

Université Louis Pasteur de Strasbourg
École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

discipline : sciences du vivant - aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

spécialité : neurosciences

par

Julien Bouissac

*Rôle de la voie Notch dans la spécification des cellules souches
neurales et dans la différenciation des précurseurs neuraux.
Utilisation du système modèle des neurosphères*

Soutenue publiquement le 06 septembre 2005

devant les membres du jury

Docteur	Éliane MOHIER	DR CNRS, Strasbourg,	Directeur de thèse
Professeur	Jean-Marc REICHHART	Professeur ULP, Strasbourg,	Rapporteur interne
Professeur	Pat SIMPSON	Professeur University of Cambridge, UK,	Rapporteur externe
Docteur	Harold CREMER	DR CNRS, Marseille,	Rapporteur externe
Docteur	Magalie LECOURTOIS	CR CNRS, Rouen,	Examineur

RÉSUMÉ

Notre équipe s'intéresse au rôle de la voie de signalisation Notch dans le devenir des cellules souches neurales et leur différenciation en neurones et en cellules gliales. Pour aborder cette étude, nous avons eu recours au système modèle des neurosphères déjà utilisé au laboratoire lorsque j'ai rejoint l'équipe d'E. Mohier. Les neurosphères sont des clones de cellules poussant en suspension qui dérivent de cellules souches neurales. Sur un support solide, les neurosphères se différencient en neurones, oligodendrocytes et astrocytes selon des proportions définies. Ce système de culture permet de distinguer expérimentalement une phase de prolifération, au cours de laquelle a lieu la spécification des différents types cellulaires (choix de l'identité cellulaire) et une phase de différenciation, au cours de laquelle les progéniteurs déjà engagés dans une voie de développement achèveront de se différencier. Cette technique permet par conséquent, de définir si un facteur (génétique ou pharmacologique) agit sur la spécification ou sur la différenciation cellulaire.

Des neurosphères mutantes pour le gène *Dll1* codant l'un des ligands du récepteur Notch montrent une forte augmentation de la proportion de neurones aux dépens des cellules gliales par rapport aux neurosphères de type sauvage. Le sauvetage du phénotype mutant par un apport exogène et transitoire d'une forme soluble du ligand Jagged1 (autre ligand de Notch) a permis de montrer que la voie Notch agit sur le devenir des cellules souches neurales en deux étapes. Dans une première étape, Notch agit sur l'alternative neurone / cellule gliale en réprimant la voie neuronale et en favorisant la voie gliale. Dans une seconde étape, Notch agit sur les progéniteurs en réprimant la différenciation des neurones et oligodendrocytes et en stimulant celle des astrocytes (publication 1). Parallèlement à ce travail, nous avons testé des petites molécules pour leur capacité à influencer le devenir des cellules souches neurales. L'une de ces molécules, le tCFA15 augmente les neurones aux dépens des cellules gliales selon des modalités proches de celles résultant de l'inactivation de la voie Notch. L'analyse moléculaire a montré que le tCFA15 provoquait une diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5*. L'étude du mécanisme d'action du tCFA15 a montré qu'il agit sur la voie STAT3, suggérant un lien entre les voies Notch et STAT3. Des expériences combinant gain et de perte de fonction pour chacune des deux voies, ont permis d'établir une hiérarchie fonctionnelle entre les gènes *Notch1* et STAT3 et de déterminer que dans les neurosphères, l'expression de *Notch1* était contrôlée par STAT3, comme l'a confirmé la biologie moléculaire (publication 2).

En parallèle de ces travaux, nous avons également testé l'effet neurotrophique d'autres petites molécules non peptidiques dans le système des neurosphères (publication 3 et 4).

Un troisième volet de mon travail a consisté à tester les effets du tCFA15 sur des lignées tumorales du système nerveux central. Nous fondant sur les effets physiologiques contraires de la voie Notch sur les neurones et oligodendrocytes, qu'elle inhibe, et sur les astrocytes, qu'elle stimule, nous avons recherché si cet effet pouvait être transposé à des lignées tumorales correspondantes (neuroblastomes, oligodendrogliomes et astrocytomes). Des résultats encore préliminaires suggèrent que c'est bien le cas, puisque le tCFA15 semble induire la différenciation des neuroblastomes et des oligodendrogliomes tandis qu'il inhibe celle des astrocytomes. Ces effets s'accompagnent respectivement d'une 'amélioration' et d'une 'aggravation' du phénotype tumoral in vitro et in vivo, ce qui illustre bien la complexité de la voie Notch dans les processus de la cancérogenèse.

ABSTRACT

In our laboratory we are interested in the role of the Notch pathway on cell fate decision of neural stem cells and on their differentiation into neurons and glia. These studies have been carried out in the model system of neurospheres, already used in Dr. Eliane Mohier's laboratory when I joined her team. Neurospheres derive clonally from neural stem cells and proliferate in suspension in the adapted cell culture medium. Once plated on a solid support where they attach, neurospheres differentiate into neurons, oligodendrocytes and astrocytes in defined proportions. Because they allow distinguishing experimentally between the proliferation phase (during which cell fate decisions occur) and the differentiation phase (during which differentiation of committed progenitors occurs), neurospheres allow determining whether a factor (either genetic or pharmacologic) is acting on cell fate or differentiation.

Neurospheres prepared from *Dll1* (coding for a Notch ligand) mutant embryos segregate more neurons at the expense of both oligodendrocytes and astrocytes, compared to the wild-type ones. This mutant phenotype could be rescued when *Dll1* mutant neurospheres were cultured in the presence of a soluble form of Jagged1 (another Notch ligand). Our results indicate that the Notch pathway is acting in two steps: (i) in a first step it inhibits the neuronal fate while promoting glial fate, (ii) in a second step Notch promotes the differentiation of astrocytes while inhibiting the differentiation of both neurons and oligodendrocytes (publication 1).

In parallel to this work we have tested the effects of small non peptidic molecules on the cell fate decision of neural stem cells. One of these molecules, referred to as tCFA15, increases the number of neurons at the expense of glial cells, in a manner reminiscent of that resulting from the inactivation of Notch through the *Dll1* mutation. Molecular analysis has shown that tCFA15 consistently decreases the expression of *Notch1* gene, and subsequently of *Hes5*, a downstream target gene of Notch activation. In addition, we have shown that tCFA15 causes a diminution of the tyr705 phosphorylation of STAT3, thereby suggesting a link between both Notch and STAT3 signalings. We established a functional hierarchy between Notch and STAT3 by experiments combining gain and loss of functions for these two pathways and we found that in the system of neurospheres STAT3 is an upstream regulator of *Notch1*. These results have been confirmed by molecular analysis. (publication 2)

In parallel to this work we have also tested the neurotrophic effect of other non peptidic small molecules in the system of neurospheres (publication 3 and 4)

A third part of my work consisted in studying the effects of tCFA15 on tumor cell lines of the central nervous system. We attempted to establish a parallel between the opposite physiological effects of Notch on the differentiation of neurons, oligodendrocytes and astrocytes and a putative effect of Notch on various tumor cell lines from the central nervous system. Using tCFA15 as a pharmacological tool to modulate Notch function, preliminary data showed that tCFA15 seems to induce the differentiation of neuroblastoma and oligodendroglioma on the one hand, while it inhibits the differentiation of astrocytoma, on the other hand. These effects are complementary to an "improve" and an "aggravation" respectively of the tumor phenotype in vitro and in vivo, which shows the complexity of the Notch pathway in the process of cancer.

