD3 ganglioside by developing rat cerebellar Purkinje cells in situ. *J Neurosci Res* 20:311-319.
- Ribera AB, Spitzer NC (1992) Developmental regulation of potassium channels and the impact on neuronal differentiation. *Ion Channels* 3:1-38.
- Ricard D, Rogemond V, Charrier E, Aguera M, Bagnard D, Belin MF, Thomasset N, Honnorat J (2001) Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes. *J Neurosci* 21:7203-7214.
- Richter-Landsberg C (2000) The oligodendroglia cytoskeleton in health and disease. *J Neurosci Res* 59:11-18.
- Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T (1982) Cytoplasmic pH and free Mg<sup>2+</sup> in lymphocytes. *J Cell Biol* 95:189-196.
- Robey RB, Ruiz OS, Baniqued J, Mahmud D, Espiritu DJ, Bernardo AA, Arruda JA (2001) SFKs, Ras, and the classic MAPK pathway couple muscarinic receptor activation to increased Na-HCO<sub>3</sub> cotransport activity in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F844-850.
- Robey RB, Ruiz OS, Espiritu DJ, Ibanez VC, Kear FT, Noboa OA, Bernardo AA, Arruda JA (2002) Angiotensin II stimulation of renal epithelial cell Na/HCO<sub>3</sub> cotransport activity: a central role for Src family kinase/classic MAPK pathway coupling. *J Membr Biol* 187:135-145.
- Rogers SW, Gregori NZ, Carlson N, Gahring LC, Noble M (2001) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression by O2A/oligodendrocyte progenitor cells. *Glia* 33:306-313.
- Roos A, Boron WF (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev* 61:296-434.

## Bibliographie

- Rose CR, Ransom BR (1997) Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes. *Glia* 20:299-307.
- Roussel G, Nussbaum JL (1981) Comparative localization of Wolfgram W1 and myelin basic proteins in the rat brain during ontogenesis. *Histochem J* 13:1029-1047.
- Ruitenbergh MJ, Eggers R, Boer GJ, Verhaagen J (2002a) Adeno-associated viral vectors as agents for gene delivery: application in disorders and trauma of the central nervous system. *Methods* 28:182-194.
- Ruitenbergh MJ, Plant GW, Christensen CL, Blits B, Niclou SP, Harvey AR, Boer GJ, Verhaagen J (2002b) Viral vector-mediated gene expression in olfactory ensheathing glia implants in the lesioned rat spinal cord. *Gene Ther* 9:135-146.
- Ruiz OS, Arruda JA (1992) Regulation of the renal Na-HCO<sub>3</sub> cotransporter by cAMP and Ca-dependent protein kinases. *Am J Physiol* 262:F560-565.
- Russell JM, Boron WF (1976) Role of chloride transport in regulation of intracellular pH. *Nature* 264:73-74.
- Salzer JL, Holmes WP, Colman DR (1987) The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J Cell Biol* 104:957-965.
- Sanderson MJ, Charles AC, Boitano S, Dirksen ER (1994) Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol* 98:173-187.
- Sardet C, Franchi A, Pouysségur J (1989) Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Cell* 56:271-280.
- Sardet C, Fafournoux P, Pouysségur J (1991) Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem* 266:19166-19171.
- Sassani P, Pushkin A, Gross E, Gomer A, Abuladze N, Dukkipati R, Carpenito G, Kurtz I (2002) Functional characterization of NBC4: a new electrogenic sodium-bicarbonate cotransporter. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C408-416.
- Sato-Bigbee C, Yu RK (1993) Presence of cyclic AMP response element-binding protein in oligodendrocytes. *J Neurochem* 60:2106-2110.
- Sato-Bigbee C, DeVries GH (1996) Treatment of oligodendrocytes with antisense deoxyoligonucleotide directed against CREB mRNA: effect on the cyclic AMP-dependent induction of myelin basic protein expression. *J Neurosci Res* 46:98-107.
- Sato-Bigbee C, Chan EL, Yu RK (1994) Oligodendroglial cyclic AMP response element-binding protein: a member of the CREB family of transcription factors. *J Neurosci Res* 38:621-628.
- Sato-Bigbee C, Pal S, Chu AK (1999) Different neuroligands and signal transduction pathways stimulate CREB phosphorylation at specific developmental stages along oligodendrocyte differentiation. *J Neurochem* 72:139-147.
- Schlue WR, Thomas RC (1985) A dual mechanism for intracellular pH regulation by leech neurones. *J Physiol* 364:327-338.
- Schmitt BM, Berger UV, Douglas RM, Bevenssee MO, Hediger MA, Haddad GG, Boron WF (2000) Na/HCO<sub>3</sub> cotransporters in rat brain: expression in glia, neurons, and choroid plexus. *J Neurosci* 20:6839-6848.
- Schwartz MA, Ingber DE, Lawrence M, Springer TA, Lechene C (1991) Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH. *Exp Cell Res* 195:533-535.
- Schwob VS, Clark HB, Agrawal D, Agrawal HC (1985) Electron microscopic immunocytochemical localization of myelin proteolipid protein and myelin basic protein to oligodendrocytes in rat brain during myelination. *J Neurochem* 45:559-571.

