



**HAL**  
open science

**Etude du peptidome du cervelet de rat au cours du développement et identification des effets neurotrophiques de la nociceptine dans la mise en place des neurones en grain.**

Auriane Corbière

► **To cite this version:**

Auriane Corbière. Etude du peptidome du cervelet de rat au cours du développement et identification des effets neurotrophiques de la nociceptine dans la mise en place des neurones en grain.. Biologie du développement. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR063 . tel-01819085

**HAL Id: tel-01819085**

**<https://theses.hal.science/tel-01819085>**

Submitted on 20 Jun 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

# THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Préparée au sein de l'Université Rouen Normandie**

**Etude du peptidome du cervelet de rat au cours du développement et identification des effets neurotrophiques de la nociceptine dans la mise en place des neurones en grain**

**Présentée et soutenue par  
Auriane CORBIERE**

**Thèse soutenue publiquement le 19 décembre 2017  
devant le jury composé de**

|                        |  |            |
|------------------------|--|------------|
| Charles PINEAU         | Directeur de Recherche à l'INSERM,<br>Université de Rennes | Rapporteur |
| Vincent LELIEVRE       | Professeur à l'Université de Strasbourg                    | Rapporteur |
| Isabelle DUSART        | Directeur de Recherche au CNRS,<br>Université Paris 8      | Membre     |
| Bruno GONZALEZ         | Directeur de Recherche à l'INSERM,<br>Université de Rouen  | Président  |
| Céline ZATYLNKY-GAUDIN | Maître de Conférences à l'Université de Caen               | Membre     |
| David VAUDRY           | Chargé de Recherche à l'INSERM,<br>Université de Rouen     | Membre     |

**Thèse dirigée par David VAUDRY, unité INSERM 1239, laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine**





## Remerciements

---

*Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'Université de Rouen, dans le laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, INSERM 1239 dirigé par le Dr. Youssef Anouar.*

*Je voudrais tout d'abord remercier chaleureusement les membres du Jury :*

*Le **Dr. Charles Pineau**, Directeur de Recherche à l'Université de Rennes a accepté la charge d'être rapporteur de ce travail. Je le remercie sincèrement pour l'intérêt qu'il témoigne ainsi à nos recherches.*

*Le **Pr. Vincent Lelièvre**, Professeur à l'Université de Strasbourg me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Je suis consciente de la faveur qu'il m'accorde et souhaite lui témoigner toute ma gratitude.*

*Le **Dr. Isabelle Dusart**, Directeur de Recherche à l'Université Paris 8 a accepté d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa présence aujourd'hui.*

*Le **Dr. Bruno Gonzalez** Directeur de Recherche à l'Université de Rouen a bien voulu examiner ce travail. Je tiens à lui témoigner toute ma gratitude pour l'intérêt qu'il porte à nos recherches.*

*Le **Dr. Céline Zatylny-Gaudin** Maître de conférences à l'Université de Caen a accepté de faire partie de mon jury et d'examiner ce travail. Je souhaite ici lui témoigner ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, **David Vaudry** pour m'avoir encadrée pendant ces 3 années et m'avoir transmis sa rigueur scientifique. Merci pour ta disponibilité permanente, tes conseils et ton soutien. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je mesure la chance que j'ai d'avoir eu un chef comme toi qui a toujours écouté mes idées, qui m'a soutenue lors des moments de doutes et qui m'a laissé manger ses tic-tac pendant 3 ans ! Si j'ai parfois râlé lorsque ton œil de lynx repérait une erreur de mise en page, je suis heureuse d'avoir acquis cette exigence grâce à toi.*

*Je souhaite remercier le **Dr. Youssef Anouar**, Directeur de l'unité INSERM 1239 de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir mis à disposition les moyens nécessaires au déroulement de ces travaux de thèse.*

*La thèse est certes, un défi personnel, mais rien ne serait possible sans l'aide de nombreuses personnes qui ont contribué à ce projet aussi bien de façon technique et scientifique que par leurs paroles d'encouragement et de soutien.*

*Un très grand merci à **Hubert** pour son aide tout au long du projet. Les nombreuses discussions que nous avons eues m'ont éclairé et m'ont encouragé à toujours faire mieux.*

*Merci à l'équipe de Pissaro, **Marie-Laure**, **Philippe** et **Julie** pour votre aide dans mes aventures peptidomiques ! **Marie-Laure**, ta bonne humeur permanente a rendu les longues journées d'extraction et d'analyses agréables. Merci de ne jamais m'avoir chassée de ton*

bureau quand j'y venais plusieurs fois par jour au moment de la réaction de l'article et du manuscrit ! Tu as toujours répondu patiemment à mes (nombreuses) questions et c'est grâce à toi que je peux parler de d'ion parent, de TIC et que je peux annoter des spectres sans sourciller. Merci de ton soutien de tous les instants et de tes encouragements.

Merci à l'équipe LITIS pour son aide précieuse dans le tri et l'analyse de données. **Arnaud, Thierry, Jérôme et Paul-Arthur** vous m'avez épargné un temps infini avec mes fichiers excel et nos discussions autour du projet auront été très formatrices.

Merci à **Régis et Karine** de l'équipe Protim pour leur aide en imagerie MALDI, pour m'avoir accueillie quelques jours parmi vous et pour avoir répondu à toutes mes questions.

Un très grand merci aux membres de l'équipe (**Julien, Magali, Delphine, Olivier, Jérôme, Benjamin, Malika, Marjorie**) pour vos relectures, votre présence pendant les répétitions, votre aide en manips, vos conseils de façon générale mais aussi pour les repas d'équipe, les lasers games et les moments de détente. Vous m'avez tous beaucoup apporté, à la fois professionnellement et personnellement au cours de ces années passées dans l'équipe.

J'ai une pensée particulière pour **Catherine**, tu m'as permis de remporter la bataille que représente la mise en page sous Word ! Mais de façon plus générale, ta gentillesse, ta disponibilité et ta bonne humeur auront toujours été un réconfort pour moi.

Merci également aux autres membres du labo pour les discussions (scientifiques ou non) qui m'ont aidées pendant ces 3 ans de thèse : **Christophe** et **Marie** pour avoir rendu la formation expé animale mémorable, **Pierrick** pour ton aide pendant mes fonctions auprès de l'Ecole Doctorale, **Marie-Christine** pour ta bonne humeur et pour avoir toujours ri à mes blagues pendant les longues heures de culture cellulaire mais aussi **David Alexandre, Maïté, Laurences D...**

Merci à mes compagnons de rédaction (**Benjamin, Karima, Ophélie**) nos séances de thérapie de groupe m'ont aidé à surmonter les caprices de Word avec grâce et élégance ! **Ophélie** pour m'avoir initiée au café, pour les pauses chocolatées et pour m'avoir épargné le bus après les longues journées. **Karima** (mon rayon de soleil chevelu) merci pour les week-ends de rédaction à la bibliothèque, les soirées passées au labo et pour ton aide lors des derniers jours. Sans les fous rires et les repas du dimanche midi que nous avons partagés, je n'aurais pas réussi à tenir le coup. Et **Benji** nos « meeting » dans nos bureaux respectifs pour parler de Zotero, de Stardew Valley, de l'asso et de nos vies, nos retours en bus après les nocturnes au labo et tout le chocolat que tu m'as donné (ou que j'ai pris) auront été source de réconfort. Tous les 4 nous avons passé tant d'heures à travailler ensemble et sans notre équipe de mousquetaires de choc, l'aventure n'aurait pas été aussi belle. Je compte bien profiter de mes quelques semaines d'avance avant de devoir vous appeler docteurs !

Les sportifs du labo, que d'aventures ensembles ! Les courses d'obstacles dans la boue, les séances de fractionné et les trails nocturnes en plein mois de décembre entourés par des zombies resteront gravés dans ma mémoire. Je ne remercie pas la team Mud Day (**Hugo** mon petit cabri « cochtaud », **Alex** mon partenaire de côtes et **Anthony** le chef loutre) pour les

*séances en côtes, les pompes claquées et les douches glacées, en revanche merci pour la motivation et les encouragements sans faille, j'ai adoré me dépasser en votre compagnie et relever des défis parfois un peu extrêmes. « Grenade !! »*

*Les « vieux du labo » **Pierre-Michaël, Alexis, Hélène, Rhita, Jane, Abdallah, Marion, Matthieu** merci pour tous vos conseils et pour les nombreuses soirées passées au 3 pièces. **Pierre-Michaël**, nos plans pour dominer le monde n'ont pas encore portés leurs fruits, mais maintenant que nous sommes tous les deux docteurs, ça ne saurait tarder. **Hélène** merci de tes conseils lors des quelques mois où nous avons partagé notre bureau et merci pour ton manuscrit qui est devenu ma référence pour toute la mise en page.*

*Et de façon générale, tous les doctorants du labo : **Julie** merci pour ton soutien, pour tes blagues, pour nos discussions matinales et pour beaucoup d'autres choses (si j'ai un jour une grenouille je lui donnerais ton nom), **Sarah** je te laisse porter haut les couleurs du cervelet et le soin d'imposer radio Nostalgie en BM2. **Mahmoud**, thank you for the lebanese sweets and for always let me sit in the front of your car. Et tous les autres **Julien, Paul, Fanny, Roxane, Alexandre N, Aurélien, Lisa** je garderai en mémoire le grand nettoyage au moment du déménagement, nos courses de chariots, nos repas du midi, nos blagues et la super ambiance de ces années de thèse.*

*Un clin d'œil à l'extraordinaire bureau Normadoc (**Marie, Marc, Nicolas, Benjamin, François, Thomas et Bérénice**) avec qui l'aventure associative s'est révélée pleine d'affiches kitch et de folles soirées (ou réunions, je confonds). Le manuscrit est dans la boîte, je répète, le manuscrit est dans la boîte.*

***Alexiane et Paul-Xavier**, les vacances à la montagne m'auront, à chaque fois permis de décompresser (sauf sur la piste rouge de Chatel). Les livraisons de vin pendant la période de rédaction auront bien aidé aussi ! Mais surtout vous avez créé ensemble le plus merveilleux de tous les neveux qui, malgré la distance, fut un réconfort à chaque moment de découragement. Les images de ses premiers exploits et la perspective de passer Noël à la montagne tous ensemble m'auront soutenue dans les dernières semaines. Ma grande sœur préférée, tu vas maintenant devoir m'appeler Docteure Bibi pendant quelques semaines, le temps que je m'en remette !*

***Maman, Papa**, vous m'avez transmis une autonomie, un sens de l'organisation et une assurance sans lesquels cette thèse n'aurait jamais pu aboutir. Merci **Maman** de m'avoir soutenue tout au long de cette aventure et de m'avoir réconfortée dans les moments difficiles. Tu vois, j'ai fais du chemin depuis la maternelle !*



# Liste des publications réalisées dans le cadre de ma formation doctorale

---

## Publication originale dans une revue à comité de lecture

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Basille-Dugay M., Hardouin J. and Vaudry D. A peptidomic approach to characterize peptides involved in cerebellar cortex development leads to the identification of the neurotrophic effects of nociceptin. *Mol Cell Prot.* (en révision)

## Communications orales dans des congrès

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Basille-Dugay M., Hardouin J. and Vaudry D. (2017) Peptidomic study of the rat developing cerebellum leads to the identification of the neurotrophic effects of nociceptin on granule neurons. Journées de l'Ecole Doctorale, Le Havre. (1<sup>ers</sup> prix jury et public)

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Basille-Dugay M., Hardouin J. and Vaudry D. (2017) Involvement of nociceptin in cerebellar cortex development: proteomics, molecular and cellular approaches. LARC Neurosciences, Rennes (1<sup>er</sup> prix)

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Basille-Dugay M., Hardouin J. and Vaudry D. (2016). Involvement of nociceptin in cerebellar cortex development. RegPep, Rouen.

## Communications affichées dans des congrès

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Basille-Dugay M., Hardouin J. and Vaudry D. (2016). Proteomic approach to characterize the involvement of nociceptin in cerebellar cortex development. Journées Normande de la Recherche Biomédicale, Rouen.

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Basille-Dugay M., Hardouin J. and Vaudry D. (2016) Peptidomic during development in the rat cerebellum. RegPep Workshop, Rouen.

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Basille-Dugay M., Hardouin J. and Vaudry D. (2016) Implication of nociceptin in cerebellar cortex development. Journées de l'Ecole Doctorale, Caen.

Rondel K., Corbière A., Lavigne R., Com E., Pineau C., Vaudry D. (2015) Identification of endogenous peptides potentially implicated in cerebellar cortex development, by MALDI imaging mass spectrometry. Congrès de Spectrométrie de Masse et Analyses Protéomique.

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Hardouin J. and Vaudry D. (2015) A peptidomic approach to characterize neuropeptides involved in cerebellar cortex development. Société française des neurosciences, Montpellier.

Corbière A., Walet-Balieu ML., Chan P., Hardouin J. and Vaudry D. (2015) A peptidomic approach to characterize neuropeptides involved in cerebellar cortex development. Congrès Perenne, Caen.





# Abstract

---

The cerebellum is a structure involved in many motor and cognitive functions whose development occurs after birth under the control of various factors, including neuropeptides. Peptides acting on cerebellar cortex development often exhibit a specific pattern of expression with in rodents a high expression over the 2 first postnatal weeks which then decreases at adulthood. The aim of this study was to identify additional peptides with such expression profile and to characterize their putative functions in the development of the cerebellar cortex and more particularly, in the establishment of cerebellar granule neurons which are the most abundant cells of the cerebellum. To address this, cerebella of rats aged from 8 to 90 days-old were analyzed by mass spectrometry. Among the 33 peptides identified in the cerebellum, 4 had the particular expression profile we were looking for. We choose to study further one of them, *i.e.* the nociceptin, and confirmed peptidomic results by measuring the expression of its gene precursor and of its receptor. Combining laser microdissection and qPCR approaches revealed that both nociceptin and its receptor genes were expressed in the internal granular layer of the cerebellar cortex. Functional studies showed that nociceptin exerts a neurotrophic effect on granule neurons by increasing their survival and differentiation, but had no effect on their motility. Preliminary *in vivo* experiments indicate that nociceptin can also counteract ethanol-induced toxicity. The last part of the present study aimed to identify new neuropeptides expressed in the rat cerebellum by using *de novo* sequencing. The large amount of peptide sequences initially found was then reduced to only 6 candidates for further analysis, by using filters such as recurrence of the sequences and their differential expression in between the four developmental stages considered. Additional genomic studies will help to decrease even further this number, in order to focus the biological tests on the targets which are most likely to code for biological active peptides.

Key words: cerebellum; development; peptidomic; nociceptin; granule neurons



## Résumé étendu

---

Le cervelet est une région du cerveau située en arrière du tronc cérébral, impliquée dans les comportements moteurs et cognitifs. Il est constitué d'une substance blanche interne et d'une substance grise périphérique appelée cortex cérébelleux. Ce cortex s'organise en couches cellulaires bien distinctes dont l'architecture est aisément reconnaissable. Chacune de ces couches est constituée de plusieurs types cellulaires, mais les cellules les plus nombreuses sont les neurones en grain qui, à l'âge adulte, constituent la population la plus abondante du cerveau. Le cervelet se développe après la naissance chez l'Homme et les rongeurs. En particulier, les neurones en grain se mettent en place, chez le rat, au cours des 2 premières semaines post natales. Le développement du cortex cérébelleux est contrôlé par de nombreux facteurs comme des chimiokines, des neurotransmetteurs, des facteurs de croissance et des peptides. Parmi les peptides impliqués on retrouve notamment le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* qui augmente la survie et la différenciation mais diminue la migration, la somatostatine qui stimule la migration des cellules en grain au niveau de la couche granulaire externe mais l'inhibe au niveau de la couche granulaire interne et l'octadecaneuropeptide qui protège les neurones en grain contre le stress oxydatif. Ces différents peptides, ainsi que d'autres impliqués dans le développement du cervelet, présentent un profil d'expression très particulier. En effet, ils sont très abondants au cours des 2 premières semaines de vie postnatale, période au cours de laquelle les processus développementaux sont les plus intenses, puis leur expression diminue à l'âge adulte.

En se basant sur cette observation, l'objectif de ce projet de thèse était donc d'identifier des peptides dont l'expression est forte au cours des 2 premières semaines postnatales avant de diminuer à l'âge adulte, puis de caractériser leurs effets éventuels sur la mise en place des neurones en grain.

La première partie du projet avait pour but d'identifier les peptides différenciellement exprimés au cours du développement. Pour cela nous avons collecté des cervelets de rats âgés de 8, 16, 21 et 90 jours dont nous avons extrait les peptides avant de les analyser par des techniques de spectrométrie de masse. Grâce à une base de données de neuropeptides et de précurseurs de neuropeptides de rat que nous avons créée, nous avons pu identifier 33 peptides exprimés de façon récurrente au cours du développement. Parmi ces peptides, 19 ne sont pas encore connus pour être des peptides bioactifs mais en présentent toutes les caractéristiques. La quantification

de l'abondance de ces peptides à l'aide d'outils bioinformatiques, nous a permis de mettre en évidence 8 peptides différentiellement exprimés au cours du développement. Parmi ces 8 peptides régulés, 4 voient leur expression diminuer à l'âge adulte, suggérant une possible implication dans le développement du cortex cérébelleux. La somatostatine a été retrouvée régulée comme décrit dans la littérature, validant notre approche expérimentale. Nous avons choisi, pour la deuxième partie de l'étude, de nous intéresser plus particulièrement à un autre des peptides dont l'expression diminue entre P8 et P16 puis disparaît à l'âge adulte, la nociceptine.

Pour essayer de corréliser les résultats de peptidomique avec l'expression du gène de la nociceptine et de son récepteur, nous avons réalisé des expériences de PCR quantitative sur des cervelets de rats âgés de 2, 4, 8, 16, 21 et 90 jours. Nous avons pu mettre en évidence que le gène de la nociceptine est fortement exprimé entre le 2<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> jour de vie postnatale, avant de fortement diminuer entre le 16<sup>ème</sup> et 90<sup>ème</sup> jour. Le gène du récepteur est, quant à lui, fortement exprimé entre le 8<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jour de vie postnatale mais plus faiblement avant et après cette période. Le cortex cérébelleux étant constitué de 4 couches cellulaires pendant le développement et de 3 couches à l'âge adulte, afin de savoir dans laquelle de ces couches étaient exprimés la nociceptine et son récepteur, nous avons découpé par microdissection laser chaque couche du cortex cérébelleux chez des animaux âgés de 8 et 21 jours. Cette expérience a permis de montrer que le gène de la nociceptine est surtout exprimé dans la couche la plus interne du cortex à 8 jours. De même le gène du récepteur n'est exprimé que dans la couche interne, quelque soit le stade du développement. Cette zone interne du cortex cérébelleux étant presque exclusivement composée de neurones en grain, nous avons ensuite conduit des tests fonctionnels sur ces cellules en culture.

Nous avons tout d'abord montré que les neurones en grain en culture expriment le gène du récepteur de la nociceptine et ce jusqu'à 5 jours après l'ensemencement. Nous avons ensuite étudié l'effet de la nociceptine sur les neurones en grain soumis à un stress oxydatif par l'ajout de peroxyde d'hydrogène. La nociceptine favorise la survie des cellules en grain en inhibant le processus d'apoptose comme illustré par la mesure de l'activité caspase-3. La motilité des neurones en grain a été mesurée en utilisant la technique de microexplants et n'a révélé aucun effet de la nociceptine sur ce paramètre. En revanche, la nociceptine augmente la différenciation des neurones en grain, tant au niveau du nombre de neurites que de leur longueur.

L'ensemble de ces données suggère que la nociceptine est impliquée dans les processus plus tardifs du développement en favorisant la survie et la différenciation des neurones en grain dans la couche la plus interne du cortex cérébelleux.

La dernière partie de ce projet avait pour objectif d'identifier des peptides encore inconnus en réalisant un séquençage *de novo* à partir des données peptidomiques. Grâce à ce procédé nous avons mis en évidence environ 7 500 séquences qui ne sont pas répertoriées dans la base de données SwissProt/UniProt. Le nombre de ces séquences a été réduit à 17 en éliminant toutes celles qui n'étaient pas retrouvées exprimées de façon récurrente et puis à 11 en ne retenant que les séquences régulées au cours du développement (dont 6 voient leur expression diminuer à l'âge adulte). Ensuite, ces séquences ont été reverse traduites afin de localiser ces peptides au sein du génome. La suite de ce projet devra s'attacher à déterminer si certaines séquences pourraient correspondre à des peptides bioactifs en recherchant entre autres au niveau du précurseur la présence d'un peptide signal, de sites de clivage par les prohormones convertases encadrant la séquence et/ou d'une forte conservation évolutive. Cela permettra pour finir de sélectionner 2 à 3 peptides qui seront testés biologiquement.



# Table des matières

---

|  |           |
|--|-----------|
| Liste des abréviations .....   | 11        |
| Liste des figures .....  | 13        |
| Liste des tables .....   | 14        |
| Introduction .....   | 15        |
| <b>Chapitre I : le cervelet .....</b>  | <b>17</b> |
| 1. Présentation générale .....   | 17        |
| 2. Fonctions du cervelet .....   | 20        |
| 3. Ontogenèse du cervelet .....  | 25        |
| 4. Le cervelet comme modèle d'étude du développement cérébral .....                              | 29        |
| 5. Facteurs impliqués dans la mise en place des neurones en grain .....                          | 29        |
| 5.1. Facteurs non-peptidiques .....  | 30        |
| 5.2. Facteurs peptidiques .....  | 32        |
| <b>Chapitre II : l'étude des peptides biologiquement actifs .....</b>                            | <b>37</b> |
| 1. Caractéristiques des neuropeptides .....  | 37        |
| 2. Stratégies d'identification des neuropeptides .....   | 40        |
| 2.1. Identification à partir d'une activité biologique .....                                     | 41        |
| 2.2. Identification à partir du récepteur .....  | 42        |
| 2.3. Identification à partir des caractéristiques des neuropeptides .....                        | 42        |
| 2.4. Identification en utilisant des techniques génomiques .....                                 | 43        |
| 2.5. Identification en utilisant des techniques peptidomiques .....                              | 44        |
| 2.6. Identification <i>de novo</i> .....   | 46        |
| <b>Chapitre III : le système nociceptinergique .....</b>   | <b>47</b> |
| 1. La nociceptine .....  | 47        |
| 2. Le récepteur de la nociceptine .....  | 49        |
| 3. Développement de ligands .....  | 52        |
| 4. Distribution du système nociceptinergique .....   | 53        |
| 4.1. Expression dans le cerveau antérieur : diencephale et télencéphale .....                    | 53        |
| 4.2. Expression dans le cervelet .....   | 54        |
| 4.3. Expression dans le tronc cérébral et la moelle épinière : mésencéphale, pont et bulbe ..... | 54        |
| 4.4. Expression à la périphérie .....  | 54        |



|  |     |
|--|-----|
| 4.5. Expression au cours du développement .....  | 55  |
| 5. Fonctions de la nociceptine.....  | 56  |
| Objectifs.....   | 63  |
| Matériel et méthodes.....  | 67  |
| Résultats.....   | 77  |
| 1. Etude de l'expression d'une banque de peptides au cours du développement du cervelet et caractérisation des effets de la nociceptine sur les neurones en grain..... | 79  |
| 1.1. Approche peptidomique ayant permis d'identifier les effets neurotrophiques de la nociceptine dans le développement du cortex cérébelleux.....                     | 79  |
| 1.2. Résultats complémentaires à l'article .....   | 116 |
| 1.2.1. Cinétique d'expression de la nociceptine et de son récepteur par les cellules du cervelet en culture .....  | 116 |
| 1.2.2. Etude de l'effet de la nociceptine dans le cervelet en développement <i>in vivo</i> chez le rat .....   | 117 |
| 2. Analyse du peptidome par imagerie MALDI.....  | 117 |
| 2.1. Optimisation de la résolution spatiale et regroupement des spectres par clusters  | 117 |
| 2.2. Recherche par imagerie MALDI de peptides régulés au cours du développement ... ..   | 119 |
| 3. Recherche de nouveaux neuropeptides potentiellement impliqués dans le développement du cervelet par séquençage <i>de novo</i> .....                                 | 121 |
| Discussion .....   | 127 |
| 1. Expression spatio-temporelle des peptides dans le cervelet en développement .....   | 129 |
| 1.1. Expression de l'ensemble des neuropeptides retrouvés.....   | 129 |
| 1.2. Expression de la nociceptine.....   | 131 |
| 2. Effets neurotrophiques de la nociceptine dans le cervelet en développement .....  | 133 |
| 3. Découverte de nouveaux peptides .....   | 137 |
| 3.1. Peptides issus de la <i>Neuropeptide rat database</i> .....   | 137 |
| 3.2. Peptides issus du séquençage <i>de novo</i> .....   | 138 |
| Conclusion et perspectives.....  | 141 |
| Références bibliographiques.....   | 147 |

## Liste des abréviations

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| $\alpha$ -MSH                 | hormone mélanotrope                         |
| ACN                           | acétonitrile                                |
| ACTH                          | adrénocorticotrophine                       |
| ADNc                          | ADN complémentaire                          |
| AMPc                          | adénosine monophosphate cyclique            |
| ARNm                          | ARN messenger                               |
| BDNF                          | <i>brain derived neurotrophic factor</i>    |
| b-FGF                         | <i>basic fibroblast growth factor</i>       |
| CG                            | couche granulaire                           |
| CGE                           | couche granulaire externe                   |
| CGI                           | couche granulaire interne                   |
| CM                            | couche moléculaire                          |
| CP                            | couche des cellules de Purkinje             |
| CRH                           | corticolibérine                             |
| CXCL                          | <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>         |
| DMEM                          | <i>dubecco's modified Eagle's medium</i>    |
| E                             | jour embryonnaire                           |
| FDA                           | fluorescéine diacetate                      |
| FDR                           | <i>false discovery rate</i>                 |
| GABA                          | acide gamma-amino butyrique                 |
| GAPDH                         | glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogenase    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | peroxyde d'hydrogène                        |
| HPLC                          | chromatographie liquide à haute performance |
| HSA                           | <i>human serum albumin</i>                  |
| IGF-1                         | <i>insulin growth factor 1</i>              |
| KO                            | <i>knock-out</i>                            |

|       |   |
|-------|---|
| LCR   | liquide céphalo-rachidien                                 |
| MALDI | <i>matrix-assisted laser desorption ionisation</i>        |
| m/z   | rapport masse sur charge                                  |
| NERP  | <i>neuroendocrine regulatory peptide</i>                  |
| NGC   | neurone en grain du cervelet                              |
| NOP   | <i>nociceptin opioid peptide</i>                          |
| NT-3  | neurotrophine 3   |
| ODN   | octadecaneuropeptide                                      |
| ORL1  | <i>opioid receptor-like 1</i>                             |
| P     | jour postnatal  |
| PACAP | <i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i> |
| PC    | <i>prohormone convertase</i>                              |
| POMC  | pro-opiomélanocortine                                     |
| RCPG  | récepteur couplé aux protéines G                          |
| ROC   | <i>receiver operating characteristic</i>                  |
| SDF-1 | <i>stromal cell-derived factor</i>                        |
| Shh   | sonic hedgehog  |
| SST   | somatostatine   |
| TFA   | acide trifluoroacétique                                   |
| VIP   | <i>vasoactive intestinal peptide</i>                      |

## Liste des figures

---

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1: Anatomie générale du cervelet .....   | 17  |
| Figure 2 : Représentation schématique du cortex cérébelleux et des connexions entre les cellules qui le composent. ....   | 19  |
| Figure 3 : Représentation des circuits cérébelleux impliqués dans la motricité. ....  | 21  |
| Figure 4 : Développement embryonnaire du cervelet de rongeur. ....  | 26  |
| Figure 5 : Ontogenèse du cortex cérébelleux chez le rat.....  | 27  |
| Figure 6 : Effets des différents facteurs sur la mise en place des neurones en grain du cervelet. ....  | 34  |
| Figure 7 : Schématisation de l'évolution de la concentration des peptides et de l'intensité des processus au cours du développement. ....   | 36  |
| Figure 8 : Biosynthèse des neuropeptides .....  | 39  |
| Figure 9 : Maturation du précurseur de la nociceptine.....  | 48  |
| Figure 10 : Alignement évolutif des séquences de la nociceptine chez différentes espèces de vertébrés. ....   | 49  |
| Figure 11 : Représentation de l'activation et de la désensibilisation du récepteur NOP. ....  | 51  |
| Figure 12 : Représentation de l'expression du système noiceptinergique dans le cerveau.....   | 56  |
| Figure 13 : Expression du gène de la nociceptine et de son récepteur dans des neurones en grain du cervelet en culture. ....  | 116 |
| Figure 14 : Mesure de l'activité caspase-3/7 suite aux injections in vivo d'éthanol (2 × 2,5 g/kg) et/ou de nociceptine (1 µg/10 µL) .....  | 117 |
| Figure 15 : Illustration de l'impact de l'augmentation de la résolution spatiale sur la précision de distribution de 3 composés dans les différentes couches du cortex cérébelleux. ....                            | 118 |
| Figure 16 : Répartition spatiale des spectres de masse au sein du cervelet au stade 21 jours. ....  | 119 |
| Figure 17 : Images des rapports m/z des composés retrouvés différentiellement exprimés entre le 8 <sup>ème</sup> et 21 <sup>ème</sup> jour de vie postnatale dans des coupes histologiques de cervelet de rat. .... | 120 |
| Figure 18 : Description des étapes suivies pour trier les peptides identifiés par séquençage de novo. ....  | 121 |
| Figure 19 : Séquences <i>de novo</i> dont l'expression diminue au cours du développement .....  | 123 |
| Figure 20 : Autres types de profils d'expression retrouvés parmi les séquences de novo. ....  | 124 |
| Figure 21 : Spectre annoté de la séquence KDLEDVIFYKY. ....   | 124 |
| Figure 22 : Alignement des 6 séquences identifiées par séquençage de novo correspondant à des peptides dont l'expression diminue au cours du développement avec la base de données UniProt mammifères .....         | 125 |
| Figure 23 : Proposition de mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans l'effet de la nociceptine sur la survie et la différenciation des neurones en grain.....   | 136 |
| Figure 24 : Structure de la chromogranine A et localisation de ses peptides.....  | 137 |
| Figure 25 : Evolution du nombre de neuropeptides découverts depuis 1900. ....   | 140 |

## Liste des tables

---

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1 : Injections réalisées selon les groupes expérimentaux. ....                                | 74  |
| Tableau 2 : Liste des séquences de novo exprimées de façon récurrente au cours du développement. .... | 122 |

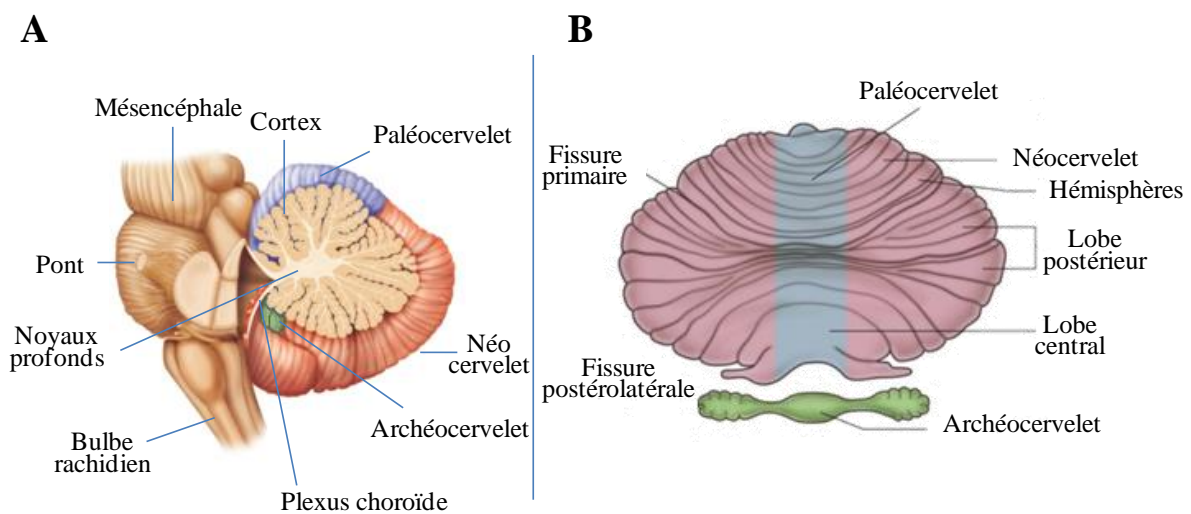
# **Introduction**



## Chapitre I : le cervelet

### 1. Présentation générale

Le cervelet est un organe impair d'origine métencéphalique situé dans la fosse crânienne postérieure, en arrière du tronc cérébral (Fig. 1A). Il est recouvert des 3 méninges classiques, à savoir de l'extérieur vers l'intérieur : la dure-mère qui constitue, à l'interface avec le reste du cerveau, une membrane très épaisse appelée tente du cervelet, puis l'arachnoïde et la pie-mère. Entre ces 2 dernières circule le liquide céphalo-rachidien dans l'espace sous-arachnoïdien, au niveau de larges cavités à l'interface avec le cervelet qui forment différentes citernes. Au cours de l'évolution animale, on remarque l'apparition successive de 3 parties distinctes au niveau du cervelet, (i) l'archéocervelet déjà présent chez les poissons, (ii) le paléocervelet apparu chez les reptiles et les oiseaux et (iii) le néocervelet retrouvé uniquement chez les mammifères (Fig. 1A). Le cervelet est composé de plusieurs sous-structures formant de la plus grossière à la plus fine, les lobes, les lobules, les lames et les lamelles, elles-mêmes séparées par des sillons (Fig. 1B).



**Figure 1: Anatomie générale du cervelet.** (A) coupe sagittale présentant le cervelet et les structures avoisinantes. (B) coupe transversale présentant le cervelet et sa division en lobes séparés par des fissures.

La complexité du cervelet s'accroît au cours de l'évolution, ce qui se traduit par un organe de plus en plus replié avec l'augmentation du nombre de circonvolutions présentes à sa surface. Au niveau histologique, le cervelet est composé d'une substance blanche interne dans laquelle sont enchâssés 4 paires de noyaux profonds (dentelé, fastigial, interposés antérieur et postérieur), relais intermédiaires entre le cervelet, le tronc cérébral et le cerveau. Autour de



cette substance blanche se trouve une substance grise corticale appelée cortex cérébelleux contenant les corps cellulaires des neurones. Malgré sa petite taille (il ne représente que 15% de la masse cérébrale), le cervelet contient à lui seul plus de 70 % des neurones du cerveau chez le rat (Herculano-Houzel *et al.* 2006).

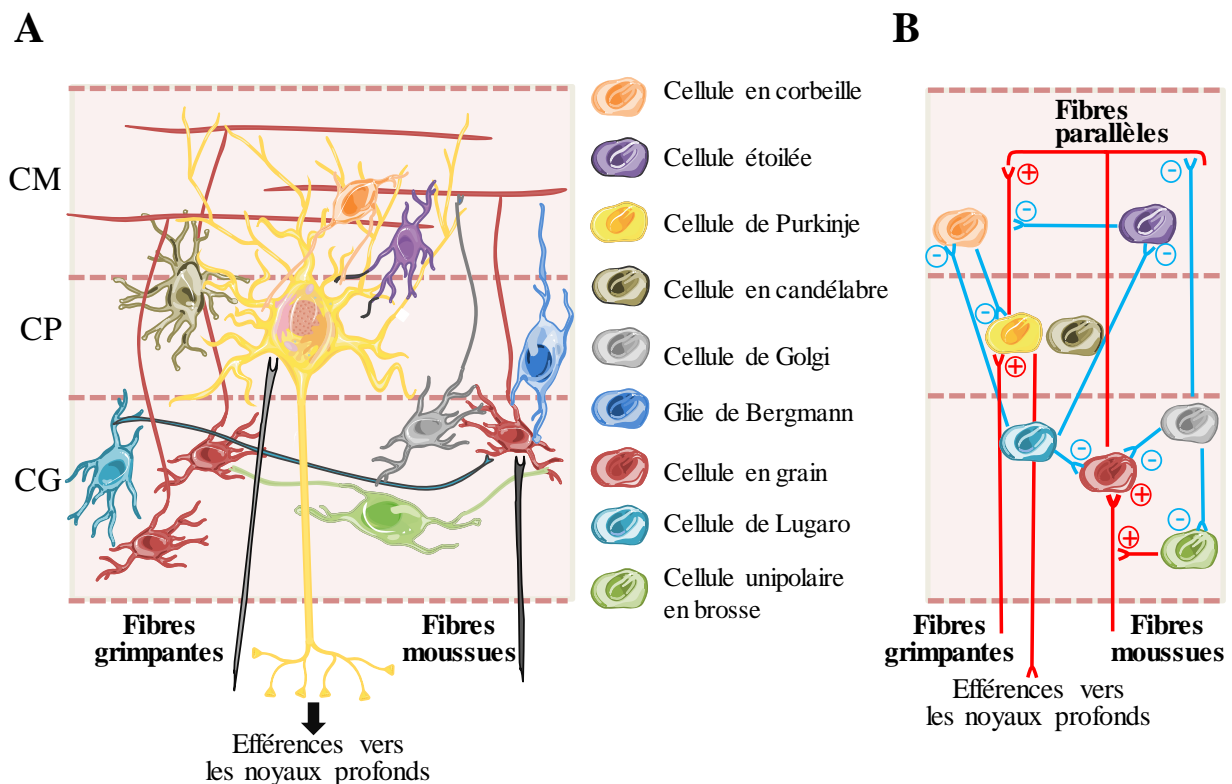
Le développement du cervelet suit les mêmes étapes chez tous les vertébrés mais sa maturité est atteinte plus ou moins rapidement. Chez les espèces capables de marcher dès la naissance comme le cheval, le cervelet est déjà presque entièrement développé lors de la mise-bas. En revanche, pour les espèces dont la marche s'acquiert plus tard comme l'homme ou le rat, son développement est en grande partie postnatal. A maturité, le cortex cérébelleux est composé de 3 couches cellulaires bien distinctes, à savoir en surface la couche moléculaire (CM), au milieu la couche des cellules de Purkinje (CP), et dans la partie interne, la couche granulaire (CG) au contact de la substance blanche (Fig. 2A).

La CM présente une faible densité cellulaire et contient principalement les ramifications dendritiques des cellules de Purkinje, ainsi que les axones des neurones en grain du cervelet (NGC ; appelés fibres parallèles) et les prolongements de la glie de Bergmann (Voogd et Glickstein 1998). Les 2 autres types cellulaires présents sont les cellules en corbeille et les cellules étoilées qui sont des inter-neurones inhibiteurs. Les cellules en corbeille émettent des prolongements qui vont directement contacter le corps cellulaire des cellules de Purkinje (Tigyi *et al.* 1990), tandis que les cellules étoilées exercent leur inhibition *via* les dendrites des cellules de Purkinje (Ito 2006).

La CP est constituée d'une assise monocellulaire de cellules de Purkinje à l'aspect piriforme et dont l'arborisation dendritique est très développée dans la CM (Fig. 2A). Ce sont des neurones de grande taille produisant l'acide gamma-amino butyrique (GABA ; Saitow *et al.* 2000) et dont les axones qui traversent la CG pour inhiber l'activité des noyaux profonds constituent la seule efférence du cortex cérébelleux (De Zeeuw and Berrebi 1995). En plus de ces cellules de Purkinje, la CP est également composée d'inter-neurones inhibiteurs tels que les cellules en candélabre qui étendent leurs axones vers la CM (Lainé and Axelrad 1994). Enfin, dans cette couche se trouvent des cellules gliales, la glie de Bergmann qui étend ses prolongements jusqu'à la surface du cortex cérébelleux (Grosche *et al.* 2002).

La CG contient environ 60 milliards de NGC qui constituent, à l'âge adulte, la plus large population neuronale du cerveau chez l'Homme (Zagon *et al.* 1977). Les NGC sont de petits neurones glutamatergiques dont le soma de 5 à 8  $\mu\text{m}$  est presque entièrement occupé par le

noyau (Gallo *et al.* 1982). Ils reçoivent des afférences appelées fibres moussues issues de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cerveau, qui se ramifient pour entrer en contact avec plusieurs centaines de NGC. L'information est ensuite transmise par des axones qui se divisent en 2 dans la CM pour former les fibres parallèles contactant les cellules de Purkinje *via* leur arborisation dendritique (Pichitpornchai *et al.* 1994). La CG comporte également des interneurons inhibiteurs, dont les cellules de Golgi, qui contactent les NGC au niveau de leurs fibres parallèles et de leurs dendrites (Ekerot and Jörntell 2001), ainsi que les cellules de Lugaro qui inhibent les cellules de Golgi (Dumoulin *et al.* 2001) et les NGC (Dugué *et al.* 2005 ; Fig. 2B). Les cellules de Lugaro émettent également des prolongements ascendants pour inhiber les cellules de Purkinje (Dean *et al.* 2003), les cellules en corbeille et les cellules étoilées dans la CM (Lainé and Axelrad 1994). Enfin, les cellules unipolaires en brosse, seuls interneurons excitateurs du cortex cérébelleux, forment des synapses glutamatergiques avec les fibres moussues (Diño *et al.* 1999) et vont amplifier leur signal avant de le transmettre aux NGC (Kalinichenko and Okhotin 2005).



**Figure 2 : Représentation schématique du cortex cérébelleux et des connexions entre les cellules qui le composent.** (A) organisation des cellules au sein des 3 couches du cortex cérébelleux adulte. (B) connexions entre les cellules du cortex cérébelleux. En rouge : les connexions activatrices. En bleu : les connexions inhibitrices. CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje ; CG : couche granulaire.

Malgré cette grande diversité cellulaire, le fonctionnement du cortex cérébelleux repose essentiellement sur les cellules de Purkinje et les NGC ; ces 2 types cellulaires formant une véritable boucle d'intégration de l'information, finement régulée par les inter-neurones (Fig. 2B). L'information arrive dans le cortex par 2 voies : les fibres moussues contactant les NGC afin de transmettre l'information aux cellules de Purkinje et les fibres grimpantes contactant directement les cellules de Purkinje. Une fois intégré, le signal est renvoyé vers les régions centrales et la moelle épinière par les efférences des cellules de Purkinje qui font relai dans les noyaux profonds (Fig. 2B). Ce réseau permet au cervelet d'exercer un grand nombre de fonctions non seulement motrices, mais également cognitives.

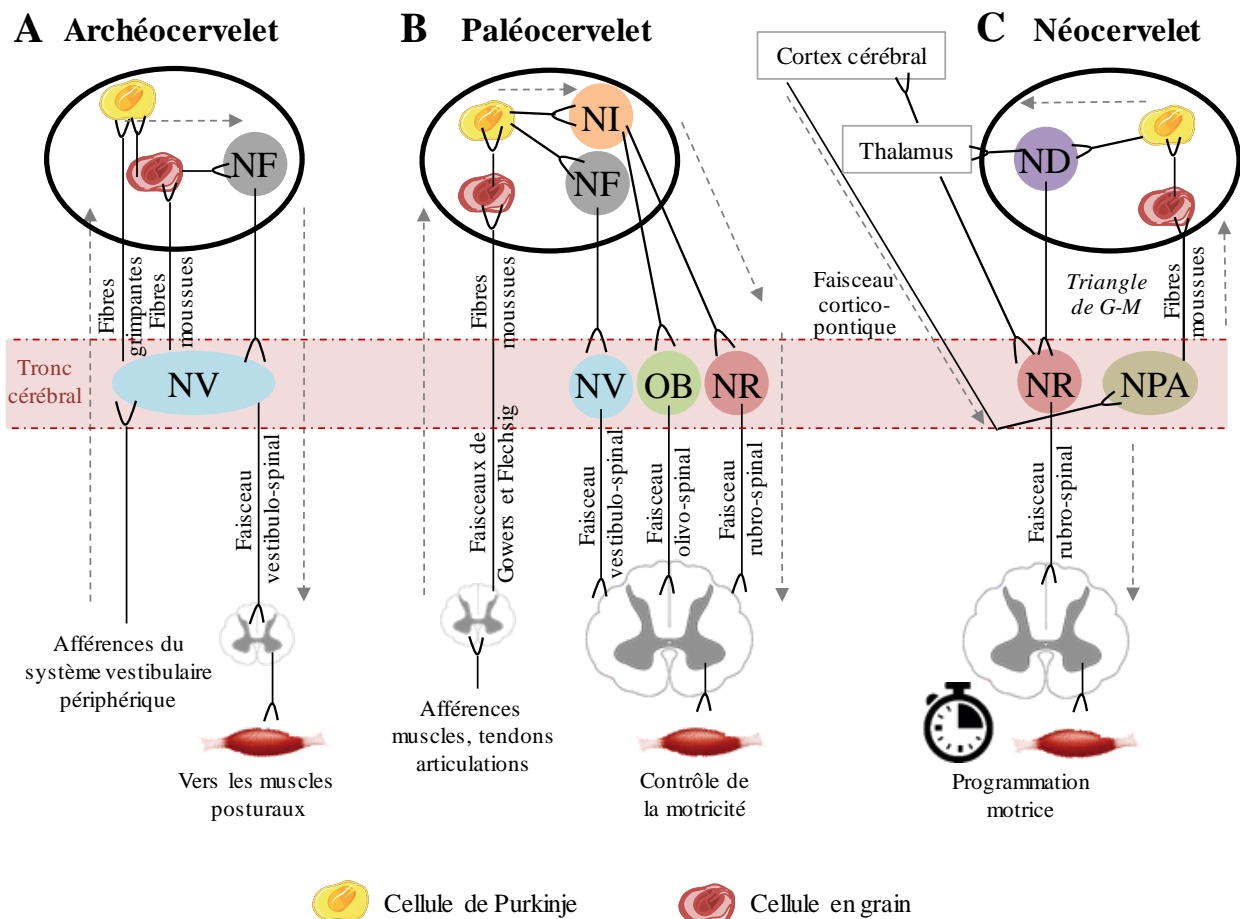
## 2. Fonctions du cervelet

Parmi les diverses fonctions exercées par le cervelet, les premières décrites dès le XIX<sup>ème</sup> siècle ont été les fonctions motrices (Jackson, 1841). La division anatomique du cervelet en 3 parties anatomiques distinctes, conséquence de l'évolution, correspond également à une répartition des fonctions liées à la motricité (Fig. 3). L'archécervelet (aussi appelé vestibulocervelet), région la plus ancienne phylogéniquement, reçoit des afférences des organes vestibulaires de l'oreille interne *via* les fibres grimpantes, ou *via* les fibres moussues (Kaufman *et al.* 1996). Après intégration, l'information est transmise aux noyaux vestibulaires (Barmack 2003) puis circule dans la moelle épinière par la voie extrapyramidale (ou faisceau vestibulo-spinal ; Fig. 3A) pour commander les motoneurones responsables des muscles posturaux en charge du maintien de l'équilibre (Horak *et al.* 2002). L'archécervelet intervient également dans le contrôle des mouvements oculaires (Giolli *et al.* 1988) ainsi que dans les mouvements de la tête (Bankoul and Neuhuber 1990). La lésion de cette région entraîne une ataxie vestibulo-cérébelleuse qui se traduit par des troubles de l'équilibre avec une perte de la posture verticale, des troubles de la marche pouvant aller jusqu'à rendre la station debout impossible, ainsi qu'un tremblement des globes oculaires (nystagmus ; (Kaufman *et al.* 1996).

Le paléocervelet (aussi appelé spinocervelet), apparu chez les oiseaux et les reptiles, reçoit les afférences du faisceau de Flechsig en provenance des membres inférieurs et de la partie inférieure du tronc, ainsi que les afférences du faisceau de Gowers en provenance des membres supérieurs et de la partie supérieure du tronc. Ces 2 faisceaux véhiculent les informations issues des fuseaux neuromusculaires, des organes tendineux et des récepteurs articulaires afin de renseigner la position du corps dans l'espace. Le message afférent parvient aux NGC par l'intermédiaire des fibres moussues puis est transmis aux cellules de Purkinje *via* les fibres

parallèles (Hashimoto *et al.* 2003). Une fois l'information intégrée, les cellules de Purkinje la communique aux noyaux fastigiens et interposés dans le vermis, puis aux noyaux vestibulaires, aux noyaux rouges et à l'olive bulbaire dans le tronc cérébral, qui vont finalement la transmettre à la moelle épinière par les faisceaux vestibulo, olivo et rubrospinaux (Fig. 3B). Par ces voies, le paléocervelet contrôle la posture (Ouchi *et al.* 1999) mais compare également le mouvement planifié au mouvement exécuté afin de le corriger finement si besoin (Tracy *et al.* 2001). La lésion de cette structure entraîne une hypotonie posturale due aux troubles du tonus des muscles antagonistes ainsi qu'une mauvaise exécution des mouvements dans le temps et dans l'espace (dysmétrie ; Hore *et al.* 1991).

Le néocervelet (aussi appelé cérébrocervelet), uniquement présent chez les mammifères, est en



**Figure 3 : Représentation des circuits cérébelleux impliqués dans la motricité.** (A) schématisation de l'archéocervelet. (B) schématisation du paléocervelet. (C) schématisation du néocervelet. NF : noyau fastigial ; NI : noyau interposé ; NPA : noyau de la protubérance annulaire ; NR : noyaux rouges ; NV : noyau vestibulaire ; OB : olive bulbaire.

étroite relation avec les aires motrices du cortex cérébral grâce aux voies cortico-ponto-cérébelleuses (Brodal and Bjaalie 1997). Il existe 2 boucles de régulation impliquant cette

région du cervelet : l'une connecte le néocerevet au cerveau en faisant relais dans le thalamus, c'est la voie cortico-reticulo-spinale en charge de réguler le mouvement volontaire global, et l'autre relie le néocerevet au bulbe rachidien, c'est le triangle de Guillain-Mollaret agissant sur les muscles de la face, du pharynx et du diaphragme (Fig. 3C). Grâce à ces 2 voies, cette partie du cervelet contribue à la planification des mouvements en préparation (Wolpert *et al.* 1998) ainsi qu'à l'évaluation des informations sensorielles (Shih *et al.* 2009). Une lésion dans cette région induit des troubles de l'exécution du mouvement avec une perte de l'organisation temporo-spatiale (Iloeje 1992). Cependant, la plus grande partie du néocerevet est dédiée aux fonctions cognitives.

En effet, au-delà de ces fonctions motrices, le cervelet exerce également des fonctions cognitives qui ont été soupçonnées pour la première fois en 1985 par Botez *et al.*. La découverte relativement tardive de cette composante est due au fait que les premiers et plus importants symptômes observés en cas de lésions ou de pathologies cérébelleuses sont d'abord moteurs, et peuvent masquer d'autres déficits. De plus, cette structure étant très régionalisée une atteinte localisée entraîne des déficits spécifiques rendant difficile une compréhension plus globale de son rôle. Au cours des 3 dernières décennies, l'implication du cervelet dans un grand nombre de fonctions cognitives a été rapportée et la découverte de son importance dans les fonctions non-motrices ne cesse de s'accroître. En particulier, le cervelet échange des informations avec le cortex préfrontal (Middleton and Strick 2000), et les lobes du néocerevet et du paléocerevet impliqués dans cette interaction ont vu leur volume augmenter au cours de l'évolution (Balsters *et al.* 2010), suggérant leur rôle dans les fonctions cognitives chez l'Homme.

Le cervelet a d'abord été caractérisé pour son rôle dans l'apprentissage moteur par des expériences de conditionnement de fermeture de la paupière au cours desquelles un défaut de mémorisation apparaît en cas de lésion des noyaux interposés responsables de la connexion entre le paléocerevet et le thalamus (Grant *et al.* 1960). Grâce à ses connexions avec le système limbique, et notamment l'amygdale et l'hippocampe, le paléocerevet est également impliqué dans l'apprentissage conditionné par la peur. En effet, dans des tests de conditionnement aversif, les lésions du vermis entraînent une diminution du temps d'immobilité traduisant un défaut de mémorisation (Supple *et al.* 1987). De plus, un renforcement des synapses entre cellules de Purkinje et fibres parallèles est observé après la phase d'apprentissage (Sacchetti *et al.* 2004), suggérant que le cervelet participe à cette mémoire aversive. Enfin, de par son rôle dans la coordination motrice, il a d'abord été suggéré que le cervelet soit impliqué dans le versant moteur du langage en contrôlant les muscles faciaux. Cependant, l'observation de

patients présentant des lésions cérébelleuses montre qu'il participe aussi à la reconnaissance des mots et à la construction des phrases (Guell *et al.* 2015). Dans une autre étude utilisant la stimulation magnétique transcrânienne pour induire une diminution de l'excitabilité du cortex cérébelleux chez des sujets sains, les personnes devaient énoncer une série de mots commençant par une lettre proposée par l'expérimentateur (Arasanz *et al.* 2012). La baisse des performances observée après la stimulation transcranienne suggère un rôle du cervelet dans la production des mots.

Au niveau émotionnel, le cervelet est particulièrement impliqué dans la perception des 5 émotions primaires avec des régions spécifiquement activées pour chacune (*i.e.* colère, peur, dégoût, joie et tristesse ; Baumann and Mattingley 2012). Dans le cas d'une ataxie spinocérébelleuse provoquée par une dégénérescence du cervelet et des connexions corticocérébelleuses, les patients présentent un déficit de reconnaissance des émotions sur les visages, associé à des degrés variés de troubles cognitifs et psychiatriques (D'Agata *et al.* 2011). Cet ensemble de symptômes, qui comprend aussi un défaut des fonctions exécutives comme la planification ou la mémoire de travail, des troubles du langage et une anxiété accrue, est connu sous le nom de syndrome cognitif et affectif cérébelleux (Schmahmann and Sherman 1998). Toutes ces fonctions exercées par le cervelet dans l'apprentissage, le langage et les composantes émotionnelles ont conduit la communauté scientifique à s'interroger sur l'implication de cette structure dans des pathologies présentant des déficits d'une ou plusieurs de ces fonctions. Par exemple, les sujets atteints de syndromes de type autistiques montrent, entre autres symptômes, des troubles du langage, des retards d'apprentissage, des difficultés à communiquer et une altération de la socialisation. Des études post-mortem réalisées sur des cervelets de patients afin de comprendre l'implication de cette région dans les troubles autistiques révèlent, entre autres altérations histologiques, une dysplasie du cortex cérébelleux avec une CG fine et désorganisée, une diminution du nombre de cellules de Purkinje et des clusters de NGC dans la CM (Wegiel *et al.* 2010). Ces altérations de structure semblent être imputables à un mauvais développement du cervelet. En effet, une étude récente a utilisé un modèle de souris invalidées pour le gène *Tsc 1* impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire modélisant les syndromes de type autistique. Et malgré d'importants déficits cellulaires, il est possible de retrouver un phénotype normal jusqu'au jour postnatal 7 (P7) en administrant aux animaux de la rapamycine capable de restaurer la fonction du gène (Tsai *et al.* 2012). Cela suggère l'existence d'une phase critique dans le développement du cervelet qui, si elle ne se déroule pas correctement, peut engendrer des déficits cognitifs. Cette hypothèse est confortée par l'observation que chez les enfants

prématurés ayant connu un épisode d'hémorragie cérébelleuse périnatale, l'incidence des déficits de type autistique augmente (34% contre 9% chez les enfants n'ayant pas subi d'hémorragie ; Limperopoulos *et al.* 2007). A l'échelle structurelle, le cervelet de ces enfants apparaît anormalement petit avec une désorganisation du paléocervelet et des hémisphères cérébelleux pouvant aller jusqu'à un cervelet unilatéralisé.