à mes parents

à Joffrey

à ma petite femme, Marie

sans eux, rien n'aurait été possible...

Je tiens à remercier Éliane, mon directeur de thèse, de m'avoir fait confiance durant toutes ces années. Elle m'a fait découvrir les joies de la voie Notch, un domaine aussi passionnant que complexe. Je tiens également à la remercier pour sa patience durant les moments difficiles. Enfin, je la remercie pour ses nombreux conseils et pour le travail que nous avons effectué ensemble. Elle a su me guider au mieux au cours de toutes ces années. Merci Éliane.

Je remercie les membres de mon jury de thèse de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail :

Je remercie Monsieur le professeur Jean-Marc Reichhart qui a accepté sans hésitation de faire partie de mon Jury. Il était important pour moi qu'il soit présent. C'est lui qui m'a donné goût à la biologie du développement.

Je remercie Madame le professeur Pat Simpson d'avoir accepté de venir de Cambridge pour participer au jury de ma thèse et surtout d'avoir accepté de prendre le temps de juger mes travaux malgré un emploi du temps très chargé. C'est un honneur pour moi de la compter dans mon jury, d'une part pour son expertise de la voie Notch (que je redoute) et d'autre part pour sa notoriété dans le domaine du développement.

Je remercie Monsieur le docteur Harold Cremer de venir de Marseille et d'avoir accepté de juger ce manuscrit. Son expertise de la neurogénèse des mammifères et des cellules souches neurales sera utile dans ce jury constitué en majorité de « drosophilistes ».

Enfin, je remercie Madame le docteur Magalie Lecourtois qui a accepté d'examiner mon travail et qui vient de Rouen pour assister à ma soutenance.

Je garderai un très bon souvenir de mon séjour au Centre de Neurochimie, j'y ai en effet rencontré de nombreux « collègues » qui sont vite devenus des amis. Merci à Jeremy, Valérie, Huguette, Carole, Djalil et à tous les chimistes du 4^e étage. Je ne vous oublierai jamais.

Merci à tous les étudiants stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ma thèse. J'ai essayé de vous former, de vous conseiller, de partager ma maigre expérience de la recherche avec vous et en échange, vous m'avez donné un sacré coup de main pour les manip. Un grand merci en particulier à Isa et à Lindzy.

Je tiens également à remercier Gérard Labourdette, qui a toujours été là pour moi. Ton fauteuil et « nos séances » me manqueront. Sans parler de ton expertise de la culture cellulaire qui m'a été d'une grande aide.

Je remercie également Yoichi Nakatani pour nos longues discussions et nos nombreux repas. Vous m'avez vraiment donné envie d'aller au Japon.

J'ai déjà remercié Marie Paschaki mais je le fais à nouveau. Merci pour ton soutien de tous les jours. C'est un plaisir d'avoir effectué tout ce travail avec toi, de partir en postdoc au Japon avec toi, de partager ta vie... On ne s'en sort pas si mal finalement.

Je voudrais également remercier le CNRS qui a eu la bonne idée de rénover le Centre de Neurochimie durant près de trois ans ;-). Dire que j'aurais pu utiliser des labos tout neufs et une animalerie à la pointe de la technologie...et je pars déjà. Concernant la dure période des travaux, je voudrais tout de même remercier Serges Stein, Philippe Costanzer et Bernard Poulain qui ont toujours été là pour rendre cette période moins difficile.

Enfin, je remercie la société MEIJI Dairies et l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC) qui ont eu confiance en notre sujet et qui ont financé mon doctorat.

Sommaire

Remerciements**Sommaire****Principales abréviations utilisées****Avant-propos**

CHAPITRE I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
1. Cellules souches, spécification et différenciation	2
1.1. Historique de la notion de cellule souche, exemple des cellules souches hématopoïétiques.....	2
1.2. Concepts de cellule souche, de progéniteur et de précurseur – Difficultés à établir une définition des cellules souche.....	3
1.3. Concepts d'autorenouvellement, de déterminisme, de spécification et de différenciation cellulaire	5
1.4. Totipotentialité, pluripotentialité, multipotentialité et unipotentialité	6
1.5. Potentialités développementales des cellules souches embryonnaires.....	7
1.6. Plasticité des cellules souches adultes.....	7
1.6.1. Les observations.....	7
1.6.2. Problèmes et controverses.....	9
1.7. Dédifférenciation et conversion des précurseurs en cellules souches.....	10
1.8. Des cellules souches cancéreuses ?.....	11
1.9. Un objectif : Contrôler le devenir cellulaire.....	12
2. Les cellules souches neurales (CSN)	13
2.1. Développement du système nerveux central et cellules souches neurales.....	13
2.1.1. Types cellulaires présents dans le système nerveux central	13
2.1.2. Précurseurs neuronaux et gliaux au cours du développement du système nerveux central..	14
2.1.3. Mise en place des lignages cellulaires à partir des CSN.....	15
2.2. CSN et modèle des neurosphères	17
2.2.1. Présentation du système des neurosphères.....	17
2.2.2. Applications des neurosphères.....	19
2.3. Plasticité des cellules souches neurales.....	19
2.3.1. Plasticité des CSN au sein du SNC.....	19
2.3.2. Potentialités des CSN pour la régénération du SNC.....	20
2.4. Facteurs régulant le déterminisme et la différenciation des CSN	21
2.4.1. Facteurs intrinsèques.....	21
2.4.2. Facteurs extrinsèques	21
2.4.3. Voies moléculaires et gènes impliqués	22
2.4.4. Contrôles épigénétiques	23
3. La voie Notch.....	25
3.1. Introduction générale à la voie Notch	25
3.2. Voie Notch et spécification	25
3.2.1. Signalisation unidirectionnelle (mode inductif).....	26
3.2.2. Signalisation bidirectionnelle par inhibition latérale (mode permissif).....	26
3.2.3. Signalisation au cours de la division asymétrique	27
3.3. Mécanismes moléculaires de la voie Notch	27
3.3.1. Structure des récepteurs et ligands de la voie Notch	27
3.3.1.1. Les récepteurs Notch.....	27
3.3.1.2. Les ligands de Notch : familles Delta et Serrate.....	28
3.3.2. Fragment intracellulaire de Notch et effecteurs.....	29
3.4. Modulations de l'activité de la voie Notch	30
3.4.1. Considérations évolutives	30
3.4.2. Modulation par des formes clivées des ligands	30