## Bibliographie

- Scolding NJ, Frith S, Linington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DA (1989) Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J Neuroimmunol* 22:169-176.
- Shirvan A, Kimron M, Holdengreber V, Ziv I, Ben-Shaul Y, Melamed S, Melamed E, Barzilai A, Solomon AS (2002) Anti-semaphorin 3A antibodies rescue retinal ganglion cells from cell death following optic nerve axotomy. *J Biol Chem* 277:49799-49807.
- Shoyab M, Todaro GJ (1980) Specific high affinity cell membrane receptors for biologically active phorbol and ingenol esters. *Nature* 288:451-455.
- Shrode LD, Rubie EA, Woodgett JR, Grinstein S (1997) Cytosolic alkalinization increases stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase (SAPK/JNK) activity and p38 mitogen-activated protein kinase activity by a calcium-independent mechanism. *J Biol Chem* 272:13653-13659.
- Simchowicz L, Cragoe EJ, Jr. (1986a) Regulation of human neutrophil chemotaxis by intracellular pH. *J Biol Chem* 261:6492-6500.
- Simchowicz L, Cragoe EJ, Jr. (1986b) Inhibition of chemotactic factor-activated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in human neutrophils by analogues of amiloride: structure-activity relationships in the amiloride series. *Mol Pharmacol* 30:112-120.
- Small RK, Riddle P, Noble M (1987) Evidence for migration of oligodendrocyte--type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328:155-157.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
- Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieu JM, Zalc B (1996) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia* 18:39-48.
- Soltoff SP, Cantley LC (1988) Mitogens and ion fluxes. *Annu Rev Physiol* 50:207-223.
- Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83:311-327.
- Sontheimer H, Trotter J, Schachner M, Kettenmann H (1989a) Channel expression correlates with differentiation stage during the development of oligodendrocytes from their precursor cells in culture. *Neuron* 2:1135-1145.
- Sontheimer H, Perouansky M, Hoppe D, Lux HD, Grantyn R, Kettenmann H (1989b) Glial cells of the oligodendrocyte lineage express proton-activated Na<sup>+</sup> channels. *J Neurosci Res* 24:496-500.
- Spassky N, Heydon K, Mangatal A, Jankovski A, Olivier C, Queraud-Lesaux F, Goujet-Zalc C, Thomas JL, Zalc B (2001) Sonic hedgehog-dependent emergence of oligodendrocytes in the telencephalon: evidence for a source of oligodendrocytes in the olfactory bulb that is independent of PDGFRalpha signaling. *Development* 128:4993-5004.
- Spassky N, de Castro F, Le Bras B, Heydon K, Queraud-LeSaux F, Bloch-Gallego E, Chedotal A, Zalc B, Thomas JL (2002) Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci* 22:5992-6004.
- Spassky N, Goujet-Zalc C, Parmantier E, Olivier C, Martinez S, Ivanova A, Ikenaka K, Macklin W, Cerruti I, Zalc B, Thomas JL (1998) Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *J Neurosci* 18:8331-8343.
- Staines WA, Craig J, Reuhl K, McBurney MW (1996) Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. *Neuroscience* 71:845-853.