Concernant les autres fonctions cognitives, il a été montré que la lésion des noyaux du paléocervelet empêche le développement de comportements d'habitude lors d'un entraînement (Callu *et al.* 2007). De plus, l'implication des NGC a été rapportée très récemment dans une expérience d'auto-administration de récompense couplée à une mesure d'activité calcique des NGC par microscopie 2-photons (Wagner *et al.* 2017). Dans cette étude, certains NGC sont activés lorsque l'animal, après avoir déplacé un levier, attend la récompense et d'autres lorsque celle-ci n'est pas délivrée, suggérant l'implication de ces cellules dans l'association entre l'action et la récompense. D'autres cellules du cervelet seraient aussi impliquées dans ces phénomènes de récompense mais également d'addiction. En effet, l'administration de cannabinoïdes induit une suractivation des cellules de Purkinje en se fixant sur les récepteurs CB1 présents au niveau de leurs synapses avec les cellules en corbeille (Takahashi and Linden 2000). L'activation du récepteur CB1 inhibe la libération de GABA par les cellules en corbeille, ce qui lève l'inhibition qu'elles exercent sur les cellules de Purkinje. L'activation simultanée des cellules de Purkinje et des NGC lors de la prise de drogues a pour conséquence une activation globale du cervelet. De plus, il a été observé chez des patients présentant une addiction à la cocaïne, une diminution de la flexibilité de comportement lors d'un test, c'est à dire leur capacité à interrompre un comportement amorcé (Hester and Garavan 2004). Cela entraîne de mauvaises performances dans des tâches de types *GO-NOGO* pendant lesquelles les patients doivent appuyer sur un bouton lorsqu'un certain stimulus leur est présenté. De fait, ils ne parviennent pas à interrompre leur réponse face à un autre stimulus. Au niveau cellulaire est observé une sur-activation du cervelet et une inhibition du cortex préfrontal (Hester and Garavan 2004). Le cervelet étant étroitement connecté au cortex préfrontal, il a été suggéré que ces 2 structures soient recrutées de manière compétitive lors de prises de décisions. Si une composante cognitive est présente, c'est le contrôle du cortex préfrontal qui est activé, en revanche, si une réponse rapide et automatique est requise, c'est le cervelet qui est activé tandis que le cortex est inhibé. Cela suggère que lors d'une addiction, une réorganisation du schéma de prise de décision a lieu. En effet, se met en place une inhibition du cortex préfrontal et une

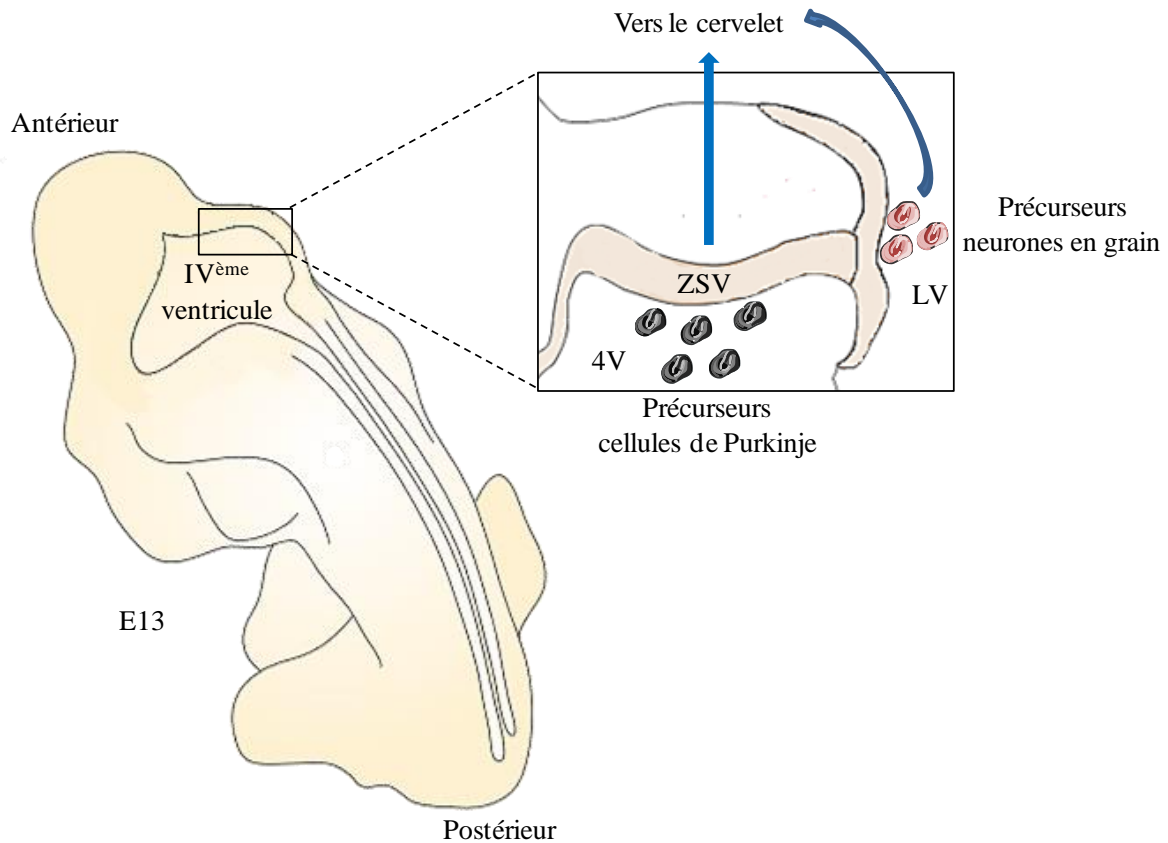
sur-activation concomitante du cervelet qui entraîne une diminution du versant cognitif de la réponse conduisant à la consommation compulsive de drogue.

Comme illustré à travers ces quelques exemples, le cervelet exerce donc un grand nombre de fonctions, à la fois motrices et cognitives toutes intimement liées au bon développement de la structure qui, chez l'Homme comme chez le rat, se déroule principalement après la naissance.

### 3. Ontogenèse du cervelet

Le développement du cervelet est similaire dans ses étapes chez tous les mammifères mais son organisation temporelle diffère selon les espèces. Chez les espèces dont le petit peut marcher dès la naissance, le cervelet est déjà en place et bien organisé dès la mise-bas. En revanche, chez les espèces dont les capacités motrices à la naissance sont réduites, le cervelet est complètement immature. Ainsi chez les rongeurs, le développement se termine au cours de la troisième semaine postnatale (Altman and Sudarshan 1975) alors que chez l'Homme il ne sera totalement mature qu'à l'adolescence (Diamond 2000). La neurogenèse des cellules constituant le cortex cérébelleux commence au sein de 2 assises germinatives primaires : la lèvre rhombique située entre la partie dorsale du tube neural et le quatrième ventricule, et la zone sous-ventriculaire située entre le quatrième ventricule et le métencéphale (Fig. 4). La zone sous-ventriculaire donne naissance aux cellules de Purkinje, aux cellules de Golgi, aux cellules étoilées et aux cellules en corbeille (Maricich and Herrup 1999), tandis que la lèvre rhombique produit les NGC et les cellules unipolaires en brosse (Ilijic *et al.* 2005 ; Wang *et al.* 2005). Chez le rongeur entre le jour embryonnaire 11 (E11) et E13, les précurseurs des cellules de Purkinje quittent la zone sous-ventriculaire, traversent ce qui deviendra les noyaux profonds et la substance blanche, et terminent leur migration dans le cortex cérébelleux où ils forment une couche pluristratifiée (Altman and Bayer 1985). A partir d'E15, les précurseurs des NGC commencent leur migration à la surface du cervelet pour venir former la couche granulaire externe (CGE ; Wingate and Hatten 1999). Cette couche cellulaire transitoire est une assise germinative secondaire qui va s'épaissir au fur et à mesure de la prolifération des cellules (Wang *et al.* 2005). A la naissance, le cortex cérébelleux est donc constitué de 3 couches : la CGE à la surface, la CM à l'intermédiaire et la CP en profondeur (Fig. 5). Au moment de la naissance, les cellules de Purkinje sont fusiformes avec un axone projetant vers les noyaux profonds et quelques dendrites peu étendues (Armengol and Sotelo 1991).

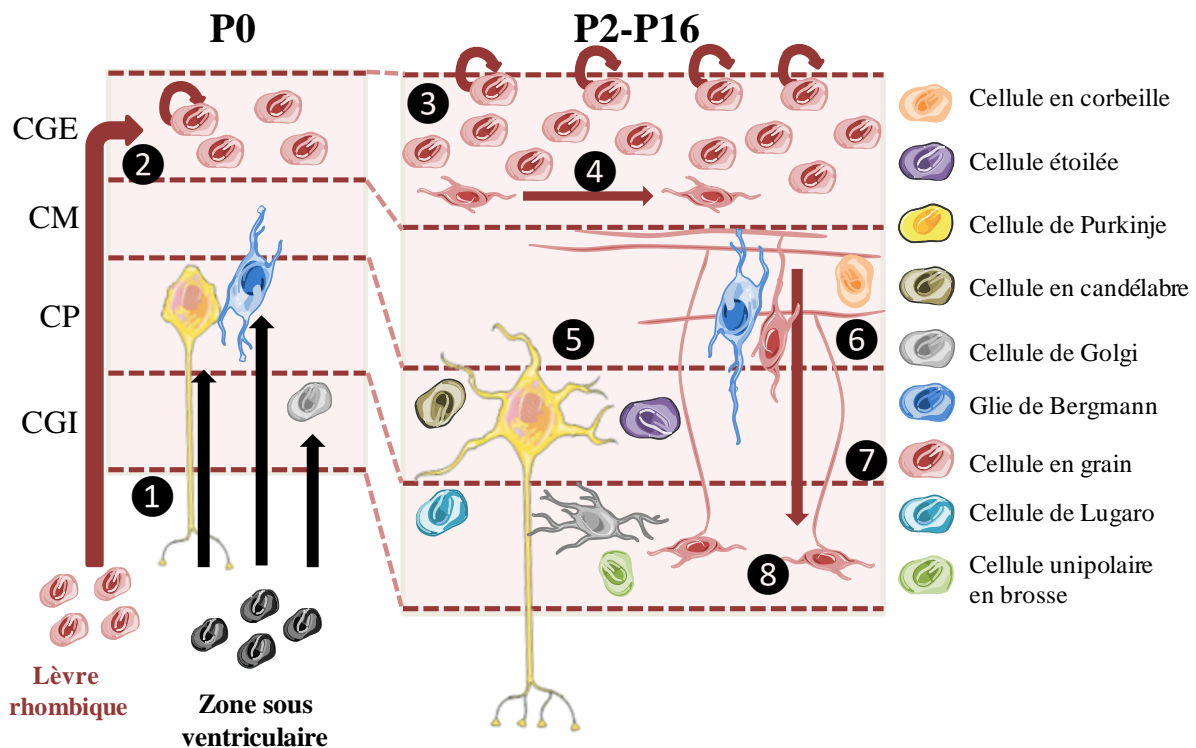




**Figure 4 : Développement embryonnaire du cervelet de rongeur.** Les précurseurs venant de la ZSV et de la LV vont migrer vers le cervelet. E : jour embryonnaire ; LV : lèvre rhombique ; ZSV : zone sous-ventriculaire. Adaptée de Wang and Zoghbi 2005.

Ces cellules commencent à s'arranger en couche monocellulaire et reçoivent de multiples afférences de la part des fibres grimpantes en cours de formation (Hashimoto and Kano 2005). A la fin du développement cérébelleux, chaque cellule de Purkinje ne sera plus innervée que par une unique fibre grimpante (Morando *et al.* 2001). Le processus d'élimination des fibres surnuméraires est altéré chez des souris dont la synaptogenèse entre les cellules de Purkinje et les NGC est anormale (Crepel *et al.* 1981), suggérant que l'établissement de la connexion entre ces 2 types cellulaires participe à la maturation des cellules de Purkinje. L'arborisation dendritique des cellules de Purkinje commence à se mettre en place dès P8, à partir de 3 dendrites principales qui vont s'allonger et se ramifier dans la CM, pour achever leur différenciation aux alentours de P30 (Berry and Bradley 1976). Les interneurons venant de la zone sous-ventriculaire suivent le même chemin que les cellules de Purkinje et se mettent en place dans le cortex. Les cellules de Golgi commencent à se connecter aux cellules de Purkinje vers P10 tandis que les cellules étoilées et les cellules en corbeille se différencient dans la CM (Zhang and Goldman 1996 ; Simat *et al.* 2007).

Dans la CGE, certains NGC continuent de se diviser après la naissance avec un pic mitotique entre P4 et P8, tandis que d'autres entament une phase de migration tangentielle. Il en résulte une séparation de la CGE en une couche proliférative à sa surface et une couche migratoire dans sa partie interne (Fig. 5). Cette première phase de migration au sein de la CGE dure entre 24 et 48 heures et permet aux NGC d'émettre 2 prolongements axonaux horizontaux à l'origine des fibres parallèles (Komuro *et al.* 2001). Ces fibres parallèles précoces établissent déjà des contacts avec les dendrites des cellules de Purkinje et participent à leur différenciation (Schilling *et al.* 1991). Cette migration tangentielle est essentielle à l'organisation du cortex car, une fois achevée, les NGC ne pourront plus changer leur position antéro-postérieure ou médio-latérale (Komuro and Rakic 1998). Il s'en suit, à partir de P3, une seconde phase de migration radiale, perpendiculaire à la première, à travers les CM et CP.



**Figure 5 : Ontogénèse du cortex cérébelleux chez le rat.** Les précurseurs des cellules de Purkinje arrivent dans le cortex depuis la zone sous-ventriculaire dès E11 (1) puis ceux des neurones en grain depuis la lèvre rhombique à partir de E15 pour constituer la CGE (2). Les neurones en grain vont continuer à proliférer dans la CGE jusqu'à P8 (3) tandis que les premiers arrivés entament une étape de migration tangentielle au sein de cette couche (4). Pendant ce temps, les autres cellules du cortex commencent à se différencier, en particulier les cellules de Purkinje qui développent leur arborisation dendritique (5). Les neurones en grain migrent ensuite radialement, d'abord en association avec la glie de Bergmann (6) puis de façon glie-indépendante (7) pour venir former la CGI (8). CGE : couche granulaire externe ; CGI : couche granulaire interne ; CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje ; E : jour embryonnaire ; P : jour postnatal.

Entre les migrations tangentielle et radiale, se déroule une étape de transition pendant laquelle la cellule change son orientation en s'allongeant radialement et émet un autre prolongement perpendiculaire aux 2 premiers (Komuro *et al.* 2001). Ce troisième prolongement est constitué d'une partie dite proximale en avant de la cellule dans le sens de la migration et distale en arrière de la cellule. La migration radiale s'effectue en association avec la glie de Bergmann (Sotelo *et al.* 1994) grâce à la partie distale du prolongement qui va venir s'enrouler autour de la fibre gliale (Edmondson and Hatten 1987). La partie proximale, quant à elle, va permettre d'orienter la migration en étendant puis rétractant son cône de croissance (Komuro and Rakic 1995). A leur arrivée dans la CP, les NGC se détachent de la glie de Bergmann et, après une pause d'environ 2 heures, pendant laquelle elles vont changer de forme puis étirer leur prolongement proximal, continuent leur migration de façon glie-indépendante (Komuro and Rakic 1998). A la fin de leur migration, les premiers NGC s'arrondissent et s'arrêtent juste en dessous de la CP (Fig. 5), les cellules suivantes devront donc traverser la couche granulaire interne (CGI) en formation pour s'insérer successivement en-dessous des cellules déjà en place. La CGI va, quant à elle, progressivement disparaître jusqu'à P16, non seulement par le départ des NGC migrant vers la CGI, mais également grâce à une première phase d'apoptose particulièrement intense entre P7 et P9 (Wood *et al.* 1993). Dans la CGI, la différenciation des NGC consiste en l'émission de courtes dendrites, tandis que, dans la CM, les prolongements horizontaux émis lors de la migration s'allongent afin de donner naissance aux fibres parallèles. Une deuxième phase d'apoptose se déroule entre P15 et P30 dans la CGI et élimine les NGC n'ayant pas établi de synapses avec les cellules de Purkinje (Lossi *et al.* 2002). Cela montre, une fois de plus, l'interdépendance des NGC et des cellules de Purkinje au moment de leur développement. Les NGC reçoivent des afférences *via* les fibres moussues qui se développent bien avant la fin de leur différenciation. En effet, entre E15 et E19 ces fibres se mettent en place dans le cervelet puis projettent vers les NGC situés dans la CGI vers P2-P4 (Grishkat and Eisenman 1995). Une fois en place vers P7, les fibres moussues reçoivent un signal de la part des NGC en cours de différenciation ce qui entraîne l'arrêt de leur croissance, chaque fibre moussue innerve alors environ 500 NGC (Zhang and Mason 1998).

Comme indiqué ci-dessus, cette ontogenèse met en jeu plusieurs processus tels que la prolifération, la migration, la différenciation et la survie d'un ensemble de cellules. Parmi ces différents types cellulaires, les NGC ont été utilisés comme modèle afin d'étudier le développement du système nerveux central.

#### 4. Le cervelet comme modèle d'étude du développement cérébral

Les données présentées précédemment montrent que, lors de l'ontogenèse du cervelet, les NGC subissent l'ensemble des processus impliqués dans le développement du cerveau. Grâce à son architecture simple et bien reconnaissable en couches cellulaires distinctes, le cervelet permet l'étude *in vivo* des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans sa mise en place. Ces mécanismes sont très proches chez l'Homme et chez le rongeur, permettant une possible extrapolation des résultats obtenus chez cette espèce modèle. Par ailleurs, grâce à son développement postnatal, le cervelet permet des observations facilitées en évitant les manipulations *in utero*. Les très nombreux NGC du cortex cérébelleux peuvent, de surcroît, être aisément mis en culture à l'aide d'un protocole permettant d'atteindre une pureté de 95% de cellules en plaques multi-puits et d'étudier la survie et la différenciation neuronales (Gonzalez *et al.* 1997). De plus, la motilité des NGC peut être mesurée par la technique de microexplants (Raoult *et al.* 2014). Enfin, un modèle de tranches organotypiques permet d'observer les différentes phases de la migration dans un environnement plus complexe car mettant en jeu l'ensemble des cellules du cortex cérébelleux et notamment la glie de Bergmann impliquée dans la première phase de la migration radiale (Yacubova and Komuro 2002). De par sa position anatomique chez le rongeur, le cervelet rend également possible les observations *in vivo*. En effet, grâce à des injections intracisternales le cervelet devient directement accessible sans passage par le système circulatoire ou la barrière hémato-encéphalique et sans intervention complexe. Chez le raton, cette injection se pratique sur animal vigile et permet donc la mise en place de protocoles simples afin d'étudier l'effet d'une molécule sur le développement du cervelet. Ces analyses souvent histologiques, génomiques ou biochimiques peuvent être couplées à des tests comportementaux. Pour terminer, des techniques d'imagerie *in vivo* en réalisant des fenêtres crâniennes permettent d'observer, par exemple, l'impact de la lumière sur la migration de NGC par microscopie confocale (Fahrion *et al.* 2012).

#### 5. Facteurs impliqués dans la mise en place des neurones en grain

Le développement du cortex cérébelleux, et donc des NGC, met en jeu des mécanismes pour assurer la prolifération, la migration, la différenciation et la survie des différents types cellulaires. Chacun de ces processus est finement contrôlé par de nombreux facteurs de nature peptidique ou non qui, par leur équilibre, assurent la mise en place de l'architecture du cortex dont dépendent les fonctions exercées par le cervelet. De multiples études ont, en particulier, porté sur la caractérisation des facteurs contrôlant la mise en place des NGC.

### 5.1. Facteurs non-peptidiques

Parmi les facteurs non-peptidiques, nous pouvons distinguer des chimiokines, des facteurs de croissance, des neurotrophines et des neurotransmetteurs. La famille des neurotrophines comprend plusieurs membres dont l'implication dans le développement du cervelet a été montrée. Nous pouvons notamment citer le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dont l'expression augmente depuis la naissance jusqu'à P14 puis se maintient jusqu'à P21 (Das *et al.* 2001). Le BDNF favorise la survie des NGC immatures dans la CGE (Kubo *et al.* 1995). Cette neurotrophine agit également sur la migration radiale des NGC en jouant un rôle chimioattractif pour les guider vers la CGI (Zhou *et al.* 2007). La mise en culture de NGC issus de souris *knock-out* (KO) pour le gène du BDNF montre l'implication de ce facteur dans la transition entre migration tangentielle et radiale en permettant l'attachement des NGC à la glie de Bergmann (Borghesani *et al.* 2002). Au sein de la CGI, le BDNF stimule la croissance axonale des NGC afin de permettre leur différenciation (Segal *et al.* 1995). Issue de la même famille de facteurs, la neurotrophine 3 (NT-3) montre également une expression différentielle au cours du développement, avec un pic d'expression pendant la phase embryonnaire et ce, jusqu'à la naissance, avant de diminuer au cours de la période postnatale (Takumi *et al.* 2005). Les animaux KO pour le gène de la NT-3, présentent un cortex cérébelleux aminci et survivent rarement au-delà de P1 (ElShamy *et al.* 1996) du fait de son action non seulement sur la prolifération des précurseurs dans la CGE (Katoh-Semba *et al.* 2000), mais aussi sur la survie des NGC dans la CGI (Bates *et al.* 1999).

Parmi les facteurs de croissance, l'*insulin growth factor 1* (IGF-1) apparaît particulièrement important dans le contrôle du nombre de précurseurs dans la CGE puisque sa surexpression entraîne une augmentation du nombre de NGC de plus de 80% (Ye *et al.* 1996). L'IGF-1 agit en activant des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xl et en inhibant des protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bad (Chrysis *et al.* 2001). En plus de son effet anti-apoptotique, l'IGF-1 favorise aussi la migration des NGC (Li *et al.* 2012), mais ce n'est pas le seul facteur de croissance exerçant un effet pro-migratoire sur les cellules en grain. En effet, le *vascular endothelial growth factor* est exprimé selon un gradient croissant depuis la CGE jusqu'à la CP et va, grâce à son récepteur Flk1 présent sur les NGC, faciliter leur sortie de la CGE pour guider leur migration vers la CP (Ruiz de Almodovar *et al.* 2010).

Les neurotransmetteurs sont eux aussi nécessaires à l'établissement de l'architecture du cortex cérébelleux. Par exemple, le glutamate exerce plusieurs effets *via* l'activation de son récepteur

NMDA et à l'augmentation des courants calciques. Tout d'abord le glutamate accélère la migration radiale des NGC (Komuro and Rakic 1993) puis, plus tard dans le développement, il favorise la survie des NGC matures dans la CGI (Monti and Contestabile 2000). La sérotonine quant à elle, agit de façon indirecte sur les NGC en stimulant dans un premier temps la différenciation des cellules de Purkinje (Oostland *et al.* 2013). Ensuite, l'expression transitoire du récepteur 5HT-3 par les NGC induit l'expression de réeline par ces cellules, ce qui limite la croissance dendritique des cellules de Purkinje et favorise l'élitage synaptique. Enfin, l'activation des récepteurs 5HT-2 exprimés en fin de développement puis dans le cervelet mature, participe à la stabilité et l'activité synaptique.

Finalement, d'autres types de molécules comme celles de la matrice extracellulaire influent sur la mise en place des NGC. Par exemple la nétrine, fortement exprimée au niveau de la lèvre rhombique au stade embryonnaire et à P5 dans la CGE (Alcántara *et al.* 2000), active la migration des précurseurs des NGC vers le cervelet, puis inhibe la croissance neuritique de ces cellules dans la CGE (Alcántara *et al.* 2000). Cela signifie que la nétrine empêche l'allongement prématuré des fibres parallèles dans la zone proliférative de la CGE afin que celles-ci apparaissent seulement lors de la migration tangentielle. Parallèlement, le *C-X-C motif chemokine ligand 14* (CXCL14) est une chimiokine exprimée dans la CP et la CM de façon transitoire entre P1 et P8 (Park *et al.* 2012). Grâce à des expériences de migration de NGC cultivés en *transwell* ou de motilité avec des microexplants, il a été montré que le CXCL14 augmente la migration de ces cellules en culture (Park *et al.* 2012). Au vu de son profil d'expression dans les premières phases de développement et de ces expériences mimant les phases de migration glie-indépendante, cela suggère que cette chimiokine est impliquée dans les étapes précoces de migration. D'autres membres issus de la même famille comme le SDF-1 (*stromal cell-derived factor*, appelé également CXCL12) présentent un profil d'expression similaire avec une forte concentration au cours des 2 premières semaines du développement (Tham *et al.* 2001). Le SDF-1 est exprimé à la surface piaie du cervelet, c'est-à-dire au-dessus de la CGE (Tham *et al.* 2001), et concentré dans cette région par des protéoglycanes (Reiss *et al.* 2002). Son récepteur, le CXCR4, est également exprimé dans le cervelet et plus précisément dans la CGE (Zou *et al.* 1998). Son invalidation entraîne une désorganisation du cortex cérébelleux avec une migration anarchique des NGC, mais n'a pas d'effet sur la prolifération des NGC ou sur la mise en place d'autres types cellulaires. De plus, des expériences *in vitro* montrent que le SDF-1 exerce aussi un effet chimioattractant sur les NGC immatures, mais pas sur les cellules matures, suggérant que cet effet est régulé dans le temps (Reiss *et al.* 2002).

L'ensemble de ces résultats montre que l'activation de ce récepteur permet d'empêcher la migration prématurée de ces neurones (Zou *et al.* 1998), afin de permettre aux NGC d'achever leur migration tangentielle avant de quitter cette couche pour migrer vers la CGI.

Chacun des facteurs présentés ci-dessus exerce ses propres effets sur les NGC, cependant, lors du développement, le devenir des cellules dépend surtout de l'équilibre spatiotemporel entre ces différentes molécules. Ainsi sonic hedgehog (Shh), produit par les cellules de Purkinje, est l'un des principaux agents pro-mitotiques dans le cervelet et favorise donc la prolifération des précurseurs dans la CGE (Lewis *et al.* 2004). Par cet effet, il s'oppose à la différenciation des NGC alors que les molécules capables d'inhiber son action constituent des signaux pro-différenciateurs pour ces cellules. Plusieurs de ces molécules ont été identifiées, dont le *basic fibroblast growth factor* (b-FBF) également sécrété par les cellules de Purkinje mais dont l'action s'oppose à l'effet mitogène de shh de façon dose dépendante. Le b-FGF stimule aussi la croissance neuritique des NGC arrivés dans la CGI (Hatten *et al.* 1988). D'autres facteurs interviennent également dans la balance entre prolifération et différenciation des NGC, dont la vitronectine retrouvée dans la matrice extracellulaire (Pons *et al.* 2001) ou encore des membres de la famille des *bone morphogenic proteins* surexprimés au cours du développement (Rios *et al.* 2004).

La régulation des différents processus du développement est donc la résultante de l'effet de plusieurs facteurs qui s'équilibrent entre eux. Cet équilibre est à la fois spatial, puisque ces facteurs ne sont pas présents dans les mêmes couches du cortex ou selon les mêmes gradients, mais également temporel, car les cinétiques d'expression diffèrent, permettant une régulation précise du développement des NGC. Néanmoins, il apparaît que ces molécules importantes pour la mise en place des NGC présentent souvent une expression qui est transitoire pendant le développement du cervelet et souvent maximale au cours des 2 premières semaines postnatales chez le rongeur.

## 5.2. Facteurs peptidiques

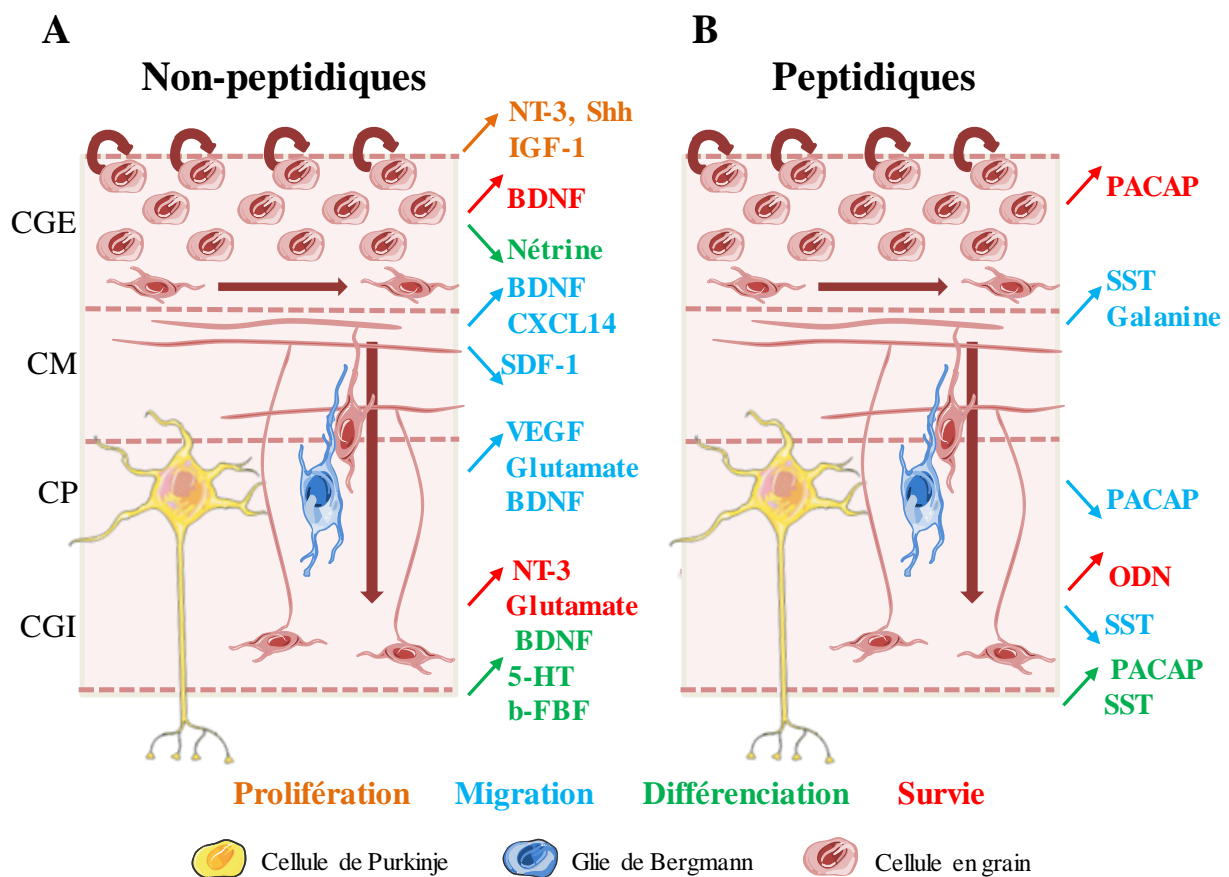
De nombreux facteurs de type peptidique jouent aussi un rôle dans la mise en place des NGC. Par exemple, le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) est exprimé par les cellules de Purkinje avec un profil temporel particulier (Nielsen *et al.* 1998). En effet, il commence à être détecté dans le cervelet à partir d'E14, puis son expression augmente fortement jusqu'à atteindre un pic à P14 avant de diminuer de moitié à l'âge adulte (Tatsuno *et al.* 1994). Seuls les récepteurs VPAC1 et PAC1 sont exprimés dans le cervelet et rendent donc

possible les effets du peptide sur les différentes étapes du développement (Basille *et al.* 2000). Le PACAP diminue notamment la prolifération des précurseurs dans la CGE en bloquant l'effet pro-mitotique de Shh (Nicot *et al.* 2002). Le PACAP inhibe la motilité de NGC dans des expériences de microexplants et l'utilisation d'un antagoniste bloque l'arrêt transitoire de ces cellules dans la CP (Cameron *et al.* 2007). Il augmente également la survie des précurseurs (Gonzalez *et al.* 1997) en stimulant l'expression de Bcl-2 *via* la voie des MAP kinases (Falluel-Morel *et al.* 2004). Cet effet a été confirmé *in vivo* par une augmentation transitoire du nombre de NGC après injection du peptide à la surface du cervelet de rats âgés de 8 jours (Vaudry *et al.* 1999). L'implication du PACAP dans le développement du cervelet a pu aussi être mise en évidence chez des animaux PACAP KO chez lesquels il a été observé une augmentation du nombre de cellules en apoptose au cours de la première semaine postnatale (Allais *et al.* 2007). En plus de son effet physiologique au cours du développement du cervelet, le PACAP peut également protéger les NGC de l'apoptose induite par le stress oxydatif (Vaudry *et al.* 2002a) ou l'exposition à l'éthanol (Vaudry *et al.* 2002b). Enfin, ce peptide exerce un effet pro-différenciateur sur des neurones en culture (Gonzalez *et al.* 1997) en réorganisant le cytosquelette (Falluel-Morel *et al.* 2005).

La somatostatine (SST) est un peptide qui existe sous 2 formes *i.e.* une forme courte de 14 acides aminés et une forme longue de 28 acides aminés. La SST est présente dans le cervelet dès le stade embryonnaire et son expression augmente pendant les 2 premières semaines postnatales dans les cellules de Purkinje, les cellules de Golgi et les fibres grimpantes (Inagaki *et al.* 1989 ; Villar *et al.* 1989). Les récepteurs de la SST sont exprimés par les NGC situés dans la CGE (Viollet *et al.* 1997). Il a été montré par des études en microscopie sur tranches organotypiques que leur activation entraîne un effet opposé sur la migration en fonction des couches du cortex (Fig. 6B). En effet, alors que la SST augmente la migration tangentielle des neurones dans la CGE, elle inhibe la migration radiale dans la CGI, permettant aux cellules de s'arrêter dans cette couche (Yacubova and Komuro 2002). Cet effet modulateur différentiel de la migration passe par une régulation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et serait dû à un changement d'expression des récepteurs. De plus, il a été montré que, si la SST ne semble pas avoir d'effet sur la prolifération (Bodenant *et al.* 1997), elle favorise la différenciation des NGC en culture en augmentant l'initiation des neurites et leur élongation (Taniwaki and Schwartz 1995).



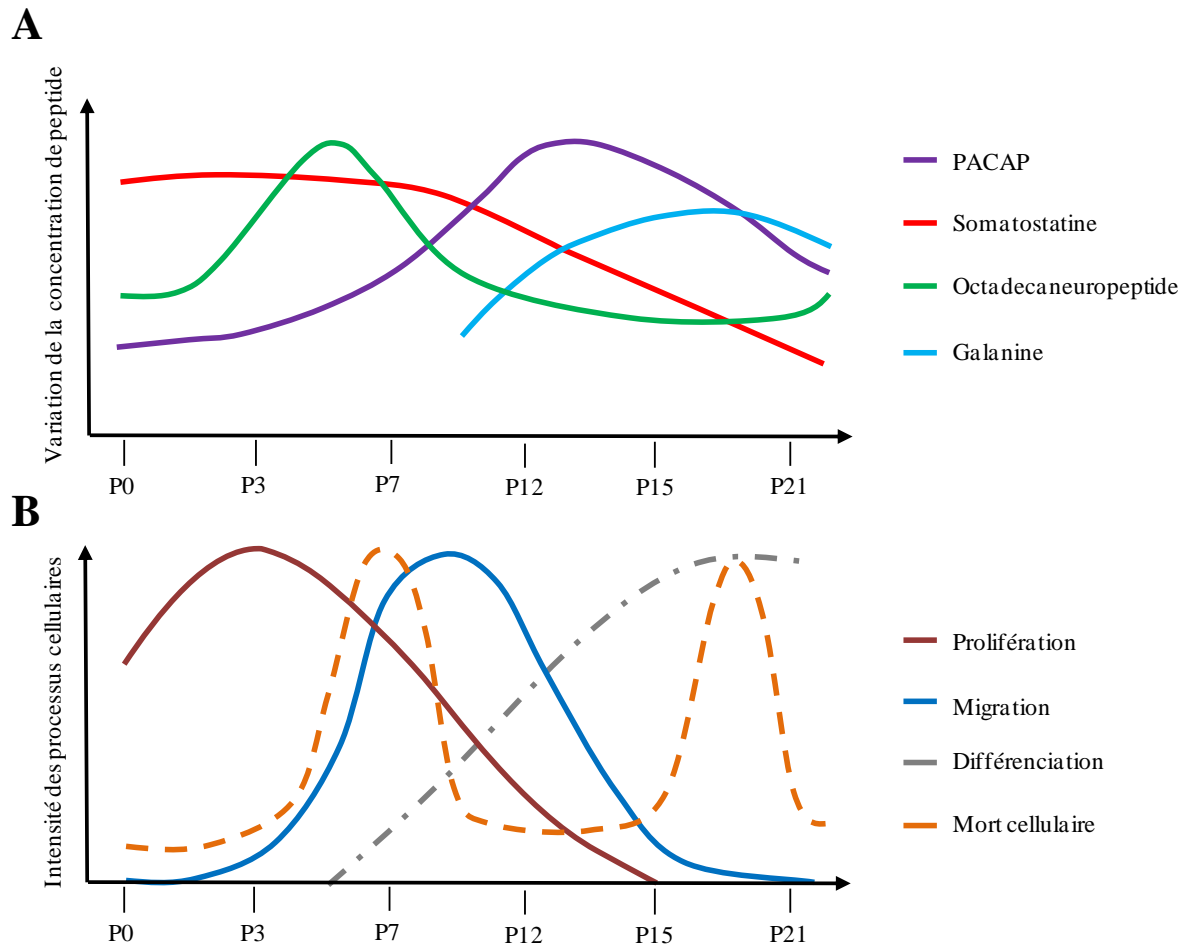
L'octadecaneuropeptide (ODN) est un peptide de 18 acides aminés issu d'un précurseur, le *diazepam binding inhibitor*. Ce peptide a été identifié dans le cervelet au cours du développement avec une expression croissante pendant le stade embryonnaire tardif, qui conduit à un pic d'expression jusqu'à P6 avant une baisse progressive jusqu'à P20 (Malagon *et al.* 1993). L'ODN est exprimé exclusivement par les cellules gliales dans le cortex cérébelleux (Vidnyánszky *et al.* 1994). Dans des expériences de culture de NGC traités à la 6-hydroxydopamine pour induire un stress oxydatif, il a été montré que l'ODN augmente la survie de ces cellules (Kaddour *et al.* 2013 ; Fig. 6B). Cet effet protecteur de l'ODN s'exerce *via* une activation des voies PKC et MAP kinases qui bloquent l'expression des protéines pro-apoptotiques telles que Bax induite par le stress oxydatif.



**Figure 6 : Effets des différents facteurs sur la mise en place des neurones en grain du cervelet.** (A) effets des facteurs non-peptidiques. (B) effets des facteurs peptidiques. 5-HT : sérotonine ; BDNF : *brain derived neurotrophic factor* ; b-FBF : *basic fibroblast growth factor* ; CXCL14 : *C-X-C motif chemokine ligand 14* ; IGF-1 : *insulin growth factor I* ; NT-3 : neurotrophine 3 ; ODN : octadecaneuropeptide ; PACAP : *pituitary adenylate cyclase-activated polypeptide* ; SDF-1 : *stromal cell-derived factor 1* ; Shh : *sonic hedgehog* ; SST : somatostatine. CGE : couche granulaire externe ; CGI : couche granulaire interne CM : couche moléculaire ; CP : couche des cellules de Purkinje.

La galanine d'une taille de 29 acides aminés, est exprimée plus particulièrement par les cellules de Purkinje dans le cortex cérébelleux (Ryan and Gundlach 1996). Le gène du peptide est régulé de façon temporelle mais également spatiale. En effet, l'ARN messager (ARNm) est détecté dès P10 et son expression est maximale à P21 dans tout le cervelet. En revanche, elle reste constante dans le néocervelet et le vermis postérieur jusqu'à l'âge adulte tandis qu'elle disparaît dans l'archéocervelet et le vermis antérieur (Ryan *et al.* 1997). Parmi ses 3 récepteurs connus, seul GalR1 est exprimé dans le cervelet avec une forte expression entre P10 et P12 (Jungnickel *et al.* 2005). La galanine stimule la migration des NGC dans la CGE, la CM et la CGI en modulant la signalisation du calcium et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans un modèle *in vitro*, et son injection *in vivo* permet une meilleure récupération du cervelet après une lésion (Komuro and Fahrion 2013).

Il est intéressant de noter que tous ces peptides impliqués dans la mise en place des NGC au cours du développement du cortex cérébelleux ont un profil d'expression similaire avec une abondance particulièrement élevée au cours des 2 premières semaines postnatales (Fig. 7A). En effet, c'est au cours de cette période essentielle à l'établissement de l'architecture du cervelet que les étapes de prolifération, migration, différenciation et survie se déroulent. Et pour chacun des peptides, ce pic d'expression survient à un moment spécifique en fonction de son action sur les différents processus cellulaires (Fig. 7B). Cette observation suggère donc qu'un peptide dont l'expression est importante et transitoire au cours du développement, pourrait agir sur l'une des étapes du développement du cortex cérébelleux.



**Figure 7 : Schématisation de l'évolution de la concentration des peptides et de l'intensité des processus au cours du développement.** (A) variation de la concentration des peptides au cours du temps. (B) variation de l'intensité des processus cellulaires au cours du temps. P : jour postnatal.

## Chapitre II : l'étude des peptides biologiquement actifs

Les peptides de signalisation sont présents dans tout le règne animal, depuis les protozoaires jusqu'aux organismes les plus complexes, ainsi que chez les végétaux, les champignons et les bactéries. Le terme récent de peptidomique désigne un domaine de recherche dont l'objet est l'analyse de ces peptides, le plus souvent à grande échelle, dans des tissus, cellules ou fluides biologiques, dans des conditions précises et à un temps donné (Clynen *et al.* 2001). En effet, le peptidome est dynamique car directement lié à l'environnement dans lequel il est situé. En réponse à un stimulus interne ou externe, les peptides peuvent être synthétisés, subir des modifications, être sécrétés ou dégradés. L'analyse des peptides doit donc tenir compte de leurs caractéristiques et définir un cadre d'étude précis.

### 1. Caractéristiques des neuropeptides

Il existe aujourd'hui plus d'une centaine de neuropeptides bioactifs identifiés qui varient en longueur de 3 acides aminés, comme pour la *thyrotropin-releasing hormone*, jusqu'à plusieurs dizaines d'acides aminés (82 pour la nesfatine-1). Tous les neuropeptides sont issus du clivage de précurseurs de plus haute masse moléculaire que l'on peut classer en 3 catégories (Douglass *et al.* 1984). La première catégorie comprend les précurseurs mono-fonctionnels qui ne donnent naissance qu'à un seul peptide bioactif souvent encadré par une ou plusieurs séquences appelées peptides cryptiques dont le rôle n'est généralement pas connu. Au sein de ces précurseurs, le peptide bioactif peut être placé à l'extrémité N-terminale en amont des séquences cryptiques, en position intermédiaire ou en C-terminal. La seconde catégorie est constituée des précurseurs mono-fonctionnels mais dont la séquence du peptide bioactif est présente en plusieurs exemplaires comme la *thyrotropin-releasing hormone*, dont on retrouve 5 copies au sein du même précurseur chez le rat, résultant très probablement de duplications intragéniques au cours de l'évolution. La troisième catégorie correspond aux précurseurs multifonctionnels donnant naissance à plusieurs peptides bioactifs dont l'archétype est la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur entre autres, de l'adrénocorticotrophine (ACTH), de l'hormone mélanotrope ( $\alpha$ -MSH) et de la  $\beta$ -endorphine (Nakanishi *et al.* 1979). Les précurseurs de la première catégorie peuvent être requalifiés en troisième catégorie suite à la découverte d'une activité pour l'un de leurs peptides cryptiques. De fait, des séquences d'abord considérées comme cryptiques peuvent parfois s'avérer exercer un effet biologique, comme ce fut le cas pour la nocistatine,

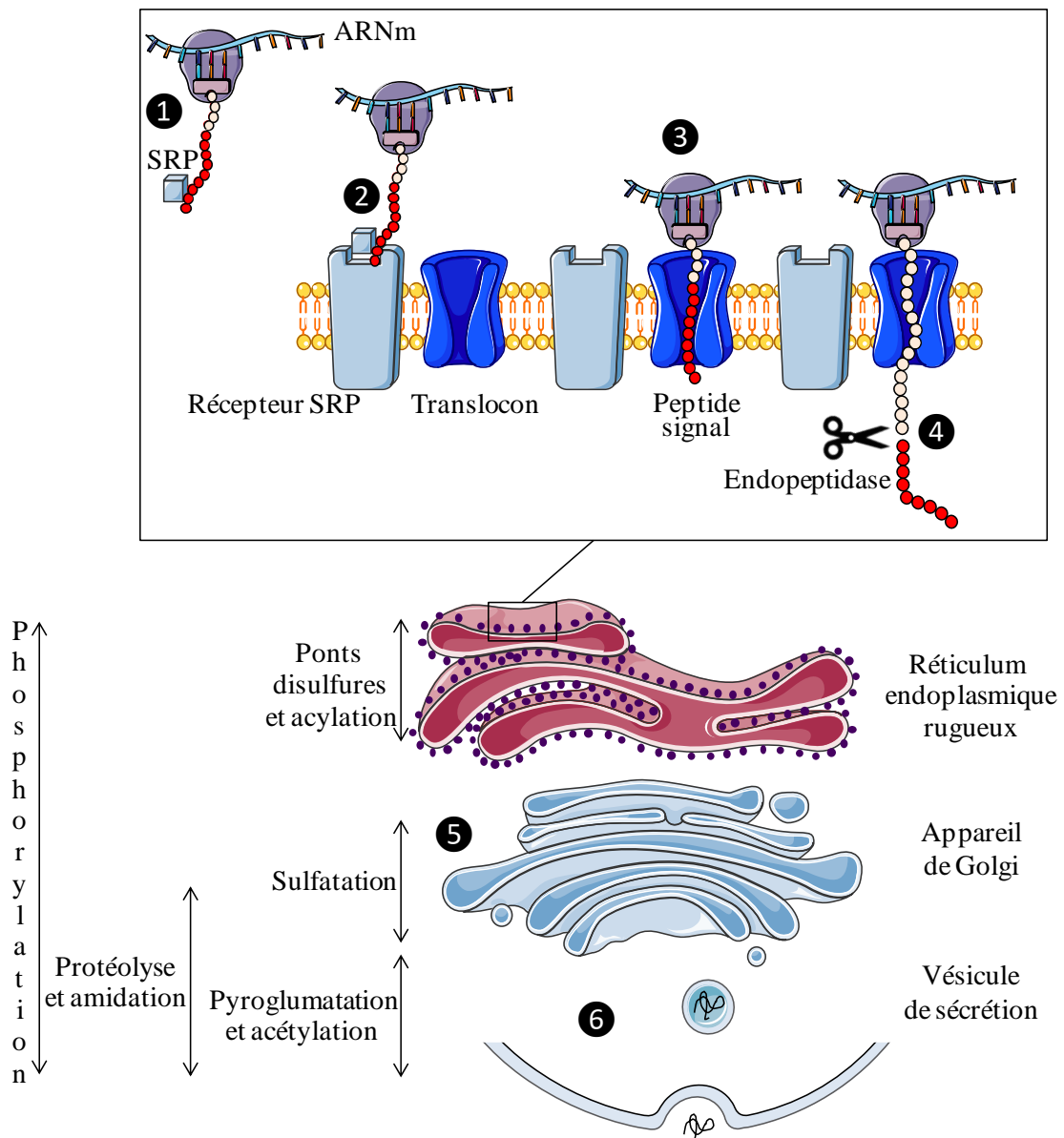
présente au sein du même précurseur que la nociceptine et exerçant un effet inverse sur la transmission de la douleur (Okuda-Ashitaka and Ito 2000).

Les précurseurs des neuropeptides possèdent plusieurs caractéristiques structurales communes. Tout d'abord, ils présentent en N-terminal un peptide signal constitué d'une séquence hydrophobe d'une vingtaine d'acides aminés dont le rôle est de faciliter la translocation du polypeptide en cours de synthèse vers la lumière du réticulum endoplasmique (Coleman *et al.* 1985). Lorsque le peptide signal est synthétisé par le ribosome, le complexe se lie à une ribonucléoprotéine associée à une molécule d'ARN, la *signal recognition particule*, qui va alors se fixer à son récepteur situé sur la membrane du réticulum, permettant la poursuite de l'élongation et la translocation du prépropeptide dans le réticulum (Walter *et al.* 1984). Au cours de la traduction, le peptide signal est excisé par une endopeptidase, la *signal peptidase* (Fig. 8).

Les précurseurs synthétisés dans la lumière du réticulum peuvent ensuite subir différentes modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la formation d'un pont disulfure entre 2 cystéines, l'ajout de groupements acylés sur la chaîne latérale de la sérine, la phosphorylation d'une sérine ou d'une thréonine, la sulfatation des tyrosines, l'amidation en position C-terminale et l'acétylation ou la pyroglutamylation en position N-terminale. Chacun de ces changements d'un ou plusieurs résidus peut modifier fortement l'activité du peptide. Par exemple, la sulfatation de la tyrosine en position 2 de la cholécystokinine (Gigoux *et al.* 1998) ou l'acétylation de l' $\alpha$ -MSH augmentent considérablement l'affinité de ces peptides pour leurs récepteurs. De même, la présence d'un pont disulfure contribue à la conformation des peptides et sa réduction conduit le plus souvent à leur inactivation comme c'est le cas pour l'urotensine II et l'ocytocine (Meraldi *et al.* 1977 ; Labarrère *et al.* 2003). Ces modifications chimiques se déroulent, soit au cours du cheminement du précurseur, du réticulum vers l'appareil de Golgi, soit dans les vésicules de sécrétion. Par exemple, l'acylation se produit dans le réticulum endoplasmique, la sulfatation se fait dans l'appareil de Golgi et l'amidation, dont fait l'objet plus de la moitié des neuropeptides, a lieu dans les granules de sécrétion.

Une fois les précurseurs arrivés dans le trans-Golgi ou les granules de sécrétion, ils subissent un clivage spécifique par des endoprotéases appelées *prohormones convertases* (PCs) pour donner naissance aux peptides biologiquement actifs. Il existe 7 PCs chez les mammifères : la PC1/3 (Seidah *et al.* 1991), la PC2 (Smeekens and Steiner 1990), la furine (van de Ven *et al.* 1990), la PACE4 (Kiefer *et al.* 1991), la PC4 (Nakayama *et al.* 1992), la PC5/6 (Lusson *et*

al. 1993) et la PC7 (Tsuji *et al.* 1994). Ces 7 PCs partagent une affinité pour les substrats possédant des acides aminés basiques (Fricker 2012). Les motifs de clivage les plus communs sont constitués de doublets basiques tels que 2 arginines, un doublet lysine-arginine ou 2 lysines. Les PC 1/3 et 2, les plus abondantes, clivent les précurseurs en aval de ce doublet et laissent donc les 2 acides aminés basiques à l'extrémité C-terminale du peptide. Ces résidus



**Figure 8 : Biosynthèse des neuropeptides.** La *signal recognition particule* (SRP) se fixe au complexe formé par le peptide en cours de synthèse, le ribosome et l'ARNm (1) puis se lie à son récepteur sur la membrane du réticulum endoplasmique (2). Cela permet à la séquence peptidique d'entrer dans le réticulum par le translocon afin que la synthèse du peptide puisse se poursuivre (3). Le peptide signal est ensuite clivé par une endopeptidase (4). Une fois synthétisé le neuropeptide va transiter par l'appareil de Golgi pour y subir des modifications post-traductionnelles (5) avant d'être sécrété de façon régulée (6).

basiques sont excisés, dans la très grande majorité des cas, par des carboxypeptidases (Fricker and Snyder 1982; Song and Fricker 1995) sauf en ce qui concerne l'ODN et la cortistatine (Ferrero *et al.* 1986 ; de Lecea *et al.* 1996). De façon plus rare, le motif de clivage peut être constitué d'un seul acide aminé basique comme c'est le cas pour la SST 28 et l'ODN (Barbaccia *et al.* 1990 ; Brakch *et al.* 1995). Plus récemment, 2 autres PCs ne requérant pas de résidus basiques au niveau du site de clivage ont été découvertes : la *subtilisin-kexin-isozyme* (Seidah *et al.* 1999) et la *proprotein convertase subtilisin-kexin isozyme* (Seidah *et al.* 2003). L'expression différentielle des PCs dans les types cellulaires conduit à des clivages tissu-spécifiques des peptides. L'exemple le plus significatif de cette maturation est celui de la POMC à l'origine de différents peptides bioactifs selon les tissus. Ainsi, dans les cellules corticotropes de l'adénohypophyse, où seule la PC1/3 est présente, seulement la moitié des 8 sites de clivage potentiels sont clivés, alors que dans les neurones du noyau arqué et les cellules mélanotropes du lobe intermédiaire de l'hypophyse, qui expriment à la fois les PC1/3 et PC2, la maturation est complète et conduit à la formation d' $\alpha$ -MSH (Bicknell 2008). Après clivage et modifications post-traductionnelles, le peptide devenu bioactif est stocké dans des vésicules de sécrétion qui, lors d'une dépolarisation de la cellule, viennent fusionner avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans l'espace extracellulaire.

Les neuropeptides possèdent donc des caractéristiques communes faisant d'eux un type particulier de molécules de signalisation intracellulaire. En effet, produits par les cellules nerveuses, ils sont issus du clivage spécifique d'un précurseur comportant un peptide signal, puis sécrétés de façon régulée. Une fois parvenu dans l'espace extracellulaire ils agissent à faible concentration en se fixant sur des récepteurs spécifiques avant d'être dégradés sans subir de recapture, contrairement aux neurotransmetteurs. Ces caractéristiques physico-chimiques et biologiques sont souvent mises à profit pour l'identification de nouveaux neuropeptides.

## 2. Stratégies d'identification des neuropeptides

Depuis la découverte du premier peptide en 1902, de très nombreuses équipes ont cherché à en découvrir de nouveaux, en particulier des neuropeptides. Les techniques utilisées pour leur identification sont diverses et ont beaucoup évoluées depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle.

## 2.1. Identification à partir d'une activité biologique

La plus ancienne méthode utilisée pour découvrir des peptides bioactifs est celle du test biologique qui consiste à observer l'effet d'extraits de tissus, le plus souvent de cerveaux pour les neuropeptides, sur un paramètre physiologique. Ces extraits sont ensuite purifiés jusqu'à l'obtention d'un seul composé. On peut distinguer 2 types d'approches pour les essais biologiques selon si l'activité testée est spécifique ou aspécifique. Concernant l'activité spécifique, c'est par cette approche qu'a été caractérisé le tout premier peptide bioactif, appelé sécrétine pour sa capacité à stimuler la sécrétion pancréatique (Bayliss and Starling 1902). Le premier neuropeptide, l'ocytocine, a également été isolé quelques années plus tard grâce à une stratégie similaire en observant la capacité d'un extrait hypophysaire humain à entraîner la contraction d'un utérus de chat (Dale 1909). La séquence peptidique de l'ocytocine fut la première à être déterminée puis synthétisée en 1953, ce qui valut le prix Nobel à Vincent du Vigneaud (Du Vigneaud *et al.* 1953). D'autres neuropeptides ont été découverts grâce à cette approche comme la *gonadotropin-releasing hormone* et la *thyrotropin releasing hormone*. Ces neurohormones furent caractérisées en étudiant la capacité d'extraits hypothalamiques à stimuler le relargage des hormones lutéinisante, folliculo-stimulante et de la thyrotropine (Guillemin *et al.* 1963 ; Ramirez *et al.* 1964). Le séquençage de ces neuropeptides permit à Schally et Guillemin d'obtenir le prix Nobel en 1977 (Nair *et al.* 1970 ; Schally *et al.* 1971).

Les tests d'activités aspécifiques ont permis d'isoler d'autres peptides comme la substance P ou les enkephalines. Pour la première, la purification a été réalisée en recherchant les effets d'extraits d'intestin, puis de cerveau, sur la contraction des muscles lisses de l'intestin (V Euler and Gaddum 1931). Toutefois, il faudra attendre 40 ans avant que ne soit déterminée la séquence du peptide en question (Chang *et al.* 1971). Pour les enképhalines, le test a consisté en l'observation de l'effet d'extraits de cerveau sur la contraction du *vas deferens* et de muscles longitudinaux (Hughes 1975). Ces extraits ont montré une augmentation de la contraction de ces 2 préparations, effet réversé par l'ajout de naloxone qui est un antagoniste des récepteurs opioïdes. L'approche aspécifique a également permis d'identifier le PACAP à partir d'extrait d'hypothalamus de mouton en mesurant l'activation de l'adénylate cyclase dans les cellules de l'hypophyse, d'où le nom de ce peptide (Miyata *et al.* 1989). Mais si ces approches par des tests biologiques ont permis d'identifier plusieurs neuropeptides dès le début des années 1900, elles ne sont pas sans inconvénients. En particulier, le processus de purification par étapes successives et de tests d'activité jusqu'à parvenir à un seul composé bioactif peut être très long.



## 2.2. Identification à partir du récepteur

Des équipes ont choisi de porter leur attention sur le récepteur afin d'identifier son ligand. Cette approche, apparue dans les années 1970, a surtout été utilisée entre 1980 et 1995 suite au clonage à grande échelle des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), entraînant la découverte de nombreux récepteurs dit orphelins, c'est-à-dire des récepteurs dont les ligands endogènes étaient inconnus. La recherche de ligands endogènes est faite en induisant l'expression de ces récepteurs dans des lignées cellulaires qui vont permettre de cribler des bibliothèques de composés synthétiques ou des extraits de tissus. L'étude de la liaison d'un potentiel neuropeptide au récepteur d'intérêt est réalisée selon 2 types d'approches. La première consiste à utiliser un ligand marqué (le plus souvent radioactif) dont la liaison au récepteur est déplacée par le ligand endogène. Le ligand marqué peut être un ligand endogène déjà connu et dans ce cas l'objectif est d'identifier de nouveaux neuropeptides se liant au récepteur, ou bien un ligand synthétique dans le cas de l'étude d'un récepteur orphelin. Cela a notamment permis d'identifier plusieurs neuropeptides issus de la prodynorphine dont les différentes formes de la dynorphine (Pert *et al.* 1977 ; Goldstein *et al.* 1979). L'obstacle principal à cette technique est la nécessité de marquer le ligand peptidique, le plus souvent en ajoutant un atome d'iode sur une tyrosine sans trop réduire son affinité. La deuxième méthode s'intéresse à l'activation du récepteur étudié en mesurant un paramètre physiologique (taux de calcium, second messenger, acidification). C'est ainsi qu'ont été identifiées, entre autres, la nociceptine et l'orexine (Meunier *et al.* 1995 ; Reinscheid *et al.* 1995 ; Sakurai *et al.* 1998). Des variantes de cette approche utilisent des techniques d'imagerie en étudiant l'internalisation du récepteur marqué avec un fluorochrome (De Mota *et al.* 2004) ou de microcalorimétrie en mesurant l'interaction entre le récepteur et son ligand grâce aux variations de température induites par un changement de conformation (Jerabek-Willemsen *et al.* 2014).