3.4.3.	Modulation des interactions récepteur/ligand	31
3.4.4.	Modulation par des phénomènes d'endocytose	32
3.4.5.	Modulation par les mécanismes de protéolyse	32
3.4.6.	Régulation des effecteurs et cibles de Notch : transduction CSL dépendante et indépendante	33
3.5.	Maladies et cancers liés à un dysfonctionnement de la voie Notch	33
3.5.1.	Voie Notch et maladies héréditaires	34
3.5.2.	Voie Notch et cancers	35
3.6.	Modulation thérapeutique de la voie Notch	36
3.7.	Voie Notch et neurogenèse chez les mammifères	36
3.7.1.	Voie Notch et développement du SNC des mammifères, l'apport des souris mutantes	36
3.7.2.	Rôle de Notch dans la génération et le maintien des CSN	38
3.7.3.	Rôle de Notch dans la spécification neurone / cellules gliales à partir des CSN	38
3.7.4.	Rôle de Notch dans la différenciation des neurones et des cellules gliales	39
4.	Petites molécules non peptidiques et cellules souches	40
4.1.	Avantage des petites molécules non peptidiques	40
4.2.	Méthodes de criblages	41
4.3.	Petites molécules non peptidiques régulant le devenir cellulaire	42
4.4.	A la recherche de nouvelles petites molécules non peptidiques neurotrophiques	42
CHAPITRE II - METHODES EXPERIMENTALES		44
1.	Culture cellulaire	45
1.1.	Animaux et principaux produits utilisés	45
1.1.1.	Animaux et animaleries	45
1.1.1.1.	Origine des lignées de souris transgéniques	45
1.1.1.2.	Elevage et obtention d'embryons	45
1.1.1.3.	Phénotype des embryons mutants pour Dll1 et HES1	46
1.1.2.	Origine des principaux produits utilisés pour la culture cellulaire	46
1.2.	Produits utilisés pour traiter les cellules	46
1.2.1.	Petites molécules non peptidiques	46
1.2.1.1.	Le tCFA15	46
1.2.1.2.	Les molécules de la famille des IFA	47
1.2.2.	Modulation de la voie Notch	47
1.2.2.1.	Fragment extracellulaire de Jagged1	47
1.2.2.2.	Oligonucléotides antisens dirigés contre Notch1 et Notch4	48
1.2.2.3.	Inhibiteur de gamma sécrétase de classe XII (GSI)	48
1.2.2.4.	Transfection transitoire des cellules par le domaine intracellulaire de Notch1 (ICN1)	48
1.2.3.	Modulation de l'activité de STAT3	49
1.2.3.1.	Utilisation de CNTF et de LIF pour activer STAT3	49
1.2.3.2.	Peptide bloquant de la dimérisation de STAT3	49
1.3.	Culture de neurosphères dérivant des cellules souches neurales	50
1.3.1.	Obtention de neurosphères primaires	50
1.3.2.	Entretien des cultures secondaires de neurosphères	50
1.3.3.	Différenciation des neurosphères	51
1.3.4.	Culture de neurosphères en conditions clonales	51
1.3.5.	Estimation de la proportion de CSN présentes dans les neurosphères en conditions semi-clonales	52
1.4.	Cultures primaires de neurones, astrocytes et oligodendrocytes	53
1.4.1.	Culture primaire de neurones corticaux	53
1.4.2.	Cultures primaires d'astrocytes	54
1.4.3.	Cultures de précurseurs d'oligodendrocytes	54
1.4.3.1.	Cultures primaires mixtes enrichies en cellules oligodendrogiales	54
1.4.3.2.	Cultures secondaires de précurseurs d'oligodendrocytes	55
1.5.	Culture de lignées tumorales et transformées	55
1.5.1.	Culture des lignées cellulaires	55
1.5.2.	Test de prolifération clonale en milieu semi-solide (agarose mou)	55
1.5.3.	Souris athymiques et modèles de tumeurs	57

1.6.	Test de prolifération et de mortalité cellulaire	58
1.6.1.	Essais Colorimétriques MTT	58
1.6.2.	Essais permettant de détecter les cellules vivantes et les cellules mortes.....	58
1.6.3.	Détection des cellules en mitose par incorporation de la bromodésoxyuridine (BrdU)	59
1.6.4.	Détection des cellules en apoptose par la méthode TUNEL.....	60
2.	Immunocytochimie.....	61
2.1.	Principaux anticorps utilisés.....	61
2.2.	Fixation et perméabilisation des cellules	62
2.3.	Saturation des sites aspécifiques et incubation avec les anticorps primaires	62
2.4.	Incubation avec les anticorps secondaires/tertiaires.....	63
2.5.	Marquage des noyaux.....	63
2.6.	Observation du marquage immunocytochimique	63
2.7.	Quantification des résultats et analyse statistique	63
3.	Techniques de biologie moléculaire.....	65
3.1.	Techniques relatives aux ADN (géotypage des animaux)	65
3.1.1.	Extraction de l'ADN génomique	65
3.1.2.	Technique PCR	65
3.1.2.1.	Principe de la technique d'amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR).....	65
3.1.2.2.	Amorces oligonucléotidiques utilisées (primers).....	66
3.1.2.3.	Protocole expérimental	66
3.2.	Techniques de biologie moléculaire relatives aux ARN	67
3.2.1.	Extraction des ARN totaux	67
3.2.2.	Reverse transcription.....	67
3.2.3.	Réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	67
3.2.4.	Electrophorèse des acides nucléiques	69
3.2.4.1.	Séparation électrophorétique des ADNc	69
3.2.4.2.	Séparation électrophorétique des ARN	69
3.3.	Techniques relatives aux protéines (Western-Blot)	70
3.3.1.	Préparation des échantillons.....	70
3.3.2.	Séparation par SDS-PAGE	70
3.3.3.	Transfert liquide sur membrane de nitrocellulose.....	70
3.3.4.	Immunodétection des protéines	71
CHAPITRE III - RESULTATS PRINCIPAUX.....		72
1.	La signalisation Delta/Notch agit sur la spécification et la différenciation des CSN en deux étapes.....	73
1.1.	Contexte « historique » de ces travaux.....	73
1.2.	Résumé des travaux publiés	74
1.3.	Article 1 : Delta - Notch signaling controls the generation of neurons / glia from neural stem cells in a stepwise process	75
1.4.	Données complémentaires.....	95
1.4.1.	Haploinsuffisance de Dll1 dans la spécification et la différenciation des CSN.....	95
1.4.2.	HES1 est nécessaire à l'autorenouvellement des CSN et inhibe la neurogenèse dans le système des neurosphères	95
1.4.2.1.	Objectif de ces travaux.....	95
1.4.2.2.	Obtention de neurosphères primaires à partir d'embryons mutants pour HES1	96
1.4.2.3.	HES1 est nécessaire à l'autorenouvellement des CSN dans le système des neurosphères.....	96
1.4.2.4.	L'inactivation de HES1 entraîne une augmentation de la proportion de neurones sans modification de la proportion des cellules gliales.....	97
1.4.2.5.	Les neurosphères mutantes pour HES1 se différencient plus rapidement que les sphères sauvages.....	98
1.4.3.	Analyse de l'expression des gènes clé de la voie Notch dans les neurosphères Dll1 ^{-/-}	98
2.	STAT3 contrôle le déterminisme entre neurones et cellules gliales par l'intermédiaire de Notch1	99
2.1.	Contexte de ces travaux.....	99