## Bibliographie

- Stariha RL, Kim SU (2001a) Mitogen-activated protein kinase signalling in oligodendrocytes: a comparison of primary cultures and CG-4. *Int J Dev Neurosci* 19:427-437.
- Stariha RL, Kim SU (2001b) Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase signalling in oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* 52:680-688.
- Stariha RL, Kikuchi S, Siow YL, Pelech SL, Kim M, Kim SU (1997) Role of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in oligodendroglial process extension. *J Neurochem* 68:945-953.
- Steinmetz PR, Andersen OS (1982) Electrogenic proton transport in epithelial membranes. *J Membr Biol* 65:155-174.
- Strait KA, Carlson DJ, Schwartz HL, Oppenheimer JH (1997) Transient stimulation of myelin basic protein gene expression in differentiating cultured oligodendrocytes: a model for 3,5,3'-triiodothyronine-induced brain development. *Endocrinology* 138:635-641.
- Sumi T, Matsumoto K, Takai Y, Nakamura T (1999) Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J Cell Biol* 147:1519-1532.
- Sundaram M, Sivaprasadarao A, DeSousa MM, Findlay JB (1998) The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *J Biol Chem* 273:3336-3342.
- Szaszi K, Kurashima K, Kapus A, Paulsen A, Kaibuchi K, Grinstein S, Orłowski J (2000) RhoA and rho kinase regulate the epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3. Role of myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 275:28599-28606.
- Szatkowski M, Schlue WR (1992) Mechanisms of pH recovery from intracellular acid loads in the leech connective glial cell. *Glia* 5:193-200.
- Takahashi E, Abe J, Gallis B, Aebersold R, Spring DJ, Krebs EG, Berk BC (1999) p90(RSK) is a serum-stimulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1. *J Biol Chem* 274:20206-20214.
- Takeda M, Nelson DJ, Soliven B (1995) Calcium signaling in cultured rat oligodendrocytes. *Glia* 14:225-236.
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM (1999) Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99:71-80.
- Tang CM, Dichter M, Morad M (1990) Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H<sup>+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6445-6449.
- Tang XM, Beesley JS, Grinspan JB, Seth P, Kamholz J, Cambi F (1999) Cell cycle arrest induced by ectopic expression of p27 is not sufficient to promote oligodendrocyte differentiation. *J Cell Biochem* 76:270-279.
- Terzic A, Pucéat M, Clement-Chomienne O, Vassort G (1992) Phenylephrine and ATP enhance an amiloride insensitive bicarbonate-dependent alkalinizing mechanism in rat single cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346:597-600.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Thomas D, Ritz MF, Malviya AN, Gaillard S (1996) Intracellular acidification mediates the proliferative response of PC12 cells induced by potassium ferricyanide and involves MAP kinase activation. *Int J Cancer* 68:547-552.

## Bibliographie

- Thomas JL, Spassky N, Perez Villegas EM, Olivier C, Cobos I, Goujet-Zalc C, Martinez S, Zalc B (2000) Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embryonic brain. *J Neurosci Res* 59:471-476.
- Thomas RC (1976) Ionic mechanism of the H<sup>+</sup> pump in a snail neurone. *Nature* 262:54-55.
- Thomas RC (1977) The role of bicarbonate, chloride and sodium ions in the regulation of intracellular pH in snail neurones. *J Physiol* 273:317-338.
- Thomas RC (1978) Comparison of the mechanisms controlling intracellular pH and sodium in snail neurones. *Respir Physiol* 33:63-73.
- Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B (1995) Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* 15:1012-1024.
- Timsit SG, Bally-Cuif L, Colman DR, Zalc B (1992) DM-20 mRNA is expressed during the embryonic development of the nervous system of the mouse. *J Neurochem* 58:1172-1175.
- Tokmakov AA, Sato KI, Fukami Y (2000) Deregulation of mitogen-activated protein kinase at low pH due to a structural rearrangement of activation segment. *Biochim Biophys Acta* 1476:66-74.
- Tokumoto YM, Durand B, Raff MC (1999) An analysis of the early events when oligodendrocyte precursor cells are triggered to differentiate by thyroid hormone, retinoic acid, or PDGF withdrawal. *Dev Biol* 213:327-339.
- Tokumoto YM, Tang DG, Raff MC (2001) Two molecularly distinct intracellular pathways to oligodendrocyte differentiation: role of a p53 family protein. *Embo J* 20:5261-5268.
- Tombaugh GC, Somjen GG (1996) Effects of extracellular pH on voltage-gated Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in isolated rat CA1 neurons. *J Physiol* 493 ( Pt 3):719-732.
- Tominaga T, Barber DL (1998) Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell* 9:2287-2303.
- Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S, Barber DL (1998) p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *Embo J* 17:4712-4722.
- Tosic M, Torch S, Comte V, Dolivo M, Honegger P, Matthieu JM (1992) Triiodothyronine has diverse and multiple stimulating effects on expression of the major myelin protein genes. *J Neurochem* 59:1770-1777.
- Trapp BD, Nishiyama A, Cheng D, Macklin W (1997) Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 137:459-468.
- Traynelis SF, Cull-Candy SG (1991) Pharmacological properties and H<sup>+</sup> sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones. *J Physiol* 433:727-763.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268:873-876.
- Tryoen-Toth P, Gaveriaux-Ruff C, Labourdette G (2000) Down-regulation of mu-opioid receptor expression in rat oligodendrocytes during their development in vitro. *J Neurosci Res* 60:10-20.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.
- Tsai HH, Miller RH (2002) Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci* 25:173-175; discussion 175-176.
- Tse CM, Levine SA, Yun CH, Khurana S, Donowitz M (1994) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-2 is an O-linked but not an N-linked sialoglycoprotein. *Biochemistry* 33:12954-12961.