## 2.3. Identification à partir des caractéristiques des neuropeptides

Les méthodes présentées ci-dessus s'attachent à la découverte de neuropeptides *via* leur fonction, soit à l'échelle d'un tissu, soit à celle d'une cellule. Cependant, plusieurs équipes ont exploité les caractéristiques remarquables de certains neuropeptides pour en découvrir de nouveaux. La principale de ces caractéristiques est l'amidation des peptides, qui peut être étudiée par une suite d'étapes de précipitations chimiques des fragments amidés avant leur purification. Cette approche a été utilisée avec succès par l'équipe de Viktor Mutt pour identifier divers nouveaux neuropeptides, dont certains déjà connus chez d'autres espèces,

comme la cholécystokinine (Tatemoto *et al.* 1984), mais aussi d'autres totalement nouveaux comme le neuropeptide Y (Tatemoto *et al.* 1982) et la galanine (Tatemoto *et al.* 1983). La principale difficulté de cette approche provient de la très grande quantité de matériel qu'elle nécessite : il a fallu par exemple 400 kg de cerveau de porc pour identifier le neuropeptide Y, rendant sa mise en œuvre difficile chez les modèles rongeurs. De plus, seule environ la moitié des neuropeptides connus est amidée, impliquant que l'autre moitié ne peut être identifiée par cette technique. Cependant, d'autres propriétés peuvent être utilisées pour trouver des neuropeptides au sein de précurseurs, comme la présence de sites de clivage pour les PCs. Cette approche bien que compliquée à mettre en œuvre par une démarche sans *a priori*, a permis de découvrir de nouveaux peptides issus de précurseurs déjà connus comme ce fut le cas pour la nocistatine (Okuda-Ashitaka *et al.* 1998). Enfin, une méthode plus rarement employée, utilise l'activité des enzymes de la biosynthèse dont fait partie la carboxypeptidase E qui intervient après le clivage par les PC pour retirer l'acide aminé basique situé en position C-terminale. L'inactivation de cette enzyme entraîne l'accumulation d'une forme presque mature du potentiel neuropeptide qui peut alors être plus facilement purifié puis séquencé. Cela a permis l'identification des peptides PEN, issus d'un précurseur proche des granines, le SAAS (Fricker *et al.* 2000), dont le récepteur n'a cependant toujours pas été identifié. Cette technique possède les mêmes limitations que les précédentes à savoir que tous les neuropeptides ne sont pas des substrats de la carboxypeptidase E. De plus toutes ces approches s'attachant aux caractéristiques des neuropeptides partagent une autre limitation puisqu'une fois le candidat purifié et séquencé, il faut encore de longues recherches pour identifier sa fonction.

#### 2.4. Identification en utilisant des techniques génomiques

D'autres approches utilisant des méthodes d'analyse du génome ont permis la découverte de plusieurs peptides déjà identifiés chez d'autres espèces et dont une partie de la séquence était conservée. C'est le cas de l'urotensine II et de la *melanin-concentrating hormone*, déjà connues chez le poisson, dont le clonage des ADN complémentaires (ADNc) a rendu possible leur identification dans la moelle épinière humaine et le cerveau de rat (Nahon *et al.* 1989 ; Coulouarn *et al.* 1998, 1999). Le processus d'épissage alternatif d'ARNm codant pour le précurseur d'un autre peptide a été à l'origine de la découverte du *calcitonin gene related peptide*, qui est produit par l'épissage tissu-spécifique dans les cellules neurales du transcrit primaire de la calcitonine (Amara *et al.* 1982).

Le séquençage du génome de la plupart des espèces utilisées couramment en recherche a permis le développement de banques génomiques contenant la quasi-totalité des séquences génomiques de ces espèces. Cependant, le manque d'annotations des gènes a rendu nécessaire la création d'outils informatiques puissants afin de cribler ces banques pour permettre l'identification de nouveaux neuropeptides. Ces logiciels utilisent plusieurs stratégies. Tout d'abord, l'alignement de séquences permet de comparer les gènes non-annotés d'une espèce aux gènes codant pour des neuropeptides d'une autre espèce (Siepel *et al.* 2005). Ainsi peuvent être identifiés les gènes qui sont conservés au cours de l'évolution, et donc susceptibles d'exercer une fonction importante. Ensuite, le criblage de banques d'ADNc peut permettre d'identifier des séquences possédant des motifs communs avec des familles de neuropeptides connus, comme par exemple le motif RFamide (Nathoo *et al.* 2001). Enfin, il est possible de s'appuyer sur les caractéristiques des précurseurs des neuropeptides afin de cribler les banques génomiques à la recherche de séquences candidates (Hewes and Taghert 2001). Ces approches utilisent des modèles mathématiques comme le modèle de Markov, attribuant un score aux séquences en fonction de leur correspondance avec chacun des critères. Il faut ensuite vérifier l'expression de ces séquences dans les cellules nerveuses et rechercher une activité pour le potentiel peptide.

Il convient néanmoins de noter que ces techniques utilisées pour identifier de nouveaux neuropeptides sont peu à peu supplantées par de nouvelles approches faisant appel à des méthodes plus performantes. L'évolution des techniques a permis l'émergence d'une nouvelle approche d'investigation des peptides utilisant la spectrométrie de masse, la peptidomique.

## 2.5. Identification en utilisant des techniques peptidomiques

Le terme de peptidomique est apparu pour la première fois en 2001 dans une étude utilisant la spectrométrie de masse pour dresser un profil peptidique chez le criquet (Clynen *et al.* 2001). Ces méthodes nécessitent un matériel de départ plus restreint et un temps d'analyse plus court grâce à la suppression des étapes de purification successives. De plus, elles permettent l'obtention de plus d'informations sur le peptide candidat, comme sa séquence ou la présence de modifications post-traductionnelles. L'étude du peptidome se déroule classiquement en 4 étapes, à savoir (i) l'extraction des peptides, (ii) leur séparation, (iii) leur détection et (iiii) leur identification et quantification. La préservation des peptides dans leur état natif est primordiale pour les études de peptidomique et commence dès le prélèvement de l'échantillon en évitant la dégradation de protéines en peptides (faux positifs) ou celle des peptides bioactifs (faux

négatifs). La protection de l'échantillon peut se faire par dénaturation par la chaleur, par acidification ou par ajout d'inhibiteurs de protéases. L'étape d'extraction s'est raffinée et « démocratisée » avec l'apparition de kits d'extraction commerciaux. Cette première étape d'extraction peut inclure l'utilisation de filtres de coupure permettant d'éliminer les plus grosses protéines. Le seuil de coupure classiquement utilisé en peptidomique est de 10 kDa, pour éliminer les protéines d'une taille supérieure à une centaine d'acides aminés. L'étape de filtration est complétée par l'utilisation de dispositifs comme les Zip Tips<sup>®</sup> ou les Spe-Pak<sup>®</sup> pour dessaler, concentrer et purifier les échantillons. La deuxième étape qui consiste à séparer les analytes en amont du spectromètre de masse, a été modernisée afin de permettre l'analyse de mélanges complexes. En effet, s'il est possible d'identifier des peptides en analysant directement l'échantillon par spectrométrie de masse, la présence de peptides et de protéines de poids moléculaires et de concentrations très différents dans une matrice complexe nécessite d'inclure une ou plusieurs étapes de séparation en amont de l'analyseur. Cette limitation peut être contournée par un couplage du spectromètre de masse à une méthode de séparation permettant l'analyse successive par le spectromètre de masse des différents composés de l'échantillon. La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) rend possible cette séparation des peptides en fonction de leur hydrophobicité, de leur polarité ou de leur taille. La miniaturisation des colonnes (nanoHPLC) et l'augmentation de la pression (ultraHPLC), a permis d'augmenter la sensibilité et le pouvoir résolutif des systèmes actuels, et ainsi, d'améliorer la séparation des analytes, tout en réduisant la quantité d'échantillon nécessaire. L'étape d'analyse des peptides par spectrométrie de masse a aussi été considérablement améliorée au cours des dernières années, notamment avec l'arrivée dans les plates formes de protéomique d'appareils comme les systèmes de la gamme Orbitrap. Le niveau de sensibilité, la vitesse d'acquisition et la gamme de masses analysables n'ont cessé de s'améliorer grâce au perfectionnement de l'ionisation, du piégeage des ions et de la fragmentation (Second *et al.* 2009 ; Eliuk and Makarov 2015). L'étape d'identification et de quantification des peptides a aussi fait des progrès considérables avec le développement de nouveaux outils informatiques. L'expansion des techniques de peptidomique permettant l'accumulation d'informations sur la séquence peptidique et ses modifications post-traductionnelles, a été facilitée par les progrès de l'informatique. En effet, l'augmentation de la quantité de données générées pouvant atteindre, pour chaque expérience, plusieurs dizaines de gigabits, implique le développement des ressources bio-informatiques. Enfin, l'analyse des

données nécessite des logiciels puissants afin de réaliser le séquençage *de novo*, la quantification *label-free* ou l'interrogation de bases de données (Martens *et al.* 2005).

### **2.6. Identification *de novo***

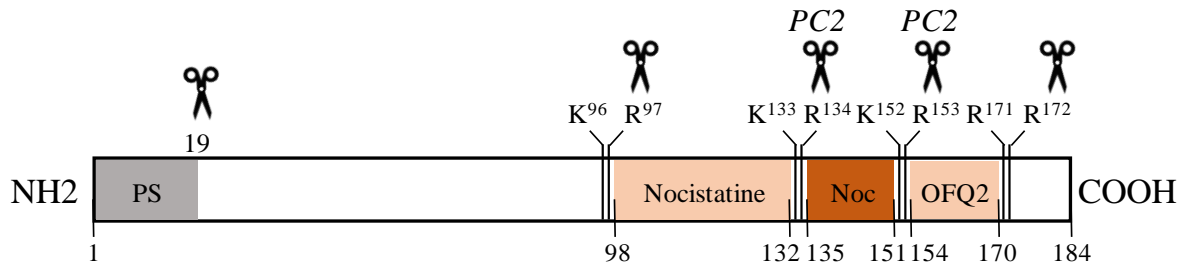
La recherche de peptides *de novo* combine plusieurs approches à la fois de peptidomique, de bio-informatique et de génomique. En effet, l'acquisition des données expérimentales est réalisée par spectrométrie de masse, puis celles-ci sont analysées et triées grâce à des outils bio-informatiques. Cela permet la sélection d'un nombre de peptides candidats qui sont potentiellement bioactifs afin de rétro-transcrire leur séquence dans le but d'identifier le gène dont ils sont issus. Enfin, grâce à des critères de sélection comme la présence d'une séquence codant pour un peptide signal en amont du peptide d'intérêt, l'existence de doublets basiques aux extrémités N et C-terminales ou la régulation de l'expression du gène, les études fonctionnelles peuvent se focaliser sur un petit nombre de peptides.

## Chapitre III : le système nociceptinergique

### 1. La nociceptine

Dans les années 90, le développement du clonage à grande échelle des génomes de l'Homme et des espèces modèles a permis la découverte de nombreux RCPGs qui, n'ayant pas de ligands endogènes connus, ont été qualifiés d'orphelins. De là est apparue une stratégie pour l'identification des ligands endogènes de ces RCPGs orphelins, la pharmacologie inverse. Un des premiers récepteurs dont le ligand a été identifié par cette méthode est le *nociceptin opioid peptide* (NOP) aussi connu sous le nom d'*opioid receptor-like 1* (ORL1). Deux équipes se sont lancées à la recherche d'un ligand de type peptidique exprimé, comme son récepteur NOP, principalement dans le système nerveux central, et ont publié leurs résultats à quelques semaines d'intervalle (Meunier *et al.* 1995 ; Reinscheid *et al.* 1995). L'équipe de Meunier a utilisé comme matériel de départ des cerveaux de rat, tandis que celle de Reinscheid s'est servie d'hypothalamus de porc qu'elles ont soumis à des étapes d'extraction et de purification successives par chromatographie à haute performance, jusqu'à identifier une fraction contenant le ligand du récepteur NOP. Pour tester l'activité des fractions obtenues, chacune de ces équipes a exploité la capacité du récepteur à inhiber l'accumulation d'AMPC induite par la forskoline dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur NOP. L'équipe suisse nomma ce peptide orphanine FQ en référence à sa liaison à un récepteur jusque-là orphelin, ainsi qu'à son premier et dernier acide aminé, respectivement une phénylalanine (F) et une glutamine (Q) (Reinscheid *et al.* 1995). L'équipe française, quant à elle, l'appela nociceptine du fait de ses effets pro-nociceptifs (Meunier *et al.* 1995). Aujourd'hui, l'appellation orphanine FQ tend à disparaître au profit de nociceptine.

La nociceptine est un peptide de 17 acides aminés qui présente, chez les mammifères, une phénylalanine en première position contrairement aux peptides de type opioïde qui possèdent une tyrosine en N-terminal, caractéristique du motif YGGF signature de cette famille. Malgré la ressemblance structurelle de NOP avec les récepteurs opioïdes, la nociceptine ne se lie que très peu à ces derniers et n'est donc plus considérée comme un membre à part entière de la famille des opioïdes mais comme un *opioid-related peptide*.



**Figure 9 : Maturation du précurseur de la nociceptine.** Après excision du peptide signal en N-terminal, la pré-pronociceptine devient la pronociceptine. Chacun des 3 peptides biologiquement actifs est ensuite clivé au niveau de doublets basiques lysine-arginine ou arginine-arginine. PC 2 : prohormone convertase 2 ; PS : peptide signal ; Noc : nociceptine ; OFQ2 : orphanine FQ II.

Le gène de la nociceptine dont la structure a été très conservée au cours de l'évolution, est situé sur le chromosome 15 chez le rat. Il dérive d'un ancêtre commun avec les gènes codant pour les précurseurs des peptides opioïdes même s'il a progressivement évolué vers un système indépendant (Danielson and Doros 1999). Ce gène code pour un précurseur, la pré-pronociceptine qui, après excision du peptide signal en N-terminal, donne naissance à une protéine de 165 acides aminés, la pronociceptine (Fig. 9). Cette dernière subit alors un clivage protéolytique pour donner, en plus de la nociceptine, un peptide de 35 acides aminés, la nocistatine, et un autre de 17 acides aminés, l'orphanine FQ II. Chacun de ces peptides est flanqué par des doublets basiques, sites caractéristiques de coupure par les PCs. De fait, le clivage de la nociceptine est réalisé par la prohormone convertase 2 (Allen *et al.* 2001 ; Fig. 9).

Ni la nocistatine ni l'orphanine FQ II ne se lient au récepteur NOP ou aux récepteurs des opioïdes, mais l'un et l'autre s'avèrent moduler les effets de la nociceptine. Ainsi, la nocistatine antagonise l'action de la nociceptine sur certaines fonctions physiologiques telles que la transmission de la douleur, la mémoire ou l'anxiété (Okuda-Ashitaka and Ito 2000). Ces effets seraient provoqués par la liaison de la nocistatine à un récepteur de type RCPG encore inconnu (Fantin *et al.* 2007 ; Johnson and Connor 2007). L'orphanine FQ II, quant à elle, exerce un effet analgésique au niveau supraspinal (Rossi *et al.* 1998) en se liant à un récepteur non encore identifié.

D'un point de vue évolutif, la nociceptine est parfaitement conservée au sein des mammifères avec une identité de séquence chez de nombreuses espèces comme l'Homme, le rat et la souris. Dans des phylums plus éloignés comme les poissons ou les amphibiens, seuls 5 acides aminés diffèrent (Fig. 10). Cette conservation au cours de l'évolution suggère que la nociceptine exerce des fonctions essentielles.

|                                     |                   |
|-------------------------------------|-------------------|
| Homme, cheval,<br>bœuf, rat, souris | FGGFTGARKSARKLANQ |
| Poulet                              | Y---I-V-----WN--  |
| Alligator                           | Y---I-V-----WN--  |
| Xénope                              | Y---I-V-----WN--  |
| Poisson zèbre                       | Y---I-I-----WN--  |
| Poisson tétra                       | Y---I-I-----WN--  |

**Figure 10 : Alignement évolutif des séquences de la nociceptine chez différentes espèces de vertébrés.** Chez les mammifères, l'identité de séquence est parfaite. Chez des espèces plus éloignées de l'Homme, quelques acides aminés seulement diffèrent. En bleu les acides aminés appartenant au même groupe physico-chimique que l'acide aminé de la séquence humaine, En rouge les acides aminés qui n'ont pas les mêmes propriétés physico-chimiques.

La demi-vie de la nociceptine est d'environ 1 h dans le plasma, mais elle est beaucoup plus brève dans un homogénat de cerveau où elle se dégrade en seulement 3 min (Gündüz *et al.* 2006 ; Rizzi *et al.* 2007). Cette courte demi-vie est due à l'action de peptidases qui vont produire divers métabolites dont certains présentent une activité propre. Suite à son injection dans l'hippocampe, la nociceptine est clivée successivement en 2 fragments [1-13] et [14-17], puis en 2 sous-fragments [1-9] et [10-13] (Sandin *et al.* 1999). Ces fragments seraient générés par l'endopeptidase 24.11 puisqu'ils ne sont plus retrouvés lorsque celle-ci est inhibée (Sakurada *et al.* 2002). Le fragment [1-13], qui est le plus abondant, bloque les effets du peptide natif sur la pression artérielle et le rythme cardiaque, suggérant qu'il agit comme un antagoniste du récepteur NOP (Chen *et al.* 2002). D'autres métabolites de dégradation comme les fragments [1-11] et [1-7], qui peuvent aussi être générés par l'endopeptidase 24.15 (Montiel *et al.* 1997), présentent des propriétés analgésiques dans des tests de retrait de la queue chez la souris (King *et al.* 1997 ; Rossi *et al.* 1997). La caractérisation de ces différents fragments a permis le développement d'agonistes et d'antagonistes du récepteur NOP. Comme la nociceptine ne semble pas traverser la barrière hémato-encéphalique, les chercheurs ont tenté de développer des agonistes capables d'atteindre le cerveau comme discuté dans la partie 3 de ce chapitre.

## 2. Le récepteur de la nociceptine

Le récepteur de la nociceptine a été identifié par homologie de séquence avec le récepteur delta opioïde (Kieffer *et al.* 1992 ; Evans *et al.* 1992) et, dans un premier temps, classé comme quatrième membre de la famille des récepteurs aux opioïdes avec les récepteurs mu, delta et kappa. Cependant, malgré ses 47% d'identité et 64% d'homologie de séquence avec cette

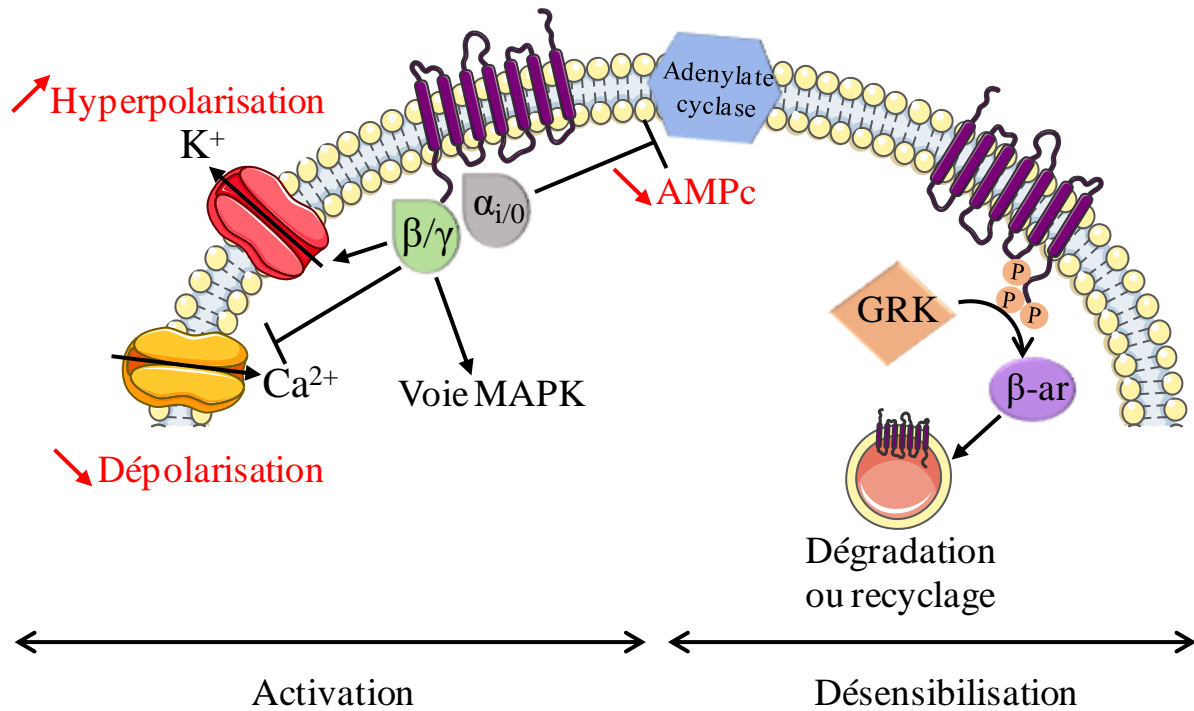


famille de récepteurs, le récepteur NOP ne présente pas de liaison de haute affinité avec les ligands opioïdes endogènes (Bunzow *et al.* 1994) et gardera donc son statut de récepteur orphelin jusqu'à la découverte en 1995 de son ligand endogène, la nociceptine. Le récepteur NOP est maintenant classé en tant que membre *opioid-like* de la famille des récepteurs aux opioïdes en raison de son insensibilité à la naloxone, un antagoniste non sélectif des récepteurs aux opioïdes. Ce RCPG de 367 acides aminés chez le rat est organisé en 7 domaines transmembranaires de type rhodopsine (classe A ; Fig. 11A) ; il est couplé à une protéine G inhibitrice, principalement de type  $\alpha_i$  et  $\alpha_0$  (Reinscheid *et al.* 1995). Le couplage avec les sous-unités  $\alpha_i/\alpha_0$  entraîne l'inhibition de la production d'AMPc par l'adénylate cyclase de façon sensible à la toxine pertussique (Mollereau *et al.* 1994) et l'inhibition de l'activité des protéines kinases dépendantes de l'AMPc (Zhang *et al.* 1999 ; Fig. 11A). Un couplage du récepteur avec les sous-unités  $\beta/\gamma$  a également été décrit dans certaines cellules. Il est associé à une activation de la voie des MAP kinases et une inhibition des canaux calciques voltage-dépendants, ce qui entraîne une diminution de l'influx de calcium (Lou *et al.* 1998 ; Chan and Wong 2000 ; Fig. 11A). L'activation de la voie MAP kinase, qui est faite *via* la phospholipase C et la protéine kinase C (Fukuda *et al.* 1997 ; Lou *et al.* 1998), permet l'ouverture de canaux potassiques à rectification entrante (canaux GIRK pour *G-protein activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> current* ; Connor *et al.* 1996 ; Vaughan *et al.* 1997). L'influx de potassium stabilise le potentiel de membrane à une valeur proche du potentiel de repos du K<sup>+</sup> induisant l'hyperpolarisation de la cellule (Fig. 11A).

Au niveau neurophysiologique, l'hyperpolarisation entraîne une diminution de la fréquence de décharge des neurones, correspondant de façon générale à une baisse de l'excitabilité neuronale. Cela se traduit par une diminution de la fréquence des potentiels d'action et des courants post-synaptiques évoqués (Moran *et al.* 2000), avec pour conséquence une réduction des courants spontanés excitateurs mais aussi inhibiteurs au sein de plusieurs structures du cerveau. Ainsi, dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus, l'activation du récepteur NOP induit une diminution dose-dépendante des courants post-synaptiques de type glutamatergiques et GABAergiques (Gompf *et al.* 2005). Dans l'amygdale, la nociceptine diminue également les courants post-synaptiques inhibiteurs de type GABA (Roberto and Siggins 2006). Cette baisse de l'excitabilité neuronale entraîne une diminution de la libération de neurotransmetteurs qui a été étudiée *in vivo* par microdialyse. Il a été en effet montré que la nociceptine inhibe la libération de dopamine dans la substance noire (Marti 2005), de noradrénaline dans le cortex préfrontal (Okawa *et al.* 2001) et de sérotonine dans le noyau du raphé dorsal (Tao *et al.* 2007).

Des mesures par microdialyse sur des animaux KO pour le gène NOP, ont révélé une augmentation de la transmission cholinergique dans l'hippocampe (Uezu *et al.* 2005). Et enfin, la nociceptine atténue aussi la potentialisation et la dépression à long terme dans cette structure (Yu and Xie 1998 ; Wei and Xie 1999). L'ensemble de ces données suggère un rôle inhibiteur du système nociceptinergique dans le système nerveux central.

Lors d'une stimulation répétée, plusieurs *G-protein receptor kinases* sont recrutées pour phosphoryler le récepteur sur des résidus sérine situés sur son domaine intracellulaire C-



**Figure 11 : Représentation de l'activation et de la désensibilisation du récepteur NOP.** (A) l'activation du récepteur par son ligand entraîne son couplage à la protéine  $G_{i/o}$ . La sous-unité  $\alpha$  inhibe la production d'AMPc par l'adénylate cyclase alors que les sous-unités  $\beta/\gamma$  activent la voie MAPK, diminuent la conductance des canaux calciques et augmentent celle des canaux potassiques. L'ensemble de ces effets conduit à une diminution globale de l'excitabilité neuronale. (B) lors d'une stimulation répétée, la phosphorylation du récepteur par les GRK entraîne sa désensibilisation. Il s'ensuit un recrutement des  $\beta$ -arrestines qui participent à l'internalisation du récepteur dans une vésicule qui peut soit fusionner à nouveau à la membrane plasmique pour recycler le récepteur, soit fusionner avec un lysosome pour être dégradé. AMPc : adénosine monophosphate cyclique ;  $\beta$ -ar :  $\beta$ -arrestine ; GRK : *G-protein receptor kinases*.

terminal et ainsi induire un changement de conformation qui empêche la liaison du ligand et entraîne sa désensibilisation (Wang *et al.* 2006 ; Zhang *et al.* 2012 ; Fig. 11B). L'internalisation du récepteur NOP suite à sa liaison avec la nociceptine a été établie dans des neurones et des cellules CHO (Spampinato *et al.* 2001, 2002). La phosphorylation du récepteur provoque le recrutement de  $\beta$ -arrestines à l'origine de la formation de puits de clathrines nécessaires à son internalisation (Mittal *et al.* 2013). Après marquage du récepteur à l'EGFP, l'observation par

microscopie confocale a montré que la moitié était internalisée au bout de 12 min (Corbani *et al.* 2004). Suite à l'internalisation, NOP peut être déphosphorylé puis recyclé à la membrane ou transporté vers le protéasome et le lysosome (Fig. 11B). Les études qui se sont intéressées au phénomène de recyclage de ce récepteur en particulier révèlent qu'il existe un seuil en terme de durée de stimulation et de concentration en agoniste au-delà duquel NOP n'est plus recyclé mais préférentiellement dégradé (Dautzenberg *et al.* 2001).

### 3. Développement de ligands

Le développement d'agonistes et d'antagonistes sélectifs est essentiel à la compréhension du rôle de la nociceptine et de son récepteur au niveau du système nerveux central. Les plus nombreux sont les analogues peptidiques de la nociceptine et notamment des variants dérivés du fragment [1-13] amidé qui agissent comme des agonistes totaux ou partiels (Guerrini *et al.* 1997 ; Carrà *et al.* 2005 ; Rizzi *et al.* 2007). Certains de ces agonistes sont plus sélectifs, plus puissants et ont une demi-vie plus longue que la nociceptine, ce qui en fait d'éventuels outils pharmacologiques. Des antagonistes peptidiques au récepteur NOP ont également été développés comme l'UFP-101 (NPhe1, Arg14, Lys15-nociceptine) qui antagonise l'effet de la nociceptine de façon compétitive, non seulement *in vitro* en bloquant l'inhibition de l'adénylate cyclase, mais également *in vivo* en empêchant la baisse d'activité locomotrice induite par le ligand natif (Calo *et al.* 2002). Certaines molécules ont été développées pour leur capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique. C'est le cas d'une molécule hybride formée d'un térapeptide agoniste des récepteurs opioïdes et d'un heptapeptide antagoniste du récepteur NOP. Ce composé montre un effet analgésique durable sans induire la dépression respiratoire qui est un effet secondaire fréquent induit par la morphine (Guillemyn *et al.* 2016).

Des agonistes et antagonistes non-peptidiques du récepteur NOP ont également été développés. C'est le cas du Ro 64-6198, un agoniste sélectif capable d'agir *in vitro* sur les cellules CHO exprimant le récepteur humain (Hashiba *et al.* 2002) mais aussi *in vivo* sur des modèles murins d'anxiété et de mémoire (Reiss *et al.* 2002 ; Goeldner *et al.* 2012). Le Ro 64-6198 compense son affinité légèrement inférieure à celle de la nociceptine par une forte sélectivité pour le récepteur NOP et une meilleure stabilité que le ligand endogène. La buprénorphine, produit de substitution aux opiacés, s'avère être un agoniste partiel des récepteurs NOP et mu-opioïde capable de passer la barrière hémato-encéphalique (Thomas *et al.* 2014).

#### 4. Distribution du système nociceptinergique

La nociceptine et son récepteur ont été étudiés principalement dans le système nerveux central, mais également dans les tissus périphériques du rat et de la souris. La localisation de l'ARNm du peptide ou de NOP a été recherchée principalement par hybridation *in situ* et celle de la protéine par immunomarquage. Une bonne corrélation est observée entre l'expression de l'ARNm et des protéines correspondantes, de même qu'une colocalisation entre le peptide et son récepteur.

##### 4.1. Expression dans le cerveau antérieur : diencéphale et télencéphale

Au niveau du thalamus, les noyaux réticulaires, suprafasciculaires et paraventriculaires, ainsi que le groupe de noyaux postérieurs expriment fortement l'ARNm de la nociceptine et contiennent des taux élevés du peptide (Neal *et al.* 1999a). Dans la partie antéroventriculaire, le marquage est moins intense et aucun signal n'est détecté dans l'aire sub-thalamique. L'expression du récepteur est corrélée avec celle du peptide, à l'exception du noyau ventromédian fortement marqué par radiolisation mais pauvre en peptide (Florin *et al.* 2000). La nociceptine et son ARNm sont aussi abondants dans l'hypothalamus, notamment dans les régions dorsale, dorsomédiane et antérieure, ainsi que dans les noyaux préoptiques (Neal *et al.* 1999b ; Fig. 12). Près du troisième ventricule, le noyau arqué est également très marqué en ARNm du peptide et de son récepteur, de même que les noyaux mamillaires, les noyaux paraventriculaire et ventromédian, l'hypophyse et la glande pinéale (Houtani *et al.* 2000). Au niveau des structures dopaminergiques, la nociceptine et son récepteur sont exprimés dans l'aire tegmentale ventrale et la substance noire (Norton *et al.* 2002 ; Fig. 12). Les régions du système limbique expriment également fortement la nociceptine et son récepteur (Neal *et al.* 1999a). Dans l'hippocampe, les aires CA1, CA2 et CA3 sont riches en peptide au niveau des neurones pyramidaux, tandis que le gyrus denté présente un marquage plus faible dans les cellules granulaires (Houtani *et al.* 2000 ; Fig. 12). Par ailleurs, l'amygdale contient une forte densité d'ARNm de la nociceptine et de son récepteur, notamment au niveau du noyau central et du noyau médian. Enfin, le gyrus cingulaire et le fornix sont également fortement marqués. D'autres structures présentent un intense marquage comme celles du néocortex, principalement dans les couches I à III, du cortex entorhinal et du cortex piriforme (Houtani *et al.* 2000). La nociceptine et son récepteur sont modérément exprimés dans le cortex auditif, mais ils sont presque absents dans le bulbe olfactif (Fig. 12).

#### **4.2. Expression dans le cervelet**

Plusieurs études portant sur l'expression de la nociceptine et de son récepteur dans le cerveau n'ont pas pris en compte le cervelet (Mollereau and Mouledous 2000 ; Neal *et al.* 2001), et les autres ont considéré le cervelet comme une structure homogène, sans en détailler les différentes structures (Neal *et al.* 1999b ; Houtani *et al.* 2000). Globalement, les résultats montrent une faible expression de NOP et de son ligand dans le cervelet. Néanmoins, des études d'imagerie récentes, utilisant la technique de tomographie par émission de positons, rapportent une liaison de la nociceptine radioactive dans le cervelet équivalente à celle observée dans le thalamus chez le singe rhésus (Kimura *et al.* 2011 ; Fig. 12) et chez l'Homme (Lohith *et al.* 2012). Dans le cervelet humain adulte, le ligand et son récepteur sont en particulier exprimés dans le cortex cérébelleux (Berthele *et al.* 2003).

#### **4.3. Expression dans le tronc cérébral et la moelle épinière : mésencéphale, pont et bulbe**

La nociceptine et son récepteur sont fortement exprimés dans la moelle épinière au niveau de la substance grise des cornes dorsale et ventrale (Houtani *et al.* 2000). Cette expression est localisée particulièrement dans les couches superficielles de la moelle épinière et dans les ganglions rachidiens (Pettersson *et al.* 2002). Le gène du précurseur de la nociceptine ne semble pas exprimé dans le bulbe rachidien ni dans le pont (Neal *et al.* 1999b). En revanche, une forte expression est observée dans les noyaux vestibulaires, le noyau du tractus solitaire et dans les noyaux des ganglions de la base (Neal *et al.* 1999b). Une forte expression du récepteur a été mise en évidence par radioliasion dans le locus coeruleus, les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, les noyaux péri et inter-pédonculés, la substance grise périaqueducule et le noyau parabrachial. Les sites de liaison ont aussi été détectés mais en moindre abondance dans les tubercules olfactifs et le noyau accumbens du striatum (Florin *et al.* 2000 ; Fig. 12).

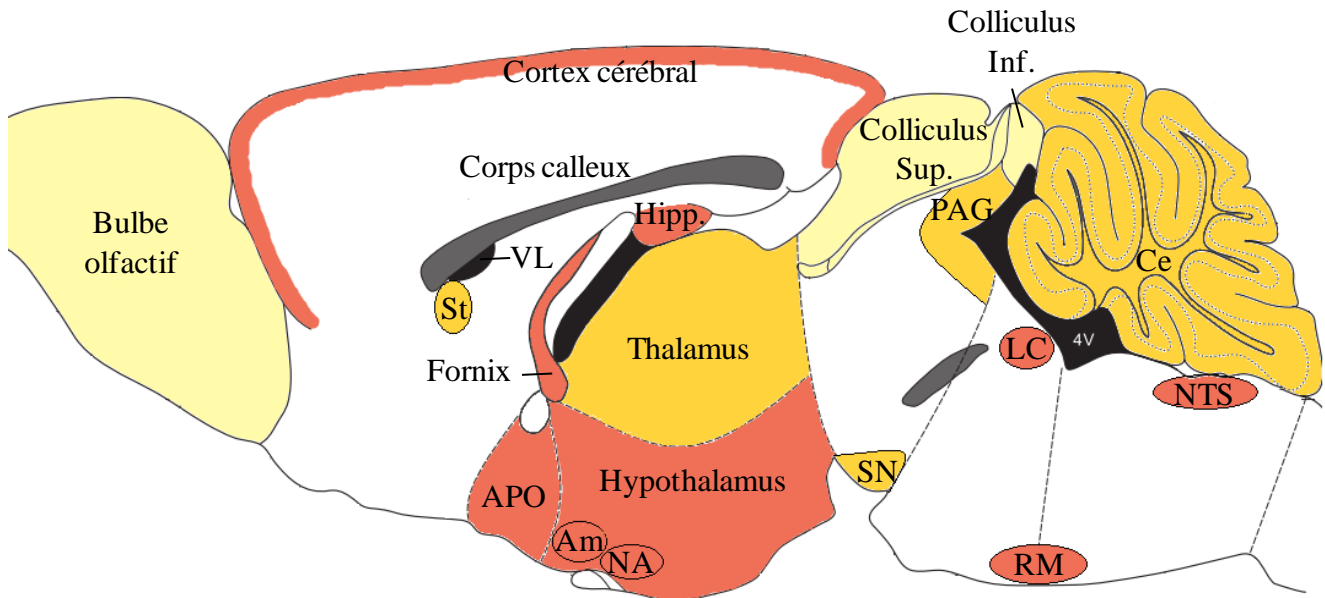
#### **4.4. Expression à la périphérie**

Bien qu'exprimés majoritairement dans le système nerveux central, la nociceptine et son récepteur sont également présents dans plusieurs tissus périphériques. Le gène du précurseur de la nociceptine est exprimé au niveau du système immunitaire dans le thymus, la rate et les lymphocytes de porc (Pampusch *et al.* 2000). Le gène du récepteur est exprimé dans le système immunitaire au niveau de la rate et des lymphocytes et monocytes circulants humains (Peluso

*et al.* 1998) et murins (Halford *et al.* 1995). Le récepteur a également été détecté par RT-PCR dans l'intestin de souris ainsi que dans le tractus gastro-intestinal et le rein de porc (Osinski *et al.* 1999). Enfin, le ligand et son récepteur sont retrouvés dans la rétine (Makman *et al.* 1997) et le cœur (Dumont and Lemaire 1998) chez le rat.

#### **4.5. Expression au cours du développement**

Chez le rat, le gène de la nociceptine est exprimé dès E12 dans les structures où l'expression est la plus forte à l'âge adulte, c'est-à-dire dans les régions qui deviendront le cortex cérébral, l'hypothalamus et la moelle épinière (Neal *et al.* 2001). A E19 cette expression se régionalise selon un schéma proche de celui observé chez l'adulte dans les cortex cingulaire et piriforme, le télencéphale basal, l'amygdale et de nombreuses régions du mésencéphale. Après la naissance, des expériences de Western blot réalisées sur des cerveaux entiers, ont montré que la nociceptine est particulièrement forte entre P2 et P5, avant de diminuer jusqu'à P21, âge auquel le taux de peptide est divisé par 5 par rapport à celui mesuré à la naissance. Au niveau du néocortex l'expression de la nociceptine est plus forte entre P7 et P21 qu'à l'âge adulte (Ikeda *et al.* 1998). Le même profil développemental est retrouvé chez l'Homme avec une très bonne correspondance entre le cerveau de rat à P1 et le cerveau humain à 22 semaines de gestation (Neal *et al.* 2001).



**Figure 12 : Représentation de l'expression du système nociceptinergique dans le cerveau.** Rouge : expression dense ; Orange : expression modérée ; Jaune : expression faible. 4V : quatrième ventricule ; APO : aire préoptique ; Am : Amygdale ; Ce : cervelet ; Hipp : Hippocampe ; LC : locus coeruleus ; NA : noyau accumbens ; NTS : noyau du tractus solitaire ; PAG : substance grise périaqueducale ; RM : raphé magnus ; SN : substance noire ; St : striatum ; VL : ventricule latéral.

## 5. Fonctions de la nociceptine

En accord avec la distribution relativement large du récepteur NOP dans le système nerveux, la nociceptine agit sur une grande diversité de fonctions physiologiques. La première fonction étudiée, ayant donné son nom à ce peptide, est la nociception. Dès sa découverte, la nociceptine a montré des effets pro-nociceptifs après injection par voie intracérébroventriculaire (Meunier *et al.* 1995). Cependant, de nouvelles études ont rapidement montré des effets opposés. L'implication de nombreuses régions du cerveau dans la transmission du message nociceptif a longtemps rendu confus le rôle exact de la nociceptine dans ce processus. Selon la littérature actuelle, il semble que la nociceptine exerce des effets opposés selon le lieu d'administration et selon le type de douleur considéré. Ainsi, lors d'une injection au niveau spinal, elle exerce un effet anti-nociceptif (King *et al.* 1997) et potentialise l'analgésie induite par la morphine (Tian *et al.* 1997). Cet effet passe notamment par l'inhibition de la transmission glutamatergique au niveau des fibres A et C qui véhiculent le message douloureux de la périphérie vers la moelle épinière (Stanfa *et al.* 1996 ; Faber *et al.* 1996). En revanche, injectée dans les régions supraspinales, la nociceptine augmente la douleur (Meunier *et al.* 1995) et bloque l'effet de la morphine et d'autres analgésiques de type opioïdes (King *et al.* 1998). Si au niveau spinal les

douleurs aiguës ou chroniques sont atténuées par la nociceptine, lors d'une injection intracérébroventriculaire la situation est bien plus complexe. La plupart des études se sont intéressées à la douleur aiguë qui est plus facile à modéliser, et la littérature concernant les effets de la nociceptine sur la douleur chronique est peu abondante. Cependant, il a été montré que l'activation centrale de NOP au niveau central diminue l'hyperalgésie diabétique chez la souris (Rutten *et al.* 2014), de même que l'hyperalgésie gastro-intestinale (Sobczak *et al.* 2014). Les souris dont le gène codant pour le précurseur de la nociceptine ou son récepteur a été invalidé, ne présentent pas de sensibilité accrue à la douleur aiguë mais montrent une hyperalgésie inflammatoire (Depner *et al.* 2003) mais les mécanismes impliqués dans ce processus restent encore inconnus. Ces études suggèrent donc que le système nociceptinergique agit de façon analgésique lorsqu'il est activé dans la moelle épinière tandis que son activation au niveau central augmente la douleur aiguë et diminue la douleur chronique.

La présence de la nociceptine et de son récepteur dans des noyaux de l'hypothalamus impliqués dans la régulation de la prise alimentaire comme les noyaux ventromédian et paraventriculaire (Florin *et al.* 2000), suggère un rôle dans le contrôle de l'appétit. De fait, l'administration intracérébroventriculaire chronique de nociceptine chez des souris, provoque une hyperphagie dose-dépendante responsable d'une prise de poids des animaux (Matsushita *et al.* 2009). L'accroissement du poids est bloqué par une restriction alimentaire, mais surviennent alors une augmentation de la masse de tissus adipeux, des taux de cholestérol, d'insuline et de leptine. Il apparaît donc que la surcharge pondérale induite par la nociceptine est non seulement due à une hyperphagie, mais également à une perturbation du métabolisme. L'effet orexigénique de la nociceptine suite à une injection dans le troisième ventricule, n'est pas retrouvé après injection dans le quatrième ventricule, renforçant l'idée d'une implication des noyaux hypothalamiques (Polidori *et al.* 2000). A l'appui de cette hypothèse, il a été montré que la nociceptine provoque une diminution de l'activité des neurones à POMC dans le noyau arqué (Bomberg *et al.* 2006), lesquels produisent l' $\alpha$ -MSH connue pour réduire la prise alimentaire (Garfield *et al.* 2009). De plus, la nociceptine inhibe, dans le noyau ventromédian, l'activité des neurones à leptine, autre facteur anorexigène (Chee *et al.* 2011). Il semblerait donc que la nociceptine exerce son effet orexigène en inhibant l'action des facteurs anorexigènes.

L'expression de la nociceptine et de son récepteur dans le cortex préfrontal ainsi que dans les régions du système limbique comme l'amygdale, le thalamus et l'hypothalamus (Neal *et al.* 1999a, 1999b) suggère un rôle du peptide dans les fonctions émotionnelles et cognitives. De fait, la nociceptine active l'axe corticotrope en augmentant les taux d'ACTH circulante en



situation de repos, mais sans toutefois potentialiser l'effet du stress sur les niveaux d'ACTH plasmatique (Devine *et al.* 2001). L'absence d'action en condition stressante pourrait être due à un effet seuil. En situation non-stressante, l'augmentation d'ACTH est spécifique du récepteur NOP car bloquée par la co-administration d'un antagoniste de ce récepteur (Leggett *et al.* 2006). En revanche, l'antagoniste seul n'a pas d'effet, suggérant que le tonus basal du système nociceptinergique n'est pas suffisant pour agir sur l'axe du stress. L'ensemble de ces études plaide en faveur d'un effet anxiogénique de la nociceptine mais d'autres éléments de la littérature montrent une activité anxiolytique de ce peptide. C'est ainsi qu'une injection intracérébroventriculaire de nociceptine diminue les comportements de type anxieux induits par le stress, augmentant par exemple le temps passé dans le compartiment clair lors d'un test de préférence clair/obscur ou allongeant le temps passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Jenck *et al.* 1997). D'ailleurs, contrairement à son effet sur l'ACTH, la nociceptine diminue le relargage de corticolibérine (CRH) dans le noyau central de l'amygdale (Cruz *et al.* 2012). Ces effets opposés exercés par la nociceptine sur la réponse au stress, suggèrent que ce peptide agit sur l'ensemble des mécanismes mis en jeu. Selon ce schéma, lors de la phase aiguë, le système nociceptinergique serait recruté pour faciliter l'adaptation à la situation source de stress en exerçant un effet anxiogène par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien. Cela se traduirait par une augmentation de la production d'ACTH par l'hypophyse, responsable à son tour d'une production accrue de corticostérone par la glande surrénale. L'hypercorticostéronémie exerce des effets bénéfiques sur le court terme puisqu'elle provoque une mobilisation des ressources en énergie et un maintien de l'état de vigilance. En revanche, à long terme la corticostérone exerce des effets délétères sur le système immunitaire et les fonctions cognitives. Donc, dans un second temps, le système nociceptinergique contribue à diminuer les conséquences pathologiques d'un stress chronique, en exerçant un effet anxiolytique extrahypophysaire induit par une diminution du relargage de CRH au niveau de l'amygdale.

Malgré son homologie avec les peptides opioïdes, la nociceptine exerce de nombreux effets anti-opioïdes au niveau central, notamment sur l'analgésie supraspinale comme mentionné précédemment, mais également sur l'addiction aux opiacés. En effet, l'administration intracérébroventriculaire de nociceptine bloque l'effet de la morphine dans le test de préférence de place conditionnée chez le rat (Murphy *et al.* 1999) probablement en bloquant l'activation des neurones du noyau accumbens induite par la morphine (Ciccocioppo *et al.* 2000). Il en résulte une réduction du relargage de dopamine en réponse à la morphine (Di Giannuario and

Pieretti 2000). De plus, lors d'une administration chronique de morphine, le taux de nociceptine augmente dans l'amygdale et la substance grise périaqueducule, 2 régions clés dans le développement de la tolérance aux opioïdes (Yuan *et al.* 1999). De la même façon, l'administration d'antagoniste du récepteur NOP ou la délétion de son gène diminuent cette tolérance (Ueda *et al.* 1997 ; Scoto *et al.* 2010 ; Kallupi *et al.* 2017), suggérant que l'activation du système nociceptinergique permet de ralentir la mise en place de la tolérance. La buprénorphine, qui est un agoniste partiel des récepteurs  $\mu$  opioïde et NOP, exerce les mêmes effets que la nociceptine en bloquant la recherche d'héroïne chez des rats dépendants *via* la diminution du relargage de dopamine (Sorge *et al.* 2005). Plusieurs études cliniques ont évalué le potentiel thérapeutique de la buprénorphine et montrent des améliorations chez les patients dépendants semblables à celles obtenues avec la méthadone, classiquement utilisée, mais avec une amélioration de la rétention en traitement (Mattick *et al.* 2003). Les mêmes effets de la nociceptine sont observés sur la dépendance à l'alcool (Economidou *et al.* 2006, 2008).

Le système nociceptinergique est également impliqué dans la mémoire spatiale comme le montrent les expériences en piscine de Morris. L'administration de l'agoniste Ro 64-6198 diminue les performances des souris lors de ce test, en inhibant la mise en place de la potentialisation à long terme dans l'hippocampe (Higgins *et al.* 2002). De plus, la délétion du gène NOP entraîne une augmentation de la potentialisation NMDA-dépendante dans l'hippocampe (Taverna *et al.* 2005), indiquant que la nociceptine agit sur les phénomènes de plasticité. Les effets potentiels de la nociceptine sur d'autres types de mémoire, comme la mémoire émotionnelle, ont également été étudiés. De fait, l'administration de nociceptine diminue le temps d'immobilisation dans un test de conditionnement aversif (Fornari *et al.* 2008) et, de façon concordante, la délétion du gène NOP augmente la rétention dans ce même test (Mamiya *et al.* 2003). Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution au vu des effets de la nociceptine sur le stress et l'anxiété, car la diminution des performances dans ces tests pourrait être due à une réduction du stress induit par le stimulus aversif.

La présence de la nociceptine et de son récepteur dans certains organes périphériques suggère diverses actions hors du système nerveux central. L'activation des lymphocytes B et T entraîne une augmentation du taux d'expression de NOP (Wick *et al.* 1995) et le blocage de la synthèse de ce récepteur par des oligonucléotides diminue la production d'anticorps (Halford *et al.* 1995). De plus, la nociceptine favorise le chimiotactisme des monocytes et le relargage de lysozyme par les neutrophiles (Trombella *et al.* 2005), améliorant la réponse immunitaire. Parmi les autres effets, la nociceptine module la bronchoconstriction induite par la capsaïcine

(Corboz *et al.* 2000 ; D'Agostino *et al.* 2010), inhibe la contraction de la vessie (Giuliani *et al.* 1998 ; Lecci *et al.* 2000) et exerce des effets anti-inflammatoires dans les cas de colites (Zielińska *et al.* 2015).

Dans un modèle murin de la maladie de Parkinson, le blocage pharmacologique du récepteur de la nociceptine diminue la gravité des symptômes moteurs, et l'inactivation du gène de NOP protège en partie les animaux de l'induction de la maladie par le halopéridol (Marti 2005). De plus, le nombre de neurones dopaminergiques dans la substance noire augmente de 50% suite à l'inactivation génique de NOP (Arcuri *et al.* 2016). Au niveau cellulaire, la surexpression du gène de la nociceptine dans une lignée de neurones de souris entraîne une augmentation du nombre et de la longueur ces neurites (Saito *et al.* 1997 ; Zaveri *et al.* 2006). Les effets pro-différenciateurs de la nociceptine sont retrouvés dans des cultures de neurones hippocampiques (Ring *et al.* 2006). Des études récentes ont montré l'implication de la nociceptine sur la différenciation des cellules gliales. Au niveau des oligodendrocytes, il a été observé que le traitement de cultures cellulaires par la buprénorphine entraîne une modification du taux de protéine de myéline dépendante de la dose utilisée (Eschenroeder *et al.* 2012). A faible dose, la buprénorphine augmente l'expression de cette protéine, mais à plus forte dose cet effet disparaît ; cela peut être expliqué par le fait que la buprénorphine présente une forte affinité pour le récepteur  $\mu$  opioïde qui serait activé dès les doses les plus faibles, et une plus faible affinité pour le récepteur NOP qui ne serait donc activé qu'à de fortes doses. L'ajout d'antagonistes pour ces 2 récepteurs a montré que la perte de l'effet positif de la buprénorphine sur la synthèse de myéline est due au récepteur NOP (Eschenroeder *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent donc que la nociceptine serait impliquée dans la myélinisation par les oligodendrocytes. Enfin, il a été rapporté que les astrocytes expriment la nociceptine et son récepteur de façon intense au moment du développement (Meyer *et al.* 2017). Le traitement de cultures astrocytaires par la nociceptine ne modifie pas la morphologie de ces cellules mais augmente l'expression du transporteur du glutamate GLAST chez le rat et l'Homme. Par des expériences *in vivo* il a été montré que cet effet est restreint à une fenêtre temporelle allant de la naissance jusqu'à P10, ce qui correspond à la période à laquelle sont produits les astrocytes (Miller and Gauthier 2007) et à laquelle sont formées la majorité des synapses glutamatergiques (Workman *et al.* 2013). A cette étape du développement, le transporteur GLAST a pour rôle de protéger les astrocytes contre la toxicité induite par le glutamate en contrôlant les taux de glutamate extracellulaires. Ces données suggèrent que le système nociceptinergique, en

induisant l'expression de GLAST, est impliqué dans le développement des astrocytes (Meyer *et al.* 2017).



# Objectifs



Les données de la littérature présentées dans cette introduction montrent que le cervelet, dont le développement se déroule après la naissance chez l'Homme et les rongeurs, est un modèle adapté pour étudier l'effet de molécules sur ce processus. Le développement de cette structure cérébrale, et plus particulièrement la mise en place des neurones en grain, est sous le contrôle de nombreuses molécules dont des peptides. Ces facteurs peptidiques présentent la caractéristique d'être surexprimés au cours des 2 premières semaines postnatales, avant de diminuer à l'âge adulte. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse que d'autres peptides possédant ce profil d'expression particulier pourraient également être impliqués dans le développement du cortex cérébelleux.

La première partie de ce projet avait pour objectif de réaliser un peptidome du cervelet de rat au cours du développement. Pour ce faire, des cervelets de rats âgés de 8 à 90 jours ont été analysés par spectrométrie de masse. Les peptides ont ensuite été identifiés et quantifiés afin de mettre en évidence ceux qui sont régulés au cours du développement. Un peptide dont l'expression varie, *i.e.* la nociceptine a été sélectionné et des analyses supplémentaires sur l'expression temporelle du gène dont il est issu et de celui de son récepteur ont été conduites par PCR quantitative. Ensuite, une analyse plus précise de l'expression de ces transcrits au sein des différentes couches du cortex cérébelleux a été réalisée après microdissection laser.

Dans un second temps, l'effet potentiel de la nociceptine sur la mise en place des neurones en grain a été étudié *in vitro*. Tout d'abord son activité a été testée sur la survie de ces cellules en cultures en mesurant l'intensité du marquage des cellules vivantes et l'activité de la caspase-3, une enzyme impliquée dans la mort cellulaire par apoptose. Ensuite l'impact de ce peptide sur la motilité cellulaire a été évalué en utilisant la technique de microexplant. Enfin, son action sur la différenciation a été quantifiée par marquage puis mesure et comptage des neurites.

La suite de ce travail s'est attachée à la découverte de nouveaux peptides exprimés dans le cervelet de rat. Pour cela un séquençage *de novo* a été réalisé sur les données collectées lors de la réalisation du peptidome et la très grande quantité de séquences générée a été passée au crible de plusieurs filtres portant, par exemple, sur la récurrence des séquences ou leur régulation. Cette analyse bioinformatique avait pour but de ne retenir que quelques peptides candidats qui pourront ensuite être testés *in vitro* à la recherche d'une activité biologique.





# **Matériel et méthodes**



**Animaux :** les rats Wistar utilisés dans cette étude sont nés et ont été élevés au sein de l'animalerie de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Rouen Normandie (agrément B.76-451-04) en accord avec la législation française. Les animaux sont maintenus dans un environnement contrôlé à  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , avec une photopériode de 12 h (lumière de 7 h à 19 h) et un accès libre à l'eau et à la nourriture.

**Prélèvement des cervelets :** les rats Wistar âgés de 1 à 8 jours sont décapités sans anesthésie, alors que les animaux âgés de 16, 21 et 90 jours sont sacrifiés après anesthésie par inhalation d'isoflurane (1000 mg/g d'Iso-Vet®). Pour les analyses protéomiques, les cervelets d'animaux âgés de 8, 16, 21 et 90 jours sont prélevés, placés dans une solution de NaCl à 0,9% afin d'être déménigés, puis insérés dans un Stabilizator™ (Denator) qui, sous vide, chauffe le tissu à  $95^{\circ}\text{C}$  pendant 20 secondes. Les cervelets sont ensuite stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction des peptides. Pour chaque stade de développement, 10 réplicats biologiques sont utilisés pour ces analyses peptidomiques. Concernant les analyses d'expression génique, les cervelets d'animaux âgés de 2, 4, 8, 16, 21 et 90 jours sont prélevés, placés dans du Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à extraction des ARN. Pour chaque stade de développement, X réplicats biologiques sont utilisés pour ces analyses transcriptomiques. Pour l'imagerie par *matrix-assisted laser desorption ionisation* (MALDI), les cervelets d'animaux âgés de 8 et 21 jours sont prélevés, immergés dans de l'isopentane à  $-25^{\circ}\text{C}$  puis stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à réalisation des coupes histologiques. Pour chaque stade de développement, 3 réplicats biologiques sont utilisés pour ces analyses d'imagerie MALDI.

**Extraction des peptides :** les cervelets sont pesés afin d'utiliser une masse de tissu identique (300 mg) pour chaque stade de développement. Les tissus sont soniqués dans 1,5 mL de tampon d'extraction (Stabilizor Peptide Extraction kit, Denator) et centrifugés à  $14\ 000 \times g$ , pendant 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les peptides contenus dans le surnageant sont quantifiés par la technique de Bradford (Bio-Rad) et 300 fmol d'un digest de *human serum albumin* (HSA ; HSA peptide standard mix, Agilent Technologies) sont ajoutés comme standard interne. Les échantillons sont ensuite filtrés avec un seuil de coupure de 10 kDa (YM-10 Microcon) à  $14\ 000 \times g$ , pendant 60 min à  $4^{\circ}\text{C}$  puis une extraction sur phase solide est réalisée sur des cartouche Oasis HLB 10 mg (Waters). Pour cela, la cartouche est d'abord rincée avec 2 mL d'acétonitrile (AcN), puis conditionnée avec une solution d' $\text{H}_2\text{O}$  contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). L'échantillon est alors chargé dans la cartouche qui est rincée avec 2 mL de la solution d' $\text{H}_2\text{O}$  contenant 0,1% de TFA puis éluée avec 2 mL d'une solution contenant 60 % d'AcN 60% et 40% d' $\text{H}_2\text{O}$ . Cet éluat est récupéré et congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 60 minutes en présence de 2 mL

d'H<sub>2</sub>O. Après congélation l'échantillon est lyophilisé pendant 1 nuit. Pour l'analyse par spectrométrie de masse les échantillons sont repris dans le solvant pour la LC-MS H<sub>2</sub>O 97% / AcN 3% / TFA 0,1%) selon un volume variable afin d'harmoniser les concentrations entre les échantillons (reprise dans 40 µL de solvant pour le plus concentré, 320 µg/mL).