2.2.	Résumé des travaux présentés.....	99
2.2.1.	Effet du tCFA15 sur la différenciation des neurosphères.....	99
2.2.2.	Le tCFA15 passe par STAT3 pour inhiber Notch1.....	100
2.2.3.	STAT3 régule l'expression de Notch1.....	101
2.2.4.	Existence d'une bouche de régulation entre STAT3 et Notch1.....	101
2.3.	Article 2 : Notch1 is functionally and molecularly downstream of STAT3 in the determinism of neurons / glia from neural stem cells.....	101
2.4.	Données complémentaires.....	120
2.4.1.	Cytotoxicité du tCFA15.....	120
2.4.2.	Effet du tCFA15 sur la différenciation de cultures primaires de neurones, oligodendrocytes et astrocytes.....	120
2.4.3.	Le tCFA15 inhibe l'autorenouvellement des CSN.....	121
CHAPITRE IV - AUTRES RESULTATS.....		122
1.	Effets du tCFA15 sur des lignées tumorales du système nerveux.....	123
1.1.	Notch1 et lignées tumorales neurales.....	123
1.2.	Lignées tumorales utilisées.....	123
1.3.	Effets du tCFA15 sur des cellules d'astrocytome de rat (C6) et de neuroblastome de rat (B104).....	124
1.3.1.	Expression des gènes de la voie Notch : effets du tCFA15.....	124
1.3.2.	Effets du tCFA15 sur la phosphorylation de STAT3 dans les cellules C6 et B104.....	125
1.3.3.	Effets phénotypiques du tCFA15 sur les cellules C6 et B104.....	125
1.3.3.1.	Effet du tCFA15 sur la différenciation des cellules C6 et B104.....	125
1.3.3.2.	Effet du tCFA15 sur la prolifération in vitro et in-vivo des cellules C6 et B104.....	126
1.4.	Effets du tCFA15 sur des lignées tumorales humaines du système nerveux....	127
1.4.1.	Expression des gènes de la voie Notch et phosphorylation de STAT3 dans les lignées SHSY-5Y, TC620 et U373, effets du tCFA15.....	127
1.4.2.	Effet du tCFA15 sur la prolifération in vitro des cellules SHSY-5Y, TC620 et U373.....	128
1.4.3.	Effets du tCFA15 sur le développement de tumeurs issues des cellules SHSY-5Y, TC620 et U373, dans des souris athymiques.....	128
1.5.	Conclusions.....	128
2.	Effets des alcools gras indoliques dans la différenciation des neurosphères.....	130
2.1.	Résumé des travaux publiés.....	130
2.2.	Commentaires liés à la méthodologie utilisée pour le criblage.....	131
2.3.	Article 3: Effects of Indole Fatty Alcohols on the differentiation of Neural Stem Cell-derived Neurospheres.....	131
3.	Effets du Ginsenoside-Rd sur la différenciation des neurosphères.....	152
3.1.	Contexte de ces travaux.....	152
3.2.	Résumé des travaux publiés.....	152
3.3.	Article 4: Ginsenoside-Rd from Panax notoginseng enhances astrocyte differentiation from neural stem cells.....	153
3.4.	Données complémentaires et discussion.....	165
CHAPITRE V - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		166
1.	Rôles de la voie Notch dans l'autorenouvellement des cellules souches neurales....	167
2.	Rôle de Notch1 dans la spécification des cellules souches neurales.....	167
3.	Rôle de Hes1 et Hes5 dans la spécification et la différenciation des cellules souches neurales.....	168
4.	Rôle de Notch4 dans la spécification et la différenciation des cellules souches neurales.....	169

5. Lien fonctionnel entre Notch1 et STAT3	169
6. Existence d'une boucle de régulation de Notch1 via STAT3 ?	170
7. Rôle de la voie Notch dans les processus de cancérisation du système nerveux	171
CHAPITRE VI - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	172

Principales abréviations utilisées

Principales abréviations utilisées

A2B5	Anticorps monoclonal dirigé contre des gangliosides (GT3, GQ1c et GP1c)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
bFGF	FGF basique (ou FGF2)
bHLH	Hélice-boucle-hélice basique (« basic helix-loop-helix »)
BrdU	Bromodésoxyuridine
BSA	Sérum albumine bovine (« bovine serum albumin »)
CNTF	Facteur neurotrophique ciliaire (« ciliary neurotrophic factor »)
CSN	Cellule souche neurale
CSL	« C promoter binding factor/Suppressor of hairless/Lag-1 transcription factor »
Dll1	Homologue murin du gène Delta de la drosophile (« Delta Like-1 »)
DMEM	« Dulbecco's modified-Eagle's medium »
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DSL	Delta Serrate Lag2
E14	14 ^{ème} jour de vie embryonnaire
ECN	Domaine extracellulaire de Notch
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme (« epidermal growth factor »)
ES	Cellule souche embryonnaire (« embryonic stem cell »)
F12	Milieu nutritif, contenant 0,6% glucose, 2 mM glutamine, 3 mM sodium bicarbonate, et 5 mM de tampon HEPES
FBS	Sérum bovin de fœtus (« fetal bovine serum »)
FCS	Sérum de veau (« calf serum »)
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes (« fibroblast growth factor »)
GalC	Galactocérébroside
GFAP	Protéine acide gliofibrillaire (« gliofibrillary acidic protein »)
GSI	Inhibiteur du complexe gamma sécrétase (« gamma secretase inhibitor »)
HES	Homologue murin du gène « Enhancer of split »
ICN	Domaine intracellulaire de Notch
IFA	Alcool gras indolique (« Indol fatty Alcohol »)
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL-6	Interleukine 6
J1 ^{EC}	Fragment extracellulaire de Jagged1
JAK	Kinase Janus
kDa	KiloDalton
LIF	« Leukaemia inhibitory factor »
LNR	Motif « LIN12/Notch repeat »
MAP	Protéines associées aux microtubules
5mIFA18	3-(18-Hydroxyoctadécyl)-5-méthoxy-1/H/-indole
MTT	Bromure de 3-(4-5 diméthylthiazol-2-yl)-diphényl tétrazolium
NTM	Domaine transmembranaire de Notch
O4	Anticorps contre les sulfatides membranaires
OPC	Précurseur d'oligodendrocyte (« oligodendrocyte precursor cell »)
pb	paires de bases
PBS	Solution tamponnée à pH 7,4 (Phosphate buffered saline) contenant : NaCl 150 mM ; NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O 2,5 mM ; Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O 13 mM
PFA	Paraformaldéhyde
PM	Poids moléculaire