## Bibliographie

- Tse CM, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Little PJ, Pouysségur J, Donowitz M (1993) Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform (NHE-2). *J Biol Chem* 268:11917-11924.
- Ueno S, Nakaye T, Akaike N (1992) Proton-induced sodium current in freshly dissociated hypothalamic neurones of the rat. *J Physiol* 447:309-327.
- Uhm JH, Dooley NP, Oh LY, Yong VW (1998) Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix. *Glia* 22:53-63.
- Umemori H, Sato S, Yagi T, Aizawa S, Yamamoto T (1994) Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* 367:572-576.
- Vaillant AR, Zanassi P, Walsh GS, Aumont A, Alonso A, Miller FD (2002) Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron* 34:985-998.
- Van Dyke RW, Hornick CA, Belcher J, Scharschmidt BF, Havel RJ (1985) Identification and characterization of ATP-dependent proton transport by rat liver multivesicular bodies. *J Biol Chem* 260:11021-11026.
- Varju P, Katarova Z, Madarasz E, Szabo G (2001) GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res* 305:239-246.
- Vartanian T, Szuchet S, Dawson G, Campagnoni AT (1986) Oligodendrocyte adhesion activates protein kinase C-mediated phosphorylation of myelin basic protein. *Science* 234:1395-1398.
- Verkhatsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380-412.
- Virkki LV, Wilson DA, Vaughan-Jones RD, Boron WF (2002) Functional characterization of human NBC4 as an electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (NBCe2). *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1278-1289.
- Volk C, Albert T, Kempfski OS (1998) A proton-translocating H<sup>+</sup>-ATPase is involved in C6 glial pH regulation. *Biochim Biophys Acta* 1372:28-36.
- von Blankenfeld G, Kettenmann H (1991) Glutamate and GABA receptors in vertebrate glial cells. *Mol Neurobiol* 5:31-43.
- Vouyiouklis DA, Brophy PJ (1995) Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors. *J Neurosci Res* 42:803-817.
- Vyklicky L, Jr., Vlachova V, Krusek J (1990) The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *J Physiol* 430:497-517.
- Walters SN, Morell P (1981) Effects of altered thyroid states on myelinogenesis. *J Neurochem* 36:1792-1801.
- Walz W (1989) Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Prog Neurobiol* 33:309-333.
- Walz W, Hertz L (1983) Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. *Prog Neurobiol* 20:133-183.
- Walz W, Hinks EC (1987) Extracellular hydrogen ions influence channel-mediated and carrier-mediated K<sup>+</sup> fluxes in cultured mouse astrocytes. *Neuroscience* 20:341-346.
- Wang DN (1994) Band 3 protein: structure, flexibility and function. *FEBS Lett* 346:26-31.
- Wang H, Singh D, Fliegel L (1997) The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter potentiates growth and retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* 272:26545-26549.