**Analyse par spectrométrie de masse :** le spectromètre de masse utilisé est une LTQ Orbitrap Elite (Thermo Scientific) couplée à une chromatographie à nano-débit (Easy-nLC II, Thermo Scientific). Deux µL d'échantillon sont injectés sur une colonne d'enrichissement (C18 PepMap100, Thermo Fisher Scientific) puis la séparation est effectuée par une colonne analytique (NTCC-360/100/5/153, NikkyoTechnos) avec une phase mobile composée d'H<sub>2</sub>O contenant 0,1% de TFA (solvant A) et d'ACN contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). L'élution est faite à une vitesse de 300 nL/min avec un gradient linéaire en 2 étapes : passage de 10 à 40% de solvant B en 30 min puis étape à 100% de solvant B pendant 10 min. Le spectromètre est utilisé en mode d'ionisation positive avec un voltage de 1,5 kV et une température de source de 275°C. Les échantillons sont analysés en utilisant la méthode de dissociation induite par collision avec une énergie normalisée de 35. Le premier scan en mode MS est enregistré sur l'analyseur (R = 60 000) avec un rapport masse sur charge (m/z) 400-1800, puis les 20 ions les plus intenses sont sélectionnés pour le mode MS/MS à l'exception des espèces mono-chargées. Toutes les mesures sont réalisées avec une recalibration interne à m/z 445,12002 (polydimethylcyclosiloxane).

**Identification des peptides :** l'identification est réalisée à l'aide du logiciel SpectrumMill (Agilent Technologies, version B04.00.127) à partir d'une base de données créée au laboratoire contenant 184 neuropeptides de rat choisis dans la littérature (voir Tab. S1 de l'article) et de la base de données UniProt/Swiss-Prot. Pour l'analyse, les paramètres utilisés sont les suivants : pas de digestion enzymatique ; tolérance de masse du précurseur de 10 ppm ; tolérance de la masse du produit de 0,5 Da ; modifications variables cystéine sulfoxydée, lysine acétylée, méthionine oxydée, déamination, acide pyroglutamique, phosphorylation sur sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y). Seuls les peptides avec un score d'identification supérieur à 10 et retrouvés dans au moins 7 des 10 échantillons par stade sont retenus.

**Quantification des peptides au cours du développement :** dans un premier temps la quantité de HSA ajoutée comme étalon externe est vérifiée pour chaque échantillon en mesurant l'aire sous la courbe à l'aide de Mass Hunter (Agilent Technologies, version B06.00) afin de valider la reproductibilité et la qualité du protocole d'extraction des peptides.

La quantification des autres peptides présents dans l'échantillon est réalisée à l'aide du logiciel Progenesis LC-MS (Non linear dynamics, version 4.0.4441.29989). Le stade P8 est fixé comme référence pour effectuer les comparaisons 2 à 2 et un échantillon P8 est choisi pour aligner les données de LC-MS et corriger le possible décalage de temps de rétention. Le seuil minimum d'alignement est fixé à 90%. Après l'alignement, une analyse statistique par analyse de variance (ANOVA) est effectuée pour déterminer les variations significatives d'expression des peptides entre les stades de développement. Seuls les peptides avec une  $P$ -value  $< 0,05$ , une  $q$ -value  $< 0,05$  et un power  $> 0,8$  sont retenus, ceux avec un rang  $> 10$  et un score  $< 20$  sont exclus. De plus, seuls les peptides avec un fold change  $> 2$  pour au moins une des comparaisons 2 à 2 sont considérés comme différentiellement exprimés. Pour l'identification de ces peptides le logiciel Mascot (Matrix Science, version 2.2.04) est utilisé avec les paramètres suivants : pas de digestion enzymatique ; tolérance de masse du précurseur de 10 ppm ; modifications variables : méthionine oxydée et carbamidométhylation.

**Imagerie MALDI :** ces expériences ont été réalisées en collaboration avec la plateforme Protim à Rennes. Trois répliquats biologiques de cervelets de rats âgés de 8 et 21 jours sont coupés au cryostat selon un plan sagittal à une épaisseur de 14  $\mu\text{m}$  et les coupes sont déposées sur une lame conductrice coatée *indium tin oxide* (Bruker). Les tissus sont lavés selon le protocole suivant : 30 s à l'éthanol 70 % ; 30 s à l'éthanol 100 % ; 2 min à la solution de Carnoy's ; 30 s à l'éthanol 100 % ; 30 s à l' $\text{H}_2\text{O}$  TFA 0,2 % ; 30 s à l'éthanol 100 %. La matrice acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique est déposée sur les coupes à l'aide de la station ImagePrep (Bruker). L'acquisition d'images est réalisée par un spectromètre de masse de type UltraFlex (Bruker) en mode linéaire, équipé d'un laser Smartbeam avec fréquence de tir de 200 Hz. Les spectres MS sont enregistrés en utilisant la méthode AutoXecute du logiciel FlexControl combiné au logiciel FlexImaging (version 4.1 Bruker). La résolution latérale atteinte est de 35  $\mu\text{m}$ . L'analyse des données obtenues est réalisée avec le logiciel SCiLS (version 2015a ; Bruker).

**Séquençage *de novo* :** à partir des données obtenues en étudiant le peptidome de cervelet, le séquençage est réalisé avec le logiciel PEAKS (version 7.5 ; Bioinformatics Solutions Inc.) en utilisant les paramètres suivants : temps de rétention : 0,5 min ; erreur  $m/z$  du précurseur : 10 ppm. Ensuite les séquences sont identifiées à partir de la base de données SwissProt/UniProt avec les paramètres suivants : masse du précurseur monoisotopique : 10 ppm ; ion fragment : 0,1 Da ; autorisation de clivage non-spécifique des 2 côtés ; modifications : oxydation des méthionines, acétylation sur lysine (K), pyroglutamylation, carbamidométhylation et

phosphorylation sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y) ; nombre maximal de modifications : 3 ; estimation du *fasle discovery rate* (FDR) par la méthode de *decoy fusion*.

**Extraction des ARNs et transcription inverse :** les ARNs des cellules ou des cervelets sont extraits avec du Tri-reagent (Sigma-Aldrich) puis purifiés à l'aide d'un kit NucleoSpin RNA (Machery Nagel) avant d'être dosés avec un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) à une absorbance de 260 nm. Un µg d'ARNs de chaque échantillon est ensuite convertit en ADNc à l'aide du kit *ImProm II Reverse Transcription System* (Promega).

**Microdissection :** les expériences de microdissection laser ont été réalisées comme précédemment décrit par (Basille-Dugay *et al.* 2013). Brièvement, les cervelets de rats âgés de 8 et 21 jours sont coupés au cryostat selon un plan frontal à une épaisseur de 14 µm et les coupes sont colorées au crésyl-violet puis déshydratées dans des bains d'éthanol. Pour les coupes à P8 les 4 couches sont prélevées (*i.e.* CGI, CP, CM et CGE) alors que pour les coupes à P21 seules les 3 couches restantes sont prélevées (*i.e.* CM, CP et CG). Pour chaque couche cellulaire 0,4 µmm<sup>2</sup> est découpé sur 4 cervelets différents à l'aide d'un microdissecteur laser (LMD 7000, Leica). L'ARN est extrait avec le kit *NucleoSpin RNA XS* (Machery Nagel) puis convertit en ADNc et amplifié avec le kit *SMARTer Pico PCR cDNA* (Clontech).

**PCR quantitative :** Deux ng d'ADNc sont amplifiés en présence de *SYBR Green Mastermix* (Applied Biosystem) et d'amorces sens et anti-sens sur une QuantStudio™ 12KFlex (Thermo Fisher Science). Les amorces sont dessinées avec le logiciel *Primer Express* (Applied Biosystem) et validées par PCR en temps réel. La quantité relative d'ADNc par échantillon est calculée avec la méthode de quantification comparative par cycle et exprimée en  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  en utilisant le gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) comme standard interne de la quantité d'acides nucléiques utilisés. Chaque échantillon est analysé en triplicat technique.

**Culture primaire de NGC :** les cultures cellulaires sont effectuées comme précédemment décrit par (Gonzalez *et al.* 1992). Brièvement, les cervelets de rats âgés de 7 à 9 jours sont prélevés et les cellules sont dissociées mécaniquement et enzymatiquement avant d'être ensemencées dans des plaques de cultures 24 puits (Costar) coatées à la poly-D-lysine (12,5 µg/mL ; BD Bioscience) à une densité de 10<sup>6</sup> cellules par mL pour les mesures de survie et 10<sup>5</sup> cellules par mL pour les mesures de différenciation. Le milieu de culture est constitué de 74% de *Dubecco's modified Eagle's medium* (DMEM ; Gibco Life Technologies), 24%

d'Ham's F-12, 1% d'antibiotique-antimicotique (100 × ; Gibco Life Technologies), 1% de supplément N2 (Invitrogen) et 25 mM de KCl. Pour les cultures de NGC matures, le milieu de culture contient du sérum de veau fœtal (Pan Biotech) et les cultures sont traitées à la cytosine arabinozide (10 µM ; Sigma-Aldrich) pour éviter la croissance des astrocytes. Les cellules sont cultivées pendant 5 jours dans des plaques 6 puits (Costar) et des prélèvements d'ARNs de cellules sont extraits avec du Tri-reagent (Sigma-Aldrich) dans 3 puits chaque jour. Pour récolter des astrocytes, des cultures de 4 jours non exposées à la cytosine arabinozide sont traitées avec du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; 30 µM, Sigma-Aldrich) pour tuer les NGC, puis 5 jours après les astrocytes sont prélevés de la même façon que les NGC.

**Traitements pharmacologiques :** les NGC en culture sont traités 3 h après ensemencement avec des concentrations croissantes de nociceptine (10<sup>-7</sup> à 10<sup>-12</sup> M ; Abcam) et dans certaines expériences de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> M ; Sigma-Aldrich) est ajouté pour induire une mort cellulaire. Le PACAP (10<sup>-7</sup> M) est utilisé comme contrôle pour ses effets neurotrophiques (Vaudry *et al.* 2002a) et inhibiteur de la motilité des NGC (Raoult *et al.* 2014).

**Mesure de la survie :** la survie cellulaire est mesurée par incorporation de fluorescéine diacétate (FDA) comme précédemment décrit (Vaudry *et al.* 2002b). Brièvement, les cellules sont incubées avec de la FDA (15 µg/mL) pendant 8 min à 37°C dans l'obscurité avant d'être rincées au PBS puis lysées. La fluorescence relarguée est mesurée avec un lecteur de plaques *Infinite® 200 pro* (Tecan) et les résultats sont normalisés par rapport au contrôle. Les mesures sont réalisées sur 10 cultures indépendantes, chaque valeur étant la moyenne de 4 puits.

**Mesure de l'activité caspase :** l'activité des caspases 3/7 est mesurée dans les cultures de NGC avec le *Caspase-Glo® 3/7 Assay* (Promega). Trois heures après le traitement ou 6 h après la première injection, les cellules sont rincées et resuspendues dans du DMEM tandis que les tissus sont soniqués dans du PBS avant d'être incubés dans le tampon 2 × du kit contenant la Z-DEVD-aminoluciférine. Le signal bioluminescent est mesuré pendant 90 min à l'aide du lecteur de plaques *Infinite® 200 pro* (Tecan).

**Mesure de la motilité cellulaire :** la motilité des NGC est mesurée grâce à la technique de microexplants décrite par (Raoult *et al.* 2011). Brièvement, des cervelets de rats âgés de 7 ou 8 jours sont prélevés et coupés en cubes de 50 à 100 µm de côté avant d'être placés dans des plaques de culture de 24 puits (Costar) double coatées à la poly-D-lysine (12,5 µg/mL, BD Bioscience) et à la laminine (20 µg/mL, Sigma-Aldrich). Les explants sont recouverts de milieu



de culture composé de *minimum essential medium* (Invitrogen) complété avec 1% de supplément N2 (Invitrogen) et 1% d'antibiotique-antimicotique (100 ×, Gibco Life Technologies), puis placés pendant 24 h dans un incubateur. Ils sont ensuite transférés dans la chambre d'incubation d'un microscope inversé (Leica DMI 6000B). L'acquisition d'images est faite toutes les 2 min pendant 45 min en condition contrôle puis 45 min en condition traitée par le logiciel *LAS-AF*. L'analyse du déplacement des cellules est réalisée à l'aide du logiciel *MetaMorph* (Roper Scientific). Pour chaque condition, 12 microexplants sont observés et au moins 24 cellules sont mesurées par expériences soit plus de 280 cellules par condition.

**Mesure de la différenciation cellulaire :** la différenciation des NGC est évaluée en comptant et mesurant les neurites pour chaque cellule. Pour cela, les NGC sont marqués avec le kit *Tubulin Tracker Green* (300 nM ; Thermo Fisher Scientific) et avec un marqueur nucléaire (Hoescht, 10 µM ; Sigma-Aldrich) dans un incubateur pendant respectivement 30 min et 10 min, puis 5 images par puits sont acquises de façon aléatoire avec un microscope inversé (Leica DMI 6000B). Les mesures sont ensuite réalisées avec le logiciel ImageJ (version 1.46). Un neurite est considéré comme tel, si et seulement si, sa longueur est supérieure à la taille du corps cellulaire du NGC. Pour chaque condition, 5 cultures indépendantes sont réalisées et au moins 28 cellules par image sont mesurées soit plus de 700 cellules par condition.

**Injections *in vivo* :** les injections sont réalisées sur des rats vigiles âgés de 8 jours selon le protocole décrit par (Botia *et al.* 2011). Les animaux reçoivent une injection intra-péritonéale d'alcool (2,5 g/kg) ou de NaCl pour les animaux contrôles, immédiatement suivie par une injection intra-cisternale de nociceptine (1 µg/10 µL) ou de liquide céphalo-rachidien (LCR) artificiel pour les animaux contrôles (Tab. 1). Ces 2 injections sont répétées 3 h plus tard et le prélèvement du cervelet est fait 6 h après la première injection.

**Tableau 1 : Injections réalisées selon les groupes expérimentaux**

| Groupe                | Intra-péritonéale | Intra-cisternale |
|-----------------------|-------------------|------------------|
| Contrôle              | NaCl              | LCR artificiel   |
| Nociceptine           | NaCl              | Nociceptine      |
| Ethanol               | Ethanol           | LCR artificiel   |
| Nociceptine + Ethanol | Ethanol           | Nociceptine      |

**Tests statistiques :** le logiciel *Graphpad Prism*<sup>®</sup> (version 6.04) est utilisé pour l'analyse statistique. La normalité des données est vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Pour les

données paramétriques, les expériences de survie, de motilité et de différenciation cellulaire sont analysées par une ANOVA suivie de tests de Bonferroni est utilisée pour les expériences de mesure. Pour les données non-paramétriques, les expériences de peptidomique, de PCR quantitative et de mesure d'activité de la caspase sont analysées par un test de Kruskal-Wallis suivi de tests de Dunn.



# Résultats



## **1. Etude de l'expression d'une banque de peptides au cours du développement du cervelet et caractérisation des effets de la nociceptine sur les neurones en grain**

### **1.1. Approche peptidomique ayant permis d'identifier les effets neurotrophiques de la nociceptine dans le développement du cortex cérébelleux**

Auriane Corbière, Marie-Laure Walet-Balieu, Philippe Chan, Magali Basille-Dugay, Julie Hardouin et David Vaudry

---

Le cervelet est une structure dont le développement, postnatal chez l'Homme et le rat, est contrôlé par de nombreux facteurs, dont les peptides. Parmi les peptides connus pour leur rôle dans ce processus, le PACAP, la somatostatine et l'ODN présentent un profil d'expression particulier avec une forte présence pendant les 2 premières semaines de vie postnatale, période riche en processus développementaux, puis une expression qui diminue avec l'âge de l'animal.

Notre travail a donc consisté à :

- Réaliser un peptidome du cervelet au cours du développement afin d'identifier les peptides présentant un profil d'expression similaire à celui des peptides déjà connus pour être impliqués dans le développement de cette structure.
- Caractériser l'expression spatiotemporelle d'un de ces peptides, la nociceptine, et de son récepteur au niveau peptidique et génomique.
- Mettre en évidence les effets de la nociceptine sur la mise en place des neurones en grain qui sont les cellules les plus abondantes du cervelet.

*Les résultats font l'objet d'un article en cours de révision dans Molecular and Cellular Proteomics #MCP/2017/000184*

**Keywords:** cerebellum; rat; development; peptidome; nociceptin

## **A peptidomic approach to characterize peptides involved in cerebellar cortex development leads to the identification of the neurotrophic effects of nociceptin**

Auriane Corbière<sup>1</sup>, Marie-Laure Walet-Balieu<sup>2</sup>, Philippe Chan<sup>2</sup>, Magali Basille-Dugay<sup>1</sup>, Julie Hardouin<sup>2</sup> and David Vaudry<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> *Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, Neuropeptides, Neuronal death and Cell plasticity team, 76000 Rouen, France*

<sup>2</sup> *Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen Proteomic Platform (PISSARO) Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France*

<sup>3</sup> *Normandie Univ, UNIROUEN, Regional Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN), 76000 Rouen, France*

Corresponding author: David Vaudry, [david.vaudry@univ-rouen.fr](mailto:david.vaudry@univ-rouen.fr)

Address: INSERM U1239, Laboratoire DC2N, Université de Rouen Normandie, Centre Universitaire de Recherche et d'Innovation Biologique, place E. Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

### Acknowledgments:

A.C. was the recipient of a doctoral fellowship from Normandy Region. This work was supported by INSERM (U1239), Rouen University, Normandy Region and European Union. Europe gets involved in Normandy with European Regional Development Fund (ERDF).

## Summary

The cerebellum is a brain structure involved in many motor and cognitive functions. The development of the cerebellar cortex (the external part of the cerebellum) is under the control of numerous factors. Among these factors, peptides such as PACAP or somatostatin modulate the survival, migration and/or differentiation of cerebellar granule cells. Interestingly, these peptides contributing to cerebellar development usually exhibit a specific transient expression profile with a low abundance at birth, a high expression level during the developmental processes, which take place within the first two postnatal weeks in rodents, and a return to low levels at adulthood. Thus, to investigate for new peptides involved in cerebellar development, rat cerebella from birth to adulthood were sampled and analyzed by a semi quantitative peptidomic approach. A total of 33 peptides were found to be expressed in the cerebellum. Among these 33 peptides, 8 had a clear differential expression during development, including 4 with a high expression level over the first two postnatal weeks that then significantly decreased at adulthood. The focus by genomic approach on one of them, *i.e.* nociceptin, confirmed its expression pattern during development and highlighted that its receptor is mainly produced by granule neurons within the internal granule cell layer of the cerebellum. Finally, functional studies revealed a new role of nociception, acting as a neurotrophic peptide able to promote the survival and differentiation of developing cerebellar granule neurons.



## Introduction

During brain development, neurons coming from germinative zones migrate and connect together to create organized structures and functional networks. This developmental process involves numerous factors which modulate cell proliferation, migration, differentiation and survival. Thanks to its postnatal development and its well organized cellular layers, the cerebellum is an excellent model to characterize factors controlling neuronal histogenesis. In rodents, during the first 2 postnatal weeks, immature neurons generated in a secondary germinative zone, *i.e.* the external granule cell layer (EGL), migrate along radial processes of glial cells through the molecular layer (ML) to reach their final destination within the internal granule cell layer (IGL; (Hibi and Shimizu 2012). In addition to correct cell placement, formation of functional synapses of cerebellar granule neurons (CGN) parallel fibers with basket, Golgi and Purkinje cells are essential for the proper motor and cognitive functions of the cerebellum (Ito 2006). By postnatal day 21 (P21), when CGN have completed their migration, the EGL disappears and only three layers remain *i.e.* from top to bottom, the molecular layer, the Purkinje cell layer (PL) and the granule cell layer (GL).

Establishment of CGN requires appropriate spatiotemporal expression of key factors timely expressed throughout development by CGN themselves or their neighboring cells. These factors can be proteases, growth factors, chemokines, neurotransmitters and neuropeptides released in the extracellular matrix to control the successive steps of CGN development. For example sonic hedgehog increases proliferation (Lewis *et al.* 2004), brain derived neurotrophic factor promotes survival (Kubo *et al.* 1995), vascular endothelial growth factor directs migration from the EGL toward the PL (Ruiz de Almodovar *et al.* 2010), glutamate (Park *et al.* 2012 ; Komuro and Rakic 1993) increase migration speed, and serotonin induces differentiation of CGN (Oostland *et al.* 2014). Among peptides, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) at the level of the PL, induces a transient stop (Cameron *et al.* 2007), and, in the IGL, promotes survival (Vaudry *et al.*, 1999, Vaudry *et al.*, 2000) and differentiation (Gonzalez *et al.* 1997) of CGN. At the same time, somatostatin increases CGN migration in the EGL but decreases their migration in the IGL, inducing the final stop of the cells in this layer (Yacubova and Komuro 2002). Although considerable progress has been made towards understanding the guidance systems that regulate development of granule neurons, many molecules involved remain to be identified.

Interestingly, most mediators controlling granule maturation, exhibit a transient expression during cerebellar development. For instance C-X-C motif chemokine ligand 14 (CXCL14) is transiently expressed in the cerebellum between P1 and P8 (Park *et al.* 2012), PACAP expression increases during development until P14 and then decreases (Tatsuno *et al.* 1994), and somatostatin is highly expressed in between birth and P21 (Villar *et al.* 1989; Inagaki *et al.* 1989). These observations suggest that factors, including peptides, with an increased expression during the developmental period (*i.e.* during the first 2 postnatal weeks in rodents) and a subsequent return to a low level of expression at adulthood may play a key role in cerebellar development. Based on this hypothesis, the aim of the present study was to identify, through omic approaches, peptides with such transient profile of expression and to subsequently characterize their putative functions.

## Material and methods

*Animals* — Male and female Wistar rats were born and bred in an accredited animal facility (approved B.76-451-04) in accordance with the French Minister of Agriculture and the European Communities Council Directive 2010/63/UE of September 22.2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Tissues were sampled from animals aged of 2, 4, 8, 16, 21 and 90 days old.

*Tissue sampling for peptidomic analysis* — Cerebella were quickly removed, placed in saline buffer and cleared of meninges and choroid plexus. Tissues were then rapidly heat denatured with a Stabilizer™ (Denator) to avoid protein and peptide degradation prior storage at -80°C. For each stage of development, tissue weight was adjusted by pooling several cerebella to reach the weight of one P90 cerebellum (*i.e.* 300 mg). For each stage, 10 biological replicates were sampled.

*Peptide extraction* — Tissues were sonicated in extraction buffer (Stabilizer Peptide Extraction Kit, Denator) and centrifuged at  $14000 \times g$ , for 30 min at 4°C. Peptide content in the supernatant was then quantified with the Bradford assay (Bio-Rad) and 300 fmol of human serum albumin (HSA; HSA peptide standard mix, Agilent Technologies) was added as an internal standard in extraction buffer. HSA level was compared between the 4 groups by measuring the area under the curve with Mass Hunter (Agilent Technologies, version B06.00) to assess the quality and reproducibility of the peptide extraction protocol. Samples were filtered with 10 kDa cut-off centrifugal filter units (YM-10 Microcon) at  $14000 \times g$  for 60 min at 4°C. The flow through was applied to a solid phase extraction cartridge (Oasis HLB 10 mg) and eluted with 60% acetonitrile (ACN)/40% H<sub>2</sub>O (v/v) and freeze-dried over-night. The peptide extracts were then re-suspended in 300 µL of LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) solvent (3% ACN/97% H<sub>2</sub>O(v/v) + 0.1% formic acid (FA)) and concentrated by evaporation to 30 µL.

*Mass spectrometry* — Nanoflow liquid chromatography-mass spectrometry (nLC-MS/MS) experiments were performed on an LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific) coupled with a nanoflow liquid chromatography instrument (Easy-nLC II, Thermo Fisher Scientific). Two microliters of each sample were injected onto an enrichment column (C18 PepMap100, Thermo Fisher Scientific). The separation was performed with an analytical column needle (NTCC-360/100-5-153, NikkyoTechnos) in the presence of a mobile phase composed of H<sub>2</sub>O/0.1% FA (buffer A) and ACN/0.1 % FA (buffer B). Elution of peptides was conducted at a flow rate of 300 nL/min, using a two-step linear gradient: from 10 to 40% buffer B over 30 min, and 10 min at 100% buffer B. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set at 1.5 kV and 275°C, respectively. The samples were analyzed using collision induced dissociation method. The first scan (MS spectra) was recorded in the Orbitrap analyzer ( $R = 60,000$ ) with the mass range  $m/z$  400–1800. Then, the 20 most intense ions were selected for MS<sup>2</sup> experiments. Singly charged species were excluded for MS<sup>2</sup> experiments. Dynamic exclusion of already fragmented precursor ions was applied for 30 s, with a repeat count of 1, a repeat duration of 30 s and an exclusion mass width of  $\pm 10$  ppm. Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with normalized collision

energy of 35. All measurements in the Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at  $m/z$  445.12002 (polydimethylcyclsiloxane).

*Identification of peptides expressed in the cerebellum*— Peptides were identified using SpectrumMill (Agilent Technologies, version B04.00.127) implemented with a specific database containing 184 rat neuropeptides chosen from the literature (Table S1). Data were also processed using the SwissProt Rat database. For analysis, the following parameters were used: no enzymatic digestion; precursor mass tolerance: 10 ppm; product mass tolerance: 0.5 Da; modifications: cysteine sulfoxide, acetylated lysine, oxidized methionine, deaminated, pyroglutamic acid, phosphorylated S, T and Y. Only peptides with an identification score above 10 and found in at least 7 samples out of 10 in one or several developmental stages were retained.

*Quantification of regulated peptides during development* — To measure peptide changes in between the four groups (P8, P16, P21 and P90), Progenesis LC-MS software (Nonlinear dynamics, version 4.0.4441.29989) was used. The P8 group was set as the reference to perform two by two comparisons and one P8 sample was chosen to align the LC-MS runs to account for retention time shifts. A minimum of 90% of alignment was required for further analysis. After alignment, statistical analysis was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) calculations. To highlight peptides differentially expressed between P8 and other groups, a  $P$ -value  $<0.05$ , a  $q$ -value  $<0.05$  and a power  $>0.8$  were required. Peptides with a rank  $>10$  and a score  $<20$  were excluded. In addition to that, only peptides with a fold change  $>2$  in at least one of the 2-by-2 comparisons were considered differentially expressed. For the identification, Mascot (Matrix Science, version 2.2.04) was used with the following parameters: no enzymatic digestion; precursor mass tolerance: 10 ppm; product mass tolerance: 0.5 Da; modifications: oxidized methionine and carbamidomethylation. Mascot search results were imported into Progenesis.

*Primary culture of CGN* — Cell cultures were prepared from 7 to 9 days-old rat, as previously described (Gonzalez *et al.* 1992). Briefly, cerebella were removed from skulls and cells were dissociated both enzymatically and mechanically. Cells were plated at a density of  $10^6$  cells/mL in Costar 24-wells culture plates previously coated with poly-D-lysine (12.5  $\mu\text{g/mL}$ , BD Bioscience). Culture medium consisted of 74% Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM), 24% Ham's F-12, 1% antibiotic-antimycotic (100 X, Gibco Life Technologies) 1% N2-supplement (Invitrogen) and 25 mM KCl.

*Cell treatments* — Cells were treated with growing concentrations of nociceptin ( $10^{-7}$  to  $10^{-12}$  M; Abcam). In some experiments hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $10^{-5}$  M; Sigma-Aldrich) was added to promote cell death before treatment and PACAP ( $10^{-7}$  M) was used as a positive control for its stimulatory effect on cell survival (Vaudry *et al.* 2002a) and inhibitory action on cell motility (Raoult *et al.* 2014).

*Cell survival measurement* — CGN survival was measured with fluorescein diacetate (FDA) as previously described (Vaudry *et al.* 2002b). Culture medium was removed and cells were incubated with FDA (15  $\mu\text{g/mL}$ ) for 8 min at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. Cells were then rinsed with PBS and lysed with a 10 mM Tris-HCl solution containing 1% sodium dodecyl sulfate.

*Caspase activity measurement* — Caspase-3/7 activity in cultured CGN was evaluated with the Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega). Three h after treatment, cells were rinsed with DMEM, resuspended in DMEM (100 µl) and incubated with 2 X caspase assay buffer containing Z-DEVD-aminoluciferin substrate. To measure enzymatic activity, bioluminescence signal was measured over 1.5 h at 37°C with an Infinite 200 microplate reader (Tecan).

*Cell motility measurement* — CGN motility was measured using the microexplant technique as previously described (Raoult *et al.* 2011). Briefly, 7 or 8 days-old rat cerebella were cut into 50 to 100 µm pieces and placed in Costar 24-well culture plates double coated with poly-D-lysine (12.5 µg/mL, BD Bioscience) and laminin (20 µg/mL, Sigma-Aldrich). After plating, the explants were covered with culture medium composed of minimum essential medium (Invitrogen) complemented with 1% N2-supplement and 1% antibiotic-antimycotic (100X, Gibco Life Technologies). After 24 h in a cell culture incubator, dishes were transferred into an incubation chamber (37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>) fixed to the stand of an inverted microscope (Leica DMI 6000B). Some images of migrating CGN were acquired with the LAS-AF software every 2 min for 45 min in control conditions and then for another 45 min in treated conditions. Analyses were performed with the MetaMorph software (Roper Scientific).

*Cell differentiation measurement* — Cell differentiation was evaluated by counting and measuring CGN neurites. CGN were labeled with the tubulin tracker green kit (300 nM, Thermo Fischer Scientific) into an incubation chamber (37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 95% O<sub>2</sub>) for 30 min and 5 images per well were randomly acquired with an inverted microscope (Leica DMI 6000B). Analyses were performed with the ImageJ software (version 1.46).

*RNA extraction* — Cell RNA or total cerebella RNA from the six groups (P2, P4, P8, P16, P21 and P90) were extracted using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) and further purified with NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel). The concentration of RNA was measured with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) at an absorbance of 260 nm and 1 µg of total RNA from each sample was reverse transcribed with the ImProm II Reverse Transcription System (Promega).

*Microdissection* — Laser microdissection experiments were conducted as previously described (Basille-Dugay *et al.* 2013). Briefly, cerebella from P8 and P21 rat were cut in the frontal-plane into 14 µm-thick sections. After cresyl violet coloration, sections were dehydrated in ethanol. For P8 cerebella, the 4 layers were sampled (*i.e.* IGL, PL, ML, and EGL), for P21 cerebella, the 3 remaining layers were collected (*i.e.* GL, PL and ML). For each cerebellar layer and each age, 0.4 mm<sup>2</sup> of tissue were cut with a laser microdissector (LMD 7000, Leica). RNA were extracted with the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey Nagel), and then reverse transcribed and amplified with the SMARTer Pico PCR cDNA kit (Clontech).

*Quantitative PCR* — Two ng complementary DNA (cDNA) were amplified in the presence of 2 X SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems) containing preset concentrations of dNTPs, MgCl<sub>2</sub> as well as forward and reverse primers, with a QuantStudio™ 12KFlex. Proper controls without reverse transcriptase or with H<sub>2</sub>O instead of cDNA were conducted. Primers targeting nociceptin and its receptor were design using Primer Express software (Applied Biosystems) and validated by real-time PCR. The relative amount of cDNA in each sample was calculated

using the comparative quantification cycle (Cq) method and expressed as  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which was constant whatever the stage of cerebellar cortex development, as an internal standard for variations in amounts of input mRNA.

Primer sequences used for real time PCR were as follows:

Gapdhf1: CAGCCTCGTCTCATAGACAAGATG

Gapdhr1: CAATGTCCACTTTGTCACAAGAGAA

Pnocf1: GCTCCGGGCAGCTTCAA

Pnocr1: GCGGACGTGAGCTCTGGAT

Opr11f1: TGCTCTCTCTCGATTCTCTACAAACT

Opr11r1: AGTACAACTCCTGACCTCTGATAGCAA

*Experimental design and statistical rationale* — Differential expression of peptides was investigated at 4 developmental (from P8 to P90). For each stage of the peptidomic analysis, 10 biological replicates were analyzed. Nociceptin and its receptor gene expression were measured at 6 different stages of development (from P2 to P90). For each stage of the gene expression study, 4 biological replicates were performed with 3 technical replicates per biological sample (*i.e.* a total of 12 samples per group were analyzed). For laser microdissection experiments, the same experimental design was used with 4 biological replicates and 3 technical replicates (*i.e.* a total of 12 samples per condition) to analyze the 4 cell layers at 2 different developmental stages. To study the effect of nociceptin on cultured granule neurons, 4 parameters were analyzed, *i.e.* cellular caspase activity, survival, motility and differentiation. For cell survival quantification, 10 independent experiments were performed, each one being the mean of 4 technical replicates. Concerning caspase activity measurement, 8 independent experiments were conducted containing 4 technical replicates each. Regarding cell motility, for each condition, 12 microexplants were observed with for each of them at least 24 cells averaged (*i.e.* over 288 cells analyzed per condition). Finally, for neuronal differentiation investigation, 5 images were randomly taken from 5 independent experiments for each condition. Results from each image were average measurement from at least 28 cells, (*i.e.* over 700 cells were measured per condition). Statistical analysis was performed with GraphPad Prism® (version 6.04). Normality was tested with a Shapiro-Wilk test; when the data were parametric an ANOVA was used, when not a Kruskal-Wallis was use instead. Statistically significant differences were estimated by ANOVA followed by Bonferroni's tests for measurement of cell survival, motility and differentiation and with Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests for differentially expressed peptides, qPCR and caspase experiments. The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium *via* the PRIDE partner repository with the data set identifier PXD006874.

## Results

*Identification and quantification of peptides within the rat cerebellum* — The peptides expressed in the cerebellum during development were characterized by mass spectrometry and identified by means of a database containing 184 rat neuropeptides or neuropeptides precursors (Table S1). To confirm the reproducibility of extraction and mass spectrometry protocol, HSA level between the four groups was measured and no significant difference was found (Fig. S1). Analysis with SpectrumMill and Mascot softwares revealed 33 peptides expressed in at least 7 out of 10 samples, at one or several stages of development (Table S2). Quantification of peptide relative expression level with Progenesis software, reported 8 peptides differentially expressed between 2 or more developmental stages (Table 1). Among these 8 peptides, 4 had an expression which increased progressively after the second week of life (Fig. 1A;  $P < 0.05$ ) while the 4 others, exhibited a high expression level at birth which then significantly decreased until adulthood (Fig. 1B;  $P < 0.05$ ). Nociceptin was identified (Fig. 2A) as one of the peptides with a decreasing expression during the developmental period (Fig. 2B). More precisely, its expression was greatly reduced between P8 and P16 (-63%; Fig. 2B), remained stable between P16 and P21, and became so low that it was not detected anymore at P90. Thanks to this particular expression profile, nociceptin was selected as a putative new neurotrophic peptide and considered for subsequent functional studies.

*Expression of nociceptin and its receptor mRNA in the developing rat cerebellum* — The evolution of the relative expression level of nociceptin and its receptor (NOP: Nociceptin/Orphanin FQ receptor) mRNAs in the developing rat cerebellum were investigated by real time PCR (Fig. 3). When compared to P2, the nociceptin mRNA expression level was stable until P8 but then dropped by P16 (-70%; Fig. 3A) and remained at a low level up to adulthood. On its sides, the mRNA encoding NOP (Fig. 3B) was detected at a low level from P2 to P4 but then increased tremendously at P8 (+411%) and remained high until P16. Nevertheless, this was only a transient increase as by P21, NOP mRNAs level dropped (-65% compared to P16) and remained low at adulthood.

Laser microdissection of the different cerebellar cortex layers revealed that at P8 (Fig. 4 left), nociceptin mRNA was mainly expressed in the IGL and significantly less abundant in the EGL (-87%), ML (-67%; non significative) and PL (-75%). At a later stage of development, this difference of expression between the different cerebellar cortical layers was no longer observed, with a low abundance of nociceptin mRNA in all layers (Fig. 4 right). In the same experiments, NOP mRNA was only expressed at P8 and P21 in the IGL with no detection in the other layers (data not shown).

*Effect of nociceptin on cultured CGN* — To determine whether nociceptin could exert neuroprotective activities during development, CGN were treated with nociceptin 3 h after plating in the absence or presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 5). After 24 h of culture, in control conditions, granule cells were alive and evenly distributed (Fig. 5A). Presence of nociceptin alone did not modify the aspect of the culture. In contrast, exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 μM) decreased the number of living CGN. This deleterious effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was prevented by co-treatment of the cells with nociceptin (Fig. 5A). Measurements of cell survival and caspase activity confirmed these observations. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure induced a 25% reduction in the number of living cells (Fig. 5B) and a 49% increase in caspase-3/7 activity (Fig. 5C). Coincubation of CGN with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and

graded concentrations of nociceptin (from  $10^{-12}$  to  $10^{-7}$  M; Fig. 5B) resulted in a dose-dependent increase in the number of surviving neurons with a half maximum effect at a dose of 10 nM. Maximum prevention of cell death (+48% when compared to  $H_2O_2$  alone) was obtained with a concentration of  $10^{-8}$  M nociceptin. Furthermore, if nociceptin had no effect *per se*, a 3 h exposure of CGN to  $H_2O_2$  in the presence of  $10^{-8}$  M nociceptin blocked  $H_2O_2$  induced caspase-3/7 activation (-26% compared to  $H_2O_2$  alone; Fig. 5C). Same results were observed when cells were treated with nociceptin and/or  $H_2O_2$ , 24 h after plating (data not shown).

To investigate the putative effect of nociceptin on granule neuron migration during development, cell motility was measured. Microexplants from P8 cerebella were cultured for 24 h and then treated with nociceptin. In control conditions, granule neurons moved regularly from their origin toward the outside of the microexplant during the whole recording period (Fig. 6A) at an average speed of  $344 \mu\text{m} / \text{h}$  (Fig. 6B). Addition of nociceptin ( $10^{-8}$  M) after 45 min of recording did not affect CGN motility (Fig. 6B), while as expected addition of PACAP ( $10^{-7}$  M) as a positive control decreased CGN motility (data not shown).

To examine the possible effect of nociceptin on CGN differentiation, cultured cells were treated for 24 h with nociceptin in the presence or absence of  $H_2O_2$  (Fig. 7). Quantification of neuritogenesis revealed that nociceptin alone ( $10^{-8}$  M) caused an increase in the percentage of cells with neurites (+31% compared to control; Fig. 7A). Conversely,  $H_2O_2$  (10  $\mu\text{M}$ ) exposure induced a marked reduction of the number of cells with neurites (-32% compared to control; Fig. 7A) which was abolished by co-treatment with nociceptin (+46% compared to  $H_2O_2$ ; Fig. 7A). Nociceptin also increased the total neurite length per neuron (+44% compared to control; Fig. 7B) and reversed the drop caused by  $H_2O_2$  (+62% compared to  $H_2O_2$ ). Finally, nociceptin alone enhanced the number of neurites per neuron (+240% for neurons with 3 or more neurites; +17% for neurons with 2 neurites; -34% for neurons with only 1 neurite; Fig. 7C). Nociceptin also reversed the decrease of neurite per neuron induced by  $H_2O_2$  (+1135% for neurons with 3 or more neurites; +44% for neurons with 2 neurites; -24% for neurons with only 1 neurite; Fig. 7C).

## Discussion

A functional brain requires several steps of development among which proliferation, survival, migration and differentiation to establish proper architecture. In the postnatal developing cerebellar cortex, all these processes are under the control of various molecules, including growth factors, chemokines, neurotransmitters or neuropeptides. These factors are expressed in a spatial and temporal dependent manner. Neuropeptides controlling cerebellar development exhibit a high expression level during developmental stages and a lower expression later at adulthood. Thus, this study searched for neuropeptides exhibiting such specific pattern of expression and investigated their possible implication in CGN development.

*Rat cerebellar peptidome* — Expression of neuropeptides during cerebellar development was studied by a peptidomic approach. Tissues were heat denatured immediately after sampling to prevent any degradation by proteases and peptides were among others purified by filtering the tissue extract with a 10 kDa cutoff filter to get rid of all heavy proteins. Analysis of the MS/MS data from all the samples with the SwissProt Rat database identified less than 100 proteins with only half of them reproductively found in the cerebellum, showing the robustness of the peptide extraction protocol used. These proteins represent less than 1% of the entries of the database, which shows that the extraction protocol excluded almost all proteins from the samples in order to detect peptides known to be expressed in low abundance compared to highly expressed proteins such as tubulin. The present protocol of extraction was retained after the optimization and comparison of several operating procedures. Nevertheless, the fact that few proteins could be identified, suggests that despite all experimental precautions, a little bit of degradation still occurs in between tissue sampling and mass spectrometry analysis. It could thus be of interest to continue to test additional extraction methods where tissues are immediately frozen in 2-methyl-butane (Van Dijck *et al.* 2011) or peptides directly extracted upon sampling (Fälth *et al.* 2007). One of these approaches may reduce further sample contamination by protein fragments and deepen the analysis of peptides present in the tissues. However the protein fragments identified are also likely to come from the physiological protein turnover induced by catalyzed proteolysis through ubiquitin or proteasome pathways (Glickman and Ciechanover 2002).

Peptide identification was conducted by means of a rat database which included 184 sequences of known active peptides and peptide precursors. A size limit was set to 100 amino acids for peptides to be included in our database. Sequences over 100 amino acids such as brain derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 (both 119 amino acids long) were excluded even if nLC-MS analysis revealed their presence in the cerebellum as expected according to previous studies (Zhou and Rush 1994). From the 184 sequences present in the database, 70 peptides were identified in at least 1 of the 10 samples in one or several stages. Nevertheless, to be certain of a reproducible presence, only the 33 peptides found expressed in at least 7 out of 10 samples at one or several stages of development, were taken into account for further analysis. These 33 peptides represent almost 18% of all the entries of the database, indicating that a large diversity of peptides is expressed in the cerebellum. Furthermore, for all these identified neuropeptides, the MS/MS coverage rate was over 89%, showing the robustness of the identification.

Among these 33 peptides, 14 were already known peptides while 19 others coded for putative new neuropeptides which have not yet been described but arise from established peptide precursors (*i.e.* Chromogranin A, Secretogranin 1, 2 and 3 and the neurosecretory protein VGF). All of these putative new peptides shared same characteristics including short sequences of less than 20 amino acids, presence of basic amino acid doublets at each end of the sequence as possible prohormone convertase cleavage sites and localization in a region of the precursor already rich of known peptides. All these properties and the fact that the sequences were reproductively detected, supports the hypothesis that they correspond to novel peptides (Hook *et al.* 2008) rather than fragments of degradation, but further studies will be needed to identify their putative functions. Even if some peptides such as cerebellin 1 and 2, or



octadecaneuropeptide were already known to be expressed in the cerebellum (Malagon *et al.* 1993), some others such as CNP-53, islet amyloid polypeptide, neuroendocrine regulatory peptide 1 and neuropeptide K were not and therefore, their functions has never been investigated in this structure. However, all the neuropeptides known to be expressed in the cerebellum were not detected. For instance, PACAP whose expression profile has already been well described in the literature (Tatsuno *et al.* 1994) was not identified. It should be pointed out that PACAP is only expressed by Purkinje cells in the developing cerebellum (Nielsen *et al.* 1998) so its abundance in the whole cerebellum remains very low. As total cerebella were analysed, despite our enrichment procedure, samples remained very complex which led to the collection of a huge number of peptide sequences (around 1400 per stage) and low abundant peptides may have been hidden by other molecular species and not selected for fragmentation. This idea is reinforced by the fact that also PACAP was not detected, the PACAP-related peptide, which comes from the same precursor was found (Vaudry *et al.* 2009). It should also be pointed out that as the analysis was conducted using a specific database containing only known neuropeptides and peptide precursors, we were unable to identify peptides coming from unknown precursors or from precursors not included in the database.

*Temporal expression of neuropeptides in the rat cerebellum during development* — The present study not only provides the first peptidome of the cerebellum but also investigates the relative expression level of those peptides during the developmental period. Among the 8 neuropeptides found to be differentially expressed during development, regulations of somatostatin which controls CGN migration (Villar *et al.*, 1989 and Inagaki *et al.*, 1989) and of octadecaneuropeptide which promotes CGN survival (Kaddour *et al.* 2013) were consistent with previous reports from the literature which strengthen our results regarding expression profile of some peptides not yet described. Also this study was initially conducted to identify peptides with a high expression during development which decreases at adulthood, 4 peptides were found with an opposite pattern of regulation. Among them, WE-14 is a 14 amino acids post-translational peptide from the chromogranin A (Curry *et al.* 2002). If the function of WE-14 remains unclear, chromogranin A is known to be involved in the biogenesis and exocytosis of secretory granules (Elias *et al.* 2012), 2 cellular mechanisms required for synaptic transmission. As during development CGN and Purkinje cells connect together to create at adulthood a functional network that relies on synaptic transmission to process information coming from outside of the cerebellum, it is tempting to speculate that according to its expression profile, WE-14 may contribute to secretory mechanisms in the mature cerebellum.

*Nociceptin as a neurotrophic factor* — Among the 4 neuropeptides whose expression was down-regulated during cerebellar development, we have chosen to further investigate the expression profile and putative function of nociceptin because, despite its various functions in the brain, nothing is known regarding its involvement in the development and/or activity in the cerebellum. This 17 amino acids peptide was described for the first time for its pro-nociceptive effect during deorphanization of its receptor NOP (Meunier *et al.* 1995). Since then, many functions of this peptide have been reported in the brain including impairment of learning abilities (Redrobe *et al.* 2000), participation in addictive behaviors (alcohol, Rorick-Kehn *et*

*al.*, 2016; food, Statnick *et al.*, 2016; cocaine and heroin, Kallupi *et al.*, 2017) and possible involvement in Parkinson disease (Marti 2005).

During development of the cerebellar cortex, granule neuron precursors proliferate in the EGL, migrate through the ML and PL, to reach their final destination in the IGL where they differentiate. This is accompanied by two main phases of apoptosis of CGN which do not properly complete this process; a first one at P7 in the EGL and a second one in between P16 and P18 in the IGL. The presence of the NOP on cultured granule neurons and the specific expression of nociceptin and its receptor genes in the IGL suggests that the peptide may act on differentiating CGN rather than on the progenitors located in the EGL. This hypothesis could be confirmed through functional studies showing that nociceptin increased the survival and differentiation of CGN but had no effect on their motility. This means that nociceptin does not act as a chemoattractive or chemorepulsive agent to modulate the migration of granule neurons as other neuropeptides do (somatostatin; Yacubova and Komuro, 2002 or PACAP; Cameron *et al.*, 2007). Since Lossi *et al.* (2002) show that the first phase of apoptosis in the EGL is synapse-independent while the second one in the IGL is synapse-dependent, by inhibiting apoptosis and promoting differentiation, nociceptin may contribute to the formation of CGN parallel fibers which, in the mature cerebellum, establish contacts with Purkinje cells. To confirm this hypothesis, future experiments should investigate the cerebellar architecture of nociceptin knockout mice and study the effect of nociceptin on the expression of contact molecules in between parallel fibers and Purkinje cells, such as NB-3 whose deficiency leads to CGN apoptosis within the IGL (Sakurai *et al.* 2009). But even if further investigation are needed to elucidate the exact contribution of nociceptin in brain development, the present results demonstrate the transient expression of the nociceptinergic system in the postnatal cerebellum IGL and provide first evidence that this peptide can, in this structure, promote CGN differentiation and survival.

## References

- Basille-Dugay, M., Hamza, M.M., Tassery, C., Parent, B., Raoult, E., Bénard, M., Raisman-Vozari, R., Vaudry, D., and Burel, D.C. (2013). Spatio-temporal characterization of the pleiotrophinergic system in mouse cerebellum: evidence for its key role during ontogenesis. *Exp. Neurol.* 247, 537–551.
- Cameron, D.B., Galas, L., Jiang, Y., Raoult, E., Vaudry, D., and Komuro, H. (2007). Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 146, 697–712.
- Curry, W.J., Barkatullah, S.C., Johansson, A.N., Quinn, J.G., Norlen, P., Connolly, C.K., McCollum, A.P., and McVicar, C.M. (2002). WE-14, a chromogranin a-derived neuropeptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971, 311–316.
- Elias, S., Delestre, C., Ory, S., Marais, S., Courel, M., Vazquez-Martinez, R., Bernard, S., Coquet, L., Malagon, M.M., Driouich, A., *et al.* (2012). Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* 153, 4444–4456.

Fälth, M., Sköld, K., Svensson, M., Nilsson, A., Fenyö, D., and Andren, P.E. (2007). Neuropeptidomics strategies for specific and sensitive identification of endogenous peptides. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 6, 1188–1197.

Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428.

Gonzalez, B., Leroux, P., Lamacz, M., Bodenant, C., Balazs, R., and Vaudry, H. (1992). Somatostatin receptors are expressed by immature cerebellar granule cells: evidence for a direct inhibitory effect of somatostatin on neuroblast activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9627–9631.

Gonzalez, B.J., Basille, M., Vaudry, D., Fournier, A., and Vaudry, H. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78, 419–430.

Hibi, M., and Shimizu, T. (2012). Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev. Neurobiol.* 72, 282–301.

Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., and Hwang, S.-R. (2008). Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 393–423.

Inagaki, S., Shiosaka, S., Sekitani, M., Noguchi, K., Shimada, S., and Takagi, H. (1989). In situ hybridization analysis of the somatostatin-containing neuron system in developing cerebellum of rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 6, 289–295.

Ito, M. (2006). Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog. Neurobiol.* 78, 272–303.

Kaddour, H., Hamdi, Y., Vaudry, D., Basille, M., Desrues, L., Leprince, J., Castel, H., Vaudry, H., Tonon, M.-C., Amri, M., *et al.* (2013). The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway. *J. Neurochem.* 125, 620–633.

Kallupi, M., Scuppa, G., de Guglielmo, G., Calò, G., Weiss, F., Statnick, M.A., Rorick-Kehn, L.M., and Ciccocioppo, R. (2017). Genetic Deletion of the Nociceptin/Orphanin FQ Receptor in the Rat Confers Resilience to the Development of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 695–706.

Komuro, H., and Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260, 95–97.

Kubo, T., Nonomura, T., Enokido, Y., and Hatanaka, H. (1995). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 85, 249–258.

Lewis, P.M., Gritli-Linde, A., Smeyne, R., Kottmann, A., and McMahon, A.P. (2004). Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev. Biol.* 270, 393–410.

Lossi, L., Mioletti, S., and Merighi, A. (2002). Synapse-independent and synapse-dependent apoptosis of cerebellar granule cells in postnatal rabbits occur at two subsequent but partly overlapping developmental stages. *Neuroscience* 112, 509–523.

Malagon, M., Vaudry, H., Van Strien, F., Pelletier, G., Gracia-Navarro, F., and Tonon, M.C. (1993). Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57, 777–786.

Marti, M. (2005). Blockade of Nociceptin/Orphanin FQ Transmission Attenuates Symptoms and Neurodegeneration Associated with Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 25, 9591–9601.

Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., and Monsarrat, B. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377, 532–535.

Nielsen, H.S., Hannibal, J., and Fahrenkrug, J. (1998). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *Neuroreport* 9, 2639–2642.

Oostland, M., Buijink, M.R., Teunisse, G.M., von Oerthel, L., Smidt, M.P., and van Hooft, J.A. (2014). Distinct temporal expression of 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors on cerebellar granule cells in mice. *Cerebellum Lond. Engl.* 13, 491–500.

Park, C.R., Kim, D.-K., Cho, E.B., You, D.-J., do Rego, J.L., Vaudry, D., Sun, W., Kim, H., Seong, J.Y., and Hwang, J.-I. (2012). Spatiotemporal expression and functional implication of CXCL14 in the developing mice cerebellum. *Mol. Cells* 34, 289–293.

Raoult, E., Roussel, B.D., Bénard, M., Lefebvre, T., Ravni, A., Ali, C., Vivien, D., Komuro, H., Fournier, A., Vaudry, H., *et al.* (2011). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates the expression and the release of tissue plasminogen activator (tPA) in neuronal cells: involvement of tPA in the neuroprotective effect of PACAP: tPA mediates the neuroprotective effect of PACAP. *J. Neurochem.* 119, 920–931.

Raoult, E., Bénard, M., Komuro, H., Lebon, A., Vivien, D., Fournier, A., Vaudry, H., Vaudry, D., and Galas, L. (2014). Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum. *J. Neurochem.* 130, 241–254.

Redrobe, J.P., Calo, G., Guerrini, R., Regoli, D., and Quirion, R. (2000). [Nphe(1)]-Nociceptin (1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1379–1384.

Rorick-Kehn, L.M., Ciccocioppo, R., Wong, C.J., Witkin, J.M., Martinez-Grau, M.A., Stopponi, S., Adams, B.L., Katner, J.S., Perry, K.W., Toledo, M.A., *et al.* (2016). A Novel, Orally Bioavailable Nociceptin Receptor Antagonist, LY2940094, Reduces Ethanol Self-Administration and Ethanol Seeking in Animal Models. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40, 945–954.

Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P.A., Knevels, E., Chounlamountri, N., Poesen, K., Hermans, K., Lambrechts, D., Van Geyte, K., Dhondt, J., *et al.* (2010). Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 15052–15066.

Sakurai, K., Toyoshima, M., Ueda, H., Matsubara, K., Takeda, Y., Karagogeos, D., Shimoda, Y., and Watanabe, K. (2009). Contribution of the neural cell recognition molecule NB-3 to synapse formation between parallel fibers and Purkinje cells in mouse. *Dev. Neurobiol.* 69, 811–824.

Statnick, M.A., Chen, Y., Ansonoff, M., Witkin, J.M., Rorick-Kehn, L., Suter, T.M., Song, M., Hu, C., Lafuente, C., Jiménez, A., *et al.* (2016). A Novel Nociceptin Receptor Antagonist LY2940094 Inhibits Excessive Feeding Behavior in Rodents: A Possible Mechanism for the Treatment of Binge Eating Disorder. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 356, 493–502.

Tatsuno, I., Somogyvari-Vigh, A., and Arimura, A. (1994). Developmental changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat brain. *Peptides* 15, 55–60.

Van Dijck, A., Hayakawa, E., Landuyt, B., Baggerman, G., Van Dam, D., Luyten, W., Schoofs, L., and De Deyn, P.P. (2011). Comparison of extraction methods for peptidomics analysis of mouse brain tissue. *J. Neurosci. Methods* 197, 231–237.

Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1999). Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 9415–9420.

Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Pamantung, T.F., Fournier, A., and Vaudry, H. (2000). PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921, 293–299.

Vaudry, D., Pamantung, T.F., Basille, M., Rousselle, C., Fournier, A., Vaudry, H., Beauvillain, J.C., and Gonzalez, B.J. (2002a). PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1451–1460.

Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T.F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B.J. (2002b). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6398–6403.

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K.C., Hashimoto, H., Galas, L., *et al.* (2009). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol. Rev.* 61, 283–357.

Villar, M.J., Hökfelt, T., and Brown, J.C. (1989). Somatostatin expression in the cerebellar cortex during postnatal development. An immunohistochemical study in the rat. *Anat. Embryol. (Berl.)* 179, 257–267.

Yacubova, E., and Komuro, H. (2002). Stage-specific control of neuronal migration by somatostatin. *Nature* 415, 77–81.

Zhou, X.F., and Rush, R.A. (1994). Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res.* 643, 162–172.