Poly-HEMA	Poly (2-hydroxy-éthyl-méthacrylate)
PS	Préséniline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (« Polymerase chain reaction »)
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (« Platelet-derived growth factor »)
PDGFR- α	Récepteur α au PDGF
PNS	Fraction saponine du Panax-Notigenseng
RPM	Tours par minute
RT-PCR	Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (« Reverse transcriptase polymerase chain reaction »)
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
STAT	« Signal transducers and activators of transcription »
tCFA15	2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexène-1-one
3T3	Lignée de fibroblastes de souris
T-ALL	Leucémie lymphoblastique aiguë des cellules T
TOPRO	« TOPRO-3 iodide », agent intercalant fluorescent marquant les noyaux
TUJ1	Nom d'un anticorps monoclonal dirigé contre la β 3 tubuline
TUNEL	« Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling »

Pour la typographie, nous avons tenté de respecter la convention suivante :

<i>Notch1</i> :	gène Notch1
NOTCH1 :	protéine Notch1
Notch :	dénomination plus générale, qui englobe à la fois le gène et la protéine (ex : fonction Notch, voie Notch...)

Avant-propos

La voie de signalisation Notch est à un mécanisme d'interactions cellulaires qui s'exerce essentiellement entre cellules voisines, dans de nombreux tissus, où elle participe au contrôle des principaux processus développementaux comme le choix de l'identité cellulaire, la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose.

Lorsque j'ai commencé le travail décrit dans ce manuscrit, le rôle de la voie Notch dans la neurogenèse avait été étudié chez la drosophile mais il était encore peu connu chez les mammifères. Nous nous sommes posé deux questions ; la première concernait le rôle de Notch dans la spécification des neurones et des cellules gliales à partir des cellules souches neurales et la seconde, son rôle dans la différenciation des précurseurs neuraux chez les mammifères.

Pour étudier le rôle de la voie Notch dans la spécification neurale au cours du développement embryonnaire il est difficile de travailler *in-vivo* sur des animaux transgéniques, en effet, la perte de fonction de la plupart des gènes de la voie Notch s'accompagne d'une létalité précoce des embryons (avant la gliogenèse). Nous avons donc eu recours au modèle de substitution des neurosphères. Ce modèle, qui permet de sélectionner les cellules souches neurales à des stades précoces du développement embryonnaire, nous permis d'étudier *in-vitro* l'implication de la voie Notch dans la neurogenèse à partir des cellules souches neurales.

Il est possible de sélectionner les cellules souches neurales et de les cultiver *in-vitro* dans un milieu de culture chimiquement défini dans lequel elles donnent naissance à des clones de cellules indifférenciées. Ces clones qui poussent en suspension dans le milieu de culture sont appelés neurosphères. Des lignées de cellules souches génétiquement modifiées, obtenues à partir d'embryons de souris transgéniques, peuvent ainsi être amplifiées et conservées quasi-indéfiniment sous forme de neurosphères. Lorsqu'on les cultive dans un milieu sensiblement différent et sur un substrat auquel elles adhèrent, les cellules des neurosphères se différencient et donnent naissance à des neurones, oligodendrocytes et astrocytes dans des proportions définies. Ce système de culture permet de distinguer expérimentalement une phase de prolifération, au cours de laquelle a lieu la spécification des différents types cellulaires (choix de l'identité cellulaire) et une phase de différenciation, au cours de laquelle les progéniteurs déjà engagés dans une voie de développement achèveront de se différencier. Cette technique permet par conséquent, de définir si un facteur (génétique ou pharmacologique) agit sur la spécification ou sur la différenciation cellulaire.

Dans un premier chapitre, nous décrivons les résultats obtenus à partir de l'étude de neurosphères mutantes pour certains gènes de la voie Notch.

Des neurosphères ont été préparées à partir d'embryons de type sauvage ou à partir d'embryons mutants pour le gène *Delta-like-1* (*Dll1*, codant le ligand nécessaire pour activer la voie Notch dans le système des neurosphères). L'obtention de neurosphères homozygotes mutantes *Dll1*^{-/-} indique que *Dll1* n'est pas nécessaire à la production et au maintien des cellules souches neurales. En différenciation, les neurosphères mutantes *Dll1* donnent naissance à un nombre de neurones plus important que celui obtenu à partir des neurosphères de type sauvage. Cette augmentation se produit aux dépens des cellules gliales, oligodendrocytes et astrocytes. La comparaison des phénotypes sauvages et mutants ainsi que l'étude du sauvetage du phénotype des sphères mutantes nous ont permis de montrer que la voie Notch agit à deux niveaux du développement des cellules nerveuses : au niveau de la spécification, elle favorise le devenir glial et réprime le devenir neuronal, et au niveau de la différenciation, elle favorise celle des astrocytes tandis qu'elle réprime celle des neurones et des oligodendrocytes. Ces résultats ont été publiés en 2003 (Grandbarbe, Bouissac et al., 2003).

J'ai également travaillé sur des neurosphères obtenues à partir de souris mutantes pour un des autres gènes de la voie Notch : *Hes1*. Nous avons montré que *Hes1* est nécessaire au maintien des cellules souches neurales et qu'il inhibe la différenciation des précurseurs de neurones dans le système des neurosphères. Par contre, contrairement à *Dll1*, *Hes1* ne semble pas jouer sur le choix du devenir cellulaire des cellules souches neurales. Des résultats très similaires aux nôtres ont été publiés par d'autres laboratoires avant que nous n'ayons soumis nos travaux à publication.

Dans un deuxième chapitre, nous présenterons les résultats obtenus dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR7123, où nous avons entrepris de tester l'effet de petites molécules sur les neurosphères pour en trouver qui pourraient orienter le devenir des CSN, ceci dans une perspective thérapeutique. L'intérêt du système des neurosphères réside dans le fait qu'il permet de dissocier expérimentalement le rôle d'agents pharmacologiques dans la spécification cellulaire à partir des cellules souches neurales et dans la différenciation des précurseurs neuraux.