## Bibliographie

- Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Guo Y, Neve RL, He Z (2002) Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-944.
- Wang X, Studzinski GP (2001) Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced differentiation of HL60 cells. *J Cell Biochem* 80:471-482.
- Wang Z, Schultheis PJ, Shull GE (1996) Three N-terminal variants of the AE2 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters. *J Biol Chem* 271:7835-7843.
- Wang Z, Conforti L, Petrovic S, Amlal H, Burnham CE, Soleimani M (2001) Mouse Na<sup>+</sup>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter isoform NBC-3 (kNBC-3): cloning, expression, and renal distribution. *Kidney Int* 59:1405-1414.
- Warf BC, Fok-Seang J, Miller RH (1991) Evidence for the ventral origin of oligodendrocyte precursors in the rat spinal cord. *J Neurosci* 11:2477-2488.
- Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S (1995) Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *J Clin Invest* 95:2143-2149.
- Weinman EJ, Steplock D, Tate K, Hall RA, Spurney RF, Shenolikar S (1998) Structure-function of recombinant Na/H exchanger regulatory factor (NHE-RF). *J Clin Invest* 101:2199-2206.
- Weise B, Janet T, Grothe C (1993) Localization of bFGF and FGF-receptor in the developing nervous system of the embryonic and newborn rat. *J Neurosci Res* 34:442-453.
- Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91:439-442.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994) Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13:583-594.
- Wilson R, Brophy PJ (1989) Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *J Neurosci Res* 22:439-448.
- Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Spriggs MK, Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1998) Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95:903-916.
- Wood AM, Bidey SP, Soden J, Robertson WR (1992) Long-term effects of thyroid stimulating hormone and insulin on intracellular pH in FRTL-5 cells. *J Endocrinol* 133:R9-11.
- Xu H, Yang Z, Cui N, Chanchevalap S, Valesky WW, Jiang C (2000) A single residue contributes to the difference between Kir4.1 and Kir1.1 channels in pH sensitivity, rectification and single channel conductance. *J Physiol* 528 Pt 2:267-277.
- Yajima M, Ui M (1975) Carbohydrate metabolism and its response to catecholamines as modified in alkalotic rat. *Am J Physiol* 228:1046-1052.
- Yamaguchi DT, Huang JT, Ma D (1995) Regulation of gap junction intercellular communication by pH in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 10:1891-1899.
- Yan W, Nehrke K, Choi J, Barber DL (2001) The Nck-interacting kinase (NIK) phosphorylates the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger NHE1 and regulates NHE1 activation by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 276:31349-31356.
- Yanaka A, Carter KJ, Goddard PJ, Silen W (1992) Prostaglandin stimulates Cl<sup>(-)</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-exchange in amphibian oxynticopeptic cells. *Am J Physiol* 262:G44-49.

## Bibliographie

- Yannoukakos D, Vasseur C, Piau JP, Wajcman H, Bursaux E (1991) Phosphorylation sites in human erythrocyte band 3 protein. *Biochim Biophys Acta* 1061:253-266.
- Yen A, Roberson MS, Varvayanis S, Lee AT (1998) Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Res* 58:3163-3172.
- Yin X, Peterson J, Gravel M, Braun PE, Trapp BD (1997) CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction. *J Neurosci Res* 50:238-247.
- Yong VW, Dooley NP, Noble PG (1994) Protein kinase C in cultured adult human oligodendrocytes: a potential role for isoform alpha as a mediator of process outgrowth. *J Neurosci Res* 39:83-96.
- Yong VW, Sekiguchi S, Kim MW, Kim SU (1988) Phorbol ester enhances morphological differentiation of oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res* 19:187-194.
- Yong VW, Cheung JC, Uhm JH, Kim SU (1991) Age-dependent decrease of process formation by cultured oligodendrocytes is augmented by protein kinase C stimulation. *J Neurosci Res* 29:87-99.
- Yoo AS, Krieger C, Kim SU (1999) Process extension and intracellular Ca<sup>2+</sup> in cultured murine oligodendrocytes. *Brain Res* 827:19-27.
- Yoshitomi K, Burckhardt BC, Fromter E (1985) Rheogenic sodium-bicarbonate cotransport in the peritubular cell membrane of rat renal proximal tubule. *Pflugers Arch* 405:360-366.
- Yu WP, Collarini EJ, Pringle NP, Richardson WD (1994) Embryonic expression of myelin genes: evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* 12:1353-1362.
- Zeller NK, Hunkeler MJ, Campagnoni AT, Sprague J, Lazzarini RA (1984) Characterization of mouse myelin basic protein messenger RNAs with a myelin basic protein cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:18-22.
- Zetterberg A, Engstrom W (1981) Mitogenic effect of alkaline pH on quiescent, serum-starved cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4334-4338.
- Zizak M, Lamprecht G, Steplock D, Tariq N, Shenolikar S, Donowitz M, Yun CH, Weinman EJ (1999) cAMP-induced phosphorylation and inhibition of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchanger 3 (NHE3) are dependent on the presence but not the phosphorylation of NHE regulatory factor. *J Biol Chem* 274:24753-24758.