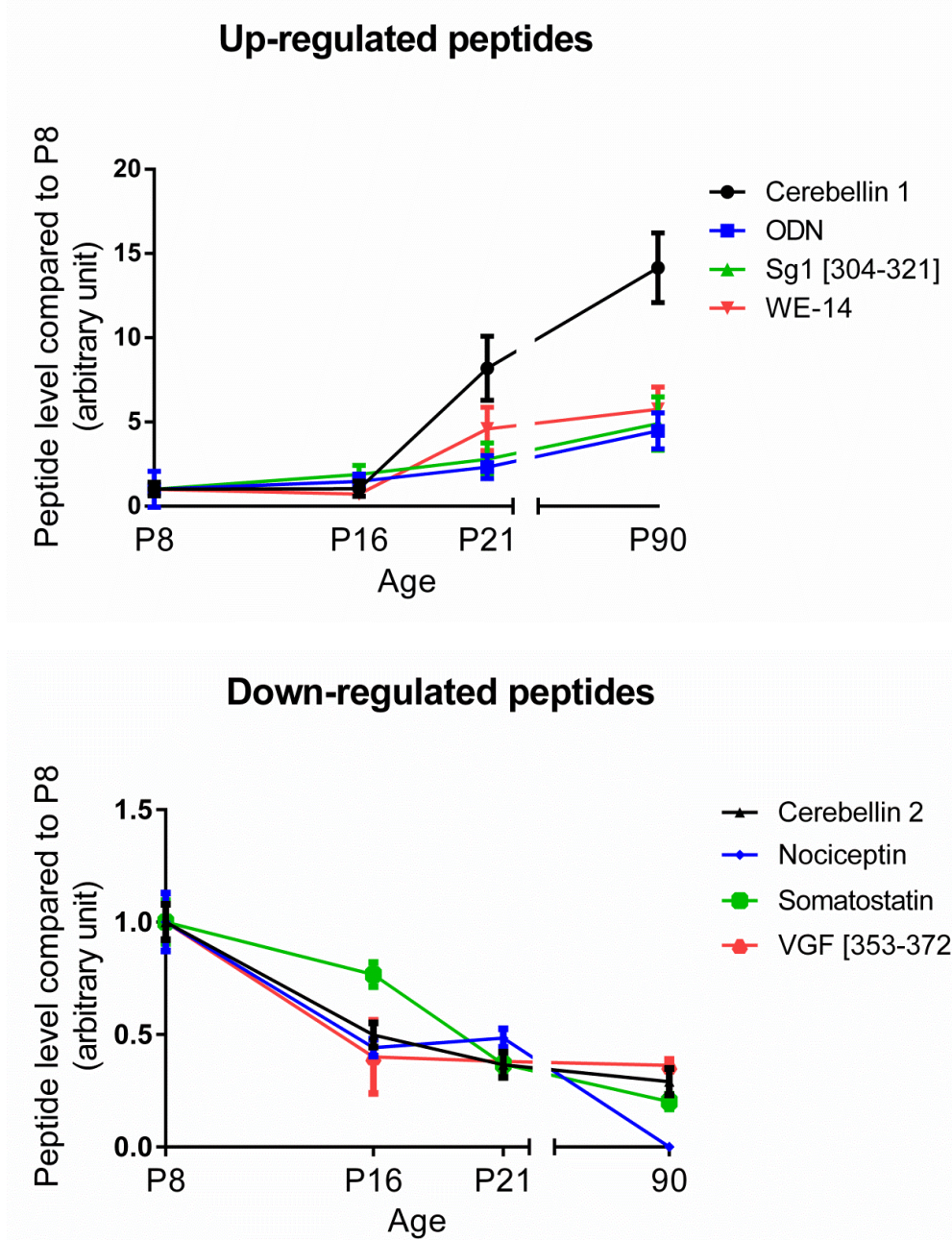
**Tables and figures**

**Tab. 1 Eight peptides were found differentially expressed from birth to adulthood**

|     |             | Cerebellin 1     | Octadeca-neuropeptide | Secretogranin 1 [304-321] | WE-14          | Cerebellin 2     | Nociceptin        | Somatostatin 28 | VGF [353-372]       |
|-----|-------------|------------------|-----------------------|---------------------------|----------------|------------------|-------------------|-----------------|---------------------|
|     | Sequence    | SGSAKVAFSAIRSTNH | QATVGDVNTDRPGLLDLK    | HAAGESKDANVATANLGE        | WSRMDQLAKELTAE | SGSAKVAFSATRSTNH | FGGFTGARKSARKLANQ | SANSNPAMAPRE    | GLQETQQERENEREEEAQE |
|     | m/z         | 1631.83797       | 1583.81551            | 1624.78315                | 1747.85633     | 1619.80159       | 1807.98055        | 1243.56154      | 2460.06369          |
| P16 | Fold change | 1.2              | 1.5                   | 1.9                       | -1.4           | -2.1             | -2.3              | -1.3            | -2.5                |
|     | Score       | 54               | 45                    | 46                        | 26             | 46               | 40                | 39              | 45                  |
|     | ANOVA       | ns               | *                     | *                         | *              | **               | ***               | *               | **                  |
| P21 | Fold change | 8.2              | 2.3                   | 2.8                       | 4.6            | -2.8             | -2.1              | -2.8            | -2.6                |
|     | Score       | 53               | 59                    | 53                        | 25             | 55               | 38                | 65              | 35                  |
|     | ANOVA       | ***              | **                    | ***                       | ***            | **               | ***               | ***             | ***                 |
| P90 | Fold change | 14.2             | 4.5                   | 4.9                       | 5.8            | -3.4             | ND                | -5              | -2.8                |
|     | Score       | 59               | 54                    | 69                        | 43             | 49               |                   | 60              | 46                  |
|     | ANOVA       | ***              | ***                   | ***                       | ***            | ***              |                   | ***             | ***                 |

Fold changes were calculated compared to P8. Score and ANOVA were calculated with Progenesis. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  ND: not detected; P: postnatal day; VGF: non-acronymic; WE-14: first and last amino acid of a 14 amino acids long peptide.

FIG. 1. Identification of peptides expressed in the rat developing cerebellum. nLC-MS/MS



runs were analyzed with Progenesis to quantify their relative expression. (A) Up-regulated peptides and (B) Down-regulated peptides from P8 (postnatal day 8) to P90. Each value is the mean ( $\pm$  SEM) of 10 samples. ODN: octadecaneuropeptide; Sg1: Secretogranin 1; SST: somatostatin; VGF: non-acronymic; WE-14: first and last amino acid of a 14 amino acids long peptide.

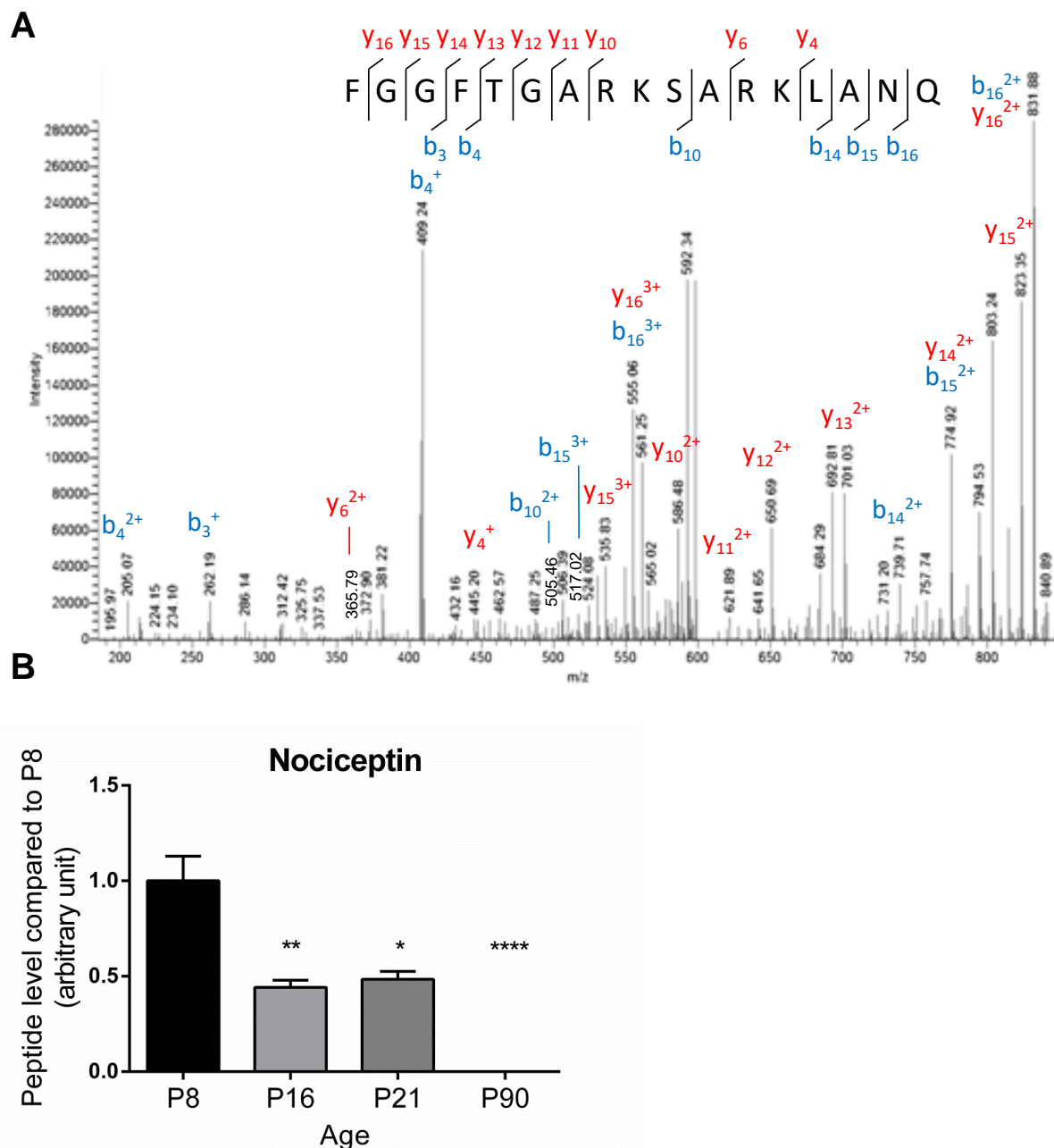


FIG. 2. **Identification and quantification of nociceptin in the developing rat cerebellum.** (A) Mass spectrometry sequence determination of nociceptin after collision-induced dissociation of the 1807.98055 m/z precursor fragment ion, exportation from Excalibur and manual annotation. (B) Relative expression level of nociceptin during development between P8 (postnatal day 8) and P90. Each value is the mean ( $\pm$  SEM) of 10 samples. Statistically significant differences were estimated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test: \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  versus P8.



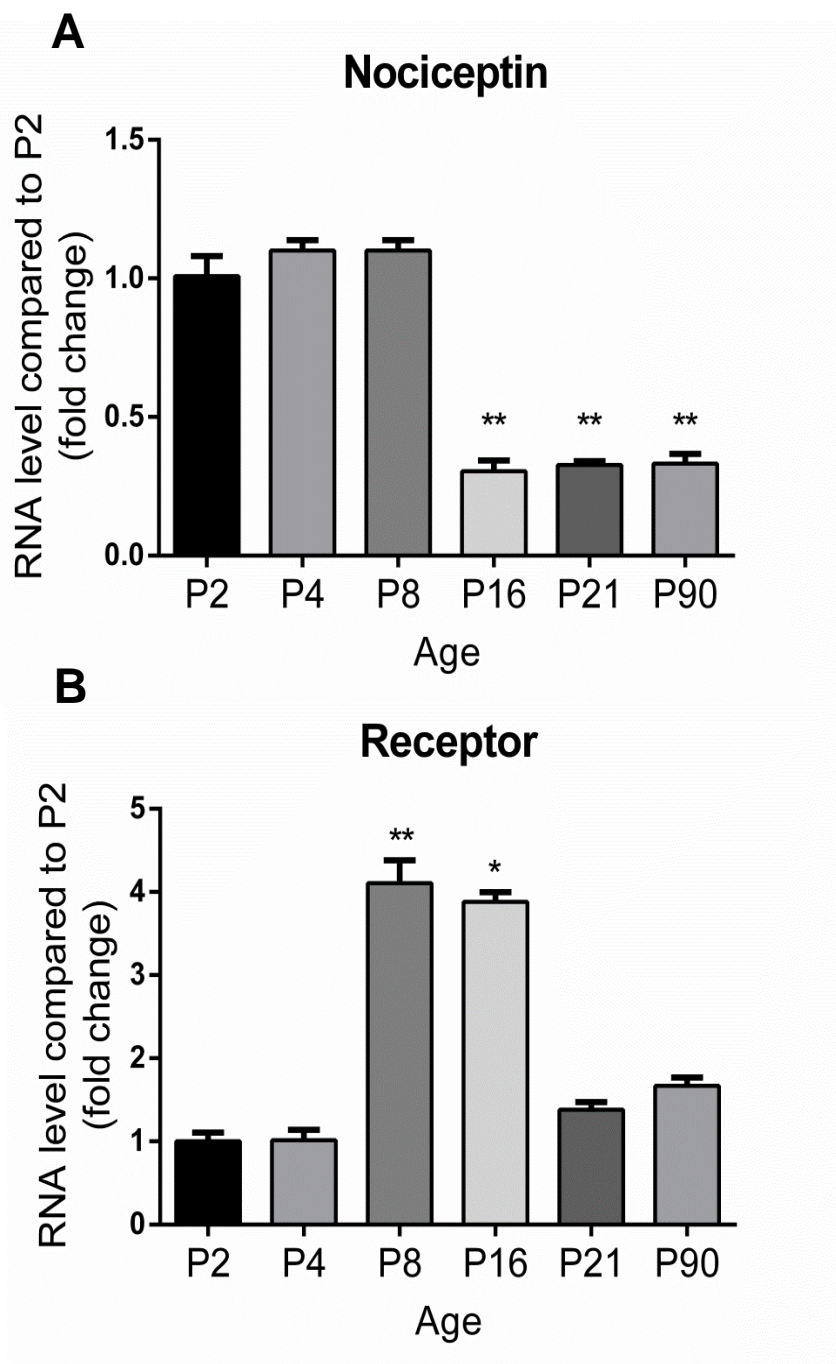


FIG. 3. **Expression of nociceptin and its receptor mRNA during rat cerebellar development.** The evolution of the relative level of expression of (A) nociceptin and (B) its receptor in the cerebellum was analyzed by real-time PCR between P2 (postnatal day 2) and P90. Each value is the mean ( $\pm$  SEM) of 6 cerebella. Statistically significant differences were estimated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus P2.

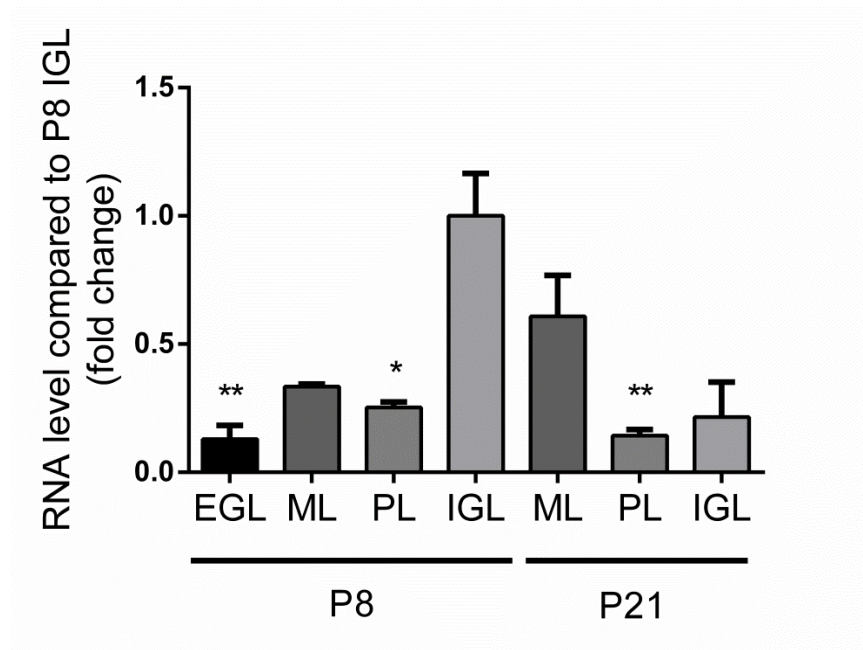
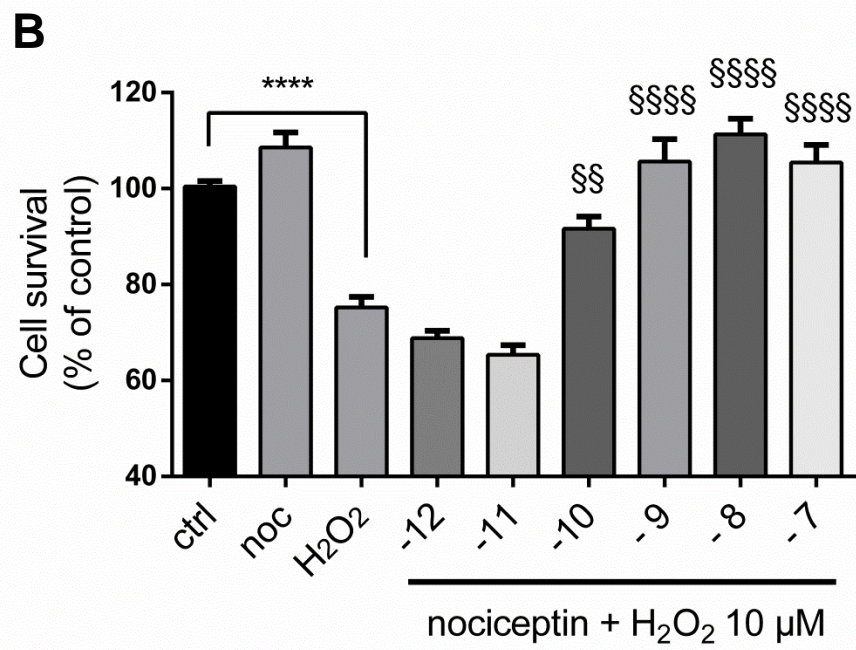
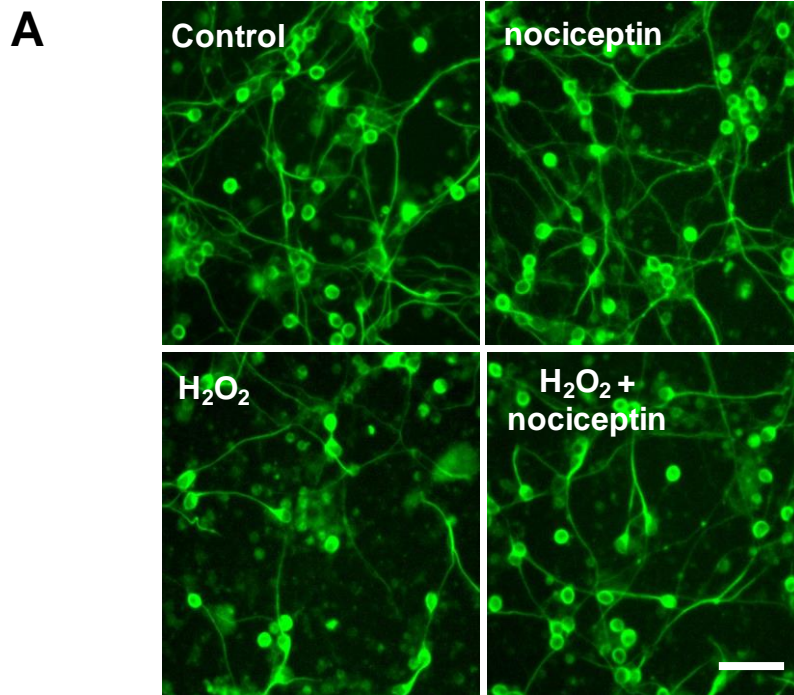


FIG. 4. **Expression of nociceptin mRNA at 8 and 21 days after birth in the different cerebellar cortex layers.** Nociceptin gene expression was measured by real-time PCR analysis at P8 (postnatal day 8) and P21. Each value is the mean ( $\pm$  SEM) of 4 cerebella. Statistically significant differences were estimated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus P8 IGL. EGL: external granular cell layer; ML: molecular layer; PL: Purkinje cell layer; IGL: internal granular cell layer.



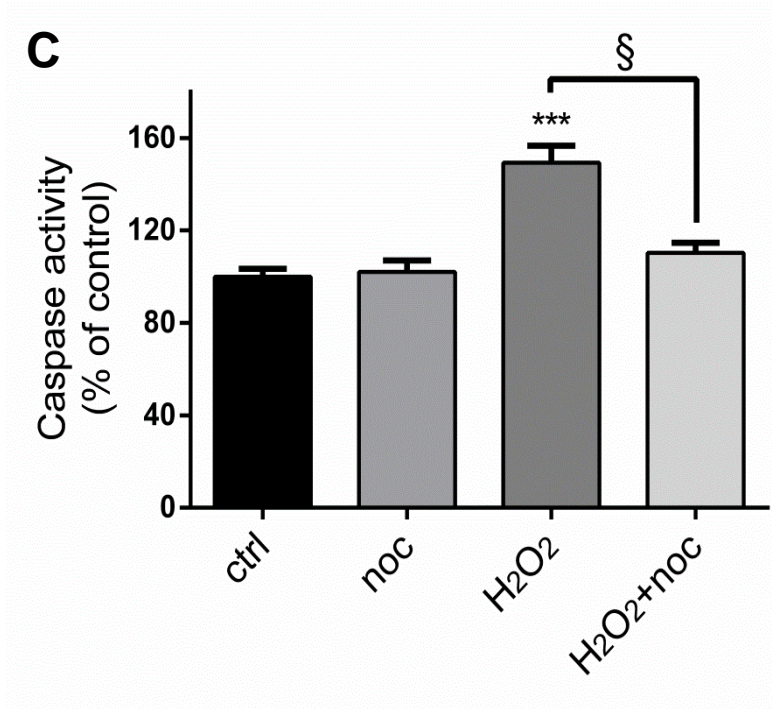
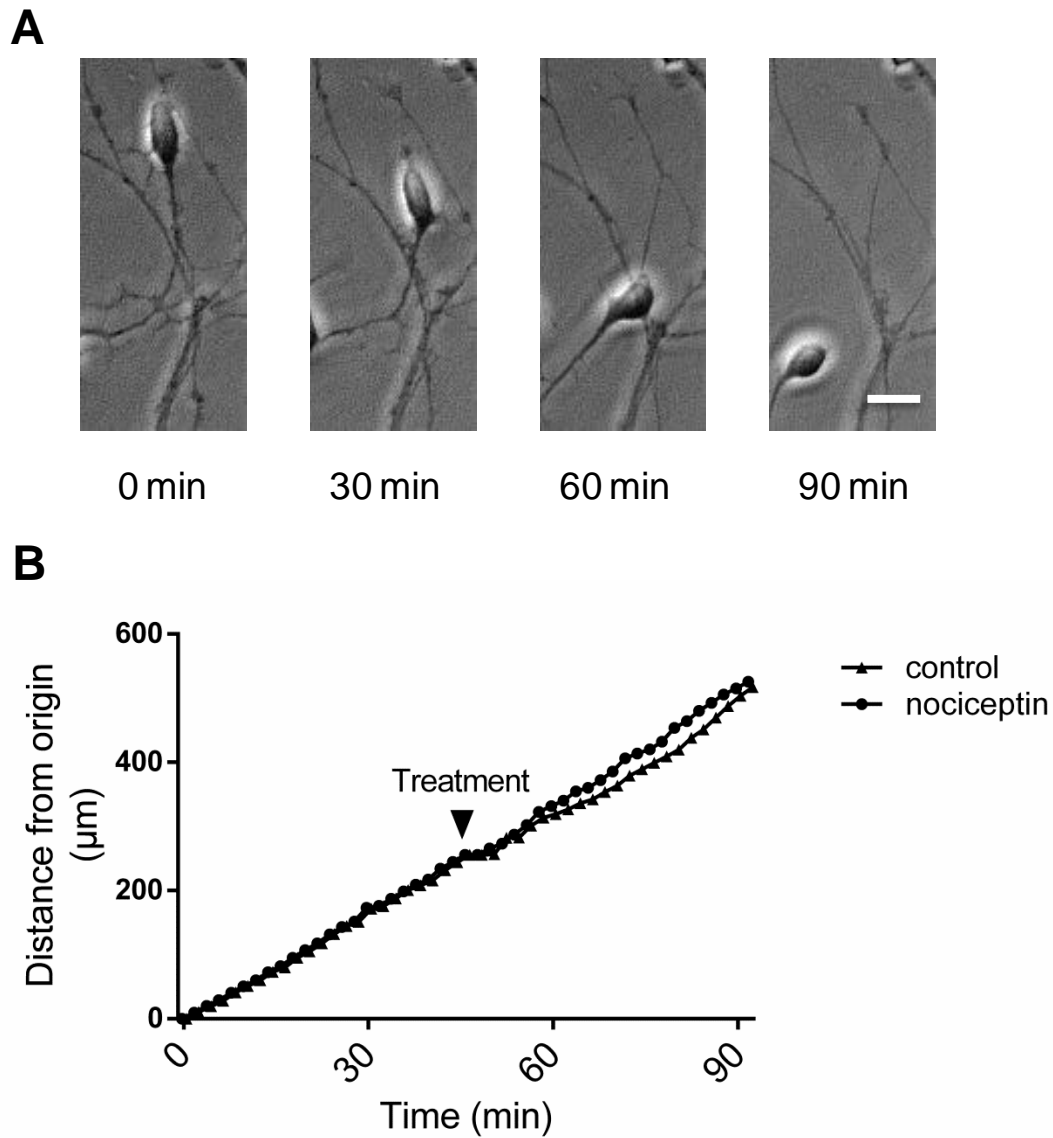
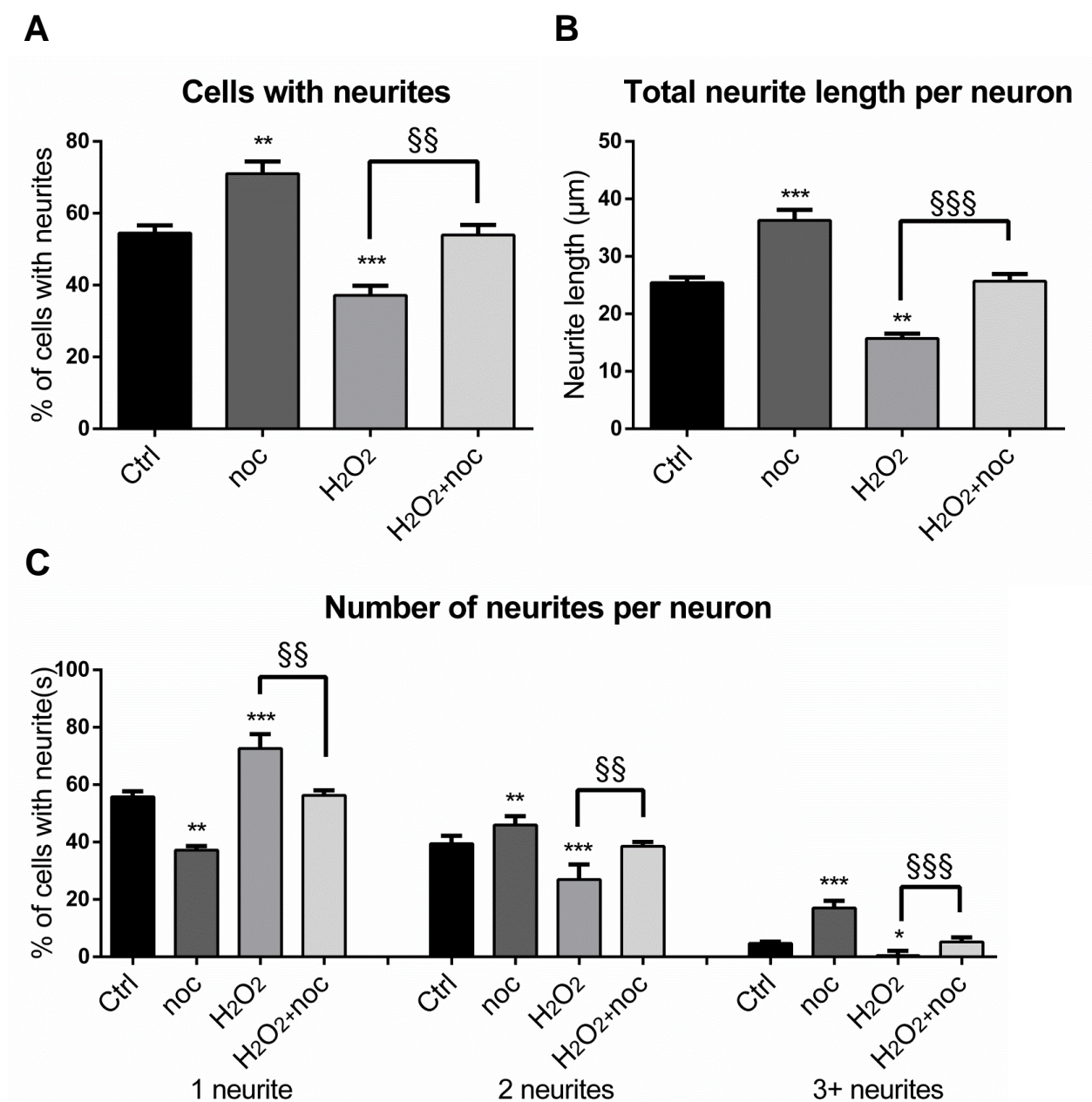


FIG. 5. **Effect of nociceptin on hydrogen peroxide-induced cerebellar granule neurons death.** (A) Typical images illustrating the protective effect of nociceptin against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) -induced cerebellar granule cell death. Scale bar = 50  $\mu$ m. Cells were treated for 24 h with 10<sup>-5</sup> M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10<sup>-8</sup> M nociceptin and labeled with tubulin tracker green. (B) Effect of graded concentrations of nociceptin (noc; 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-7</sup> M) on survival of cultured cerebellar granule cells exposed to 10<sup>-5</sup> M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> after 24 h of treatment. Cell survival was quantified by measuring fluorescein diacetate intensity. Results are expressed as percentages of control. Each value is the mean ( $\pm$  SEM) of 4 wells from at least 10 independent cultures. For the nociceptin alone condition, cells were treated with 10<sup>-8</sup> M of nociceptin. Each value is the mean ( $\pm$ SEM) of 4 wells from at least 8 independent cultures. Statistically significant differences were estimated by ANOVA followed by Bonferroni's test: \*\*\*\* $P$  < 0.001 versus control; §§ $P$  < 0.01, §§§§ $P$  < 0.0001 versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) Caspase activity of cells treated with nociceptin 10<sup>-8</sup> M and/or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10<sup>-5</sup> M. Statistically significant differences were estimated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test: \*\*\* $P$  < 0.001 versus control, § $P$  < 0.05 versus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**FIG. 6. Effect of nociceptin on cerebellar granule neuron motility.** (A) Typical images illustrating the migration of a granule neuron. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . (B) Measurement of the distance from the origin. Cell movement was recorded for 45 min in control conditions prior treatment with  $10^{-8}$  M nociceptin or culture medium (control), and recorded for another 45 min. Each value is the mean ( $\pm$ SEM) of 12 independent experiments. Statistically significant differences were estimated by Kruskal-Wallis followed by Dunn's test.





**FIG. 7. Effect of nociceptin on cerebellar granule neuron differentiation.** Cells were treated for 24 h with  $10^{-5}$  M hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and/or  $10^{-8}$  M nociceptin (noc) and labeled with tubulin tracker green for microscopy imaging. (A) Percentage of granule neurons with neurites. (B) Total neurite length per neuron. (C) Number of neurites per neuron. Each value is the mean ( $\pm$  SEM) of at least 5 images per well from 5 different experiments. Statistically significant differences were estimated by ANOVA followed by Bonferroni's test: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus respective control; §§ $P < 0.01$ , §§§ $P < 0.001$  versus  $H_2O_2$ .

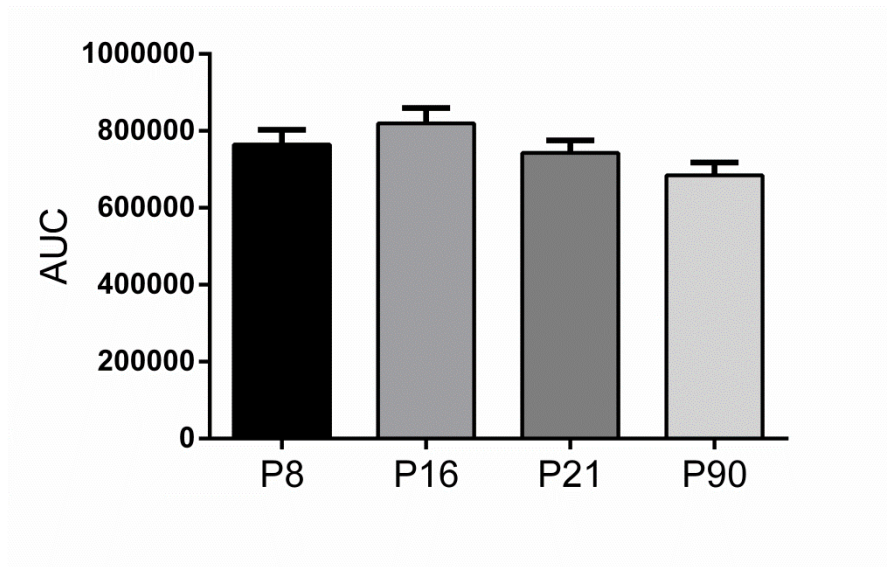


Fig. S1: AUC measurement of human serum albumin. Each value is the mean ( $\pm$ SEM) of 10 samples. Statistically significant differences were estimated by Kruskal-Wallis that reveal no significant difference between the groups. AUC: area under the curve.

**Tab. S1: Neuropeptides rat database containing 184 neuropeptides and their precursors**

| UniProt access n° | Name                         | Precursor                          | Sequence  |
|-------------------|------------------------------|------------------------------------|---|
| P63182            | [des-Ser1]-cerebellin        | Cerebellin-1                       | GSAKVAFSAIRSTNH   |
| P11030            | Acyl-CoA-binding protein     | Diazepam-binding inhibitor         | SQADFDKAAEEVKRLKTQPTDEEMLFYSHFKQATV<br>GDVNTDRPGLLDLKGKAKWDSWNKLGKTSKENA<br>MKTYYEKVEELKKKYGI   |
| P43145            | Adrenomedullin               |                                    | YRQSMNQSRSTGCRFGTCTMQKLAHQIYQFTDKD<br>KDGMAPRNKISPQGY   |
| P61312            | Adrenomedullin-2             |                                    | PHAQLLRVGCVLGTCQVQNLSHRLWQLVRPSGRRD<br>SAPVDPSSPHSY   |
| P06300            | Alpha-neoendorphin           | Proenkephalin-B                    | YGGFLRKYPK  |
| P01015            | Angiotensin-1                | Angiotensinogen                    | DRVYIHPFHL  |
| P01015            | Angiotensin-2                | Angiotensinogen                    | DRVYIHPF  |
| P01015            | Angiotensin-3                | Angiotensinogen                    | RVYIHPF   |
| P01015            | Angiotensinogen              |                                    | DRVYIHPFHLLYYSKSTCAQLENPSVETLPEPTFEPV<br>IQAKTSPVDEKTLRDKLVLATEKLEAEDRQRAAQV<br>AMIANFMGFRMYKMLSEARGVASGAVLSPPALFGT<br>LVSFYLGSLDPTASQLQVLLGVPVKEGDCTSRLDGH<br>KVLTAQAQQGLLVTQGGSSSQTPLLQSTVVGFLFTA<br>PGLRLKQPFVSLGPFTPAIFPRSLDLSTDPVLAQKI<br>NRFVQAVTGWKMNLPLEGVSTDSLFFNTYVHFQ<br>KMRGFSQTLGHEFWVDNSTSVPMLSGTGNFQH<br>WSDAQNNFVTRVPLGESVTLLLIQPQCASDLDRVE<br>VLVFQHDFLTWIKNPPRAIRLTLPQLEIRGSYNLQD<br>LLAQAKLSTLLGAEANLKGMDTNPRVGEVLNSILL<br>ELQAGEEQPTESAQQPGSPEVLDVTLSSPFLFAIYE<br>RDSGALHFLGRVDNPQNVV |
| P60042            | Antrin                       | Somatostatin                       | APSDPRLRQF  |
| Q9R0R3            | Apelin-13                    | Apelin                             | QRPRLSHKGPMPF   |
| Q9R0R3            | Apelin-28                    | Apelin                             | TGPGAWQGGRRKFRRQRPRLSHKGPMPF  |
| Q9R0R3            | Apelin-31                    | Apelin                             | TSRTGPGAWQGGRRKFRRQRPRLSHKGPMPF   |
| Q9R0R3            | Apelin-36                    | Apelin                             | LVKPRTSRTGPGAWQGGRRKFRRQRPRLSHKGPMPF  |
| P01186            | Arg-vasopressin              | Vasopressin-neurophysin 2-copeptin | CYFQNCPRG   |
| P01161            | Atrial natriuretic factor    | Natriuretic peptides A             | SLRRSSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFRY  |
| P01161            | Atriopeptin-1                | Natriuretic peptides A             | SSCFGGRIDRIGAQSGLGCNS   |
| P01161            | Atriopeptin-2                | Natriuretic peptides A             | SSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFR   |
| P01161            | Atriopeptin-3                | Natriuretic peptides A             | SSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFRY  |
| P01161            | Auriculin-A                  | Natriuretic peptides A             | RSSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFR  |
| P01161            | Auriculin-B                  | Natriuretic peptides A             | RSSCFGGRIDRIGAQSGLGCNSFRY   |
| P01194            | Beta-endorphin               | Pro-opiomelanocortin               | YGGFMTSEKSTPLVTLFKNAIKNVHKKGQ   |
| P10354            | Beta-granin                  | Chromogranin-A                     | LPVNSPMTKGDTKVMKCVLEVISDSLSPSPMPVSP<br>ECLETLQGDRLVLSILRHQNLKELQDLALQGAKER<br>AQQQQQQQQQQQQQQQQQQQHSFEDELSEVFE<br>NQSPAANKGDAASEAPSKDTVE  |
| P06300            | Beta-neoendorphin            | Proenkephalin-B                    | YGGFLRKYPK  |
| P04563            | Big gastrin                  | Gastrin                            | QLGPGQPQHFADLSKKQRPPMEEEEAYGWMDF  |
| P08934            | Bradykinin                   | Kininogen-1                        | RPPGFSPPF   |
| P13205            | Brain natriuretic peptide 45 | Natriuretic peptides B             | SQDSAFRIQERLRNSKMAHSSSCFGQKIDRIGAVSRL<br>GCDGLRLF   |



|        |                                   |   |   |
|--------|-----------------------------------|---|---|
| P01257 | Calcitonin                        |   | CGNLSTCMLGTYTQDLNKFHTFPQTSIGVVGAP   |
| P01256 | Calcitonin gene-related peptide 1 |   | SCNTATCVTHRLAGLLSRGGVVKDNFVPTNVGSEAF  |
| P10093 | Calcitonin gene-related peptide 2 |   | SCNTATCVTHRLAGLLSRGGVVKDNFVPTNVGSKAF  |
| P49192 | CART(1-52)                        | Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein | QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKELPRRQLRAPGAVLQIEALQEVLKKLKS  |
| P49192 | CART(55-102)                      | Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein | IPIYEKKYGQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL  |
| P49192 | CART(62-102)                      | Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein | YGQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL   |
| O35314 | CCB peptide                       | Secretogranin-1                                       | AAEFPDFYDSEEQMGPHQEAEDEKDRADQRVLTEEKKELENLAAMDLELQKIAEKFSQR   |
| P63182 | Cerebellin 1                      | Cerebellin-1  | SGSAKVAFSAIRSTNH  |
| P63182 | Cerebellin-1                      |   | QNETEPIVLEGGKCLVVCDSNPTSDPTGTALGISVRSGLSAKVAFSAIRSTNHEPSEMSNRTMIYFDQVLVNIQNFDSERSTFIAPRKGISFNHVVVKVYNRQTIQVSLMLNGWPVISAFAGDQDVTREAAASNGVLIQMEKGDRAYLKLERGNLMGGWKYSTFSGLVFPL   |
| P98087 | Cerebellin-2                      | Cerebellin-2  | SGSAKVAFSAIRSTNH  |
| P98087 | Cerebellin-2                      |   | MPAPGRGPRGPLLSPGRRGALREPADFGSSGLAALLLLLLPACCPVKAQNDTEPIVLEGGKCLVVCDSPPSGDGAVTSSGLISVRSGLSAKVAFSAIRSTNHEPSEMSNRTMIYFDQVLVNIQNHFDLASSIFVAPRKGISFSFHVVKVYNRQTIQVSLMQNGYPVISAFAGDQDVTREAAASNGVLLLIMEREDKVHLKLERGNLMGGWKYSTFSGLVFPL  |
| P07808 | C-flanking peptide of NPY         | Neuropeptide Y  | SSPETLISDLLMRESTENAPRTRLEDPSMW  |
| P01355 | Cholecystokinin (precursor)       |   | AVLRPDSEPRARLGALLARYIQQVRKAPSGRMSVLK NLQGLDPSHRISDRDYMGWMDF   |
| P01355 | Cholecystokinin-12                | Cholecystokinin                                       | ISDRDYMGWMDF  |
| P01355 | Cholecystokinin-22                | Cholecystokinin                                       | NLQGLDPSHRISDRDYMGWMDF  |
| P01355 | Cholecystokinin-33                | Cholecystokinin                                       | KAPSGRMSVLK NLQGLDPSHRISDRDYMGWMDF  |
| P01355 | Cholecystokinin-39                | Cholecystokinin                                       | YIQQVRKAPSGRMSVLK NLQGLDPSHRISDRDYM GWMDF   |
| P01355 | Cholecystokinin-8                 | Cholecystokinin                                       | DYMGWMDF  |
| P10354 | Catestatin                        | Chromogranin-A  | RSMKLSFRARAYGFRDPGPQL   |
| P10354 | Chromogranin-A                    |   | LPVNSPMTKGDTKVMKCVLEVISDSLSPMPVSP ECLLETLQGDERVLSILRHQNLKELQDLALQGAKER AQQQQQQQQQQQQQQQQQQHSSFEDELSEVFE NQSPAAKHGDAASEAPSKDTVEKREDSKGGQDAF EGTTEGPRPQAFPEPKQESSMMGNSQSPGEDTANNT QSPTSLPSQEHGIPQTTEGSEGPSAQQQARKAKQEE KEEEEEEEEEEEEKEEKAIAREKAGPKEVPTAASSS HFYSGYKKIQKDDDGQESQA VNGKTGASEAVPSE GKGELEHSQQEEDGEEAMAGPPQGLFPGGKQELE RKQQEEEEEEERLSREWEDKRW SRMDQLAKELTAE KRLEGEDDPDRSMKLSFRARAYGFRDPGPQLRRGW RPSSREDSVEARGDFEEKKEEGS ANRRAEDQELESLSAIEAELEKVAHQALRRG |
| P55207 | CNP-22                            | C-type Natriuretic Peptide(CNP)                       | GLSKGCFGLKLDRIGSMSGLGC  |

|        |   |   |  |
|--------|---|---|--|
| P55207 | CNP-29  | C-type Natriuretic Peptide(CNP)                       | YKGGNKKGLSKGC FGLKLD RIGSMSGLGC  |
| P55207 | CNP-53  | C-type Natriuretic Peptide(CNP)                       | DLRVDTKSRAAWARLLHEHPNAR KYKGGNKKGLSKGCFGLKLD RIGSMSGLGC  |
| P49192 | Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein | Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein | QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKELPRRQLRAPGAVLQIEALQEV LKKLKS KRIPIYEKKY GQVPMCDAGEQCAVRK GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL |
| Q8BFS3 | Relaxin 3 connecting peptide                          | Relaxin-3   | ADILAH DPLGEFFADGEANTDHLASELDEAVGSSEWLALTKSPQVFY GGRSSWQSGSPGVVRGSR  |
| P01347 | Connecting peptide                                    | Prorelaxin H1   | SQEEPAPLARQATAEVVPSFINKDAEPFDMTLKCLPNLSEERKAALSEGRAPPELQOHAPALSDS VVSLEGFKKTFFHNQLGE AEDGGPELKYLGSDAQS     |
| P01186 | Copeptin  | Vasopressin-neurophysin 2-copeptin                    | AREQSNATQLDGPARELLRLVQLAGTQESVDSAKPRVY   |
| P01143 | Corticoliberin (peptide)                              | Corticoliberin  | SEEPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII   |
| P01194 | Corticotropin   | Pro-opiomelanocortin                                  | SYSMEHFRWGPVGGKRRPVKVYPNVAENESAEAFPLEF   |
| P01194 | Corticotropin-like intermediary peptide               | Pro-opiomelanocortin                                  | PVKVYPNVAENESAEAFPLEF  |
| Q62949 | Cortistatin-14  | Cortistatin   | PCKNFFWKTFSCK  |
| Q62949 | Cortistatin-29  | Cortistatin   | QERPPLQPPHRDKKPCKNFFWKTFSCK  |
| P27682 | C-terminal peptide 7B2                                | Neuroendocrine protein 7B2                            | SVPHFSEEEKEPE  |
| P06767 | C-terminal-flanking peptide protachykinin 1           | Protachykinin-1                                       | ALNSVAYERSAMQNYE   |
| P06300 | Dynorphin A(1-13)                                     | Proenkephalin-B                                       | YGGFLRRIRPKLK  |
| P06300 | Dynorphin A(1-17)                                     | Proenkephalin-B                                       | YGGFLRRIRPKLKWDNQ  |
| P06300 | Dynorphin A(1-8)                                      | Proenkephalin-B                                       | YGGFLRRI   |
| P06300 | Dynorphin B   | Proenkephalin-B                                       | YGGFLRRQFKVVT  |
| P06300 | Dynorphin-32  | Proenkephalin-B                                       | YGGFLRRIRPKLKWDNQKRYGGFLRRQFKVVT   |
| P01346 | E peptide IGF II                                      | Insulin-like growth factor II                         | RDVSTSQAVLPDDFPRYPVGGKFFKFDWRQSAGRLRRGLPALLRARRGRMLAKELEAFREAKRHRPLIVLPPK DPAHGGASSEMSNHQ                  |
| P08025 | E peptide IGF Ia                                      | Insulin-like growth factor IA                         | RSIRAQRHTDMPKTQKEVHLKNTSRGSAGNKTYRM  |
| P22388 | Endothelin-1 (peptide)                                | Endothelin-1  | CSCSSLM DKECVYFCHLDIIW   |
| P23943 | Endothelin-2 (peptide)                                | Endothelin-2  | CSCNSWLDKECVYFCHLDIIW  |
| P13207 | Endothelin-3 (peptide)                                | Endothelin-3  | CTCFTYK DKECVYYCHLDIIW   |
| P10683 | Galanin (peptide)                                     | Galanin   | GWTLNSAGYLLGPH AIDNHRFSFDKHGLT   |
| P10683 | Galanin message -associated peptide                   | Galanin   | ELPLEVEEGR LGSVA VLPESNIVRTIMEFLSFLHLKEAGALDSLPGIPLAT SSEDLQES   |
| P04563 | Gastrin (peptide)                                     | Gastrin   | QRPPMEEEEEAYGWMDF  |
| P24393 | Gastrin-releasing peptide                             | Gastrin-releasing peptide                             | APVSTGAGGGTVLAKM YPRGSHWAVGHLM   |
| Q9QYH7 | Ghrelin   | Appetite-regulating hormone                           | GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR   |
| P06883 | Glicentin   | Glucagon  | HAPQDTEENARSFPASQTEPLEDPDQINEDKRHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA                                      |
| P06883 | Glicentin-related polypeptide                         | Glucagon  | HAPQDTEENARSFPASQTEPLEDPDQINED   |
| P06883 | Glucagon (peptide)                                    | Glucagon  | HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT  |

|         |   |                               |  |
|---------|---|-------------------------------|--|
| P06883  | Glucagon-like peptide 1(7-37)           | Glucagon                      | HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG  |
| P06883  | Glucagon-like peptide 2                 | Glucagon                      | HADGSFSDEMNTILDNLATRDFINWLIQTKITD  |
| P07490  | Gonadoliberin-1 (peptide)               | Progonadoliberin-1            | QHWSYGLRPG   |
| P08025  | Insulin-like growth factor I (peptide)  | Insulin-like growth factor IA | GPETLCGAELVDALQFVC GPRGFYFNKPTGYGSSIR<br>RAPQTGIVDECCFRSCDLRRLLEYCAPLKPTKSA  |
| P01346  | Insulin-like growth factor II (peptide) | Insulin-like growth factor II | AYRPSETLCGGELVDTLQFVCSDRGFYFSRPSSRANR<br>RSRGIVECCFRSCDLALLETYCATPAKSE   |
| P61312  | Intermedin-short                        | ADM2                          | VGCVLGTQVQNLSHRLWQLVRPSGRRDSAPVDPSS<br>PHSY  |
| P01283  | Intestinal peptide PHI-27               | VIP peptides                  | HADGVFTSDYSRLLGQISAKKYLESLI  |
| P01283  | Intestinal peptide PHI-42               | VIP peptides                  | HADGVFTSDYSRLLGQISAKKYLESLIGKRISSESD<br>PVPV   |
| P12969  | Islet amyloid polypeptide               | Islet amyloid polypeptide     | KCNTATCATQRLANFLVRSSNNGPVLPTNVGSNTY  |
| Q7TSB7  | Kisspeptin-10                           | Metastasis-suppressor KiSS-1  | YNWNSFGLR Y  |
| P20068  | Large neuromedin N (précurseur)         | Neurotensin/neuromedin N      | SDSEEDVRALEADLLTNMHASKVSKGSPPSWKMTL<br>LNVCSLNNLNSAAEEAGEMRDDDLVAKRKLPLVL<br>DDFSLEALLTVFQLQKICRSRAFQHWEIFQEDILDHG<br>NEKTEKEEVIKRKIPYIL   |
| P04094  | Leu-enkephalin A                        | Proenkephalin-A               | YGGFL  |
| P06300  | Leu-enkephalin B                        | Proenkephalin-B               | YGGFLRRQFKVVTRSQENPNTYSEDLDV   |
| P01194  | Lipotropin beta                         | Pro-opiomelanocortin          | ELEGEQPDGLEQVLEPDTEKADGPYRVEHFRWGNP<br>PKDKRYGGFMTSEKSTPLVTLFKNAIKNVHKKGQ  |
| P01194  | Lipotropin gamma                        | Pro-opiomelanocortin          | ELEGEQPDGLEQVLEPDTEKADGPYRVEHFRWGNP<br>PKD   |
| P14200  | Melanin-Concentrating Hormone(MCH)      | Pro-MCH                       | DFDMLRCMLGRVYRPCWQV  |
| P01194  | Melanotropin alpha                      | Pro-opiomelanocortin          | SYSMEHFRWGKPV  |
| P01194  | Melanotropin beta                       | Pro-opiomelanocortin          | ADGPYRVEHFRWGNPKD  |
| P01194  | Melanotropin gamma                      | Pro-opiomelanocortin          | YVMGHFRWDRF  |
| Q7TSB7  | Metastasis-suppressor KiSS-1            |                               | EPLAKMAPVVNPEPTGQQSGPQELVNAWQKGPRYA<br>ESKPGAAGLRARRTSPCPPVENPTGHQRPPCATRSRL<br>IPAPRGSVLVQREKDMSAYNWNSFGLRYGRRQVAR<br>AARG  |
| Q7TSB7  | Metastin                                | Metastasis-suppressor KiSS-1  | TSPCPPVENPTGHQRPPCATRSRLIPAPRGSVLVQR<br>EKDMSAYNWNSFGLRY   |
| P04094  | Met-enkephalin                          | Proenkephalin-A               | YGGFM  |
| Sp13205 | Natriuretic peptides 45                 | Natriuretic peptides B        | SQDSAFRIQERLRNSKMAHSSSCFGQKIDRIGAVSR<br>LGCDGLRLF  |
| Sp13205 | Natriuretic peptides B                  | Natriuretic peptides B        | HPLGSPQSPEQSTMQKLELIREKSEEMAQRQLS<br>KDQGPTKELLKRVLRSQDSAFRIQERLRNSKMAH<br>SSSCFGQKIDRIGAVSRLGCDGLRLF  |
| P27682  | Neuroendocrine protein 7B2 (précurseur) | Neuroendocrine protein 7B2    | YSPRTPDRVSETDIQRLLHGVMQLGIARPRVEYP<br>AHQAMNLVGPQSIEGGAHEGLQHLGPFGNIPNIVA<br>ELTGDNIKDFSEDQGYPDPPNPCPLGKTADDGCL<br>ENAPDTAEFSREFQLDQHLFDPEHDYPGLGKWNK<br>KLLYEKMKGGQRRKRRSVNPYLQGKRLDNVVAK<br>KSVPHFSEEEKEPE |
| P06767  | Neurokinin A                            | Protachykinin-1               | HKTDSFVGLM   |
| P20068  | Neuromedin N (peptide)                  | Neurotensin/neuromedin N      | KIPYIL   |

|        |                                       |                                    |   |
|--------|---------------------------------------|------------------------------------|---|
| P24393 | Neuromedin-C                          | Gastrin-releasing peptide          | GSHWAVGHLM  |
| Q5H8A2 | Neuromedin-S                          | Neuromedin-S                       | LPRLHHTDSRMTIDFPKDPPTTSLGRPFLLFRPRN   |
| P12760 | Neuromedin-U-23                       | Neuromedin-U                       | YKVNEYQGPVAPSGGFFLFRPRN   |
| Q62923 | Nocistatin                            | Nociceptin                         | MPRVRSVVQARDAEPEADAEPVADEADEVEQKQLQ   |
| Q62923 | Orphanin fq 2                         | Nociceptin                         | FSEFMRQYLVLSMQSSQ   |
| Q9WVA9 | Neuropeptide AF                       | FMRamide-related peptides FF       | EFWSLAAPQRF   |
| Q8K4P2 | Neuropeptide B-29                     | Neuropeptide B                     | WYKPAAGSHHYSVGRAAGLLSSFHRFPST   |
| Q9WVA9 | Neuropeptide FF                       | FMRamide-related peptides FF       | FLFQPQRF  |
| P06767 | Neuropeptide gamma                    | Protachykinin-1                    | DAGHGQISHKRHKTDSEVGLM   |
| P06767 | Neuropeptide K                        | Protachykinin-1                    | DADSSIEKQVALKALYGHGQISHKRHKTDSEVGLM   |
| Q9WVA9 | Neuropeptide SF                       | FMRamide-related peptides          | NPAFLFQPQRF   |
| Q8K1M5 | Neuropeptide W-23                     | Neuropeptide W                     | WYKHVASPRYHTVGRASGLLMGL   |
| Q8K1M5 | Neuropeptide W-30                     | Neuropeptide W                     | WYKHVASPRYHTVGRASGLLMGLRRSPYLW  |
| P07808 | Neuropeptide Y                        | Neuropeptide Y                     | YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY  |
| P14200 | Neuropeptide-glutamic acid-isoleucine | Pro-MCH                            | EIGDEENSAKFPI   |
| P14200 | Neuropeptide-glycine -glutamic acid   | Pro-MCH                            | GPAVFPAENGVQNTESTQE   |
| P01186 | Neurophysin 2                         | Vasopressin-neurophysin 2-copeptin | ATSDMELRQCLPCGPGGKGRFCGSPICCADELGCF LGTAEALRCQEENYLPSPCQSGQKPCGSGGRC AAA GICCSDESCVAEPECREGFFRLT  |
| P01179 | Neurophysin 1                         | Oxytocin-neurophysin 1             | AALDLDMRKCLPCGPGGKGRFCGSPICCADELGCF VGTAEALRCQEENYLPSPCQSGQKPCGSGGRCATA GICCSPDGCRTPACDPESAFSER   |
| P20156 | Neurosecretory protein VGF            |                                    | APPGRSDVYPPPLGSEHNQVAEDA VSRPKDDSVPEVRAARNSEPDQDQELFQGVDPRALAAVLLQALDRPASPPAVPAGSQGTPEEAAEALLTESVRSQTHSLPASEIQASAVAPPRPQTQDNDPEADDRSEELEALASLLQELRDFSPSNAKRQQETAAAE TETRHTLTRVNLLESPGPERVWRASWGEFQARVPERAPLPPSVSQFQARMSENVPLPEHQFGEVSSPKTHLGETLTPLSKAYQQLSAPFPKVRRLGSLGGSEAGERLLQQGLAQVEAGRRQAEATRQA AQEERLADLASDLLLYLLQGGARQRDLGGRGLQETQQERENEREEEAEQERRGGGEDEVGEEDEEAAEAEAEAEAEERARQNAL LFAEEEDGEAGAE DKRSQEEAPGHRRKDAEGTEE GGEEDDDDEEMDPQTIDSLIELSTKLHLPADDVVISIEEVEEKRRKKNAPPEPVPPPRAAPATHVRSPQPPAPARDELPDWNE VLPWDREDE VFPPGYPHPF PNYIRPRTLQPPASSRRRHFFHALPPARHHPDLEAQARRAQEEADAERRLQEQEELENYIEHVLLHRP |
| P20068 | Neurotensin                           |                                    | SDSEEDVRALEADLLTNMHASKVSKGSPSWKMTLLNVCSLINLNSAAEEAGEMRDDDLVAKRKLPLVLDDFSLEALLTVFQLQKICRSRAFQHWIIEQEDILDHGNEKTEKEEVIKRKIPYILKRQLYENKPRRPYILKRASYYY   |
| P20068 | Neurotensin                           | Neurotensin/neuromedin N           | QLYENKPRRPYIL   |
| Q62923 | Nociceptin                            | Nociceptin                         | FGGFTGARKSARKLANQ   |
| P06883 | Glucagon-like peptide 1               | Glucagon                           | HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG   |
| P06883 | Glucagon-like peptide 1(7-36)         | Glucagon                           | HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR  |