L'une de ces molécules, le tCFA15, était connue pour ses effets neurotrophiques. Nos résultats ont montré que le tCFA15 agit sur la différenciation des cellules souches neurales en

augmentant la proportion de neurones aux dépens des astrocytes et ceci d'une façon dose-dépendante.

Cet effet rappelait celui observé après inhibition de la voie Notch consécutivement à l'invalidation du gène codant le ligand Dll1, ce qui suggérait que le tCFA15 pouvait interagir avec la voie Notch. Pour tester cette hypothèse, nous avons examiné l'effet du tCFA15 sur l'expression de gènes clés de la voie Notch. Nous avons montré qu'effectivement, le tCFA15 diminue de plus de 90% l'expression de *Notch1*. En revanche, les autres récepteurs Notch (-2, -3, -4) ne sont pas significativement affectés, pas plus que les ligands Jagged et Delta. Nous avons également observé une diminution significative l'expression de *Hes5*, mais pas de *Hes1*. Après avoir montré que le tCFA15 agit sur le niveau d'expression de *Notch1*, nous avons étudié son mode d'action. Nous avons donc entrepris de rechercher son action éventuelle sur les facteurs qui contrôlent l'expression de *Notch1*. Cet aspect de la voie Notch était peu documenté, mais nous avons utilisé des indications indirectes. Ainsi, le CNTF est connu pour agir sur des cellules précurseurs, induisant leur différenciation en astrocytes, et aussi pour stimuler l'expression de *Notch1*. Ce facteur de croissance agit principalement par la voie de signalisation JAK/STAT. Nous avons montré que le tCFA15 inhibe l'activation de STAT3, ce qui suggérait que l'effet du tCFA15 pouvait passer par la voie de signalisation JAK/STAT.

Des expériences, combinant perte et gain de fonction pour chacune des deux voies, ont permis d'établir une hiérarchie fonctionnelle entre les gènes *Notch1* et *Stat3* et de déterminer que dans les neurosphères l'expression de *Notch1* était contrôlée par STAT3, ce qui a été confirmé par biologie moléculaire. L'ensemble de ces résultats est actuellement soumis à publication (Bouissac, Paschaki et al., soumis).

Etant donné la diversité des fonctions de la voie Notch, il n'est pas étonnant que ses dérèglements fonctionnels soient à l'origine de nombreuses pathologies allant des maladies neurodégénératives à certains cancers. Le plus souvent, ces maladies sont liées à une hyperactivité de la voie Notch. Nous fondant sur les effets de Notch sur la différenciation des cellules nerveuses normales ; inhibition de la différenciation des neurones et oligodendrocytes, et activation de celle des astrocytes, nous avons recherché si cet effet de la voie Notch sur la différenciation pouvait être transposé à des lignées tumorales correspondantes (neuroblastomes, oligodendrogliomes et astrocytomes) et si la voie Notch pouvait alors constituer une cible thérapeutique potentielle.

Nous avons donc entrepris d'étudier les effets du tCFA15 sur la différenciation de différentes lignées tumorales du système nerveux. Ces résultats, encore préliminaires, obtenus au cours d'une collaboration avec Marie Paschaki, sont décrits dans le premier chapitre des résultats complémentaires de ce manuscrit. Nous avons utilisé des lignées établies de neuroblastomes, d'astrocytomes et d'oligodendroglyomes et nous avons montré que le tCFA15 inhibe l'expression de *Notch1* dans la plupart de ces lignées. D'autre part, comme il le fait dans les cellules saines homologues, le tCFA15 active la différenciation des neuroblastomes et oligodendrocytomes alors qu'il inhibe celle des astrocytomes. Cette modulation de la différenciation par le tCFA15 est corrélée avec une modulation inverse de la prolifération. Le tCFA15 inhibant la prolifération in-vivo et in-vitro des neuroblastomes et oligodendrocytomes alors qu'il accélère celle des astrocytomes. Ces résultats montrent que le tCFA15 - et donc qu'une inhibition de *Notch1*- pourrait avoir pour effet d'« améliorer » le phénotype tumoral des neuro- et oligodendrocytomes alors qu'ils « aggraveraient » le phénotype tumoral des astrocytomes.

Ce travail a été financé entre autre par l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), qui m'a accordé une bourse pour terminer mon doctorat, et une publication reprenant l'ensemble de ces résultats est en cours d'écriture (Paschaki, Bouissac et al., en préparation).

Dans le cadre de ma thèse, dont les trois premières années ont été financées par la société MEIJI (Japon), nous avons testé l'effet d'autres petites molécules non peptidiques brevetées par cette société et synthétisées par l'UMR 7123 (Strasbourg), dans le système des neurosphères. Nous avons mis en évidence une activité biologique des molécules de la famille des IFA (Indol Fatty Alcools). Plus spécifiquement, nous avons montré qu'une de ces molécules, le 5mIFA18, exerce un effet neurotrophique, et qu'il le fait par l'intermédiaire de *Notch4*, dont il diminue le taux d'expression de manière significative. L'inhibition de l'expression de *Notch4* à l'aide d'oligonucléotides antisens a permis de démontrer l'effet neurotrophique de l'inhibition de *Notch4* dans le système des neurosphères. Ces travaux ont été publiés en 2004 (Coowar, Bouissac et al., 2004).

Une autre molécule, le Ginsenoside-Rd, purifié à partir d'une plante chinoise connue pour ses propriétés cicatrisantes (*Panax notoginseng*), a également été testée sur le système des neurosphères. Nous avons montré que cette molécule augmente la prolifération et la différenciation des astrocytes. Ces effets ne semblent toutefois pas dus à une modulation de la voie Notch. Ces travaux ont été publiés en 2005 (Shi, Hao, Bouissac et al., 2005).

Ainsi, nous avons étudié le rôle de Notch dans le système des neurosphères. Contrairement à d'autres publications contemporaines à notre travail, nous avons utilisé ce système non pas uniquement pour étudier le rôle de cette voie moléculaire dans l'autorenouveau des cellules souches neurales mais aussi pour étudier son rôle dans les processus de spécification des cellules souches neurales et de différenciation des précurseurs neuraux.

Enfin, nos travaux en cours sur le rôle de Notch dans des lignées tumorales du système nerveux ont montré que la modulation de cette fonction par des agents pharmacologiques peut avoir des applications thérapeutiques dans le traitement de certains cancers du système nerveux.

Chapitre 1

Introduction bibliographique

1. Cellules souches, spécification et différenciation

Au cours de la dernière décennie, des chercheurs aux politiciens, tout le monde parle des cellules souches. Pourquoi un tel engouement ? Peut-être parce que les cellules souches, capables de générer toutes les cellules construisant un organisme, éveillent de grands espoirs de thérapies pour de nombreuses maladies ; mais peut-être est-ce également parce qu'elles suscitent de nombreuses craintes, parfois justifiées, quant à leur usage potentiel à des fins eugéniques.

Nous allons, au cours de ce premier chapitre de l'introduction, définir ce qu'est une cellule souche, ainsi que les différents types de cellules souches embryonnaires ou adultes. Nous insisterons également sur les concepts d'autorenouvellement, de déterminisme (ou spécification) et de différenciation et nous aborderons les potentialités cliniques des travaux menés dans ce domaine.

1.1. Historique de la notion de cellule souche, exemple des cellules souches hématopoïétiques

En biologie, le terme de cellules souches désigne des cellules non déterminées qui, d'une part, peuvent donner des cellules spécialisées (déterminisme ou spécification) et, d'autre part, peuvent virtuellement se renouveler indéfiniment (autorenouvellement).

Les premières indications de l'existence des cellules souches remontent aux années 60 avec les travaux de Till, McCulloch, Wo, Becker et Siminovitch sur les précurseurs des cellules du sang (hématopoïétiques). Dans ces travaux, les auteurs ont montré que certaines cellules de la moelle osseuse, marquées et cultivées dans des conditions clonales (c'est-à-dire individuellement) in vitro avant d'être transplantées, pouvaient être retrouvées dans la rate des souris transplantées (Till et Mc, 1961). De plus, ces clones de cellules pouvaient reconstituer tous les types de cellules sanguines de l'hôte transplanté (Becker et al., 1963; Wu et al., 1968).

Pour isoler ces cellules souches hématopoïétiques, il a été nécessaire de procéder en plusieurs étapes. Premièrement, il a fallu développer des techniques pour démontrer que certaines cellules étaient capables de produire clonalement tous les types connus de cellules hématopoïétiques (des cellules myéloérythroïdes aux cellules de type T en passant par les cellules de type B). Ces travaux ont été effectués par différentes équipes de 1961 à 1984. Deuxièmement, il a fallu produire des anticorps de surface permettant d'identifier ces cellules

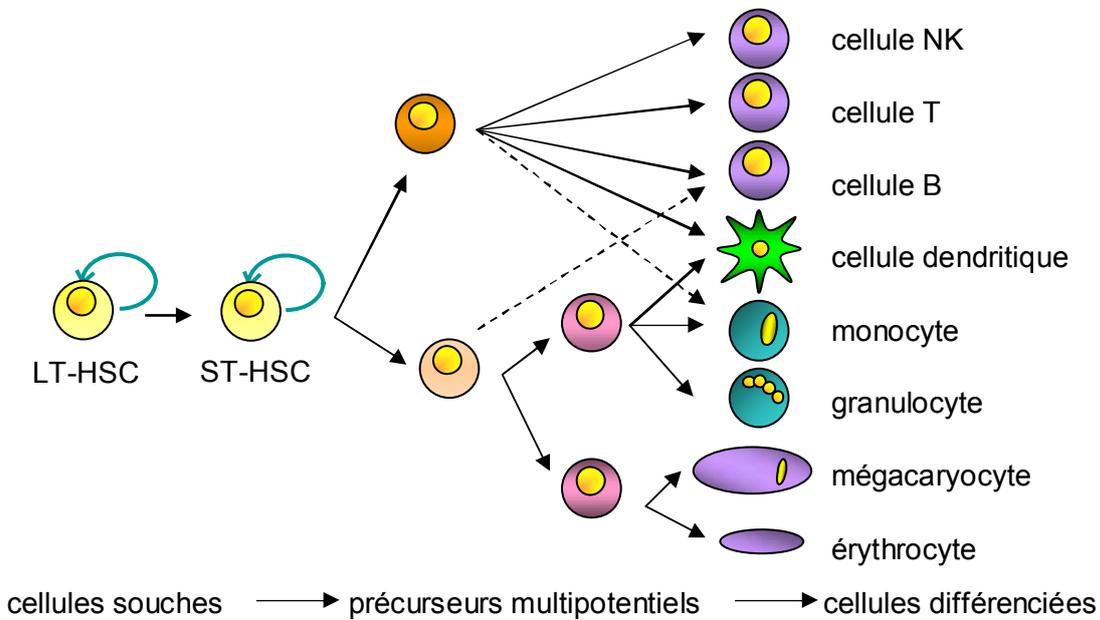


Figure 1. Lignage des cellules hématopoïétiques

Le développement des cellules sanguines matures s'effectue via une restriction séquentielle des potentialités développementales de précurseurs multipotentiels qui dérivent des cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les cellules souches hématopoïétiques sont constituées des « long term » LT-HSC et de « short term » ST-HSC. Les LT-HSC ont une plus grande capacité d'autorenouvellement que les ST-HSC. Les précurseurs multipotentiels ne s'autorenouvellent pas de façon significative. Les flèches en pointillés montrent des possibilités de différenciation décrites seulement pendant l'hématopoïèse durant le développement embryonnaire. (*adapté de Wagers et al., 2002*)