|        |   |   |   |
|--------|---|---|---|
| P01194 | NPP   | Pro-opiomelanocortin  | WCLESSQCQDLTTESNLLACIRACRLDLSAETPVFP<br>GNGDEQPLTENPRKYVMGHFRWDRFGPRNSSSAG<br>GSAQ  |
| P27682 | N-terminal peptide 7B2                                      | Neuroendocrine protein<br>7B2                               | YSPRTPDRVSETDIQRLLHGVMELGIARPRVEYP<br>AHQAMNLVGPQSIEGGAHEGLQHLGPFGNIPNIVA<br>ELTGDNIPKDFSEDQGYPDPPNPCPLGKTADDGCL<br>ENAPDTAEFSREFQLDQHLFDPEHDYPGLGKWNK<br>KLLYEKMKGGQRR   |
| Q9JI85 | Nucleobindin-2  |   | VPIDVDKTKVHNVEPVESARIEPPDTGLYYDEYLK<br>QVIEVLETDPHFREKLQKADIEEIRSGRLSQELDLV<br>SHKVRTRLDELKRQEVGRRLMLIKAKLDALQDTG<br>MNHLLKQFEHLNHQNPDTFESKDLMLIKAAT<br>ADLEQYDRTRHEEFKKE YEMMKEHERREYLKTLSE<br>EKREKFAEMKRKHEDHPKVNHPGSKDQLK<br>EVWEETDGLDPNDFDPKTFKLHDVNNDGFLDEQ<br>ELEALFTKELDKVYNPQNAEDDMIEMEEERLMR<br>EHVMNEIDNNKDRLVTLEEFLRATKKEFLEPDSW<br>ETLDQQQLFTEELKEYESI IAIQESLKKKADLQ<br>QKKEELQRQHDHLEAKQEQYQAVQQLKQKQ<br>QGIAPSGPAGELKFEFHT |
| Q9JI85 | Nucleobindin-2 peptide 1                                    | Nucleobindin-2  | DVNNDGFLDEQE  |
| Q9JI85 | Nucleobindin-2 peptide 2                                    | Nucleobindin-2  | DNNKDRLVTLEE  |
| Q9QYH7 | Obestatin-13  | Appetite-regulating<br>hormone                              | LSGAQYQQHGRAL   |
| Q9QYH7 | Obestatin-23  | Appetite-regulating<br>hormone                              | FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRAL   |
| P11030 | Octadecaneuropeptide  | Diazepam-binding<br>inhibitor                               | QATVGDVNTDRPGLLDLK  |
| O55232 | Orexin-A  | Orexin  | QPLPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL   |
| O55232 | Orexin-B  | Orexin  | RPGPPGLQGRLQRLLQANGNHAAGILTM  |
| P13085 | Osteostatin   | Parathyroid hormone<br>-related protein                     | TRSAWPGTTGSGLLEDPQPHTSPTSTSLPSSR  |
| P06883 | Oxyntomodulin   | Glucagon  | HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNR<br>NNIA   |
| P01179 | Oxytocin  | Oxytocin-neurophysin 1                                      | CYIQNCPLG   |
| P13589 | PACAP-related peptide                                       | Pituitary adenylate<br>cyclase-activating<br>polypeptide 38 | DVAHEILNEAYRKVLDQLSARKYLQSMVARGMG<br>ENLAAAAVDDRAPLT  |
| P10354 | Pancreastatin   | Chromogranin-A  | DDDGQSESQAVNGKTGASEAVPSEGKGELEHSQQ<br>EEDGEEAMAGPPQGLFPG  |
| P06303 | Pancreatic prohormone<br>c-ter peptide                      | Pancreatic prohormone                                       | DEDTAGLPGRQLPPCTSLLVGLMPCAAARS  |
| P06303 | Pancreatic hormone  | Pancreatic prohormone                                       | APLEPMYPGDYATHEQR AQYETQLRRYINTLTRPRY<br>AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAEI<br>RATSEVSPNSKPAPNTKNHPVRFSGSDDEGRYLTQE<br>TNKVETYKEQPLKTPGKKGKPGKRREQEKKKR<br>RTRSAWPGTTGSGLLEDPQPHTSPTSTSLPSSRTH  |
| P10631 | Peptide YY  | Peptide YY  | YPAKPEAPGEDASPEELSRYYASLRHYLNLVTRQRY  |
| P13589 | Pituitary adenylate<br>cyclase-activating<br>polypeptide 27 | Pituitary adenylate<br>cyclase-activating<br>polypeptide 38 | HSDGIFTDSYSRYRQMAVKKYLA AVL   |
| P13589 | Pituitary adenylate<br>cyclase-activating<br>polypeptide 38 | Pituitary adenylate<br>cyclase-activating<br>polypeptide 38 | HSDGIFTDSYSRYRQMAVKKYLA AVLGKRYKQ<br>RVKNK  |

|        |   |                               |  |
|--------|---|-------------------------------|--|
| P43145 | PreproAM C-terminal fragment            | ADM                           | RSLPEVLRARTVESSQEQTHTSAPASPAHQDISRVSRL   |
| P01346 | Preptin                                 | Insulin-like growth factor II | DVSTSQAVLPDDFPRYPVVGKFFKFDTWRQSAGRL  |
| P43145 | Proadrenomedullin N-20 terminal peptide | ADM                           | ARLDTSSQFRKKWNKVALSR   |
| P07490 | Progonadoliberin-1                      | Progonadoliberin-1            | QHWSYGLRPGGKRNTEHLVDSFQEMGKEEDQMAEPQNFECTVHWPRSPRLDLR GALERLIEEEEAGQKKM  |
| P07490 | Prolactin release-inhibiting factor 1   | Progonadoliberin-1            | NTEHLVESFQEMGKEVDQMAEPQHFECTVHWPRSPRLDLRGALES LIEEEEARQK KM  |
| P81278 | Prolactin-releasing peptide PrRP20      | Prolactin-releasing peptide   | TPDINPAWYTGRGIRPVGRF   |
| P81278 | Prolactin-releasing peptide PrRP31      | Prolactin-releasing peptide   | SRAHQHSMETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF  |
| P14200 | Pro-MCH                                 | Pro-MCH                       | ILLSASKSIRNVEDDIVNTFRMGKAFQKEDTAERSVVAPSLEGYKNDESGFMKDDDDKTTKNTGSKQNLVTHGLPLSLAVKPYLALKGPAVFP AENG VQNTTESTQEKREIGDEENS AKFPIGRDFDMLRCMLGRVYR PCWQV  |
| P83860 | Orexigenic neuropeptide QRFP            | Orexigenic neuropeptide QRFP  | FPLDRRGPTDIGDIG ARMSWVQLTEGHTPRSVQSPRPQALLVVAKEQQASRREHTGFRLGRQDSGSEATGFLPTDSEKASGPLGTLAEELSSYSRRKGGFSFRFGR  |
| P83860 | QRF-amide                               | Orexigenic neuropeptide QRFP  | QDSGSEATGFLPTDSEKASGPLGTLAEELSSYSRRKGGFSFRF  |
| P01347 | Relaxin A chain                         | Prorelaxin H1                 | QSGALLSEQCCHIGCTRRSIAKLC   |
| P01347 | Relaxin B chain                         | Prorelaxin H1                 | RVSEEWMDQVIQVCGRGYARAWIEVCGASVGR LAL   |
| Q8BFS3 | Relaxin-3 A chain                       | Relaxin-3                     | DVLAGLSSSCCEWGC SKSQISSLC  |
| Q8BFS3 | Relaxin-3 B chain                       | Relaxin-3                     | RPAPYGVKLCGREFIRAVIFTCGGSRW  |
| P11384 | Secretin                                | Secretin                      | FVLPAPRTPRHSDGTFTSELSRLQDSARLQRL LQG LVGKRSEEDTENIPENSVARPKPLEDQLCLLWSNTQALQDWLLPRLSLDGLSLWLP PGP RP AVDHSEWTE TRQPR   |
| P11384 | Secretin                                | Secretin                      | HSDGTFTSELSRLQDSARLQRL LQGLV   |
| O35314 | Secretogranin-1                         |                               | APVDNRDHNEEMVTRCIEVLSNALS KSSAPTITPECRQVLRKSGKEVKGEEKGENENSKFEVRLLRDPSDASVGRWASSREETGAPVEDSPGQAKVDNEEW TG GGGHSREAVDDQESLHPSNQVSKEAKIRHSEERG GKEEEEEEGKIYPKGEHRGDAGEEKKHTEESGEKHNAFSNKRSEASAKKKEESVARAE AHFVELEKTHSREQSSQESGEE TRRQE KPQELPDQDQSEEESEE GEEGEGATSEVT KRRPRHHHWRSQSNKPSYEGRRPLS EERKHAAGESKDANVATANLGEKRGHHLAHYRA S EEEPDYGEELRSYPGFQAPQGLQYQGRGSEEVRA P SPRSEESQEKEYKR NHPDSELESTANRHSEETEEE RSYEGAKGRQHRGRGREPGAYPALDSRQEKRLLED EGHDPVHESVDTAKRYPQSKWQE QEKNYLN YDEEGDQGRWWQ QEEQLEPEESREEVSFPDRQYAPYPTTEKRKRLGALFNPFYFDPLQWKN SDFEKKGNPDDSFLDDDGEDGNGVTMTEKNFFPEYNYD W WEKRFSEEDVNWGYEKRSFARAPHLDLKRQYDDGVAELDQLLHYRKKAAEFDFYDSEE QMGPHQEADEKDRADQRVLT EEEKKELENLAAMDLELQKIAEKFSQRG |

|        |                               |                        |  |
|--------|-------------------------------|------------------------|--|
| P47868 | Secretogranin-3               |                        | FPKPEGSQDKSLHNRELSAERPLNEQIAEAEADKIK<br>KTYPSESKPSESNFSSVDNLNLLKAITEKETVEKAKQ<br>SIRSSPFDNRLNVDDADSTKNRKLTDYDSTKSGL<br>DRKVQDDPDGLHQLDGTPLTAEDIVHKIATRIYEE<br>NDRGVFDKIVSKLLNLGLITESQAHTLEDEVAEAL<br>QKLISKEANNYEEAPEKPTSRTENQDGKIPEKVTPV<br>AATQDGFTNRENDTVSNTLTLNGLERRNPHR<br>DDDFEELQYFPNFYALLTSIDSEKEAKEKETLITIMK<br>TLIDFVKMMVKYGTISPEEGVSYLENLDETIALQT<br>KNKLEKNTTDSKSKLFPAPPEKSHEETDSTKEEAA<br>KMEKEYGSLKDSTKDDNSNLGGKTDEAKGKTEAY<br>LEAIRKNIEWLKKHNKKGNKEDYDLKMRDFINQ<br>QADAYVEKGILDKEEANAIRIYSSL  |
| P10362 | Secretoneurin                 | Secretogranin-2        | TNEIVVEEQYTPQSLATLESVFQELGKLTGPSNQ   |
| P10362 | Manserin                      | Secretogranin-2        | VSPGSSDDLQEEEQLEQAIKEHLGQGSSQEMEK<br>LAKVS   |
| P10362 | Secretoneurin-2               |                        | QRNQLLQKEPDLRLLENVQKFPSPMIRALEYIEKL<br>RQQAARESSPDYNPYQGISVPLQLKENGEESHAE<br>SSRDVLESEDEWMRIILEALRQAENPPSALKENKPY<br>ALNLEKNFPVDTDDYETQQWPERKLKHMRFPLM<br>YEENSRENPFKRTNEIVEEQYTPQSLATLESVFQEL<br>GKLTGPSNQKRERVDEEQKLYTDEDDVYKTNNI<br>AYEDVVGEDWSPMEEKIETQTQEEVRDSKENTE<br>KNEQINEEMKRSGHLGLPDEGNRKESKDQLSEDA<br>SKVITYLRRLVNAVSGRSQSGQNGDR AARLLERP<br>LDSQSIYQLIEISRNLIQPPEDLIEMLKAGEKPNGLV<br>EPEQDLELAVDLDDIPEADIDRPFQSKTSLKGG<br>YPKAPGRGMMEALPDGLSVEDILNVLGMENVANQ<br>KSPYFPNQYSRDKALLRLPYGPGKSRANQIPKVAW<br>IPDVESRQAPYDNLNDKDQELGEYLARMLVKYPE<br>LMNTNQLKR VSPGSSDDLQEEEQLEQAIKEHLG<br>QGSSQEMEKLAKVSKRIPAGSLKNEPTPNRQYLD<br>EDMLLKVLEYLNQEQAEGREHLAKRAMENM |
| P09916 | Somatoliberein                | Somatoliberein         | HADAIFTSSYRRILGQLYAR KLLHEIMNRQQGERN<br>QEQRSRFN   |
| P60042 | Somatostatin-14               | Somatostatin           | AGCKNFFWKTFTSC   |
| P60042 | Somatostatin-28               | Somatostatin           | SANSNPAMAPRERKAGCKNFFWKTFTSC   |
| P06767 | Substance P                   | Protachykinin-1        | RPKPQQFFGLM  |
| P20068 | Tail peptide                  | Neurotensin/neuromedin | ASYYY  |
| P11030 | Triakontatetra neuroP         | DBI                    | TQPTDEEMLFYSHFKQATVGDVNTDRPGLLDLK  |
| P55090 | Urocortin                     | Urocortin              | DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIF<br>DSV   |
| Q91WW1 | Urocortin-2                   | Urocortin-2            | VILSLDVPIGLLRILLEQARNKAARNQAATNAQILARV   |
| Q9QZ4  | Urotensin-2                   | Urotensin-2            | QHGTAPECFWKYCI   |
| Q76512 | Urotensin-2B                  | Urotensin-2B           | ACFWKYCV   |
| P01283 | Vasoactive intestinal peptide | VIP peptides           | HSDAVFTDNYTRLRQMAVKKYLSILN   |
| P10354 | WE-14                         | Chromogranin-A         | WSRMDQLAKELTAE   |
| P20068 | Tail peptide                  | Neurotensin/neuromedin | ASYYY  |
| P11030 | Triakontatetra neuroP         | DBI                    | TQPTDEEMLFYSHFKQATVGDVNTDRPGLLDLK  |
| P55090 | Urocortin                     | Urocortin              | DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIF<br>DSV   |
| Q91WW1 | Urocortin-2                   | Urocortin-2            | VILSLDVPIGLLRILLEQARNKAARNQAATNAQILARV   |
| Q9QZ4  | Urotensin-2                   | Urotensin-2            | QHGTAPECFWKYCI   |
| Q76512 | Urotensin-2B                  | Urotensin-2B           | ACFWKYCV   |
| P01283 | VIP                           | VIP peptides           | HSDAVFTDNYTRLRQMAVKKYLSILN   |
| P10354 | WE-14                         | Chromogranin-A         | WSRMDQLAKELTAE   |

**Tab. S2: Proteomics study of the cerebellar peptidome**

| Name                                 | Uniprot access number | Sequence   | m/z            | PTM                 | Appearance |     |     |     | Identification score |      |      |              |
|--------------------------------------|-----------------------|--|----------------|---------------------|------------|-----|-----|-----|----------------------|------|------|--------------|
|                                      |                       |  |                |                     | P8         | P16 | P21 | P90 | P8                   | P16  | P21  | P90          |
| [des-Ser1]-cerebellin                | P63182                | GS AKVAFSA<br>IRSTNH   | 1544.80<br>594 | n                   | 10         | 10  | 10  | 10  | 17.5                 | 15.3 | 16.5 | 14.2         |
| Cerebellin-1                         | P63182                | SGSAKVAFS<br>AIRSTNH   | 1631.83<br>797 | n; m; k;<br>t       | 10         | 10  | 10  | 10  | 19.8                 | 16.8 | 16.5 | 15.6         |
| Cerebellin-2                         | P98087                | SGSAKVAFS<br>ATRSTNH   | 1619.80<br>159 | m                   | 10         | 9   | 10  | 10  | 14.6                 | 13.9 | 14.8 | 13.3         |
| Cg A[377-391]                        | P10354                | (R)LEGEDDP<br>DRSMKLSF(<br>R)  | 1737.78<br>797 | none                | 6          | 3   | 10  | 3   | 13.1                 | 12.4 | 16.8 | 14.512.<br>9 |
| Cg A[395-405]                        | P10354                | (R)AYGFRDP<br>GPQL(R)  | 1219.59<br>858 | none                | 7          | 10  | 7   | 5   | 13                   | 14.7 | 15.9 | 18.4         |
| CNP-53                               | P55207                | DLRVDTKSR<br>AAWARLLH<br>EHPNARKYK<br>GGNKKGLS<br>KGCFLKLD<br>RIGSMSGLG<br>C | 5795.06<br>753 | n; k; y;<br>m; c; s | 5          | 8   | 7   | 9   | 10                   | 11.4 | 11.3 | 11.2         |
| Islet amyloid polypeptide            | P12969                | KCNTATCAT<br>QRLANFLVR<br>SSNNLGPVL<br>PPTNVGSNT<br>Y                        | 4035.98<br>95  | q; n; s             | 7          | 10  | 8   | 6   | 18.2                 | 10.8 | 10.5 | 13           |
| Neuro endocrine regulatory peptide 1 | P20156                | LEGSFLGGS<br>EAGERLLQQ<br>GLAQVEA  | 2558.29<br>765 | none                | 10         | 6   | 9   | 3   | 17.6                 | 18.2 | 16.9 | 13.8         |
| Neuro peptide k                      | P06767                | DADSSIEKQ<br>VALLKALYG<br>HGQISHKRH<br>KTDSFVGLM                             | 3979.07<br>382 | k; y                | 7          | 2   | 5   | 2   | 15.8                 | 13.5 | 11.9 | 10.6         |
| Nociceptin                           | Q62923                | FGGFTGARK<br>SARKLANQ  | 1807.98<br>055 | none                | 9          | 8   | 8   | 0   | 12.9                 | 15   | 12.5 | ND           |



|                        |        |  |                |               |    |    |    |    |      |      |      |      |
|------------------------|--------|--|----------------|---------------|----|----|----|----|------|------|------|------|
| Octadeca neuro peptide | P11030 | QATVGDVN<br>TDRPGLLDL<br>K   | 1583.81<br>551 | none          | 8  | 8  | 10 | 10 | 14.3 | 17.9 | 16.1 | 14.4 |
| PACAP-related peptide  | P13589 | DVAHEILNE<br>AYRKVLDQ<br>LSARKYLQS<br>MVARGMGE<br>NLAAAAMD<br>DRAPLT | 5268.71<br>36  | q; m; s;<br>n | 10 | 10 | 10 | 10 | 14.2 | 12.9 | 16.3 | 14.6 |
| Sg1 [304-321]          | O35314 | (K)HAAGESK<br>DANVATAN<br>LGE(K)                                     | 1753.82<br>311 | none          | 4  | 4  | 7  | 10 | 11.6 | 12.8 | 17.5 | 15.5 |
| Sg1 [372-380]          | O35314 | (R)SEESQEK<br>EY(K)  | 1127.46<br>187 | none          | 5  | 10 | 7  | 9  | 14.3 | 13.6 | 14   | 16.7 |
| Sg1 [416-432]          | O35314 | (R)GRGREPG<br>AYPALDSRQ<br>E(K)                                      | 1857.90<br>818 | none          | 9  | 10 | 10 | 10 | 19   | 17   | 15.7 | 12.5 |
| Sg1 [435-451]          | O35314 | (R)LLDEGHD<br>PVHESPVDT<br>A(K)                                      | 1829.84<br>318 | none          | 9  | 10 | 10 | 10 | 20.6 | 15.4 | 16.1 | 14.7 |
| Sg1 [512-532]          | O35314 | (R)LGALFNP<br>YFDPLQWK<br>NSDFE(K)                                   | 2400.14<br>266 | none          | 10 | 10 | 10 | 10 | 17.8 | 15.5 | 13.6 | 15.3 |
| Sg1 [585-594]          | O35314 | (R)SFARAPH<br>LDL(K)   | 1125.59<br>31  | none          | 10 | 9  | 8  | 10 | 16.9 | 13.5 | 15.4 | 13.5 |
| Sg1 [597-611]          | O35314 | (R)QYDDGV<br>AELDQLLHY<br>(R)  | 1486.69<br>399 | q             | 10 | 10 | 10 | 10 | 13.6 | 13.6 | 15.5 | 15.7 |
| Sg2 [571-583]          | P10362 | (R)IPAGSLK<br>NEDTPN(R)  | 1354.67<br>286 | n             | 10 | 10 | 10 | 10 | 15.4 | 17.7 | 17   | 13.7 |
| Sg2 [599-612]          | P10362 | (E)YLNQEQA<br>EQGREHLA(<br>K)  | 1784.84<br>418 | none          | 5  | 10 | 8  | 5  | 14.9 | 16.3 | 17.5 | 10.5 |
| Sg3 [12-26]            | P47868 | (R)FPKPEGS<br>QDKSLHN(R)   | 1582.77<br>398 | none          | 8  | 7  | 9  | 7  | 16.6 | 17.1 | 13.7 | 11.5 |
| Sg3 [38-57]            | P47868 | (R)ELSAERP<br>LNEQIAEAE<br>ADKI(K)                                   | 2225.11<br>756 | none          | 38 | 7  | 7  | 8  | 19   | 18.3 | 17.6 | 11.4 |
| Secreto neurin-2       | P10362 | ATLESVFQE<br>LGKLTGPSN<br>Q  | 2018.03<br>204 | n             | 7  | 7  | 8  | 4  | 16.2 | 18.4 | 14.5 | 13.4 |
| Somatostatin -14       | P60042 | AGCKNFFW<br>KTFTSC   | 1638.73<br>231 | none          | 7  | 3  | 1  | 0  | 15.9 | 13.2 | 14.5 | ND   |

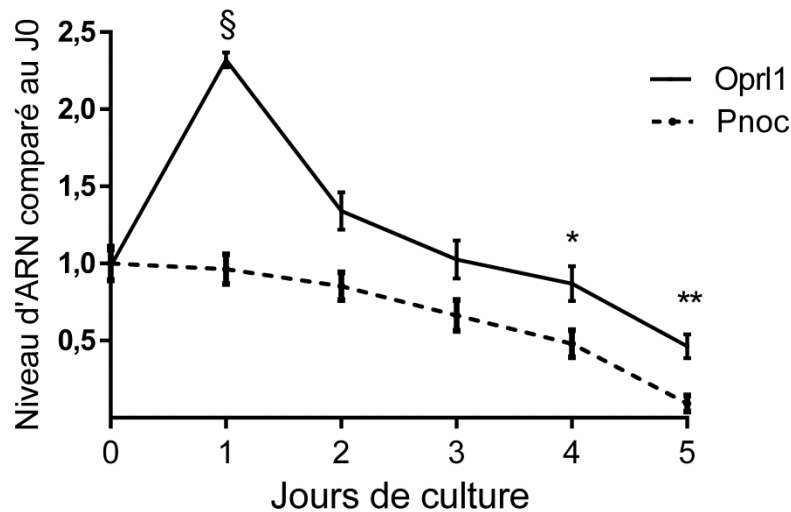
|                 |        |   |                |         |    |    |    |    |      |      |      |      |
|-----------------|--------|---|----------------|---------|----|----|----|----|------|------|------|------|
| Somatostatin-28 | P60042 | SANSNPAMA<br>PRERKAGCK<br>NFFWKTFTS<br>C                    | 1243.56<br>154 | n; c; m | 10 | 10 | 10 | 10 | 13   | 16.3 | 13   | 13.5 |
| VGF [180-209]   | P20156 | (R)qQETAAA<br>ETETRTHTL<br>TRVNLESPG<br>PERVW(R)            | 3406.68<br>657 | q       | 7  | 10 | 10 | 10 | 15.3 | 11.7 | 16.8 | 13   |
| VGF [220-235]   | P20156 | (R)VPERAPL<br>PPSVPSQFQ(A)                                  | 1747.92<br>572 | none    | 10 | 6  | 10 | 10 | 14.9 | 12.5 | 16.5 | 13.7 |
| VGF [348-372]   | P20156 | (R)DLGGRGL<br>QETQGEREN<br>EREEAEQE(R)                      | 2958.31<br>874 | none    | 7  | 3  | 2  | 5  | 16.8 | 15.3 | 10.9 | 15   |
| VGF [353-372]   | P20156 | (R)GLQETQQ<br>ERENERE<br>AEQE (R)                           | 2460.06<br>369 | n       | 7  | 7  | 10 | 7  | 17.3 | 16.4 | 17.4 | 16   |
| VGF [488-507]   | P20156 | (K)NAPPEPV<br>PPRAAPAPT<br>HV(R)                            | 1914.01<br>119 | n; k; t | 10 | 10 | 10 | 10 | 15.4 | 14.4 | 12.4 | 16.8 |
| VGF [24-63]     | P20156 | (R)APPGRSD<br>VYPPPLGSE<br>HNGQVAED<br>AVSRPKDDS<br>VPEV(R) | 3867.86<br>639 | n       | 10 | 10 | 10 | 10 | 19.6 | 15.9 | 16.6 | 13.7 |
| WE-14           | P10354 | WSRMDQLA<br>KELTAE  | 1747.85<br>633 | none    | 10 | 9  | 10 | 9  | 16.1 | 17   | 16.8 | 12.9 |

Tab. S2 Proteomics study of the rat cerebellar peptidome. 33 peptides were found expressed in, at least, 7 out of the 10 samples in one or several developmental stages. Peptide abbreviations: Cg A: chromogranin A; CNP: c-type natriuretic peptide; SG: secretogranin; VGF: non-acronymic; WE-14: first and last amino acid of a 14 amino acids long peptide. In the sequences, red amino acids were identified with MS/MS data while black amino acids were not identified; (X): predicted previous or next amino acids for peptides not yet described. Post traductional modifications (PTM): c: cysteine sulfoxide; k: acetylated lysine; m: oxidized methionin; n: deaminated; q: pyroglutamic acid; s: phosphorylated S; t: phosphorylated T; y: phosphorylated Y.

## 1.2. Résultats complémentaires à l'article

### 1.2.1. Cinétique d'expression de la nociceptine et de son récepteur par les cellules du cervelet en culture

La mesure de l'expression des gènes de la nociceptine et de son récepteur dans des cultures de NGC montre que le gène du peptide est exprimé de façon constante entre l'ensemencement des cellules et le troisième jour de culture. Son expression diminue ensuite de moitié au quatrième jour puis disparaît presque totalement au cinquième jour (Fig. 13). Le récepteur, quant à lui, connaît un pic d'expression après 24 h de culture (+ 132% ; Fig. 13) avant de revenir à son niveau basal dès le troisième jour. L'expression diminue ensuite jusqu'au cinquième jour (- 54%, non-significatif).

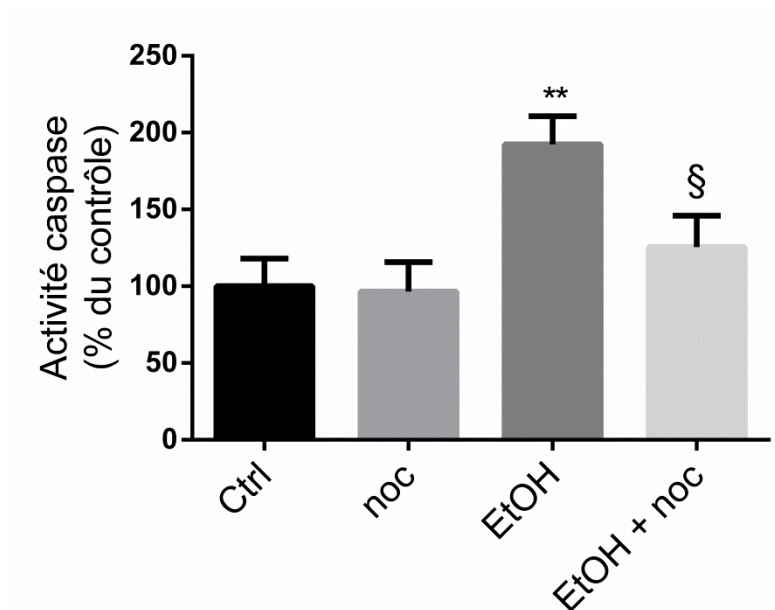


**Figure 13 : Expression du gène de la nociceptine et de son récepteur dans des neurones en grain du cervelet en culture.** Chaque valeur est la moyenne ( $\pm$ SEM) de 4 cultures indépendantes analysées chacune en 3 réplicats techniques. La significativité a été examinée grâce à un test de Kruskal-Wallis suivi par des comparaisons de Dunn. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  versus Pnoc à J0 ; §  $P < 0,05$  versus Oprl1 à J0. Pnoc : gène de la nociceptine ; Oprl1 : gène du récepteur de la nociceptine.

L'expression de ces 2 gènes a également été mesurée dans des cultures d'astrocytes après 9 jours de culture. Le gène de la nociceptine apparaît peu exprimé par ces cellules (19,6% par rapport aux NGC à J0) et celui du récepteur n'est retrouvé que de façon très résiduelle (1,5% par rapport aux NGC à J0).

### 1.2.2. Etude de l'effet de la nociceptine dans le cervelet en développement *in vivo* chez le rat

Afin de déterminer si l'effet neuroprotecteur de la nociceptine observé *in vitro* pouvait aussi être retrouvé *in vivo*, nous avons utilisé un modèle de neurotoxicité induite par l'alcool développé précédemment par l'équipe (Botia *et al.* 2011). L'injection intra-péritonéale d'éthanol ( $2 \times 2,5$  g/kg) *in vivo* provoque une forte augmentation de l'activité caspase-3/7 chez les rats 6 heures après la première injection (+92% par rapport aux animaux contrôles ; Fig. 14). L'administration de nociceptine par voie intracisternale ( $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ) permet de réduire de 67% l'activité caspase-3/7 chez les animaux alcoolisés (Fig. 14).



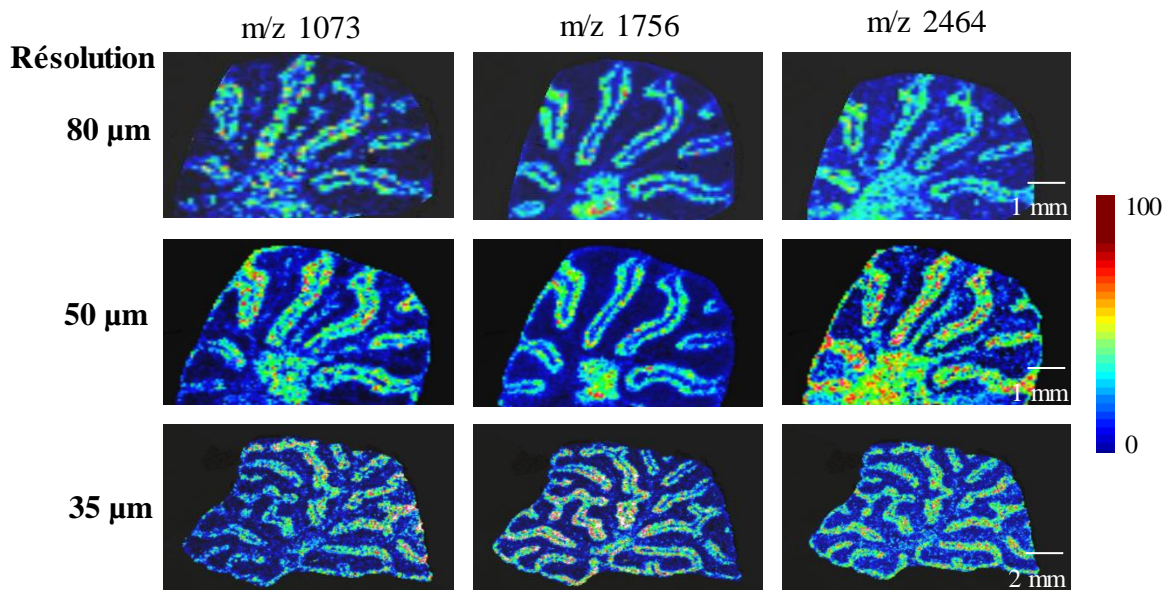
**Figure 14** : Mesure de l'activité caspase-3/7 suite aux injections *in vivo* d'éthanol ( $2 \times 2,5$  g/kg) et/ou de nociceptine ( $1 \mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ ). Chaque valeur est la moyenne ( $\pm$  SEM) de 9 animaux analysés en triplicat technique. La significativité a été examinée grâce à un test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons de Dunn. \*\* $P < 0,01$  versus contrôle ; § $P < 0,05$  versus éthanol seul. Ctrl : contrôle ; noc : nociceptine ; EtOH : éthanol.

## 2. Analyse du peptidome par imagerie MALDI

### 2.1. Optimisation de la résolution spatiale et regroupement des spectres par clusters

Afin de compléter l'étude du peptidome du cervelet au cours du développement, nous avons souhaité rechercher l'expression spatiale des peptides différenciellement exprimés au cours du développement dans les différentes couches du cortex cérébelleux. Pour cela nous avons, en collaboration avec la plateforme Protim de Rennes, utilisé la technique d'imagerie MALDI sur des cervelets de rats aux stades P8 et P21.

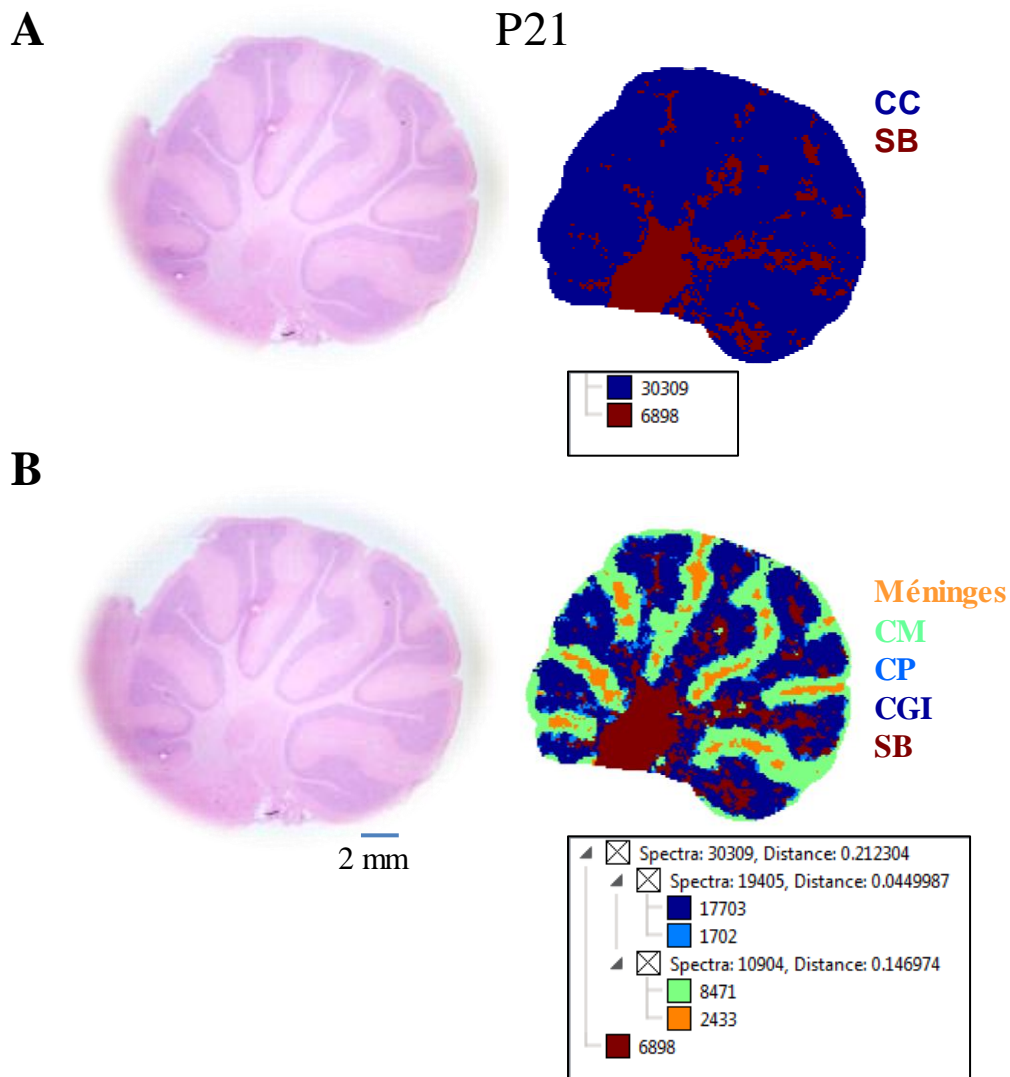
Les expériences d'imagerie MALDI sur les cervelets de rats âgés de 8 et 21 jours se sont d'abord attachées à améliorer la résolution spatiale en focalisant le laser pour réduire son diamètre afin de pouvoir accroître l'échantillonnage de l'image. Néanmoins, cette amélioration de la résolution peut conduire à une baisse de sensibilité du signal. Les tests effectués ont permis de faire passer la résolution dans un premier temps de 80 à 50  $\mu\text{m}$ , puis de 50 à 35  $\mu\text{m}$  (Fig. 15). Ce niveau de résolution semble être un bon compromis pour mettre en évidence de façon précise la localisation des analytes dans les différentes couches du cortex cérébelleux tout en gardant une intensité de signal suffisante.



**Figure 15 :** Illustration de l'impact de l'augmentation de la résolution spatiale sur la précision de distribution de 3 composés dans les différentes couches du cortex cérébelleux. Augmenter la résolution de 80  $\mu\text{m}$  à 35  $\mu\text{m}$  permet une représentation plus fine des structures du cortex cérébelleux. Les résolutions 80 et 50  $\mu\text{m}$  ont été testées sur un cervelet de 8 jours et celle de 35  $\mu\text{m}$  sur un cervelet de 21 jours. Barre d'échelle : 1 mm pour les résolutions de 80 et 50  $\mu\text{m}$  et 2 mm pour celle de 35  $\mu\text{m}$ .

Une fois la résolution optimisée, une étape de clustering a été réalisée pour déterminer la répartition spatiale des spectres de masse dans le cervelet en fonction de la similitude en termes de m/z et d'intensité des pics majoritaires par exemple (Fig. 16). Cette approche conduit à un arbre hiérarchique qui met en évidence deux profils de spectres de masse bien différents entre le cortex cérébelleux et la substance blanche (Fig. 16A). La segmentation des spectres de masse contenus dans le cortex cérébelleux permet ensuite de les subdiviser en 4 clusters distincts dont 2 se superposent remarquablement bien avec la couche moléculaire et la couche granulaire interne (Fig. 16B). Les 2 autres clusters pourraient correspondre à un phénotypage spécifique des cellules de Purkinje et des méninges, même si la résolution spatiale est un peu limitée pour

l'affirmer (35  $\mu\text{m}$ ). Ces différents segments ont ensuite été utilisés pour attribuer chaque spectre d'intérêt à une région anatomique.



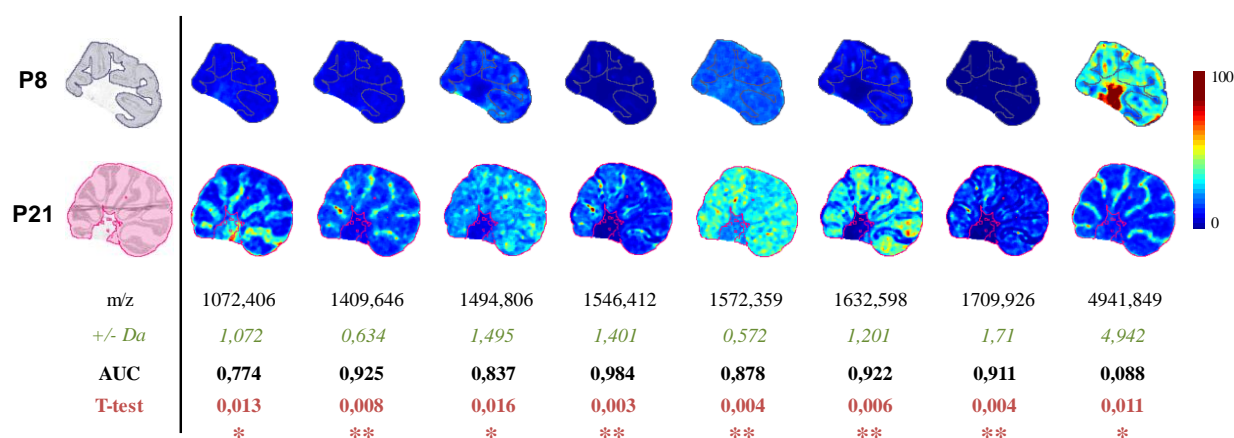
**Figure 16 : Répartition spatiale des spectres de masse au sein du cervelet au stade 21 jours.** Ce clustering des spectres de masse conduit à une segmentation de l'image par phénotypage moléculaire qui permet d'identifier plusieurs régions anatomiques du cortex cérébelleux, *i.e.* la substance blanche (SB), les méninges, la couche moléculaire (CM) et la couche granulaire interne (CGI). Barre d'échelle : 2 mm.

## 2.2. Recherche par imagerie MALDI de peptides régulés au cours du développement

La première partie des analyses a été effectuée sans *a priori*, c'est-à-dire que tous les spectres présentant une différence d'expression entre P8 et P21 ont été retenus. Pour cela, une analyse ROC (*receiver operating characteristic*) a été réalisée afin de comparer l'intensité des pics des spectres de masse dans le cortex cérébelleux entre les deux stades. Cette approche a permis

d'identifier dans nos spectres 8 composés différentiellement exprimés au cours du développement (Fig. 17).

Parmi ces 8 composés régulés, un seul voit son expression diminuer entre P8 et P21, et pourrait donc être selon notre hypothèse, impliqué dans le développement du cervelet. Cependant ce composé est principalement exprimé dans la substance blanche et non dans le cortex suggérant qu'il n'agit pas dans la mise en place de cette structure. De plus nous n'avons pas identifié de peptide dont la masse pourrait correspondre à ce composé ( $m/z$  4941,84). Concernant les 7 espèces moléculaires dont l'expression augmente entre P8 et P21, deux pourraient être des peptides inclus dans notre base de données. Le composé présentant un  $m/z$  1632,598 correspondrait à la cérébelline-1 et le composé présentant un  $m/z$  1546,412 serait la [des-Ser1]-cérébelline-1. Ces deux peptides présentent le même profil de régulation que celui observé dans les expériences de peptidomique réalisées en nanoLC-MS/MS.



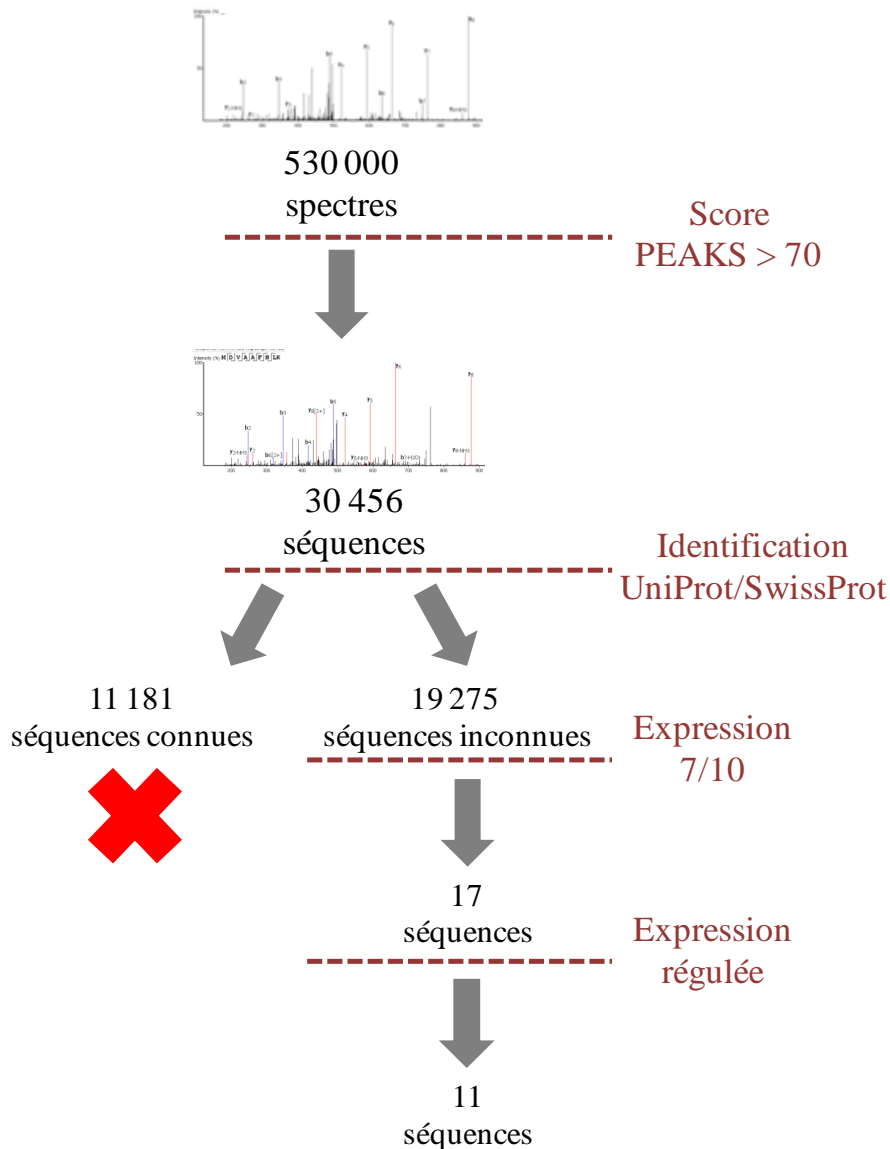
**Figure 17 : Images des rapports m/z des composés retrouvés différentiellement exprimés entre le 8<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour de vie postnatale dans des coupes histologiques de cervelet de rat.** Le rapport m/z de chaque spectre est indiqué avec l'écart de masse possible. AUC : area under the curve. La significativité a été examinée grâce à un t-test. \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  versus P8 pour chaque m/z. P : jour postnatal.

Après cette première approche sans *a priori* une seconde partie de l'analyse a consisté à rechercher spécifiquement les m/z des 8 peptides dont l'expression varie au cours du développement identifiés lors de la réalisation du peptidome sur le système Orbitrap (Article, Tab.1). Malheureusement, aucune masse correspondant à l'un de ces peptides n'a pu être retrouvée dans les spectres obtenus par imagerie MALDI.



### 3. Recherche de nouveaux neuropeptides potentiellement impliqués dans le développement du cervelet par séquençage *de novo*

Après avoir identifié des peptides connus et recherché leurs effets sur le développement du cortex cérébelleux, la dernière partie de ce projet s'est attachée à la découverte de nouveaux peptides. Pour cela nous avons utilisé la technique de séquençage *de novo*. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le laboratoire LITIS, équipe Traitement de l'Information en BioSanté (TIBS) de Rouen.



**Figure 18 :** Description des étapes suivies pour trier les peptides identifiés par séquençage *de novo*. Les séquences ayant un score de PEAKS > 70 ont été retenues puis comparées à la base de données UniProt/SwissProt afin d'éliminer celles issues de précurseurs déjà connus. Les séquences restantes ont été filtrées en fonction de leur occurrence (> 7/10) et de leur régulation (> 2). Cette approche a conduit à retenir 7 séquences régulées.



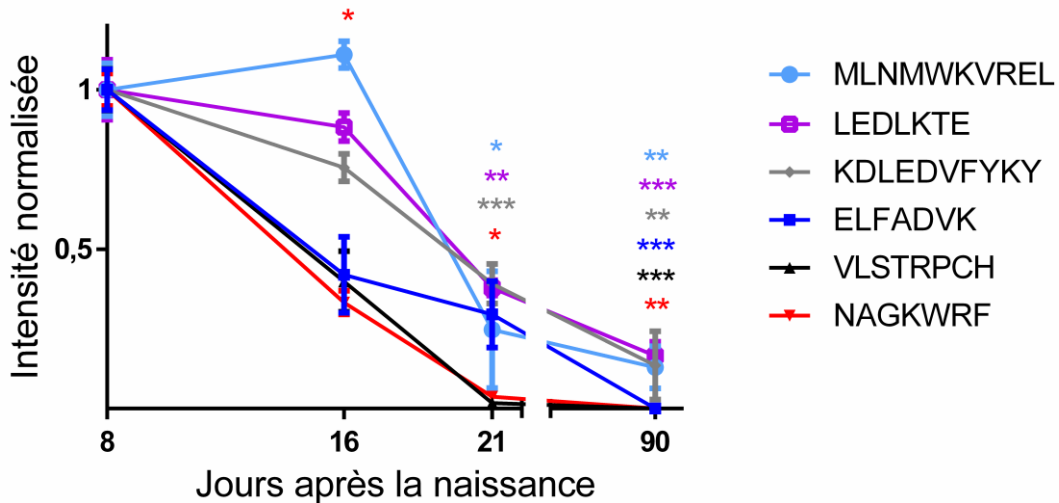
Le séquençage *de novo* des 40 échantillons pour les 4 stades de développement a conduit à analyser environ 530 000 spectres qui ont permis d'identifier 30 456 séquences avec un score de PEAKS > 70. L'analyse de l'ensemble de ces séquences indique qu'elles codent pour environ 7000 séquences uniques, c'est-à-dire que les répétitions entre les échantillons ou au sein d'un même échantillon n'ont pas été comptées. Pour restreindre ce nombre, un tri des données a été fait selon les étapes décrites en figure 18. Tout d'abord l'ensemble des séquences a été soumis à une identification contre la base de données UniProt/SwissProt rat qui contient 8 000 références de protéines connues. Cela a permis de déterminer que 11 181 séquences correspondent à des précurseurs de protéines connues chez le rat et ont donc été éliminées. Ensuite, les 19 275 séquences restantes ont été triées en fonction de leur récurrence au sein des 10 échantillons de chaque stade afin de ne conserver que celles retrouvées au minimum 7 fois sur 10 dans au moins un stade. Il s'avère que seules 17 séquences répondent à ce critère (Tab. 2).

**Tableau 2 : Liste des séquences de novo exprimées de façon récurrente au cours du développement.**

|             | P8   |           |         | P16  |           |         | P21  |           |         | P90  |           |         |
|-------------|------|-----------|---------|------|-----------|---------|------|-----------|---------|------|-----------|---------|
|             | #ech | intensité | stddev  | #ech | intensité | stddev  | #ech | intensité | stddev  | #ech | intensité | stddev  |
| VLSTRPCH    | 8    | 1,9E+07   | 1,2E+06 | 8    | 7,4E+06   | 7,1E+05 | 2    | 3,3E+05   | 0,0E+00 | 0    | ND        | ND      |
| NAGKWRP     | 8    | 7,4E+06   | 3,8E+05 | 6    | 2,5E+06   | 9,1E+04 | 2    | 2,8E+05   | 3,0E+03 | 1    | 0,0E+00   | 0,0E+00 |
| KDLEDVIFYKY | 7    | 1,3E+07   | 7,8E+05 | 7    | 9,9E+06   | 4,3E+05 | 7    | 5,1E+06   | 3,2E+05 | 4    | 1,8E+06   | 1,9E+05 |
| ELFADKV     | 7    | 6,6E+06   | 4,3E+05 | 3    | 2,8E+06   | 3,3E+05 | 2    | 2E+06     | 2E+05   | 0    | ND        | ND      |
| LEDLKTE     | 7    | 5,4E+07   | 5,1E+06 | 7    | 4,8E+07   | 2,1E+06 | 6    | 2,0E+07   | 4,9E+05 | 6    | 8,9E+06   | 4E+05   |
| MLNMWQVREL  | 6    | 7,8E+06   | 6,5E+05 | 7    | 8,7E+06   | 3,7E+05 | 4    | 1,9E+06   | 3,5E+05 | 4    | 1,0E+06   | 6,7E+04 |
| WRMPGQLGK   | 5    | 5,7E+06   | 5,5E+05 | 7    | 1,2E+07   | 7,9E+05 | 5    | 4,5E+06   | 3,1E+05 | 2    | 7,7E+05   | 8,7E+04 |
| YLYELAR     | 4    | 2,7E+06   | 3,8E+05 | 4    | 9,6E+05   | 8,6E+04 | 6    | 9,8E+05   | 1,1E+05 | 9    | 3,8E+06   | 1,4E+05 |
| LVNEVTEFKA  | 2    | 8,7E+06   | 1,0E+06 | 7    | 1,1E+07   | 5,1E+05 | 6    | 7,1E+06   | 3,6E+05 | 10   | 1,1E+07   | 2,0E+05 |
| GALDTQLK    | 6    | 2,4E+06   | 3,1E+05 | 7    | 5,4E+06   | 1,2E+05 | 8    | 5+06      | 1,5E+05 | 5    | 1,4E+07   | 4,9E+05 |
| VFAEHRY     | ND   | ND        | ND      | ND   | ND        | ND      | 1    | 0,0E+00   | 0,0E+00 | 8    | 6E+05     | 1,1E+05 |
| KSTELLR     | 8    | 0,0E+00   | 0,0E+00 | 1    | 0,0E+00   | 0,0E+00 |      | ND        | ND      | 0    | ND        | ND      |
| MDVAAFNKL   | 7    | 2,7E+06   | 1,7E+05 | 4    | 1,2E+06   | 1,9E+05 | 5    | 4,1E+05   | 1,1E+05 | 0    | ND        | ND      |
| MHVLREL     | 6    | 6,6E+06   | 8,7E+05 | 10   | 3,2E+07   | 2,6E+06 | 8    | 1,8E+07   | 4,7E+05 | 6    | 1,9E+07   | 1,3E+06 |
| LAPHALLR    | 4    | 3,8E+07   | 2,8E+06 | 5    | 4,1E+07   | 9,7E+05 | 4    | 1,1E+07   | 6,9E+05 | 7    | 2E+07     | 9E+05   |
| SPWFLDHK    | 2    | 4,1E+05   | 9,0E+03 | 5    | 3E+06     | 7,2E+04 | 6    | 4,2E+06   | 1,9E+05 | 9    | 2,3E+06   | 6,4E+04 |
| VNDLFERL    | 1    | 4,5E+06   | 0,0E+00 | ND   | ND        | ND      | ND   | ND        | ND      | 7    | 3,6E+06   | 2,6E+05 |

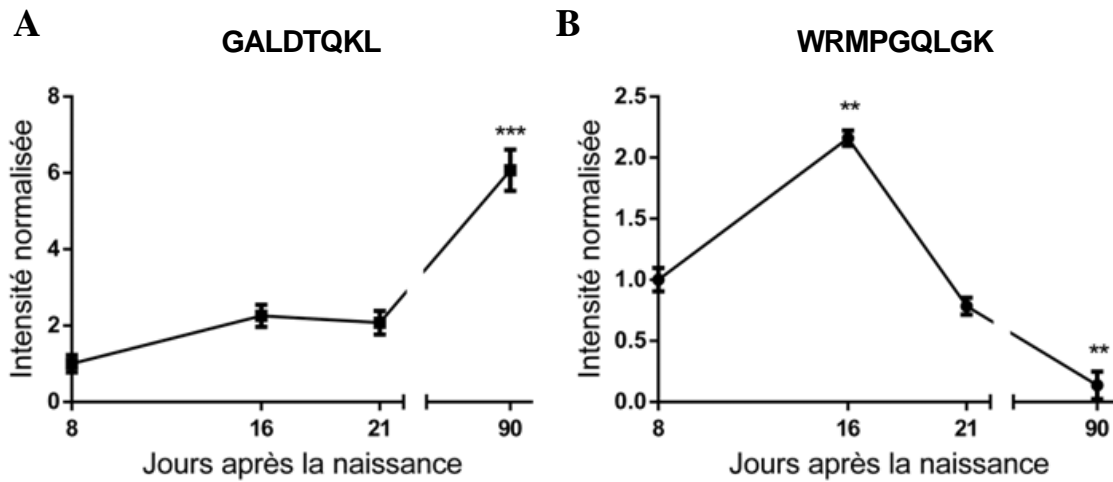
Pour chaque stade, seules les séquences exprimées plus de 7 fois sur 10 sont indiquées. #ech : occurrence de la séquence parmi les 10 échantillons ; intensité : aire sous la courbe du chromatogramme ; stddev : déviation standard. Les séquences dont l'expression diminue au cours du développement sont surlignées en rouges, celles qui connaissent un pic d'expression pendant les stades précoces sont en bleu et celles dont l'expression augmente avec l'âge de l'animal sont en vert.

Ensuite, ont été identifiées les 11 séquences dont l'expression se trouve régulée au cours du développement. Parmi ces séquences, 6 présentent une plus forte intensité à P8 qui diminue chez les animaux plus âgés, avec une différence minimum d'un facteur 2 entre P8 et P90 (Fig. 19). Au regard de notre hypothèse de départ, ces séquences pourraient être impliquées dans le développement du cortex cérébelleux.



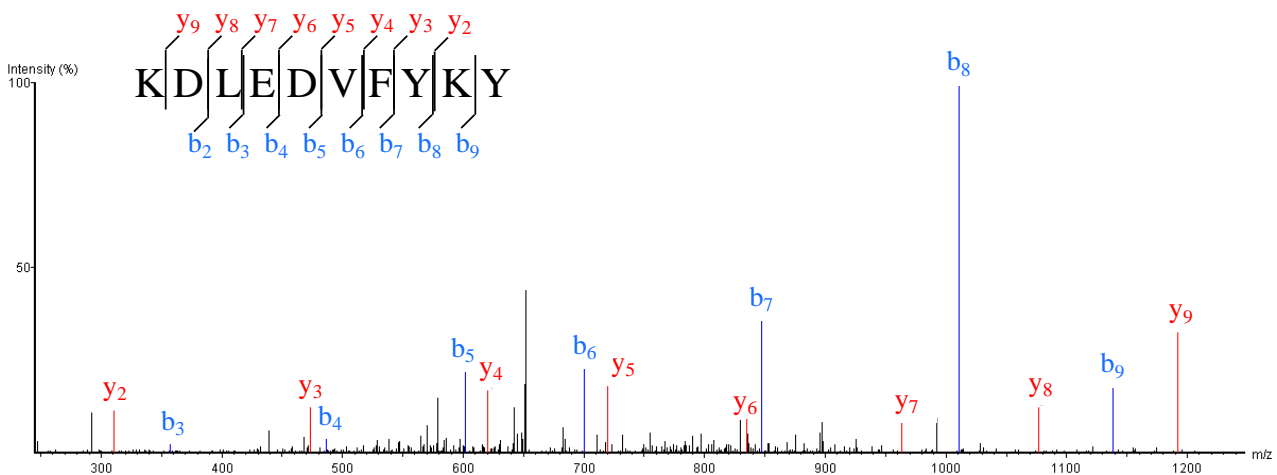
**Figure 19 : Séquences *de novo* dont l'expression diminue au cours du développement.** Pour chaque séquence, les stades 16, 21 et 90 jours sont comparés au stade 8 jours après la naissance par un test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons de Dunn. Les données sont normalisées par rapport au stade 8 jours pour chaque séquence. \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$  versus 8 jours.

Parmi les 21 séquences retrouvées de façon récurrente, d'autres profils d'expression sont observés (Fig. 20). Une partie voit son expression augmenter au cours du développement (Fig. 20A), tandis qu'une autre partie connaît un pic d'expression pendant les stades précoces, avant de diminuer à l'âge adulte (Fig. 20B).



**Figure 20 : Autres types de profils d’expression retrouvés parmi les séquences *de novo*.** (A) Exemple de séquence dont l’expression augmente au cours du développement. (B) Exemple de séquence dont l’expression connaît un pic pendant les stades précoces avant de diminuer à l’âge adulte. Pour chaque séquence, les stades 16, 21 et 90 jours sont comparés au stade 8 jours après la naissance par un test de Kruskal-Walis suivi de comparaisons de Dunn. Les données sont normalisées par rapport au stade 8 jours pour chaque séquence. \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$  versus 8 jours.










Afin de vérifier la fiabilité du séquençage *de novo* réalisé par le logiciel PEAKS, des spectres de masse ayant permis l’identification de chaque peptide dont l’expression est régulée ont été examinés manuellement. Un exemple d’un de ces spectres MS/MS est présenté en figure 21.



**Figure 21 : Spectre annoté de la séquence KDLEDVIFYKY.** Le spectre MS/MS a été extrait grâce au logiciel PEAKS et annoté à la main.

Pour terminer, les 6 séquences dont l’expression diminue au cours du développement ont été blastées contre la base UniProt mammifères qui contient les protéines connues et prédites des mammifères, soit près de 1 600 000 références. Parmi les 6 séquences, certaines correspondent à des protéines connues chez d’autres espèces que le rat comme MLNMWKVREL qui code pour la *clathrin interactor 1* humaine, d’autres à des protéines prédites comme KDLEDVIFYKY

qui code pour le *S/R-rich splicing factor 9* et certaines ne présentent pas une identité de séquence parfaite comme VLSTRPCH qui correspondrait à la *claudin*. Enfin, un cas particulier est à souligner, celui de la séquence NAGKWRF qui pourrait correspondre à 2 protéines prédites différentes à savoir la *dedicator of cytokinesis 4* ou l'*ATP-binding cassette sub-family A member 3*. Cependant, l'asparagine (N) en première position du peptide trouvé par séquençage *de novo*, serait acétylée et le poids moléculaire de cet acide aminé modifié est très proche de celui du couple glycine (G) et valine (V), 156,04 Da contre 156,09 Da. En remplaçant ce N par GV la séquence est identifiée comme un fragment de l'ubiquitine carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 qui correspond à une protéine connue chez le rat.

|  |   |
|--|---|
|  Clathrin interactor 1                              | MLNMWQVREL<br>-----VDKATNVVMN ( <i>Homo sapiens</i> )               |
|  Clathrin interactor 1                              | -----VDKATNVVMN ( <i>Rattus norvegicus</i> )                        |
|  Zinc finger protein 804B                          | LEDLKTE<br>LSRNTKEDHN-----LGKKPLELKT ( <i>Homo sapiens</i> )        |
|  S/R-rich splicing factor 9                       | KDLEDVFYKY<br>VGNLPTDVRE-----GRIREILEKN ( <i>Homo sapiens</i> )     |
|  Claudin  | VLSTRPCH<br>ATSQGGSSR-----SSLPCSDL ( <i>Mesocricetus auratus</i> )  |
|  Zinc metalloprotéase OMA1                        | LEFADKV<br>VRASAVFWQQ-----ILGDPKLEPW ( <i>Sarcophilus harrisi</i> ) |
|  Deducator of cytokinesis 4                       | NAGKWRF<br>M-----INCYCNSSNG ( <i>Homo sapiens</i> )                 |
|  ATP-binding cassette sub-family A member 3       | YFTCLDNEAS-----SKLVGDMNDR ( <i>Tupaia chinensis</i> )               |
|  Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 | GVAGKWRF<br>EMLNKVLAKL-----ADVLGLEEET ( <i>Rattus norvegicus</i> )  |

**Figure 22 : Alignement des 6 séquences identifiées par séquençage *de novo* correspondant à des peptides dont l'expression diminue au cours du développement avec les données de la base Uniprot mammifères.** Les 6 séquences ont été identifiées comme des fragments de protéines connues (en jaune) ou prédites (en bleu) chez plusieurs espèces.



# Discussion



## 1. Expression spatio-temporelle des peptides dans le cervelet en développement

### 1.1. Expression de l'ensemble des neuropeptides retrouvés

Cette étude est la première à chercher à identifier les différents neuropeptides exprimés et régulés dans le cervelet au cours du développement. Malgré l'importance des peptides dans la mise en place de cette structure, aucune mention n'est faite dans la littérature d'une recherche sans *a priori* de l'ensemble du peptidome du cervelet. Cependant, il existe des projets ayant réalisé le transcriptome ou le protéome du cerveau et/ou du cervelet en développement comme le *Mouse brain proteome* (<http://www.mousebrainproteome.com>), le *Brain Allen atlas* (<http://www.brain-map.org>) ou encore le *Brain transcriptome database* (<http://www.cdtdb.neuroinf.jp/CDT/Top.jsp>). En revanche, aucun projet ne s'est spécifiquement intéressé aux neuropeptides et il était même considéré à une certaine époque que cette structure en exprimait peu. Cela venait certainement du fait que les études avaient tendance à ne pas analyser cette structure. On découvre néanmoins un nombre croissant de peptides exprimés dans le cervelet du rongeur et impliqués dans son développement. C'est le cas de la SST que l'on retrouve fortement exprimée mais de façon transitoire entre P5 et P21 (Villar *et al.* 1989 ; Viollet *et al.* 1997) et qui agit sur la migration des neurones en grain, ou de l'ODN qui est également particulièrement exprimé entre E17 et P5 (Malagon *et al.* 1993) et favorise la survie des NGC en culture. Ces 2 peptides impliqués dans le développement du cervelet ont été retrouvés dans notre analyse peptidomique et leur régulation concorde avec les résultats préalablement décrits dans la littérature. En revanche, la plupart des études détaillant la distribution de la nociceptine dans les structures cérébrales sont des études d'expression du gène, sans quantification de son expression dans le cervelet. Une seule étude récente a mesuré le peptide de façon globale dans les hémisphères cérébraux au cours du développement, et rapporte un profil de régulation assez similaire à ce que nous avons pu observer dans le cervelet (Meyer *et al.* 2017). Même si le peptidome réalisé a permis de rapporter 33 peptides présents dans le cervelet, certains neuropeptides connus pour être exprimés dans cette structure n'ont pas été retrouvés dans nos analyses, comme par exemple le PACAP, la sécrétine ou la galanine (Ryan *et al.* 1997 ; Nielsen *et al.* 1998 ; Tay *et al.* 2004). Ceci peut être lié au fait que ces 3 neuropeptides sont exprimés uniquement par les cellules de Purkinje, donc leur abondance dans le cervelet entier reste faible (Ryan and Gundlach 1996). De plus, même si notre protocole d'extraction avait pour objectif d'éliminer les protéines pour enrichir les échantillons en



peptides, le nombre de composés présents reste très élevé ce qui a pu entraîner le masquage de ces 3 peptides par des espèces plus abondantes ou mieux ionisées.

Lors de la mise en place du protocole d'extraction des peptides, 5 stades de développement ont été sélectionnés ; *i.e.* P1, P8, P16, P21 et P90. Pour pallier à la différence de poids des cervelets entre les différents âges, des tissus provenant de plusieurs animaux ont été regroupés afin d'atteindre le poids d'un cervelet adulte (300 mg) pour tous les stades de développement. Pour obtenir ce poids, il a fallu rassembler 16 cervelets de rats âgés de 1 jour. Néanmoins, même si le poids des tissus collectés est équivalent, un dosage des protéines par la méthode de Bradford a révélé qu'au stade P1 la quantité de protéines n'excède pas 35 µg/mL, soit environ 10 fois moins que dans un cervelet adulte (P90) et 3 fois moins que dans un échantillon au stade P8. Cette très faible quantité de protéines peut s'expliquer par le caractère très aqueux et la faible densité du tissu à la naissance (Fu *et al.* 2013). Donc, additionné à la différence de masse d'un facteur 20 entre les stades P1 et P90, l'écart très important en termes de concentrations protéiques des échantillons, ne permettait pas de les normaliser correctement avec ceux des autres stades tout en gardant un volume suffisant pour les analyser par spectrométrie de masse. En effet, pour atteindre une concentration protéique suffisante dans un volume injectable par le système HPLC du spectromètre de masse, il aurait fallu au moins tripler la masse de tissus de départ. Cela aurait nécessité près de 50 animaux par échantillon, soit environ 500 rats pour les 10 échantillons du stade P1. Du fait de ces difficultés techniques, nous avons décidé d'écarter ce stade P1 de l'analyse.

Si les analyses par spectrométrie de masse LC-MS/MS ont permis d'identifier 33 peptides exprimés dans le cervelet dont 8 régulés au cours du développement, cela n'apportait aucune information quant à leur distribution spatiale. Pour essayer de résoudre ce problème, nous avons utilisé l'imagerie MALDI qui permet de distinguer les principales couches du cortex cérébelleux. Cependant, la résolution spatiale de 35 µm que nous avons atteinte reste insuffisante pour discriminer précisément les cellules de Purkinje des autres couches cellulaires comme cela peut être fait en microscopie. L'amélioration de cette résolution aurait encore été possible, puisqu'une résolution de 20 µm a été atteinte dans d'autres études (Lagarrigue *et al.* 2011), mais cela se fait au détriment de la sensibilité (Lagarrigue *et al.* 2012). Néanmoins, même si le signal dans nos échantillons était satisfaisant, nous n'avons pu retrouver que très peu des peptides contenus dans notre base. Cette difficulté à détecter nos peptides d'intérêt vient certainement du fait que le tissu constitue une matrice très complexe au sein de laquelle les peptides ne représentent pas les composés majoritaires (Thompson *et al.* 2012). L'absence de

protocole d'extraction des peptides, comme cela a été fait pour les expériences de peptidomiques couplées à la LC-MS/MS, fait que les échantillons n'ont pas été enrichis en peptides. De plus, l'imagerie MALDI ne permet pas une séparation des composés comme avec une chaîne HPLC en amont d'un analyseur Orbitrap, si bien qu'au moment de la désorption l'ensemble des composés situés sur le site impacté par le laser se retrouvent en compétition pour l'ionisation et l'analyse par le spectromètre de masse (Chatterji and Pich 2013). Donc, de part leur faible abondance et leurs séquences courtes, les neuropeptides peuvent assez facilement se retrouver masqués par des composés plus abondants ou plus facilement ionisables comme les protéines du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire. Ceci peut expliquer que le seul peptide que nous avons retrouvé soit la cérébelline 1, dont l'abondance dans la CGI (Hirai *et al.* 2005), plus importante que les autres neuropeptides recherchés, a pu faciliter la détection.

## 1.2. Expression de la nociceptine

Afin de confirmer les données d'expression de la nociceptine obtenues par l'approche peptidomique, nous avons mesuré l'expression de son gène et celle de son récepteur au cours du développement. Pour compenser l'absence du stade 1 jour dans l'étude peptidomique, des mesures par PCR quantitative ont été réalisées à des stades précoces comme P2 et P4. Parmi les quelques travaux portant sur l'expression des transcrits du système nociceptinergique dans le système nerveux central, 2 études se sont intéressées au développement. La première rapporte par hybridation *in situ*, une expression faible du gène de la nociceptine dans le cervelet à la naissance qui diminue encore chez les animaux plus âgés (Ikeda *et al.* 1998). Le récepteur apparaît plus exprimé, ce qui permet d'estimer sa localisation. Si le marquage est faible et diffus à la naissance, il devient plus fort et semble localisé dans la CGI entre P7 et P14 avant de presque totalement disparaître à P21 (Ikeda *et al.* 1998). La seconde étude ne s'est malheureusement pas intéressée au cervelet mais, dans le reste du cerveau, certaines structures présentent un marquage par hybridation *in situ* similaire à celui observé par Ikeda (Neal *et al.* 2001). En particulier, le néocortex, l'hippocampe et le thalamus apparaissent très riches en ARNm de la nociceptine et de son récepteur. Le néocortex présente une forte expression de la nociceptine de E12 à la naissance, qui diminue ensuite progressivement chez les animaux plus âgés. La corrélation temporelle entre l'expression du système nociceptinergique et le développement du néocortex (Molnár and Clowry 2012) pourrait suggérer que, comme dans le cervelet, ce peptide joue un rôle dans la mise en place d'autres structures du cerveau. D'une

façon globale, le peu de données de la littérature suggère que le système nociceptinergique est plus fortement exprimé dans les stades précoces qu'à l'âge adulte ce qui est corrélé par nos résultats. Le léger décalage temporel que nous avons observé entre l'expression du peptide et celle de son récepteur pourrait suggérer que le premier induit l'expression du second. Nous avons testé cette hypothèse en mesurant l'expression du gène de NOP dans des cultures de NGC traitées à la nociceptine mais nous n'avons pas retrouvé d'induction de l'expression du récepteur par son ligand. Afin de mieux caractériser le lien spatiotemporel entre la nociceptine et son récepteur, il serait intéressant d'étudier l'expression de ces 2 gènes à des stades intermédiaires entre P8 et P16 lorsqu'ils sont tous les 2 fortement exprimés.

Au sein du cortex cérébelleux, les peptides et leurs récepteurs sont souvent retrouvés différemment exprimés dans les différentes couches cellulaires. C'est le cas pour le PACAP qui est exprimé par les cellules de Purkinje (Nielsen *et al.* 1998) et dont les récepteurs PAC1 et VPAC1 sont localisés dans la CGE et la CGI (Basille *et al.* 2000), ou de la SST exprimée dans les cellules de Purkinje (Villar *et al.* 1989) alors que son récepteur de type 2 est lui retrouvé dans la CGE (Viollet *et al.* 1997). Cette localisation de l'expression des couples peptides / récepteurs peut souvent être corrélée avec leur fonction dans le développement du cervelet. C'est par exemple le cas du PACAP qui s'oppose à l'effet pro-mitotique de Shh dans la CGE (Nicot *et al.* 2002) et favorise la survie et la différenciation des NGC dans la CGI (Gonzalez *et al.* 1997 ; Vaudry *et al.* 2000) ou de la SST qui stimule la migration radiale dans la CGE (Yacubova et Komuro 2002). Si le récepteur NOP est retrouvé exprimé exclusivement par les cellules en grain dans la CGI au cours du développement et que son ligand est également retrouvé principalement exprimé dans cette couche, cela suggère une implication du système nociceptinergique dans la mise en place de la CGI.

La CGI est majoritairement constituée de NGC et d'astrocytes qui peuvent être mis en culture afin de mesurer l'expression de peptides ou de leurs récepteurs par ces cellules. Si une étude a rapporté la présence de nociceptine et de son récepteur dans des cultures d'astrocytes corticaux (Meyer *et al.* 2017), nous n'avons retrouvé le gène de la nociceptine que faiblement exprimé par les astrocytes cérébelleux en culture. En revanche, les expériences de PCR quantitatives révèlent que le gène du peptide et de son récepteur sont exprimés par les NGC tout au long de la culture. L'expression du système nociceptinergique sur ces NGC suggère donc un rôle autocrine et/ou paracrine de la nociceptine sur le développement de ces cellules.

## 2. Effets neurotrophiques de la nociceptine dans le cervelet en développement

Les études portant sur les effets cellulaires de la nociceptine rapportent des résultats qui diffèrent selon le type cellulaire et le mode de traitement (induction du gène ou ajout de peptide exogène) utilisés.

Une étude récente montre une action de la nociceptine sur la migration de neuroblastomes U87 (Bedini *et al.* 2017). Dans ces expériences de recouvrement de zones lésées, la nociceptine n'exerce pas d'effet propre sur les cellules tumorales mais agit de façon indirecte, en bloquant l'augmentation de la migration induite par le LPS. La fréquence des oscillations calciques intracellulaires semble être un élément clé pour contrôler la migration des NGC, puisque favoriser ces oscillations stimule leur migration, tandis qu'inhiber les canaux calciques a l'effet inverse (Komuro and Rakic 1992). Comme la nociceptine inhibe l'ouverture des canaux calciques de type N (Chan and Wong 2000), nous avons envisagé qu'elle pourrait donc freiner la migration des NGC arrivés dans la CGI. Cependant, les résultats obtenus en vidéomicroscopie montrent que, dans nos conditions, la nociceptine n'a pas d'effet sur la motilité des cellules. Il faut néanmoins garder à l'esprit que le modèle de microexplants utilisé ne mime qu'une partie du processus de migration des NGC puisque les cellules se retrouvent isolées, dépourvues d'interactions avec d'autres cellules. Pour se rapprocher de la situation *in vivo*, il aurait fallu suivre la migration des cellules dans un modèle de tranches organotypiques de cervelets *ex vivo* dans lequel les NGC peuvent interagir avec leurs partenaires, notamment la glie de Bergmann, essentielle à la migration radiale dans la couche moléculaire (Edmondson and Hatten 1987). Cependant, cette technique est plus complexe à mettre en place et la plupart des molécules, comme le PACAP ou l'éthanol, qui agissent sur la migration dans les tranches semblent aussi avoir un effet sur les cellules issues de microexplants (Cameron *et al.* 2007 ; Kumada *et al.* 2010).

Concernant la différenciation, la surexpression du gène de la nociceptine dans des lignées de neuroblastomes provoque une augmentation de la maturation de ces cellules (Saito *et al.* 1997). Une autre équipe a examiné les gènes induits par le traitement de cultures de neurones hippocampaux par le BDNF (Ring *et al.* 2006), lequel agit aussi comme agent pro-différenciateur des cellules en grain (Segal *et al.* 1995). Un des gènes retrouvés surexprimés dans les neurones hippocampiques immatures exposés au BDNF est celui de la nociceptine, et l'ajout de nociceptine exogène induit la différenciation de ces cellules en augmentant à la fois le nombre, la longueur et les ramifications des neurites (Ring *et al.* 2006). La même équipe a

ensuite montré un effet inverse de la nociceptine sur des cellules matures (Alder *et al.* 2013), suggérant une action opposée du peptide en fonction du stade de maturité des neurones. C'est une particularité que nous avons aussi observé avec les cellules en grain puisque si la nociceptine agit sur les NGC immatures, elle n'exerce plus d'effet sur les cellules matures. Il semble donc que l'effet neurotrophique de ce peptide soit limité aux cellules immatures et donc à une fenêtre temporelle précise liée à la période de développement. Cette hypothèse est étayée par la diminution de l'expression des gènes du peptide et de son récepteur que nous avons mesurée au cours de la maturation des NGC en culture. Le mécanisme par lequel la nociceptine favorise la différenciation pourrait impliquer la voie de CREB et des MAP kinases retrouvée activée par le peptide dans des cultures de neuroblastomes (Kim *et al.* 2002 ; Fig. 23) et connue pour favoriser l'élongation neuritique dans des lignées cellulaires et la maturation neuronale au cours du développement du cortex cérébral (Hu *et al.* 2015 ; Landeira *et al.* 2016).

Quelques effets de la nociceptine sur la survie cellulaire ont aussi été décrits. Sur les neurones dopaminergiques, la nociceptine semble surtout avoir un effet pro-apoptotique. En effet, l'invalidation du gène du récepteur NOP dans un modèle de Parkinson diminue de moitié la mort des neurones dopaminergiques (Arcuri *et al.* 2016). Ce travail réalisé *in vivo* n'a pas recherché les voies impliquées dans l'effet neurotoxique de la nociceptine, mais une étude utilisant des cultures de neurones dopaminergiques montre que le peptide pourrait agir via la MAK kinase p38. En effet, le blocage de cette voie par le SB203580, supprime les effets de la nociceptine sur ces neurones (Collins *et al.* 2016). Peut-être en partie lié à ces effets sur la survie, un inhibiteur du récepteur NOP restaure partiellement les performances dans des tests comportementaux de rats modèles de la maladie de Parkinson (Marti 2005). La récupération des capacités motrices affectées suite à une lésion de la substance noire est similaire à celle retrouvée avec la Levodopa qui est l'agent classiquement utilisé pour traiter la maladie de Parkinson.

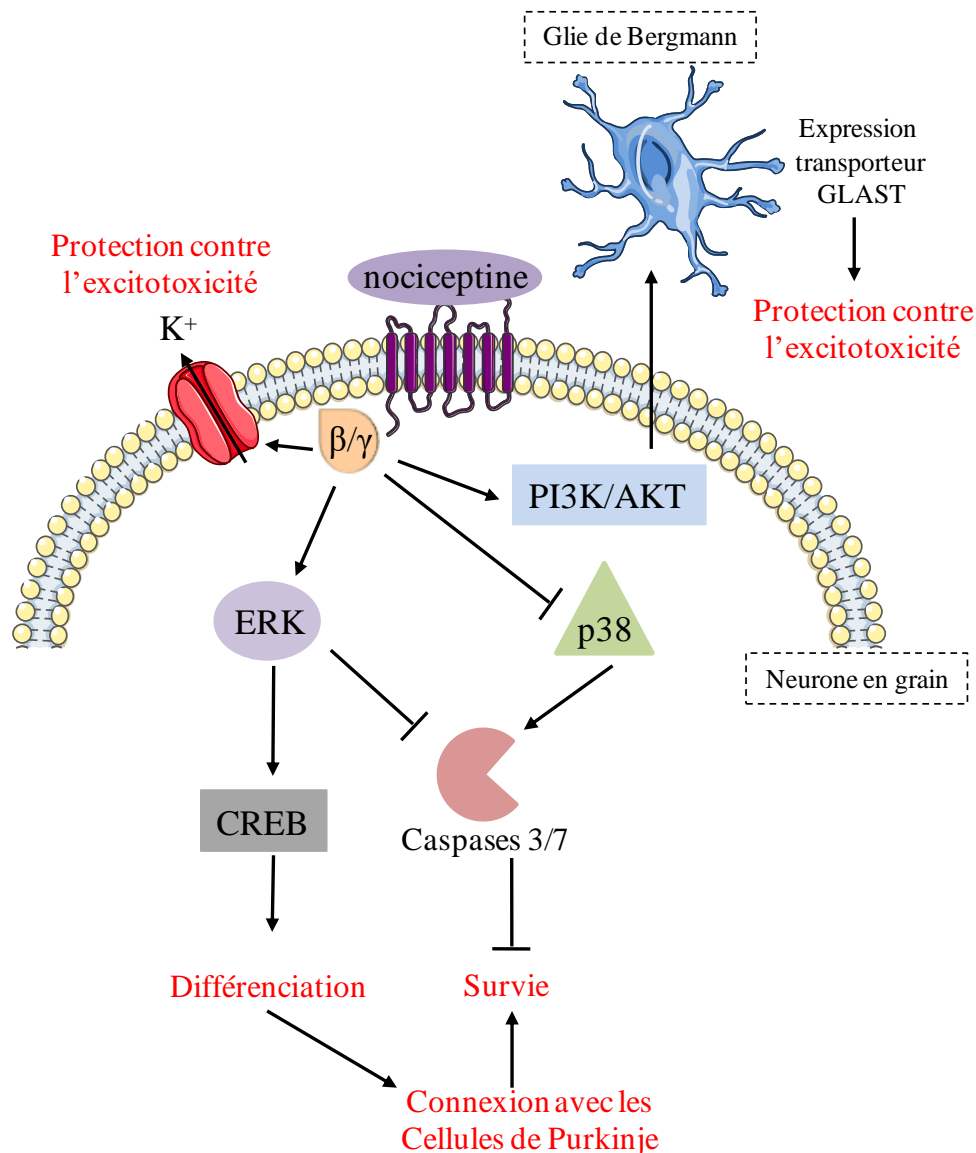
Néanmoins, la nociceptine active aussi la phosphorylation de CREB et de ERK par une voie AMPc / PKA dépendante dans des cellules dopaminergiques SH-SY5Y (Kim *et al.* 2002). L'activation de ERK par la nociceptine est aussi retrouvée au niveau du noyau accumbens (Chen *et al.* 2002) et dans des neurones corticaux en culture (Wang *et al.* 2010). Or, cette phosphorylation des MAP kinases ERK-1/2 est bien connue pour participer à l'effet neuroprotecteur de peptides comme le PACAP (Villalba *et al.* 1997 ; Fig. 23) ou l'ODN (Kaddour *et al.* 2013). Il n'est donc pas surprenant que nous ayons observé un effet protecteur de la nociceptine sur les NGC en culture qui passe par une diminution de l'activité des caspases

3/7. Comme pour le PACAP ou l'ODN, la nociceptine pourrait agir en stimulant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et en inhibant celle de Bax afin de préserver l'intégrité mitochondriale (Falluel-Morel *et al.* 2004 ; Kaddour *et al.* 2013). En plus d'agir sur les NGC *in vitro*, des expériences préliminaires montrent que la nociceptine est aussi capable de réduire l'augmentation de l'activité des caspases 3/7 induite par l'éthanol *in vivo*.

La littérature a aussi montré que l'homéostasie du potassium joue un rôle important dans la survie des NGC, puisque la privation de KCl dans le milieu de culture entraîne l'apoptose de la moitié des neurones au bout de 24 h (Hernández-Martínez *et al.* 2011). Agir sur les canaux potassiques comme peut le faire le PACAP sur les canaux voltage-dépendants est un moyen de favoriser la survie des NGC en culture (Castel *et al.* 2006). Comme le récepteur NOP est également capable de moduler l'ouverture des canaux potassiques GIRK (Connor *et al.* 1996 ; Vaughan *et al.* 1997) exprimés par les NGC (Mathie *et al.* 2003), la nociceptine pourrait exercer son effet neuroprotecteur par cette voie de transduction. De plus, l'activation de ces canaux potassiques entraîne une hyperpolarisation des neurones conduisant à une diminution de leur excitabilité qui peut être associée à une moindre sensibilité à l'excitotoxicité induite par le glutamate. Etant donné que le glutamate n'exerce un effet sur la survie que des NGC matures (Monti and Contestabile 2000 ; Amani *et al.* 2016) et participe à l'établissement de leurs synapses glutamatergiques avec les cellules de Purkinje, la nociceptine pourrait réduire la phase d'apoptose tardive impliquée dans l'élimination des NGC n'ayant pas établi de connexions (Lossi *et al.* 2002). Pour compléter cette possible interaction entre la nociceptine et la voie glutamatergique, une étude récente montre que la nociceptine induit une augmentation dose-dépendante de l'expression et de l'activité du transporteur GLAST dans des cultures d'astrocytes corticaux *via* la voie PI3K/AKT (Meyer *et al.* 2017), ce qui pourrait favoriser la recapture du neurotransmetteur par les astrocytes et ainsi limiter sa toxicité sur les NGC.

L'ensemble de ces données suggère donc que l'effet neurotrophique de la nociceptine pourrait passer par une activation de la voie MAP kinase ERK, une inhibition de la voie p-38 *in vitro* et/ou une meilleure résistance à l'excitotoxicité du glutamate *in vivo* (Fig. 23). Au regard de nos résultats sur l'expression et la fonction de la nociceptine et de son récepteur ainsi que des données de la littérature, nous pensons que ce peptide pourrait agir sur les NGC arrivant dans la CGI pour favoriser leur survie en les protégeant contre l'excitotoxicité du glutamate et en activant une voie PKA / CREB / MAP kinase ERK aboutissant à une diminution de l'activité des caspases (Fig. 23). Par son action sur les MAP kinases, la nociceptine favoriserait aussi la différenciation des NGC pour leur permettre d'établir des connexions avec leur partenaires,

parmi lesquels les cellules de Purkinje. Ces effets neuroprotecteur et prodifférenciateur de la nociceptine pourraient protéger les NGC de la vague d'apoptose tardive chargée d'éliminer les cellules non ou mal intégrées dans le réseau neuronal du cortex cérébelleux.

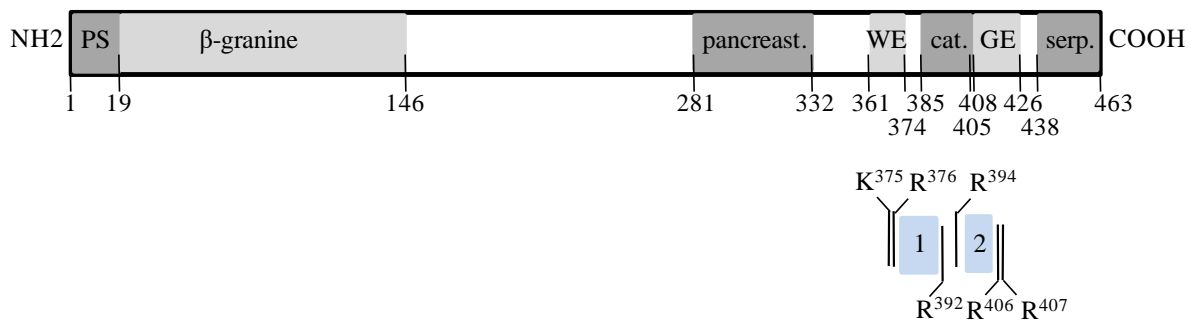


**Figure 23 : Proposition de mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans l'effet de la nociceptine sur la survie et la différenciation des neurones en grain.** La fixation de la nociceptine sur son récepteur entraîne son couplage avec la protéine  $G_i/0$ . La sous-unité  $\beta/\gamma$  inhibe la phosphorylation de la MAP kinase p38 ce qui lève son activation des caspases 3/7. La MAP kinase ERK est activée, favorisant la survie et la phosphorylation du facteur CREB qui augmente la différenciation. Cette différenciation implique la mise en place de connexions avec les cellules de Purkinje, protégeant les neurones en grain de l'apoptose tardive. L'activation du récepteur de la nociceptine entraîne aussi la protection contre l'excitotoxicité *via* l'activation des canaux potassiques et l'expression du transporteur du glutamate GLAST par la glie de Bergmann

### 3. Découverte de nouveaux peptides

#### 3.1. Peptides issus de la *Neuropeptide rat database*

La réalisation du peptidome du cervelet au cours du développement a permis d'identifier 33 peptides exprimés de façon récurrente. Parmi ces 33 peptides, 19 sont issus de précurseurs connus mais ne correspondent à aucun peptide biologiquement actif répertorié dans la littérature. Néanmoins ces 19 séquences ne semblent pas liées à un clivage aléatoire puisqu'elles sont flanquées d'acides aminés basiques, présentent une expression récurrente à plusieurs stades de développement et sont issues de 5 précurseurs déjà riches en peptides connus pour 4 d'entre eux. En effet, la chromogranine A (Fig. 24), la *neurosecretory protein VGF*, et les sécrétogranines 1 et 2 sont les précurseurs de nombreux peptides biologiquement actifs. Finalement, seule la sécrétogranine 3 ne présente encore aucun peptide décrit.



**Figure 24 : Structure de la chromogranine A et localisation de ses peptides.** La majorité des peptides issus de la chromogranine A est située en C-terminal de la protéine. En gris les peptides connus, en bleu les peptides identifiés par spectrométrie de masse. 1 : chromogranine A [377-391] ; 2 : chromogranine A [395-405] ; cat : catestatine ; GE : GE 44 ; pancreastat : pancreastatine ; PS : peptide signal ; serp : serpinine ; WE : WE-14.

Les doublets basiques entourant les séquences de nouveaux peptides potentiels que nous avons identifiés pourraient être des sites de clivage par des PCs, les enzymes impliquées dans la biosynthèse des peptides. Ces doublets basiques jouent un rôle essentiel dans la maturation des peptides puisque l'inactivation chez des souris du gène de la PC 1/3 entraîne une diminution du clivage en N- et C-terminal des fragments chromogranine A [372-380] et sécrétogranine 1 [435-451], [585-594] et [597-611] (Wardman *et al.* 2010). Parmi les 6 fragments issus du VGF que nous avons retrouvés dans nos échantillons, l'un d'entre eux est régulé au cours du développement. Nous avons testé ce fragment [353-372] du VGF sur la survie des NGC en culture sans pouvoir mettre en évidence d'effet. Ce peptide pourrait cependant agir sur d'autres processus cellulaires comme c'est le cas du TLPQ-62, un autre peptide de 62 acides aminés issu du VGF, qui augmente la prolifération des progéniteurs neuronaux de l'hippocampe (Thakker-Varia *et al.* 2014). Certaines de ces 6 séquences du VGF ont déjà été identifiées dans la



littérature, comme le peptide [24-63] (Lee *et al.* 2010), le peptide [180-209], désigné sous le nom de *neuroendocrine regulatory peptide-3* (NERP-3) ou NAPPE-19 ou le peptide [488-507] appelé NERP-4 ou AQEE-30 (Sasaki *et al.* 2010). Ces 2 derniers peptides ont été découverts en utilisant la spectrométrie de masse pour identifier les peptides relargués par exocytose dans des cultures cellulaires et sont capables d'induire une réponse calcique transitoire dans du tissu hypothalamique et hypophysaire (Sasaki *et al.* 2010). Le peptide NAPPE-19 provoque aussi le relargage de la vasopressine au niveau de l'hypophyse antérieure (Fujihara *et al.* 2012). Le peptide AQEE-30, quant à lui favorise la survie des neurones striataux en culture (Noda *et al.* 2015). Il apparaît donc que si certaines des 19 séquences peptidiques issues de précurseurs connus présentent une activité biologique, pour la plupart d'entre elles aucune fonction n'a été rapportée à ce jour et devrait donc être maintenant recherchée.

### 3.2. Peptides issus du séquençage *de novo*

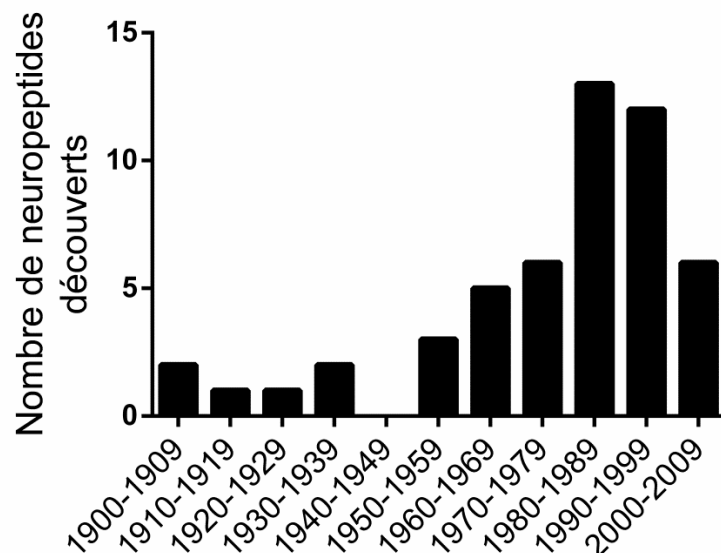
La découverte de nouveaux neuropeptides potentiels au sein de précurseurs connus, nous a poussés à nous interroger sur la présence éventuelle de peptides totalement inconnus dans le cervelet en développement. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons utilisé une approche par séquençage *de novo* afin d'identifier tous les peptides présents dans nos échantillons. Parmi les 19 000 séquences n'appartenant pas à des protéines connues chez le rat, seules 17 sont retrouvées de façon récurrente au sein des échantillons. Même lorsque le seuil de récurrence est abaissé à 5 fois sur 10 (au lieu de 7 fois sur 10), le nombre de séquences ne dépasse pas 60. Ce faible nombre implique que la quasi-totalité des séquences ne sont pas répétées, et pourraient donc provenir de produits de dégradation aléatoire de protéines. Cependant, nous avons observé que certaines séquences sont présentes sous plusieurs formes. Cette variabilité est communément rencontrée lors de séquençage *de novo* et est due à l'erreur expérimentale de masse qui entraîne parfois l'inversion de 2 acides aminés en début ou fin de séquence, là où le séquençage par MS/MS est le moins précis (Muth and Renard 2017). Il peut également s'agir d'un acide aminé modifié dont la masse est très proche d'un autre acide aminé. Ce cas a été observé pour l'une des 17 séquences retrouvées de façon récurrente où l'asparagine acétylée possède une masse très proche de celle du couple glycine-valine. Ces erreurs de séquençage nécessitent une vérification manuelle très longue mais dans le cadre d'une analyse informatique automatisée augmentent de façon erronée la diversité des séquences et diminuent donc en conséquence le nombre de séquences récurrentes. A ce stade de notre analyse, les séquences qui apparaissent régulées au cours du développement ont été identifiées comme des

fragments de protéines chez différentes espèces, il s'agit maintenant de savoir si ce sont simplement des produits de dégradation de protéines, ou si certaines pourraient finalement correspondre à des peptides bioactifs. Pour essayer de répondre à cette question il est possible de s'intéresser à la régulation de ces protéines et à leur rôle éventuel au cours du développement. La *zinc finger protein 804A* dont est issue la séquence LEDLKTE est fortement exprimée au moment de la naissance dans l'hippocampe, en particulier au niveau des cônes de croissance des neurites (Hinna *et al.* 2015). De plus, cette protéine favorise l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire ce qui suggère qu'elle pourrait promouvoir la différenciation, la synaptogenèse et/ou la migration neuronale (Hill *et al.* 2012). Les protéines dont sont issues les 5 autres séquences ne semblent pas impliquées dans le développement. Afin de déterminer si ces séquences pourraient correspondre à des peptides bioactifs, plusieurs stratégies sont possibles comme l'alignement évolutif ou la recherche de caractéristiques de séquences.

L'alignement évolutif peut se faire à partir de la séquence peptidique ou génomique afin d'identifier les régions les plus conservées au cours de l'évolution qui sont les plus susceptibles d'exercer une fonction biologique. Cette méthode a été utilisée pour réaliser le peptidome d'une espèce de termite et a permis d'identifier 163 peptides prédits dont la séquence est très proche de peptides connus chez d'autres espèces d'arthropodes (Christie 2015). Certaines catégories de peptides présentent des caractéristiques précises au niveau de leur hydrophobicité, de leur charge et de leur conformation. C'est le cas des peptides antimicrobiens qui peuvent donc être recherchés sur la base de ces critères. Pour cela, des équipes utilisent des outils bioinformatiques puissants comme le *machine learning* qui permet d'entraîner un algorithme à reconnaître ces caractéristiques avant de l'appliquer sur un jeu de données (Vishnepolsky and Pirtskhalava 2014 ; Speck-Planche *et al.* 2016). Cette méthode est également applicable à la recherche de peptides avec un domaine d'interaction avec une protéine, un site de reconnaissance pour une enzyme ou un motif pouvant subir une modification post-traductionnelle (Zatylny-Gaudin *et al.* 2016). Malgré l'utilité de ces techniques pour sélectionner les séquences présentant le plus de probabilité d'être des peptides bioactifs, la recherche d'une activité par des expériences *in vitro* ou *in vivo*, est une étape de validation indispensable.

Après une période d'intense découverte de neuropeptides dans les années 80 et 90, le nombre de neuropeptides caractérisés au cours de ces dernières années a sensiblement décru (Fig. 25). Cela pourrait être dû au fait que la grande majorité des peptides bioactifs présentant des critères classiques (issus de précurseurs par clivage enzymatiques, sécrétés par la voie régulée, agissant *via* un récepteur...) ont déjà été découverts. Il faudrait donc chercher du côté des séquences

moins conventionnelles comme c'est le cas par exemple de l'ODN. En effet, l'ODN présente plusieurs spécificités parmi lesquelles la présence d'une lysine en C-terminal et l'absence de peptide signal au niveau de son précurseur l'*acyl-CoA-binding protein* à l'origine d'une sécrétion par une voie non conventionnelle qui pourrait être de type autophagique (Loomis *et al.* 2010). Très récemment, un nouveau type de peptides a aussi été découvert appelés les micropeptides. Cette avancée a été réalisée en montrant que des ARNs que l'on pensait jusque là non-codants, sont non seulement très conservés au cours de l'évolution mais aussi régulés par des facteurs de transcription (Guttman *et al.* 2009). Il a ensuite été montré que ces ARNs proviennent de petits cadres de lecture ouverts n'ayant pas été considérés comme des gènes en raison de leur taille mais présents et conservés par centaines dans le génome de l'Homme et d'espèces modèles (Ladoukakis *et al.* 2011 ; Mackowiak *et al.* 2015). Enfin, les séquences issues de la traduction de ces ARNs ont été identifiées par spectrométrie de masse (Slavoff *et al.* 2013) et certaines présentent un effet biologique sur le développement ou l'activité transcriptionnelle (Kondo *et al.* 2007, 2010 ; Chng *et al.* 2013). Ces quelques exemples montrent que la recherche de nouveaux neuropeptides ne doit plus se limiter à l'étude des formes classiques mais doit également prêter attention à des séquences moins conventionnelles qui pourraient se révéler biologiquement actives.



**Figure 25 : Evolution du nombre de neuropeptides découverts depuis 1900.** . Les neuropeptides et leurs dates de découvertes sont issus du Handbook of biologically active peptides seconde édition publiée par AJ. Kastin en 2013 (Academic press).

# **Conclusion et perspectives**



L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse contribue à la compréhension de l'implication des peptides dans la mise en place du cortex cérébelleux, et plus particulièrement au rôle de la nociceptine.

Les peptides impliqués dans le développement du cervelet étant souvent surexprimés pendant cette phase de développement, une identification et une quantification de ces peptides a été réalisée par spectrométrie de masse, à partir d'une base de données de tous les neuropeptides et précurseurs de neuropeptides que nous avons pu identifier. Cela nous a permis de mettre en évidence que, parmi les 33 neuropeptides exprimés de façon récurrente dans le cervelet de rat, 4 présentent un profil d'expression particulier avec une forte expression pendant le développement mais qui diminue ensuite à l'âge adulte. Cependant, en raison d'une très faible concentration en protéines par rapport au stade adulte, nous n'avons pas pu analyser le stade P1. Dans le but de quantifier les peptides exprimés à ce stade précoce du développement, nous prévoyons d'analyser ces échantillons en prenant comme référence le stade P8 qui, moins concentré en protéines que P90, permettra une normalisation plus facile avec les échantillons provenant des rats nouveaux nés. Si la quantité de peptides reste trop faible pour une détection dans ce milieu complexe, nous pourrions cibler spécifiquement les peptides que nous avons trouvés exprimés par targeted MS/MS. Parmi les 4 peptides identifiés comme différentiellement exprimés au cours du développement, nous avons choisi d'étudier l'implication de la nociceptine dans la mise en place des neurones en grain du cervelet.

Pour confirmer les résultats obtenus par spectrométrie de masse, l'expression des gènes de la nociceptine et de son récepteur ont été mesurés dans le cervelet au cours du développement. Ces 2 gènes présentent une expression transitoire avec une fenêtre temporelle commune, qu'il conviendra d'affiner en augmentant le nombre de stades étudiés. Afin d'identifier le type cellulaire et le lieu d'expression de ces gènes, des expériences de microdissection ont été conduites et ont montré qu'ils sont retrouvés majoritairement dans la couche granulaire interne. De plus, le gène de la nociceptine et de son récepteur sont exprimés par les neurones en grain du cervelet qui constituent les cellules majoritaires de cette couche. Afin de renforcer ces résultats, nous réaliserons un marquage de la nociceptine et de son récepteur par immunohistochimie, ce qui nous permettra de situer précisément leurs lieux d'expression.

La nociceptine augmente la survie et la différenciation des neurones en grain en culture mais n'agit pas sur leur migration. Les 2 premiers paramètres étant très liés au cours du développement, il est possible que l'effet de la nociceptine sur la survie soit à la fois direct en

protégeant les neurones lors de leur arrivée dans la couche granulaire interne du cortex, mais aussi indirect, puisque favoriser la différenciation neuronale permet aux cellules de mieux résister à la phase d'apoptose tardive. Afin de caractériser les voies intracellulaires impliquées dans ces processus, nous commencerons par mesurer l'activation ou l'inhibition de différents seconds messagers par la nociceptine, avant d'utiliser des inhibiteurs spécifiques des voies activées dont en particulier les MAP kinases p-38 et ERK qui sont, selon la littérature, les plus susceptibles de médier les effets neurotrophiques de la nociceptine. Les expériences préliminaires réalisées *in vivo* montrent que le peptide est capable de réduire l'activité des caspases 3/7 induite par une injection d'éthanol. Afin de confirmer ces premiers résultats, nous mesurerons l'expression des gènes de ces caspases ainsi que ceux d'autres protéines impliquées dans la cascade apoptotique tels que Bax et Bcl-2. Nous examinerons ensuite l'histologie du cortex cérébelleux après injection d'éthanol et/ou de nociceptine afin d'en observer l'effet potentiel sur l'épaisseur des différentes couches cellulaires. Enfin, nous prévoyons de réaliser des tests comportementaux sur les rats comme le test de géotaxie négative ou de retournement, pour évaluer l'impact de ces injections sur le fonctionnement du cervelet. En plus des administrations de nociceptine, nous pourrions aussi évaluer le rôle endogène de la nociceptine en utilisant des animaux chez qui le précurseur du peptide ou le récepteur ont été invalidés (Sakoori and Murphy 2010).

La réalisation du peptidome du cervelet en développement nous a conduits à identifier 19 séquences issues de précurseurs connus et présentant les caractéristiques de neuropeptides tels que la présence à l'extrémité de leurs séquences de sites de clivage par les prohormones convertases. Ces peptides ne possédant aucune activité connue dans la littérature, il sera intéressant d'étudier leurs effets potentiels sur la migration, la différenciation et/ou la survie des neurones en grain. Afin de réduire le nombre de ces séquences à 2 ou 3 peptides synthétisables, nous réaliserons des alignements évolutifs pour mesurer leur degré de conservation et nous chercherons dans ces séquences la présence de motifs pouvant être reconnus par des prohormones convertases ou d'acides aminés pouvant être modifiés comme l'amidation C-terminale. En plus de ces peptides potentiels, le séquençage *de novo* nous a permis d'identifier des peptides dont l'expression est récurrente au sein du cervelet. Parmi les 17 séquences, 6 présentent un profil d'expression suggérant leur implication dans le développement. Après interrogation d'une base de données de protéines de mammifères, nous avons pu déterminer que ces 6 peptides régulés codent pour des protéines, excluant l'hypothèse de peptides totalement nouveaux. A ce stade nous effectuerons les mêmes vérifications que

pour les 19 séquences issues du peptidome, afin de déterminer si néanmoins ces séquences ne pourraient pas correspondre à des peptides bioactifs originaires de précurseurs connus, ou s'il s'agit de produits de dégradation des protéines. Dans ce dernier cas, cela pourrait signifier que ces protéines, présentes de façon récurrente et régulée au cours du développement, pourraient avoir un rôle dans la mise en place du cortex cérébelleux.





# **Références bibliographiques**



- Alcántara S, Ruiz M, De Castro F, Soriano E, Sotelo C (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Dev Camb Engl* 127:1359–1372
- Alder J, Kallman S, Palmieri A, Khadim F, Ayer JJ, Kumar S, Tsung K, Grinberg I, Thakker-Varia S (2013) Neuropeptide orphanin FQ inhibits dendritic morphogenesis through activation of RhoA. *Dev Neurobiol* 73:769–784
- Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H, Gonzalez BJ (2007) Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Eur J Neurosci* 25:2604–2618
- Allen RG, Peng B, Pellegrino MJ, Miller ED, Grandy DK, Lundblad JR, Washburn CL, Pintar JE (2001) Altered processing of pro-orphanin FQ/nociceptin and pro-opiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:5864–5870
- Altman J, Bayer SA (1985) Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. *J Comp Neurol* 231:42–65
- Altman J, Sudarshan K (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 23:896–920
- Amani N, Soodi M, Daraei B, Dashti A (2016) Chlorpyrifos Toxicity in Mouse Cultured Cerebellar Granule Neurons at Different Stages of Development: Additive Effect on Glutamate-Induced Excitotoxicity. *Cell J* 18:464–472
- Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298:240–244
- Arasanz CP, Staines WR, Roy EA, Schweizer TA (2012) The cerebellum and its role in word generation: a cTBS study. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav* 48:718–724
- Arcuri L, Viaro R, Bido S, Longo F, Calcagno M, Fernagut P-O, Zaveri NT, Calò G, Bezdard E, Morari M (2016) Genetic and pharmacological evidence that endogenous nociceptin/orphanin FQ contributes to dopamine cell loss in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 89:55–64
- Armengol JA, Sotelo C (1991) Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in “in vitro” slices. *Brain Res Dev Brain Res* 64:95–114
- Balsters JH, Cussans E, Diedrichsen J, Phillips KA, Preuss TM, Rilling JK, Ramnani N (2010) Evolution of the cerebellar cortex: the selective expansion of prefrontal-projecting cerebellar lobules. *NeuroImage* 49:2045–2052
- Bankoul S, Neuhuber WL (1990) A cervical primary afferent input to vestibular nuclei as demonstrated by retrograde transport of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase in the rat. *Exp Brain Res* 79:405–411

- Barbaccia ML, Berkovich A, Guarneri P, Slobodyansky E (1990) DBI (diazepam binding inhibitor): the precursor of a family of endogenous modulators of GABAA receptor function. History, perspectives, and clinical implications. *Neurochem Res* 15:161–168
- Barmack NH (2003) Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Res Bull* 60:511–541
- Basille M, Vaudry D, Coulouarn Y, Jegou S, Lihmann I, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B (2000) Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development. *J Comp Neurol* 425:495–509
- Basille-Dugay M, Hamza MM, Tassery C, Parent B, Raoult E, Bénard M, Raisman-Vozari R, Vaudry D, Burel DC (2013) Spatio-temporal characterization of the pleiotrophinergic system in mouse cerebellum: evidence for its key role during ontogenesis. *Exp Neurol* 247:537–551
- Bates B, Rios M, Trumpp A, Chen C, Fan G, Bishop JM, Jaenisch R (1999) Neurotrophin-3 is required for proper cerebellar development. *Nat Neurosci* 2:115–117
- Baumann O, Mattingley JB (2012) Functional topography of primary emotion processing in the human cerebellum. *NeuroImage* 61:805–811
- Bayliss WM, Starling EH (1902) The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol* 28:325–353
- Bedini A, Baiula M, Vincelli G, Formaggio F, Lombardi S, Caprini M, Spampinato S (2017) Nociceptin/orphanin FQ antagonizes lipopolysaccharide-stimulated proliferation, migration and inflammatory signaling in human glioblastoma U87 cells. *Biochem Pharmacol* 140:89–104
- Berry M, Bradley P (1976) The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. *Brain Res* 112:1–35
- Berthele A, Platzer S, Dworzak D, Schadrack J, Mahal B, Büttner A, Aßmus HP, Wurster K, Zieglgänsberger W, Conrad B, Tölle TR (2003) [3h]-nociceptin ligand-binding and nociceptin opioid receptor mrna expression in the human brain. *Neuroscience* 121:629–640
- Bicknell AB (2008) The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol* 20:692–699
- Bodenant C, Laquerrière A, Paresy M, Hemet J, Vaudry H, Leroux P (1997) Somatostatin does not affect multiplication of granule cells in the rat cerebellum. *Peptides* 18:257–262
- Bomberg EM, Grace MK, Levine AS, Olszewski PK (2006) Functional interaction between nociceptin/orphanin FQ and alpha-melanocyte-stimulating hormone in the regulation of feeding. *Peptides* 27:1827–1834
- Borghesani PR, Peyrin JM, Klein R, Rubin J, Carter AR, Schwartz PM, Luster A, Corfas G, Segal RA (2002) BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Dev Camb Engl* 129:1435–1442

- Botez MI, Gravel J, Attig E, Vézina JL (1985) Reversible chronic cerebellar ataxia after phenytoin intoxication: possible role of cerebellum in cognitive thought. *Neurology* 35:1152–1157
- Botia B, Jolivel V, Burel D, Le Joncour V, Roy V, Naassila M, Bénard M, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D (2011) Neuroprotective effects of PACAP against ethanol-induced toxicity in the developing rat cerebellum. *Neurotox Res* 19:423–434
- Brakch N, Galanopoulou AS, Patel YC, Boileau G, Seidah NG (1995) Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett* 362:143–146
- Brodal P, Bjaalie JG (1997) Salient anatomic features of the cortico-ponto-cerebellar pathway. *Prog Brain Res* 114:227–249
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK (1994) Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 347:284–288
- Callu D, Puget S, Faure A, Guegan M, El Massioui N (2007) Habit learning dissociation in rats with lesions to the vermis and the interpositus of the cerebellum. *Neurobiol Dis* 27:228–237
- Calo G, Rizzi A, Rizzi D, Bigoni R, Guerrini R, Marzola G, Marti M, McDonald J, Morari M, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D (2002) [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH<sub>2</sub>, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol* 136:303–311
- Cameron DB, Galas L, Jiang Y, Raoult E, Vaudry D, Komuro H (2007) Cerebellar cortical-layer-specific control of neuronal migration by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience* 146:697–712
- Carrà G, Rizzi A, Guerrini R, Barnes TA, McDonald J, Hebbes CP, Mela F, Kenigs VA, Marzola G, Rizzi D, Gavioli E, Zucchini S, Regoli D, Morari M, Salvadori S, Rowbotham DJ, Lambert DG, Kapusta DR, Calo' G (2005) [(pF)Phe4,Arg14,Lys15]N/OFQ-NH<sub>2</sub> (UFP-102), a highly potent and selective agonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 312:1114–1123
- Castel H, Vaudry D, Mei Y-A, Lefebvre T, Basille M, Desrues L, Fournier A, Vaudry H, Tonon M-C, Gonzalez BJ (2006) The delayed rectifier channel current I<sub>K</sub> plays a key role in the control of programmed cell death by PACAP and ethanol in cerebellar granule neurons. *Ann N Y Acad Sci* 1070:173–179
- Chan AS, Wong YH (2000) Regulation of c-Jun N-terminal kinase by the ORL(1) receptor through multiple G proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1094–1100
- Chang MM, Leeman SE, Niall HD (1971) Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biol* 232:86–87
- Chatterji B, Pich A (2013) MALDI imaging mass spectrometry and analysis of endogenous peptides. *Expert Rev Proteomics* 10:381–388

- Chee MJ, Price CJ, Statnick MA, Colmers WF (2011) Nociceptin/orphanin FQ suppresses the excitability of neurons in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 589:3103–3114
- Chen Y, Chang M, Wang ZZ, Chen LX, Yang Q, Qi YM, Wang R (2002) [Nphe1]nociceptin(1-13)-NH<sub>2</sub> antagonizes nociceptin-induced hypotension, bradycardia, and hindquarters vasodilation in the anesthetized rat. *Can J Physiol Pharmacol* 80:31–35
- Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B (2013) ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev Cell* 27:672–680
- Christie AE (2015) In silico prediction of a neuropeptidome for the eusocial insect *Mastotermes darwiniensis*. *Gen Comp Endocrinol* 224:69–83
- Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D’Ercole AJ (2001) Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:1481–1489
- Ciccocioppo R, Angeletti S, Sanna PP, Weiss F, Massi M (2000) Effect of nociceptin/orphanin FQ on the rewarding properties of morphine. *Eur J Pharmacol* 404:153–159
- Clynen E, Baggerman G, Veelaert D, Cerstiaens A, Van der Horst D, Harthoorn L, Derua R, Waelkens E, De Loof A, Schoofs L (2001) Peptidomics of the pars intercerebralis-corpora cardiaca complex of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Eur J Biochem* 268:1929–1939
- Coleman J, Inukai M, Inouye M (1985) Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. *Cell* 43:351–360
- Collins LM, Dal Bo G, Calcagno M, Monzón-Sandoval J, Sullivan AM, Gutierrez H, Morari M, O’Keeffe GW (2016) Nociceptin/Orphanin FQ Inhibits the Survival and Axon Growth of Midbrain Dopaminergic Neurons Through a p38-MAPK Dependent Mechanism. *Mol Neurobiol* 53:7284–7297
- Connor M, Vaughan CW, Chieng B, Christie MJ (1996) Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro. *Br J Pharmacol* 119:1614–1618
- Corbani M, Gonindard C, Meunier J-C (2004) Ligand-regulated internalization of the opioid receptor-like 1: a confocal study. *Endocrinology* 145:2876–2885
- Corboz MR, Rivelli MA, Egan RW, Tulshian D, Matasi J, Fawzi AB, Benbow L, Smith-Torhan A, Zhang H, Hey JA (2000) Nociceptin inhibits capsaicin-induced bronchoconstriction in isolated guinea pig lung. *Eur J Pharmacol* 402:171–179
- Coulouarn Y, Jégou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihmann I (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* 457:28–32
- Coulouarn Y, Lihmann I, Jégou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog

- and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15803–15808
- Crepel F, Delhaye-Bouchaud N, Dupont JL (1981) Fate of the multiple innervation of cerebellar Purkinje cells by climbing fibers in immature control, x-irradiated and hypothyroid rats. *Brain Res* 227:59–71
- Cruz MT, Herman MA, Kallupi M, Roberto M (2012) Nociceptin/orphanin FQ blockade of corticotropin-releasing factor-induced gamma-aminobutyric acid release in central amygdala is enhanced after chronic ethanol exposure. *Biol Psychiatry* 71:666–676
- Curry WJ, Barkatullah SC, Johansson AN, Quinn JG, Norlen P, Connolly CK, McCollum AP, McVicar CM (2002) WE-14, a chromogranin a-derived neuropeptide. *Ann N Y Acad Sci* 971:311–316
- D'Agata F, Caroppo P, Baudino B, Caglio M, Croce M, Bergui M, Tamietto M, Mortara P, Orsi L (2011) The recognition of facial emotions in spinocerebellar ataxia patients. *Cerebellum Lond Engl* 10:600–610
- D'Agostino B, Orlotti D, Calò G, Sullo N, Russo M, Guerrini R, De Nardo M, Mazzeo F, Candeletti S, Rossi F (2010) Nociceptin modulates bronchoconstriction induced by sensory nerve activation in mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42:250–254
- Dale HH (1909) The Action of Extracts of the Pituitary Body. *Biochem J* 4:427–447
- Danielson PB, Dores RM (1999) Molecular evolution of the opioid/orphanin gene family. *Gen Comp Endocrinol* 113:169–186
- Das KP, Chao SL, White LD, Haines WT, Harry GJ, Tilson HA, Barone S (2001) Differential patterns of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA and protein levels in developing regions of rat brain. *Neuroscience* 103:739–761
- Dautzenberg FM, Wichmann J, Higelin J, Py-Lang G, Kratzeisen C, Malherbe P, Kilpatrick GJ, Jenck F (2001) Pharmacological characterization of the novel nonpeptide orphanin FQ/nociceptin receptor agonist Ro 64-6198: rapid and reversible desensitization of the ORL1 receptor in vitro and lack of tolerance in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 298:812–819
- De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C (2004) Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10464–10469
- De Zeeuw CI, Berrebi AS (1995) Postsynaptic targets of Purkinje cell terminals in the cerebellar and vestibular nuclei of the rat. *Eur J Neurosci* 7:2322–2333
- Dean I, Robertson SJ, Edwards FA (2003) Serotonin drives a novel GABAergic synaptic current recorded in rat cerebellar purkinje cells: a Lugaro cell to Purkinje cell synapse. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23:4457–4469



- Depner UB, Reinscheid RK, Takeshima H, Brune K, Zeilhofer HU (2003) Normal sensitivity to acute pain, but increased inflammatory hyperalgesia in mice lacking the nociceptin precursor polypeptide or the nociceptin receptor. *Eur J Neurosci* 17:2381–2387
- Devine DP, Watson SJ, Akil H (2001) Nociceptin/orphanin FQ regulates neuroendocrine function of the limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 102:541–553
- Di Giannuario A, Pieretti S (2000) Nociceptin differentially affects morphine-induced dopamine release from the nucleus accumbens and nucleus caudate in rats. *Peptides* 21:1125–1130
- Diamond A (2000) Close interrelation of motor development and cognitive development and of the cerebellum and prefrontal cortex. *Child Dev* 71:44–56
- Diño MR, Willard FH, Mugnaini E (1999) Distribution of unipolar brush cells and other calretinin immunoreactive components in the mammalian cerebellar cortex. *J Neurocytol* 28:99–123
- Douglass J, Civelli O, Herbert E (1984) Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. *Annu Rev Biochem* 53:665–715
- Du Vigneaud V, Ressler C, Trippett S (1953) The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 205:949–957
- Dugué GP, Dumoulin A, Triller A, Dieudonné S (2005) Target-dependent use of co-released inhibitory transmitters at central synapses. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25:6490–6498
- Dumont M, Lemaire S (1998) Characterization of the high affinity [3H]nociceptin binding site in membrane preparations of rat heart: correlations with the non-opioid dynorphin binding site. *J Mol Cell Cardiol* 30:2751–2760
- Dumoulin A, Triller A, Dieudonné S (2001) IPSC kinetics at identified GABAergic and mixed GABAergic and glycinergic synapses onto cerebellar Golgi cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:6045–6057
- Economidou D, Fedeli A, Fardon RM, Weiss F, Massi M, Ciccocioppo R (2006) Effect of novel nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor ligands on ethanol drinking in alcohol-preferring msP rats. *Peptides* 27:3299–3306
- Economidou D, Hansson AC, Weiss F, Terasmaa A, Sommer WH, Cippitelli A, Fedeli A, Martin-Fardon R, Massi M, Ciccocioppo R, Heilig M (2008) Dysregulation of nociceptin/orphanin FQ activity in the amygdala is linked to excessive alcohol drinking in the rat. *Biol Psychiatry* 64:211–218
- Edmondson JC, Hatten ME (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 7:1928–1934
- Ekerot CF, Jörntell H (2001) Parallel fibre receptive fields of Purkinje cells and interneurons are climbing fibre-specific. *Eur J Neurosci* 13:1303–1310

- Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R, Bernard S, Coquet L, Malagon MM, Driouich A, Chan P, Gasman S, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2012) Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* 153:4444–4456
- Eliuk S, Makarov A (2015) Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem Palo Alto Calif* 8:61–80
- ElShamy WM, Linnarsson S, Lee KF, Jaenisch R, Ernfors P (1996) Prenatal and postnatal requirements of NT-3 for sympathetic neuroblast survival and innervation of specific targets. *Dev Camb Engl* 122:491–500
- Eschenroeder AC, Vestal-Laborde AA, Sanchez ES, Robinson SE, Sato-Bigbee C (2012) Oligodendrocyte responses to buprenorphine uncover novel and opposing roles of  $\mu$ -opioid- and nociceptin/orphanin FQ receptors in cell development: implications for drug addiction treatment during pregnancy. *Glia* 60:125–136
- Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952–1955
- Faber ES, Chambers JP, Evans RH, Henderson G (1996) Depression of glutamatergic transmission by nociceptin in the neonatal rat hemisectioned spinal cord preparation in vitro. *Br J Pharmacol* 119:189–190
- Fahrion JK, Komuro Y, Li Y, Ohno N, Littner Y, Raoult E, Galas L, Vaudry D, Komuro H (2012) Rescue of neuronal migration deficits in a mouse model of fetal Minamata disease by increasing neuronal Ca<sup>2+</sup> spike frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:5057–5062
- Falluel-Morel A, Aubert N, Vaudry D, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2004) Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 91:1231–1243
- Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Galas L, Benard M, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2005) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents the effects of ceramides on migration, neurite outgrowth, and cytoskeleton remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2637–2642
- Fälth M, Sköld K, Svensson M, Nilsson A, Fenyö D, Andren PE (2007) Neuropeptidomics strategies for specific and sensitive identification of endogenous peptides. *Mol Cell Proteomics MCP* 6:1188–1197
- Fantin M, Fischetti C, Trapella C, Morari M (2007) Nocistatin inhibits 5-hydroxytryptamine release in the mouse neocortex via presynaptic Gi/o protein linked pathways. *Br J Pharmacol* 152:549–555
- Ferrero P, Santi MR, Conti-Tronconi B, Costa E, Guidotti A (1986) Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:827–831

- Florin S, Meunier J, Costentin J (2000) Autoradiographic localization of [3H]nociceptin binding sites in the rat brain. *Brain Res* 880:11–16
- Fornari RV, Soares JCK, Ferreira TL, Moreira KM, Oliveira MGM (2008) Effects of nociceptin/orphanin FQ in the acquisition of contextual and tone fear conditioning in rats. *Behav Neurosci* 122:98–106
- Fricker LD (2012) Neuropeptides and other bioactive peptides: from discovery to function. <http://sci-hub.cc/10.4199/c00058ed1v01y201205npe003>
- Fricker LD, McKinzie AA, Sun J, Curran E, Qian Y, Yan L, Patterson SD, Courchesne PL, Richards B, Levin N, Mzhavia N, Devi LA, Douglass J (2000) Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20:639–648
- Fricker LD, Snyder SH (1982) Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3886–3890
- Fu Y, Rusznák Z, Herculano-Houzel S, Watson C, Paxinos G (2013) Cellular composition characterizing postnatal development and maturation of the mouse brain and spinal cord. *Brain Struct Funct* 218:1337–1354
- Fujihara H, Sasaki K, Mishiro-Sato E, Ohbuchi T, Dayanithi G, Yamasaki M, Ueta Y, Minamino N (2012) Molecular characterization and biological function of neuroendocrine regulatory peptide-3 in the rat. *Endocrinology* 153:1377–1386
- Fukuda K, Shoda T, Morikawa H, Kato S, Mori K (1997) Activation of mitogen-activated protein kinase by the nociceptin receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett* 412:290–294
- Gallo V, Ciotti MT, Coletti A, Aloisi F, Levi G (1982) Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci* 79:7919–7923
- Garfield AS, Lam DD, Marston OJ, Przydzial MJ, Heisler LK (2009) Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 20:203–215
- Gigoux V, Escrieut C, Silvente-Poirot S, Maignet B, Gouilleux L, Fehrentz JA, Gully D, Moroder L, Vaysse N, Fourmy D (1998) Met-195 of the cholecystokinin-A receptor interacts with the sulfated tyrosine of cholecystokinin and is crucial for receptor transition to high affinity state. *J Biol Chem* 273:14380–14386
- Giolli RA, Torigoe Y, Blanks RH, McDonald HM (1988) Projections of the dorsal and lateral terminal accessory optic nuclei and of the interstitial nucleus of the superior fasciculus (posterior fibers) in the rabbit and rat. *J Comp Neurol* 277:608–620
- Giuliani S, Lecci A, Tramontana M, Maggi CA (1998) The inhibitory effect of nociceptin on the micturition reflex in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 124:1566–1572
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373–428

- Goeldner C, Spooren W, Wichmann J, Prinssen EP (2012) Further characterization of the prototypical nociceptin/orphanin FQ peptide receptor agonist Ro 64-6198 in rodent models of conflict anxiety and despair. *Psychopharmacology (Berl)* 222:203–214
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6666–6670
- Gompf HS, Moldavan MG, Irwin RP, Allen CN (2005) Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) inhibits excitatory and inhibitory synaptic signaling in the suprachiasmatic nucleus (SCN). *Neuroscience* 132:955–965
- Gonzalez B, Leroux P, Lamacz M, Bodenat C, Balazs R, Vaudry H (1992) Somatostatin receptors are expressed by immature cerebellar granule cells: evidence for a direct inhibitory effect of somatostatin on neuroblast activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9627–9631
- Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78:419–430
- Grant DA, McFARLING C, Gormezano I (1960) Temporal conditioning and the effect of interpolated UCS presentations in eyelid conditioning. *J Gen Psychol* 63:249–257
- Grishkat HL, Eisenman LM (1995) Development of the spinocerebellar projection in the prenatal mouse. *J Comp Neurol* 363:93–108
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68:138–149
- Guell X, Hoche F, Schmahmann JD (2015) Metalinguistic deficits in patients with cerebellar dysfunction: empirical support for the dysmetria of thought theory. *Cerebellum Lond Engl* 14:50–58
- Guerrini R, Calo G, Rizzi A, Bianchi C, Lazarus LH, Salvadori S, Temussi PA, Regoli D (1997) Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J Med Chem* 40:1789–1793
- Guillemin R, Yamazaki E, Gard DA, Jutisz M, Sakiz E (1963) In vitro secretion of thyrotropin (tsh): stimulation by a hypothalamic peptide (TRF). *Endocrinology* 73:564–572
- Guillemyn K, Starnowska J, Lagard C, Dyniewicz J, Rojewska E, Mika J, Chung NN, Utard V, Kosson P, Lipkowski AW, Chevillard L, Arranz-Gibert P, Teixidó M, Megarbane B, Tourwé D, Simonin F, Przewlocka B, Schiller PW, Ballet S (2016) Bifunctional peptide-based opioid agonist-nociceptin antagonist ligands for dual treatment of acute and neuropathic pain. *J Med Chem* 59:3777–3792
- Gündüz O, Rizzi A, Baldisserotto A, Guerrini R, Spagnolo B, Gavioli EC, Kocsis L, Magyar A, Benyhe S, Borsodi A, Calò G (2006) In vitro and in vivo pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor ligand Ac-RYYRIK-ol. *Eur J Pharmacol* 539:39–48

- Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458:223–227
- Halford WP, Gebhardt BM, Carr DJ (1995) Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. *J Neuroimmunol* 59:91–101
- Hashiba E, Lambert DG, Jenck F, Wichmann J, Smith G (2002) Characterisation of the non-peptide nociceptin receptor agonist, Ro64-6198 in Chinese hamster ovary cells expressing recombinant human nociceptin receptors. *Life Sci* 70:1719–1725
- Hashimoto I, Kimura T, Tanosaki M, Iguchi Y, Sekihara K (2003) Muscle afferent inputs from the hand activate human cerebellum sequentially through parallel and climbing fiber systems. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 114:2107–2117
- Hashimoto K, Kano M (2005) Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. *Neurosci Res* 53:221–228
- Hatten ME, Lynch M, Rydel RE, Sanchez J, Joseph-Silverstein J, Moscatelli D, Rifkin DB (1988) In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev Biol* 125:280–289
- Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R (2006) Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12138–12143
- Hernández-Martínez JM, Domínguez G, Blancas S, Morán J (2011) Oxidation of biomolecules in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by potassium deprivation. *Neurochem Res* 36:677–685
- Hester R, Garavan H (2004) Executive dysfunction in cocaine addiction: evidence for discordant frontal, cingulate, and cerebellar activity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:11017–11022
- Hewes RS, Taghert PH (2001) Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res* 11:1126–1142
- Hibi M, Shimizu T (2012) Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol* 72:282–301
- Higgins GA, Kew JNC, Richards JG, Takeshima H, Jenck F, Adam G, Wichmann J, Kemp JA, Grottick AJ (2002) A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. *Eur J Neurosci* 15:911–922
- Hill MJ, Jeffries AR, Dobson RJB, Price J, Bray NJ (2012) Knockdown of the psychosis susceptibility gene ZNF804A alters expression of genes involved in cell adhesion. *Hum Mol Genet* 21:1018–1024
- Hinna KH, Rich K, Fex-Svenningsen Å, Benedikz E (2015) The rat homolog of the schizophrenia susceptibility gene ZNF804A is highly expressed during brain development, particularly in growth cones. *PLoS One* 10:e0132456

- Hirai H, Pang Z, Bao D, Miyazaki T, Li L, Miura E, Parris J, Rong Y, Watanabe M, Yuzaki M, Morgan JI (2005) Cbln1 is essential for synaptic integrity and plasticity in the cerebellum. *Nat Neurosci* 8:1534–1541
- Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J, Hwang S-R (2008) Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:393–423
- Horak FB, Buchanan J, Creath R, Jeka J (2002) Vestibulospinal control of posture. *Adv Exp Med Biol* 508:139–145
- Hore J, Wild B, Diener HC (1991) Cerebellar dysmetria at the elbow, wrist, and fingers. *J Neurophysiol* 65:563–571
- Houtani T, Nishi M, Takeshima H, Sato K, Sakuma S, Kakimoto S, Ueyama T, Noda T, Sugimoto T (2000) Distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice. *J Comp Neurol* 424:489–508
- Hu S, Cui W, Mak S, Xu D, Hu Y, Tang J, Choi C, Lee M, Pang Y, Han Y (2015) Substantial Neuroprotective and Neurite Outgrowth-Promoting Activities by Bis(propyl)-cognitin via the Activation of Alpha7-nAChR, a Promising Anti-Alzheimer's Dimer. *ACS Chem Neurosci* 6:1536–1545
- Hughes J (1975) Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res* 88:295–308
- Ikeda K, Watanabe M, Ichikawa T, Kobayashi T, Yano R, Kumanishi T (1998) Distribution of prepro-nociceptin/orphanin FQ mRNA and its receptor mRNA in developing and adult mouse central nervous systems. *J Comp Neurol* 399:139–151
- Ilijic E, Guidotti A, Mugnaini E (2005) Moving up or moving down? Malpositioned cerebellar unipolar brush cells in reeler mouse. *Neuroscience* 136:633–647
- Iloeje SO (1992) Cerebellar ataxia in childhood: a review of clinical features, investigative findings and aetiology in 30 cases. *East Afr Med J* 69:58–63
- Inagaki S, Shiosaka S, Sekitani M, Noguchi K, Shimada S, Takagi H (1989) In situ hybridization analysis of the somatostatin-containing neuron system in developing cerebellum of rats. *Brain Res Mol Brain Res* 6:289–295
- Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78:272–303
- Jackson W (1841) Cases of Diseases of the Cerebellum: Read before the Sheffield Medical Society. *Prov Med Surg J* 3:251–254
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ, Nothacker HP, Civelli O (1997) Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14854–14858

- Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, Breitsprecher D (2014) MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J Mol Struct* 1077:101–113
- Johnson EE, Connor M (2007) Towards a receptor for nocistatin? *Br J Pharmacol* 152:415–416
- Jungnickel SR-F, Yao M, Shen P-J, Gundlach AL (2005) Induction of galanin receptor-1 (GalR1) expression in external granule cell layer of post-natal mouse cerebellum. *J Neurochem* 92:1452–1462
- Kaddour H, Hamdi Y, Vaudry D, Basille M, Desrues L, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon M-C, Amri M, Masmoudi-Kouki O (2013) The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway. *J Neurochem* 125:620–633
- Kalinichenko SG, Okhotin VE (2005) Unipolar brush cells--a new type of excitatory interneuron in the cerebellar cortex and cochlear nuclei of the brainstem. *Neurosci Behav Physiol* 35:21–36
- Kallupi M, Scuppa G, de Guglielmo G, Calò G, Weiss F, Statnick MA, Rorick-Kehn LM, Ciccocioppo R (2017a) Genetic Deletion of the Nociceptin/Orphanin FQ Receptor in the Rat Confers Resilience to the Development of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 42:695–706
- Kallupi M, Scuppa G, de Guglielmo G, Calò G, Weiss F, Statnick MA, Rorick-Kehn LM, Ciccocioppo R (2017b) Genetic Deletion of the Nociceptin/Orphanin FQ Receptor in the Rat Confers Resilience to the Development of Drug Addiction. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 42:695–706
- Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K (2000) Neurotrophin-3 controls proliferation of granular precursors as well as survival of mature granule neurons in the developing rat cerebellum. *J Neurochem* 74:1923–1930
- Kaufman GD, Mustari MJ, Miselis RR, Perachio AA (1996) Transneuronal pathways to the vestibulocerebellum. *J Comp Neurol* 370:501–523
- Kiefer MC, Tucker JE, Joh R, Landsberg KE, Saltman D, Barr PJ (1991) Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol* 10:757–769
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12048–12052
- Kim M-S, Cheong Y-P, So H-S, Lee K-M, Son Y, Lee C-S, Yun J-S, Park R (2002) Regulation of cyclic AMP-dependent response element-binding protein (CREB) by the nociceptin/orphanin FQ in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291:663–668
- Kimura Y, Fujita M, Hong J, Lohith TG, Gladding RL, Zoghbi SS, Tauscher JA, Goebel N, Rash KS, Chen Z, Pedregal C, Barth VN, Pike VW, Innis RB (2011) Brain and whole-body imaging in rhesus monkeys of 11C-NOP-1A, a promising PET radioligand for

- nociceptin/orphanin FQ peptide receptors. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 52:1638–1645
- King M, Chang A, Pasternak GW (1998) Functional blockade of opioid analgesia by orphanin FQ/nociceptin. *Biochem Pharmacol* 55:1537–1540
- King MA, Rossi GC, Chang AH, Williams L, Pasternak GW (1997) Spinal analgesic activity of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *Neurosci Lett* 223:113–116
- Komuro H, Fahrion J (2013) Role of galanin in neuronal cell migration after brain injury. *Neurosci Meet Plan New Orleans Soc Neuroscience* 219.07/A7
- Komuro H, Rakic P (1992) Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science* 257:806–809
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95–97
- Komuro H, Rakic P (1995) Dynamics of granule cell migration: a confocal microscopic study in acute cerebellar slice preparations. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 15:1110–1120
- Komuro H, Rakic P (1998) Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 18:1478–1490
- Komuro H, Yacubova E, Yacubova E, Rakic P (2001) Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:527–540
- Kondo T, Hashimoto Y, Kato K, Inagaki S, Hayashi S, Kageyama Y (2007) Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA. *Nat Cell Biol* 9:660–665
- Kondo T, Plaza S, Zanet J, Benrabah E, Valenti P, Hashimoto Y, Kobayashi S, Payre F, Kageyama Y (2010) Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during *Drosophila* embryogenesis. *Science* 329:336–339
- Kubo T, Nonomura T, Enokido Y, Hatanaka H (1995) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can prevent apoptosis of rat cerebellar granule neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 85:249–258
- Kumada T, Komuro Y, Li Y, Hu T, Wang Z, Littner Y, Komuro H (2010) Inhibition of cerebellar granule cell turning by alcohol. *Neuroscience* 170:1328–1344
- Labarrère P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon M-C, Dubessy C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Calas B, Pacaud P, Vaudry H (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *J Enzyme Inhib Med Chem* 18:77–88
- Ladoukakis E, Pereira V, Magny EG, Eyre-Walker A, Couso JP (2011) Hundreds of putatively functional small open reading frames in *Drosophila*. *Genome Biol* 12:R118



- Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R, Deininger S-O, Walch A, Aubry F, Suckau D, Pineau C (2011) Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20-microm resolution. *Mol Cell Proteomics MCP* 10:M110.005991
- Lagarrigue M, Lavigne R, Guével B, Com E, Chaurand P, Pineau C (2012) Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry: a promising technique for reproductive research. *Biol Reprod* 86:74
- Lainé J, Axelrad H (1994) The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339:159–173
- Landeira BS, Santana TT da S, Araújo JA de M, Tabet EI, Tannous BA, Schroeder T, Costa MR (2016) Activity-Independent Effects of CREB on Neuronal Survival and Differentiation during Mouse Cerebral Cortex Development. *Cereb Cortex N Y N 1991*
- Lecci A, Giuliani S, Tramontana M, Criscuoli M, Maggi CA (2000) Multiple sites of action in the inhibitory effect of nociceptin on the micturition reflex. *J Urol* 163:638–645
- de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, Gautvik KM, Schweitzer P, Danielson PE, Dunlop CL, Siggins GR, Henriksen SJ, Sutcliffe JG (1996) A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242–245
- Lee JE, Atkins N, Hatcher NG, Zamdborg L, Gillette MU, Sweedler JV, Kelleher NL (2010) Endogenous Peptide Discovery of the Rat Circadian Clock: a focused study of the suprachiasmatic nucleus by ultrahigh performance tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics MCP* 9:285–297
- Leggett JD, Harbuz MS, Jessop DS, Fulford AJ (2006) The nociceptin receptor antagonist [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin/orphanin FQ-NH2 blocks the stimulatory effects of nociceptin/orphanin FQ on the HPA axis in rats. *Neuroscience* 141:2051–2057
- Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP (2004) Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol* 270:393–410
- Li Y, Komuro Y, Fahrion JK, Hu T, Ohno N, Fenner KB, Wootton J, Raoult E, Galas L, Vaudry D, Komuro H (2012) Light stimuli control neuronal migration by altering of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:2630–2635
- Limperopoulos C, Bassan H, Gauvreau K, Robertson RL, Sullivan NR, Benson CB, Avery L, Stewart J, Soul JS, Ringer SA, Volpe JJ, duPlessis AJ (2007) Does cerebellar injury in premature infants contribute to the high prevalence of long-term cognitive, learning, and behavioral disability in survivors? *Pediatrics* 120:584–593
- Lohith TG, Zoghbi SS, Morse CL, Araneta MF, Barth VN, Goebel NA, Tauscher JT, Pike VW, Innis RB, Fujita M (2012) Brain and whole-body imaging of nociceptin/orphanin FQ peptide receptor in humans using the PET ligand 11C-NOP-1A. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 53:385–392
- Loomis WF, Behrens MM, Williams ME, Anjard C (2010) Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes. *J Biol Chem* 285:21359–21365

- Lossi L, Mioletti S, Merighi A (2002) Synapse-independent and synapse-dependent apoptosis of cerebellar granule cells in postnatal rabbits occur at two subsequent but partly overlapping developmental stages. *Neuroscience* 112:509–523
- Lou LG, Zhang Z, Ma L, Pei G (1998) Nociceptin/orphanin FQ activates mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells expressing opioid receptor-like receptor. *J Neurochem* 70:1316–1322
- Lusson J, Vieau D, Hamelin J, Day R, Chrétien M, Seidah NG (1993) cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6691–6695
- Mackowiak SD, Zauber H, Bielow C, Thiel D, Kutz K, Calviello L, Mastrobuoni G, Rajewsky N, Kempa S, Selbach M, Obermayer B (2015) Extensive identification and analysis of conserved small ORFs in animals. *Genome Biol* 16:179
- Makman MH, Lyman WD, Dvorkin B (1997) Presence and characterization of nociceptin (orphanin FQ) receptor binding in adult rat and human fetal hypothalamus. *Brain Res* 762:247–250
- Malagon M, Vaudry H, Van Strien F, Pelletier G, Gracia-Navarro F, Tonon MC (1993a) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57:777–786
- Malagon M, Vaudry H, Van Strien F, Pelletier G, Gracia-Navarro F, Tonon MC (1993b) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57:777–786
- Mamiya T, Yamada K, Miyamoto Y, König N, Watanabe Y, Noda Y, Nabeshima T (2003) Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Psychiatry* 8:752–765
- Maricich SM, Herrup K (1999) Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol* 41:281–294
- Martens L, Hermjakob H, Jones P, Adamski M, Taylor C, States D, Gevaert K, Vandekerckhove J, Apweiler R (2005) PRIDE: the proteomics identifications database. *Proteomics* 5:3537–3545
- Marti M (2005) Blockade of Nociceptin/Orphanin FQ Transmission Attenuates Symptoms and Neurodegeneration Associated with Parkinson's Disease. *J Neurosci* 25:9591–9601
- Mathie A, Clarke CE, Ranatunga KM, Veale EL (2003) What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? *Cerebellum Lond Engl* 2:11–25
- Matsushita H, Ishihara A, Mashiko S, Tanaka T, Kanno T, Iwaasa H, Ohta H, Kanatani A (2009) Chronic intracerebroventricular infusion of nociceptin/orphanin FQ produces body weight gain by affecting both feeding and energy metabolism in mice. *Endocrinology* 150:2668–2673

- Mattick RP, Ali R, White JM, O'Brien S, Wolk S, Danz C (2003) Buprenorphine versus methadone maintenance therapy: a randomized double-blind trial with 405 opioid-dependent patients. *Addict Abingdon Engl* 98:441–452
- Meraldi JP, Hruby VJ, Brewster AI (1977) Relative conformational rigidity in oxytocin and (1-penicillamine)-oxytocin: a proposal for the relationship of conformational flexibility to peptide hormone agonism and antagonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1373–1377
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J (1995b) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532–535
- Meyer LC, Paisley CE, Mohamed E, Bigbee JW, Kordula T, Richard H, Lutfy K, Sato-Bigbee C (2017) Novel role of the nociceptin system as a regulator of glutamate transporter expression in developing astrocytes. *Glia* 65:2003–2023
- Middleton FA, Strick PL (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev* 31:236–250
- Miller FD, Gauthier AS (2007) Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54:357–369
- Mittal N, Roberts K, Pal K, Bentolila LA, Fultz E, Minasyan A, Cahill C, Pradhan A, Conner D, DeFea K, Evans C, Walwyn W (2013) Select G-protein-coupled receptors modulate agonist-induced signaling via a ROCK, LIMK, and  $\beta$ -arrestin 1 pathway. *Cell Rep* 5:1010–1021
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574
- Mollereau C, Mouledous L (2000) Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* 21:907–917
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341:33–38
- Molnár Z, Clowry G (2012) Cerebral cortical development in rodents and primates. *Prog Brain Res* 195:45–70
- Monti B, Contestabile A (2000) Blockade of the NMDA receptor increases developmental apoptotic elimination of granule neurons and activates caspases in the rat cerebellum. *Eur J Neurosci* 12:3117–3123
- Montiel JL, Cornille F, Roques BP, Noble F (1997) Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J Neurochem* 68:354–361
- Moran TD, Abdulla FA, Smith PA (2000) Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides* 21:969–976

- Morando L, Cesa R, Rasetti R, Harvey R, Strata P (2001) Role of glutamate delta -2 receptors in activity-dependent competition between heterologous afferent fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9954–9959
- Murphy NP, Lee Y, Maidment NT (1999) Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference. *Brain Res* 832:168–170
- Muth T, Renard BY (2017) Evaluating de novo sequencing in proteomics: already an accurate alternative to database-driven peptide identification? *Brief Bioinform* bbx033
- Nahon JL, Schoepfer R, Vale W (1989) cDNA sequence of salmon melanin-concentrating hormone exhibits similarities with 7SL RNA. *Nucleic Acids Res* 17:3598
- Nair RM, Barrett JF, Bowers CY, Schally AV (1970) Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. *Biochemistry (Mosc)* 9:1103–1106
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278:423–427
- Nakayama K, Kim WS, Torii S, Hosaka M, Nakagawa T, Ikemizu J, Baba T, Murakami K (1992) Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J Biol Chem* 267:5897–5900
- Nathoo AN, Moeller RA, Westlund BA, Hart AC (2001) Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditis elegans* and other species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14000–14005
- Neal CR, Akil H, Watson SJ (2001) Expression of orphanin FQ and the opioid receptor-like (ORL1) receptor in the developing human and rat brain. *J Chem Neuroanat* 22:219–249
- Neal CR, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker H-P, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1999a) Opioid receptor-like(ORL 1) receptor distribution in the rat central nervous system: Comparison of ORL 1 receptor mRNA expression with 125 I-[14 Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 412:563–605
- Neal CR, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ (1999b) Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 406:503–547
- Nicot A, Lelièvre V, Tam J, Waschek JA, DiCicco-Bloom E (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:9244–9254
- Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J (1998) Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *Neuroreport* 9:2639–2642
- Noda Y, Shimazawa M, Tanaka H, Tamura S, Inoue T, Tsuruma K, Hara H (2015) VGF and striatal cell damage in in vitro and in vivo models of Huntington's disease. *Pharmacol Res Perspect* 3:e00140

- Norton CS, Neal CR, Kumar S, Akil H, Watson SJ (2002) Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems. *J Comp Neurol* 444:358–368
- Okawa H, Kudo M, Kudo T, Guerrini R, Lambert DG, Kushikata T, Yoshida H, Matsuki A (2001) Effects of nociceptinNH<sub>2</sub> and [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> on rat brain noradrenaline release in vivo and in vitro. *Neurosci Lett* 303:173–176
- Okuda-Ashitaka E, Ito S (2000) Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides* 21:1101–1109
- Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tachibana S, Yoshihara Y, Nishiuchi Y, Kimura T, Ito S (1998) Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature* 392:286–289
- Oostland M, Buijink MR, van Hooft JA (2013) Serotonergic control of Purkinje cell maturation and climbing fibre elimination by 5-HT<sub>3</sub> receptors in the juvenile mouse cerebellum. *J Physiol* 591:1793–1807
- Oostland M, Buijink MR, Teunisse GM, von Oerthel L, Smidt MP, van Hooft JA (2014) Distinct temporal expression of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors on cerebellar granule cells in mice. *Cerebellum Lond Engl* 13:491–500
- Osinski MA, Pampusch MS, Murtaugh MP, Brown DR (1999) Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract. *Eur J Pharmacol* 365:281–289
- Ouchi Y, Okada H, Yoshikawa E, Nobezawa S, Futatsubashi M (1999) Brain activation during maintenance of standing postures in humans. *Brain J Neurol* 122 ( Pt 2):329–338
- Pampusch MS, Serie JR, Osinski MA, Seybold VS, Murtaugh MP, Brown DR (2000) Expression of nociceptin/OFQ receptor and prepro-nociceptin/OFQ in lymphoid tissues. *Peptides* 21:1865–1870
- Park CR, Kim D-K, Cho EB, You D-J, do Rego JL, Vaudry D, Sun W, Kim H, Seong JY, Hwang J-I (2012a) Spatiotemporal expression and functional implication of CXCL14 in the developing mice cerebellum. *Mol Cells* 34:289–293
- Park CR, Kim D-K, Cho EB, You D-J, do Rego JL, Vaudry D, Sun W, Kim H, Seong JY, Hwang J-I (2012b) Spatiotemporal expression and functional implication of CXCL14 in the developing mice cerebellum. *Mol Cells* 34:289–293
- Peluso J, LaForge KS, Matthes HW, Kreek MJ, Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C (1998) Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* 81:184–192
- Pert A, Simantov R, Snyder SH (1977) A morphine-like factor in mammalian brain: analgesic activity in rats. *Brain Res* 136:523–533
- Petersson LME, Sundler F, Danielsen N (2002) Expression of orphanin FQ/nociceptin and its receptor in rat peripheral ganglia and spinal cord. *Brain Res* 945:266–275

- Pichitpornchai C, Rawson JA, Rees S (1994) Morphology of parallel fibres in the cerebellar cortex of the rat: an experimental light and electron microscopic study with biocytin. *J Comp Neurol* 342:206–220
- Polidori C, Calo G, Ciccocioppo R, Guerrini R, Regoli D, Massi M (2000) Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperphagia: identification of a selective antagonist. *Psychopharmacology (Berl)* 148:430–437
- Pons S, Trejo JL, Martínez-Morales JR, Martí E (2001) Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Dev Camb Engl* 128:1481–1492
- Ramirez VD, Nallar R, Mccann SM (1964) PURIFICATION OF LUTEINIZING HORMONE-RELEASING FACTOR FROM BEEF HYPOTHALAMUS. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* 115:1072–1076
- Raoult E, Bénard M, Komuro H, Lebon A, Vivien D, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D, Galas L (2014) Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum. *J Neurochem* 130:241–254
- Raoult E, Roussel BD, Bénard M, Lefebvre T, Ravni A, Ali C, Vivien D, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D, Galas L (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates the expression and the release of tissue plasminogen activator (tPA) in neuronal cells: involvement of tPA in the neuroprotective effect of PACAP: tPA mediates the neuroprotective effect of PACAP. *J Neurochem* 119:920–931
- Redrobe JP, Calo G, Guerrini R, Regoli D, Quirion R (2000) [Nphe(1)]-Nociceptin (1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *Br J Pharmacol* 131:1379–1384
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ, Civelli O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270:792–794
- Reiss K, Mentlein R, Sievers J, Hartmann D (2002) Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 115:295–305
- Ring RH, Alder J, Fennell M, Kouranova E, Black IB, Thakker-Varia S (2006) Transcriptional profiling of brain-derived-neurotrophic factor-induced neuronal plasticity: A novel role for nociceptin in hippocampal neurite outgrowth. *J Neurobiol* 66:361–377
- Rios I, Alvarez-Rodríguez R, Martí E, Pons S (2004) Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Dev Camb Engl* 131:3159–3168
- Rizzi A, Spagnolo B, Wainford RD, Fischetti C, Guerrini R, Marzola G, Baldisserotto A, Salvadori S, Regoli D, Kapusta DR, Calo G (2007) In vitro and in vivo studies on UFP-112, a novel potent and long lasting agonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Peptides* 28:1240–1251

- Roberto M, Siggins GR (2006) Nociceptin/orphanin FQ presynaptically decreases GABAergic transmission and blocks the ethanol-induced increase of GABA release in central amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9715–9720
- Rorick-Kehn LM, Ciccocioppo R, Wong CJ, Witkin JM, Martinez-Grau MA, Stopponi S, Adams BL, Katner JS, Perry KW, Toledo MA, Diaz N, Lafuente C, Jiménez A, Benito A, Pedregal C, Weiss F, Statnick MA (2016) A Novel, Orally Bioavailable Nociceptin Receptor Antagonist, LY2940094, Reduces Ethanol Self-Administration and Ethanol Seeking in Animal Models. *Alcohol Clin Exp Res* 40:945–954
- Rossi GC, Leventhal L, Bolan E, Pasternak GW (1997) Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *J Pharmacol Exp Ther* 282:858–865
- Rossi GC, Mathis JP, Pasternak GW (1998) Analgesic activity of orphanin FQ2, murine prepro-orphanin FQ141-157 in mice. *Neuroreport* 9:1165–1168
- Ruiz de Almodovar C, Coulon C, Salin PA, Knevels E, Chounlamountri N, Poesen K, Hermans K, Lambrechts D, Van Geyte K, Dhondt J, Dresselaers T, Renaud J, Aragonés J, Zacchigna S, Geudens I, Gall D, Stroobants S, Mutin M, Dassonville K, Storkebaum E, Jordan BF, Eriksson U, Moons L, D’Hooge R, Haigh JJ, Belin M-F, Schiffmann S, Van Hecke P, Gallez B, Vinckier S, Chédotal A, Honnorat J, Thomasset N, Carmeliet P, Meissirel C (2010a) Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:15052–15066
- Ruiz de Almodovar C, Coulon C, Salin PA, Knevels E, Chounlamountri N, Poesen K, Hermans K, Lambrechts D, Van Geyte K, Dhondt J, Dresselaers T, Renaud J, Aragonés J, Zacchigna S, Geudens I, Gall D, Stroobants S, Mutin M, Dassonville K, Storkebaum E, Jordan BF, Eriksson U, Moons L, D’Hooge R, Haigh JJ, Belin M-F, Schiffmann S, Van Hecke P, Gallez B, Vinckier S, Chédotal A, Honnorat J, Thomasset N, Carmeliet P, Meissirel C (2010b) Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:15052–15066
- Rutten K, Tzschentke TM, Koch T, Schiene K, Christoph T (2014) Pharmacogenomic study of the role of the nociceptin/orphanin FQ receptor and opioid receptors in diabetic hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 741:264–271
- Ryan MC, Gundlach AL (1996) Localization of preprogalanin messenger RNA in rat brain: identification of transcripts in a subpopulation of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 70:709–728
- Ryan MC, Loiacono RE, Gundlach AL (1997) Galanin messenger RNA during postnatal development of the rat brain: expression patterns in Purkinje cells differentiate anterior and posterior lobes of cerebellum. *Neuroscience* 78:1113–1127
- Sacchetti B, Scelfo B, Tempia F, Strata P (2004) Long-Term Synaptic Changes Induced in the Cerebellar Cortex by Fear Conditioning. *Neuron* 42:973–982
- Saito Y, Maruyama K, Saido TC, Kawashima S (1997) Overexpression of a neuropeptide nociceptin/orphanin FQ precursor gene, N23K/N27K, induces neurite outgrowth in mouse NS20Y cells. *J Neurosci Res* 48:397–406

- Saitow F, Satake S, Yamada J, Konishi S (2000) beta-adrenergic receptor-mediated presynaptic facilitation of inhibitory GABAergic transmission at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *J Neurophysiol* 84:2016–2025
- Sakoori K and Murphy NP (2010) Reduced degeneration of dopaminergic terminals and accentuated astrocyte activation by high dose methamphetamine administration in nociceptin receptor knock out mice. *Neurosci Lett* 469 (3): 309-313
- Sakurada C, Sakurada S, Orito T, Tan-No K, Sakurada T (2002) Degradation of nociceptin (orphanin FQ) by mouse spinal cord synaptic membranes is triggered by endopeptidase-24.11: an in vitro and in vivo study. *Biochem Pharmacol* 64:1293–1303
- Sakurai K, Toyoshima M, Ueda H, Matsubara K, Takeda Y, Karagogeos D, Shimoda Y, Watanabe K (2009) Contribution of the neural cell recognition molecule NB-3 to synapse formation between parallel fibers and Purkinje cells in mouse. *Dev Neurobiol* 69:811–824
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–585
- Sandin J, Georgieva J, Silberring J, Terenius L (1999) In vivo metabolism of nociceptin/orphanin FQ in rat hippocampus. *Neuroreport* 10:71–76
- Sasaki K, Takahashi N, Satoh M, Yamasaki M, Minamino N (2010) A peptidomics strategy for discovering endogenous bioactive peptides. *J Proteome Res* 9:5047–5052
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF (1971) Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173:1036–1038
- Schilling K, Dickinson MH, Connor JA, Morgan JI (1991) Electrical activity in cerebellar cultures determines Purkinje cell dendritic growth patterns. *Neuron* 7:891–902
- Schmahmann JD, Sherman JC (1998) The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 121:561–579
- Scoto GM, Aricò G, Iemolo A, Ronsisvalle G, Parenti C (2010) Selective inhibition of the NOP receptor in the ventrolateral periaqueductal gray attenuates the development and the expression of tolerance to morphine-induced antinociception in rats. *Peptides* 31:696–700
- Second TP, Blethrow JD, Schwartz JC, Merrihew GE, MacCoss MJ, Swaney DL, Russell JD, Coon JJ, Zabrouskov V (2009) Dual-pressure linear ion trap mass spectrometer improving the analysis of complex protein mixtures. *Anal Chem* 81:7757–7765
- Segal RA, Pomeroy SL, Stiles CD (1995) Axonal growth and fasciculation linked to differential expression of BDNF and NT3 receptors in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 15:4970–4981



- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:928–933
- Seidah NG, Marcinkiewicz M, Benjannet S, Gaspar L, Beaubien G, Mattei MG, Lazure C, Mbikay M, Chrétien M (1991) Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol Endocrinol Baltim Md* 5:111–122
- Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Touré BB, Basak A, Munzer JS, Marcinkiewicz J, Zhong M, Barale JC, Lazure C, Murphy RA, Chrétien M, Marcinkiewicz M (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1321–1326
- Shih LYL, Chen L-F, Kuo W-J, Yeh T-C, Wu Y-T, Tzeng OJL, Hsieh J-C (2009) Sensory acquisition in the cerebellum: an fMRI study of cerebrocerebellar interaction during visual duration discrimination. *Cerebellum Lond Engl* 8:116–126
- Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, Clawson H, Spieth J, Hillier LW, Richards S, Weinstock GM, Wilson RK, Gibbs RA, Kent WJ, Miller W, Haussler D (2005) Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* 15:1034–1050
- Simat M, Ambrosetti L, Lardi-Studler B, Fritschy J-M (2007) GABAergic synaptogenesis marks the onset of differentiation of basket and stellate cells in mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 26:2239–2256
- Slavoff SA, Mitchell AJ, Schwaid AG, Cabili MN, Ma J, Levin JZ, Karger AD, Budnik BA, Rinn JL, Saghatelian A (2013) Peptidomic discovery of short open reading frame-encoded peptides in human cells. *Nat Chem Biol* 9:59–64
- Smeekens SP, Steiner DF (1990) Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J Biol Chem* 265:2997–3000
- Sobczak M, Mokrowiecka A, Cygankiewicz AI, Zakrzewski PK, Sałaga M, Storr M, Kordek R, Małecka-Panas E, Krajewska WM, Fichna J (2014) Anti-inflammatory and antinociceptive action of an orally available nociceptin receptor agonist SCH 221510 in a mouse model of inflammatory bowel diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 348:401–409
- Song L, Fricker LD (1995) Purification and characterization of carboxypeptidase D, a novel carboxypeptidase E-like enzyme, from bovine pituitary. *J Biol Chem* 270:25007–25013
- Sorge RE, Rajabi H, Stewart J (2005) Rats maintained chronically on buprenorphine show reduced heroin and cocaine seeking in tests of extinction and drug-induced reinstatement. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 30:1681–1692

- Sotelo C, Alvarado-Mallart RM, Frain M, Vernet M (1994) Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 14:124–133
- Spampinato S, Di Toro R, Alessandri M, Murari G (2002) Agonist-induced internalization and desensitization of the human nociceptin receptor expressed in CHO cells. *Cell Mol Life Sci CMLS* 59:2172–2183
- Spampinato S, Di Toro R, Qasem AR (2001) Nociceptin-induced internalization of the ORL1 receptor in human neuroblastoma cells. *Neuroreport* 12:3159–3163
- Speck-Planche A, Kleandrova VV, Ruso JM, Cordeiro MNDS (2016) First Multitarget Chemo-Bioinformatic Model To Enable the Discovery of Antibacterial Peptides against Multiple Gram-Positive Pathogens. *J Chem Inf Model* 56:588–598
- Stanfa LC, Chapman V, Kerr N, Dickenson AH (1996) Inhibitory action of nociceptin on spinal dorsal horn neurones of the rat, in vivo. *Br J Pharmacol* 118:1875–1877
- Statnick MA, Chen Y, Ansonoff M, Witkin JM, Rorick-Kehn L, Suter TM, Song M, Hu C, Lafuente C, Jiménez A, Benito A, Diaz N, Martínez-Grau MA, Toledo MA, Pintar JE (2016) A Novel Nociceptin Receptor Antagonist LY2940094 Inhibits Excessive Feeding Behavior in Rodents: A Possible Mechanism for the Treatment of Binge Eating Disorder. *J Pharmacol Exp Ther* 356:493–502
- Supple WF, Leaton RN, Fanselow MS (1987) Effects of cerebellar vermal lesions on species-specific fear responses, neophobia, and taste-aversion learning in rats. *Physiol Behav* 39:579–586
- Takahashi KA, Linden DJ (2000) Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 83:1167–1180
- Takumi K, Mori T, Shimizu K, Hayashi M (2005) Developmental changes in concentrations and distributions of neurotrophins in the monkey cerebellar cortex. *J Chem Neuroanat* 30:212–220
- Taniwaki T, Schwartz JP (1995) Somatostatin enhances neurofilament expression and neurite outgrowth in cultured rat cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res* 88:109–116
- Tao R, Ma Z, Thakkar MM, McCarley RW, Auerbach SB (2007) Nociceptin/orphanin FQ decreases serotonin efflux in the rat brain but in contrast to a kappa-opioid has no antagonistic effect on mu-opioid-induced increases in serotonin efflux. *Neuroscience* 147:106–116
- Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V (1982) Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296:659–660
- Tatemoto K, Jörnvall H, Siimesmaa S, Halldén G, Mutt V (1984) Isolation and characterization of cholecystinin-58 (CCK-58) from porcine brain. *FEBS Lett* 174:289–293
- Tatemoto K, Rökaeus A, Jörnvall H, McDonald TJ, Mutt V (1983) Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164:124–128

- Tatsuno I, Somogyvari-Vigh A, Arimura A (1994) Developmental changes of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptor in the rat brain. *Peptides* 15:55–60
- Taverna FA, Georgiou J, McDonald RJ, Hong NS, Kraev A, Salter MW, Takeshima H, Muller RU, Roder JC (2005) Defective place cell activity in nociceptin receptor knockout mice with elevated NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Physiol* 565:579–591
- Tay J, Goulet M, Rusche J, Boismenu R (2004) Age-related and regional differences in secretin and secretin receptor mRNA levels in the rat brain. *Neurosci Lett* 366:176–181
- Thakker-Varia S, Behnke J, Doobin D, Dalal V, Thakkar K, Khadim F, Wilson E, Palmieri A, Antila H, Rantamaki T, Alder J (2014) VGF (TLQP-62)-induced neurogenesis targets early phase neural progenitor cells in the adult hippocampus and requires glutamate and BDNF signaling. *Stem Cell Res* 12:762–777
- Tham TN, Lazarini F, Franceschini IA, Lachapelle F, Amara A, Dubois-Dalcq M (2001) Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 13:845–856
- Thomas CP, Fullerton CA, Kim M, Montejano L, Lyman DR, Dougherty RH, Daniels AS, Ghose SS, Delphin-Rittmon ME (2014) Medication-assisted treatment with buprenorphine: assessing the evidence. *Psychiatr Serv Wash DC* 65:158–170
- Thompson AJ, Abu M, Hanger DP (2012) Key issues in the acquisition and analysis of qualitative and quantitative mass spectrometry data for peptide-centric proteomic experiments. *Amino Acids* 43:1075–1085
- Tian JH, Xu W, Fang Y, Mogil JS, Grisel JE, Grandy DK, Han JS (1997) Bidirectional modulatory effect of orphanin FQ on morphine-induced analgesia: antagonism in brain and potentiation in spinal cord of the rat. *Br J Pharmacol* 120:676–680
- Tigyi G, Matute C, Miledi R (1990) Monoclonal antibodies to cerebellar pinceau terminals obtained after immunization with brain mRNA-injected *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:528–532
- Tracy JI, Faro SS, Mohammed FB, Pinus AB, Madi SM, Laskas JW (2001) Cerebellar mediation of the complexity of bimanual compared to unimanual movements. *Neurology* 57:1862–1869
- Trombella S, Vergura R, Falzarano S, Guerrini R, Calo G, Spisani S (2005) Nociceptin/orphanin FQ stimulates human monocyte chemotaxis via NOP receptor activation. *Peptides* 26:1497–1502
- Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG, Sahin M (2012) Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell *Tsc1* mutant mice. *Nature* 488:647–651
- Tsuji A, Hine C, Mori K, Tamai Y, Higashine K, Nagamune H, Matsuda Y (1994) A novel member, PC7, of the mammalian kexin-like protease family: homology to PACE4A, its

- brain-specific expression and identification of isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1452–1459
- Ueda H, Yamaguchi T, Tokuyama S, Inoue M, Nishi M, Takeshima H (1997) Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene. *Neurosci Lett* 237:136–138
- Uezu K, Sano A, Sei H, Toida K, Houtani T, Sugimoto T, Suzuki-Yamamoto T, Takeshima H, Ishimura K, Morita Y (2005) Enhanced hippocampal acetylcholine release in nociceptin-receptor knockout mice. *Brain Res* 1050:118–123
- V Euler US, Gaddum JH (1931) An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 72:74–87
- Van Dijck A, Hayakawa E, Landuyt B, Baggerman G, Van Dam D, Luyten W, Schoofs L, De Deyn PP (2011) Comparison of extraction methods for peptidomics analysis of mouse brain tissue. *J Neurosci Methods* 197:231–237
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BKC, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol Rev* 61:283–357
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H (1999) Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc Natl Acad Sci* 96:9415–9420
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fournier A, Vaudry H (2000) PACAP acts as a neurotrophic factor during histogenesis of the rat cerebellar cortex. *Ann N Y Acad Sci* 921:293–299
- Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ (2002a) PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 15:1451–1460
- Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2002b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6398–6403
- Vaughan CW, Ingram SL, Christie MJ (1997) Actions of the ORL1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons in vitro. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 17:996–1003
- van de Ven WJ, Voorberg J, Fontijn R, Pannekoek H, van den Ouweland AM, van Duijnhoven HL, Roebroek AJ, Siezen RJ (1990) Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep* 14:265–275
- Vidnyánszky Z, Görcs TJ, Hámori J (1994) Diazepam binding inhibitor fragment 33-50 (octadecaneuropeptide) immunoreactivity in the cerebellar cortex is restricted to glial cells. *Glia* 10:132–141

- Villalba M, Bockaert J, Journot L (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83–90
- Villar MJ, Hökfelt T, Brown JC (1989) Somatostatin expression in the cerebellar cortex during postnatal development. An immunohistochemical study in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 179:257–267
- Viollet C, Bodenant C, Prunotto C, Roosterman D, Schaefer J, Meyerhof W, Epelbaum J, Vaudry H, Leroux P (1997) Differential expression of multiple somatostatin receptors in the rat cerebellum during development. *J Neurochem* 68:2263–2272
- Vishnepolsky B, Pirtskhalava M (2014) Prediction of linear cationic antimicrobial peptides based on characteristics responsible for their interaction with the membranes. *J Chem Inf Model* 54:1512–1523
- Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370–375
- Wagner MJ, Kim TH, Savall J, Schnitzer MJ, Luo L (2017) Cerebellar granule cells encode the expectation of reward. *Nature* 544:96–100
- Walter P, Gilmore R, Blobel G (1984) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 38:5–8
- Wang H-L, Kuo Y-L, Hsu C-Y, Huang P-C, Li AH, Chou A-H, Yeh T-H, Chen Y-L (2006) Two C-terminal amino acids, Ser(334) and Ser(335), are required for homologous desensitization and agonist-induced phosphorylation of opioid receptor-like 1 receptors. *Cell Signal* 18:670–678
- Wang VY, Rose MF, Zoghbi HY (2005) Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron* 48:31–43
- Wardman JH, Zhang X, Gagnon S, Castro LM, Zhu X, Steiner DF, Day R, Fricker LD (2010) Analysis of peptides in prohormone convertase 1/3 null mouse brain using quantitative peptidomics. *J Neurochem* 114:215–225
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, Ma SY, Chauhan A, Chauhan V, Bobrowicz TW, de Leon M, Louis LAS, Cohen IL, London E, Brown WT, Wisniewski T (2010) The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 119:755–770
- Wei WZ, Xie CW (1999) Orphanin FQ suppresses NMDA receptor-dependent long-term depression and depotentiation in hippocampal dentate gyrus. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 6:467–477
- Wick MJ, Minnerath SR, Roy S, Ramakrishnan S, Loh HH (1995) Expression of alternate forms of brain opioid “orphan” receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Brain Res Mol Brain Res* 32:342–347
- Wingate RJ, Hatten ME (1999) The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Dev Camb Engl* 126:4395–4404

- Wolpert DM, Miall RC, Kawato M (1998) Internal models in the cerebellum. *Trends Cogn Sci* 2:338–347
- Wood KA, Dipasquale B, Youle RJ (1993) In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11:621–632
- Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2013) Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:7368–7383
- Yacubova E, Komuro H (2002) Stage-specific control of neuronal migration by somatostatin. *Nature* 415:77–81
- Ye P, Xing Y, Dai Z, D’Ercole AJ (1996) In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res* 95:44–54
- Yu TP, Xie CW (1998) Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol* 80:1277–1284
- Yuan L, Han Z, Chang JK, Han JS (1999) Accelerated release and production of orphanin FQ in brain of chronic morphine tolerant rats. *Brain Res* 826:330–334
- Zagon IS, McLaughlin PJ, Smith S (1977) Neural populations in the human cerebellum: estimations from isolated cell nuclei. *Brain Res* 127:279–282
- Zatylny-Gaudin C, Cornet V, Leduc A, Zanuttini B, Corre E, Le Corguillé G, Bernay B, Garderes J, Kraut A, Couté Y, Henry J (2016) Neuropeptidome of the Cephalopod *Sepia officinalis*: Identification, Tissue Mapping, and Expression Pattern of Neuropeptides and Neurohormones during Egg Laying. *J Proteome Res* 15:48–67
- Zaveri NT, Waleh N, Toll L (2006) Regulation of the prepronociceptin gene and its effect on neuronal differentiation. *Gene* 384:27–36
- Zhang L, Goldman JE (1996) Generation of cerebellar interneurons from dividing progenitors in white matter. *Neuron* 16:47–54
- Zhang NR, Planer W, Siuda ER, Zhao H-C, Stickler L, Chang SD, Baird MA, Cao Y-Q, Bruchas MR (2012) Serine 363 is required for nociceptin/orphanin FQ opioid receptor (NOPR) desensitization, internalization, and arrestin signaling. *J Biol Chem* 287:42019–42030
- Zhang Q, Mason CA (1998) Developmental regulation of mossy fiber afferent interactions with target granule cells. *Dev Biol* 195:75–87
- Zhang Z, Xin SM, Wu GX, Zhang WB, Ma L, Pei G (1999) Endogenous delta-opioid and ORL1 receptors couple to phosphorylation and activation of p38 MAPK in NG108-15 cells and this is regulated by protein kinase A and protein kinase C. *J Neurochem* 73:1502–1509

- Zhou P, Porcionatto M, Pilapil M, Chen Y, Choi Y, Tolias KF, Bikoff JB, Hong EJ, Greenberg ME, Segal RA (2007) Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron* 55:53–68
- Zhou XF, Rush RA (1994) Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res* 643:162–172
- Zielińska M, Ben Haddou T, Cami-Kobeci G, Sałaga M, Jarmuż A, Padysz M, Kordek R, Spetea M, Husbands SM, Fichna J (2015) Anti-inflammatory effect of dual nociceptin and opioid receptor agonist, BU08070, in experimental colitis in mice. *Eur J Pharmacol* 765:582–590
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393:595–599