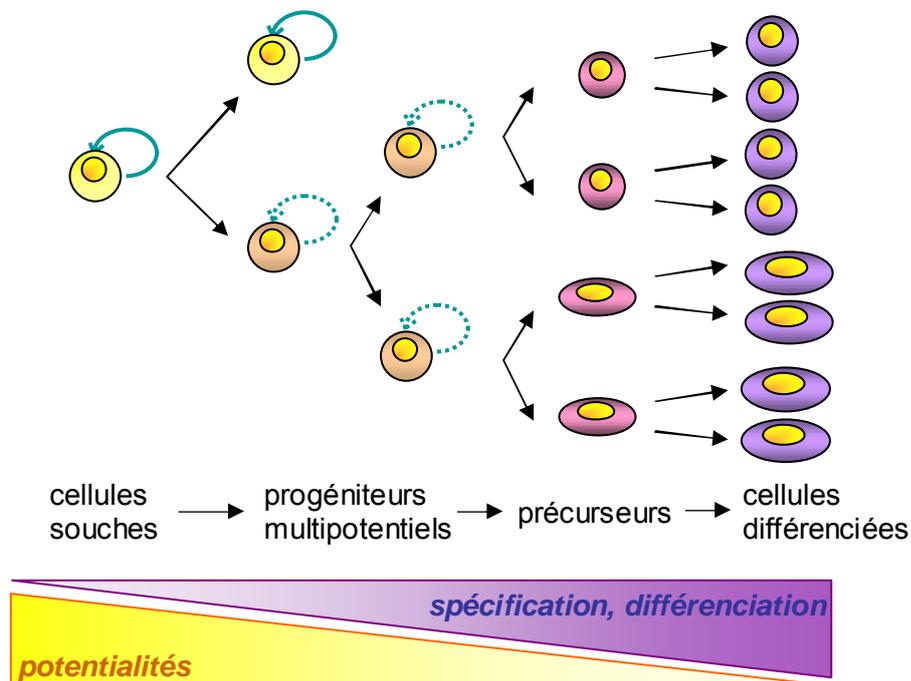


Figure 2. Concept de cellule souche, de progéniteur et de précurseur

Les cellules souches sont définies comme des cellules indifférenciées **(i)** qui peuvent s'autorenouveler par division symétrique ou asymétrique pour donner des cellules souches et des cellules destinées à se différencier. Lorsqu'une cellule souche se divise on peut obtenir deux cellules souches identiques (division symétrique) ou une cellule souche et une cellule engagée dans un lignage particulier (division asymétrique).

Les cellules souches sont également capable de **(ii)** proliférer de manière quasi-illimitée **(iii)** et sont multipotentiels, elles peuvent en effet dans la plupart des cas donner naissance à plusieurs types cellulaires. Les progéniteurs, destinées à se différencier, passent d'abord par le stade de « cellules transitoires » qui prolifèrent avant le stade de la différenciation finale.

souches issues de la moelle osseuse. Enfin, il a fallu appliquer ces résultats au tri rapide des cellules portant ces épitopes (marqueurs reconnus par les anticorps). L'ensemble de ces techniques a finalement permis d'isoler les cellules souches hématopoïétiques au milieu des années 80 (Muller-Sieburg et al., 1986; Spangrude et al., 1988).

Une méthodologie similaire a été utilisée dans les années 90 pour identifier les précurseurs intermédiaires des différentes lignées de cellules hématopoïétiques (pour revue, voir (Wagers et al., 2002)). Ces travaux sont résumés dans la figure 1.

L'ensemble de ces travaux a montré que, au cours de l'hématopoïèse, il existe une petite population de cellules qui répondent aux trois critères suivants : (i) elles sont capables d'autorenouvellement, (ii) elles peuvent être maintenues en culture pour une durée quasi illimitée, (iii) elles sont capables, lorsqu'elles sont cultivées clonalement, de générer des cellules précurseurs capables de générer tous les types cellulaires présents dans le tissu d'origine (ici, toutes les cellules sanguines).

Ces cellules sont définies comme cellules souches et leurs caractéristiques peuvent être généralisées à tous les types de cellules souches (Loeffler et Roeder, 2004; Potten et Loeffler, 1990) - des cellules souches embryonnaires, capables de donner naissance à toutes les cellules de l'organisme, aux cellules souches spécifiques de certains tissus, telles que les cellules souches neurales du système nerveux central ou les cellules souches des kératinocytes (responsables de la pigmentation de la peau et des cheveux).

1.2. Concepts de cellule souche, de progéniteur et de précurseur – Difficultés à établir une définition des cellules souche

Comme nous l'avons vu ci-dessus, une cellule souche est une cellule qui peut produire des cellules filles qui seront elles-mêmes des cellules souches (autorenouvellement) ou qui s'engageront dans une voie de développement en restreignant leurs potentialités développementales (précurseurs). Ces précurseurs vont proliférer avant de se différencier, ils sont donc souvent appelés « transit amplifying cells » ou cellules s'amplifiant transitoirement (figure 2). Les termes de précurseurs et de progéniteurs sont généralement interchangeables mais certains auteurs utilisent « progéniteur » pour faire référence à des cellules qui ont de plus grandes potentialités développementales que les précurseurs.

La plupart des définitions postulent que les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de s'autorenouveler à l'infini (ou au moins pour la durée de la vie de leur hôte) et sont multi potentielles, c'est-à-dire capables de donner naissance à plusieurs types de cellules différenciées. Néanmoins, certaines cellules souches échappent à la deuxième partie de cette

définition. Ainsi, les cellules souches spermatogoniales des testicules ne produisent qu'un seul type de cellule : les spermatozoïdes (Meachem et al., 2001).

La distinction en termes de biologie cellulaire entre cellule souche et précurseur n'est pas toujours très claire. Pour certains auteurs, une des caractéristiques moléculaire des cellules souches est qu'elles maintiennent leur activité télomérase (Forsyth et al., 2002). L'enzyme nommée télomérase, découverte en 1994, est capable de réparer les télomères et aurait le pouvoir de rendre la cellule immortelle. Les télomères sont des portions d'ADN se trouvant aux extrémités des chromosomes. À chaque division cellulaire, une partie des télomères disparaît. Lorsqu'il ne reste plus de télomères, la cellule cesse de se diviser puis meurt. Les cellules qui produisent de la télomérase échappent à ce destin : à mesure que les télomères raccourcissent, la télomérase les synthétise de nouveau. Ainsi, la cellule garde la capacité de se diviser indéfiniment. C'est le cas des cellules souches et des cellules cancéreuses qui pourraient donc conserver les télomères dans un état parfait, ce qui rend ces cellules immortelles - du moins jusqu'à la mort de l'individu.

De nombreux précurseurs humains perdent leur activité télomérase. Ainsi, même s'ils peuvent être maintenus dans un état non spécifié en culture, ils peuvent se diviser seulement un nombre de fois limité avant que un ou plusieurs des télomères ne soient trop courts et causent un arrêt permanent du cycle cellulaire (Cong et al., 2002). Par contre, à l'encontre de la définition proposée, chez les rongeurs, de nombreux précurseurs peuvent maintenir une activité télomérase et se multiplier à l'infini dans des conditions données de culture (Mathon et al., 2001).

Enfin, certains précurseurs peuvent regagner des caractéristiques de cellules souches *in vitro*, montrant que la spécification des cellules souches n'est pas irréversible. C'est également possible *in vivo*, comme cela a été montré dans le cas des cellules souches intestinales (Marshman et al., 2002) et des cellules souches neurales (Doetsch, 2003a; Doetsch et al., 2002); il semblerait donc qu'il ne soit pas nécessaire de passer exclusivement par l'autorenouvellement pour maintenir le pool de cellules souches dans l'organisme, comme cela est souvent décrit. Les cellules souches peuvent être conservées à l'état quiescent sous une forme peu différenciée. Certaines cellules totalement différenciées ont même été décrites comme pouvant se dédifférencier *in vivo*. C'est le cas par exemple de l'épithélium auditif du poulet où certaines cellules de support peuvent se dédifférencier et recommencer à se diviser pour se différencier en cellules pileuses, lorsque les cellules pileuses ont été détruites (Stone et al., 1998).

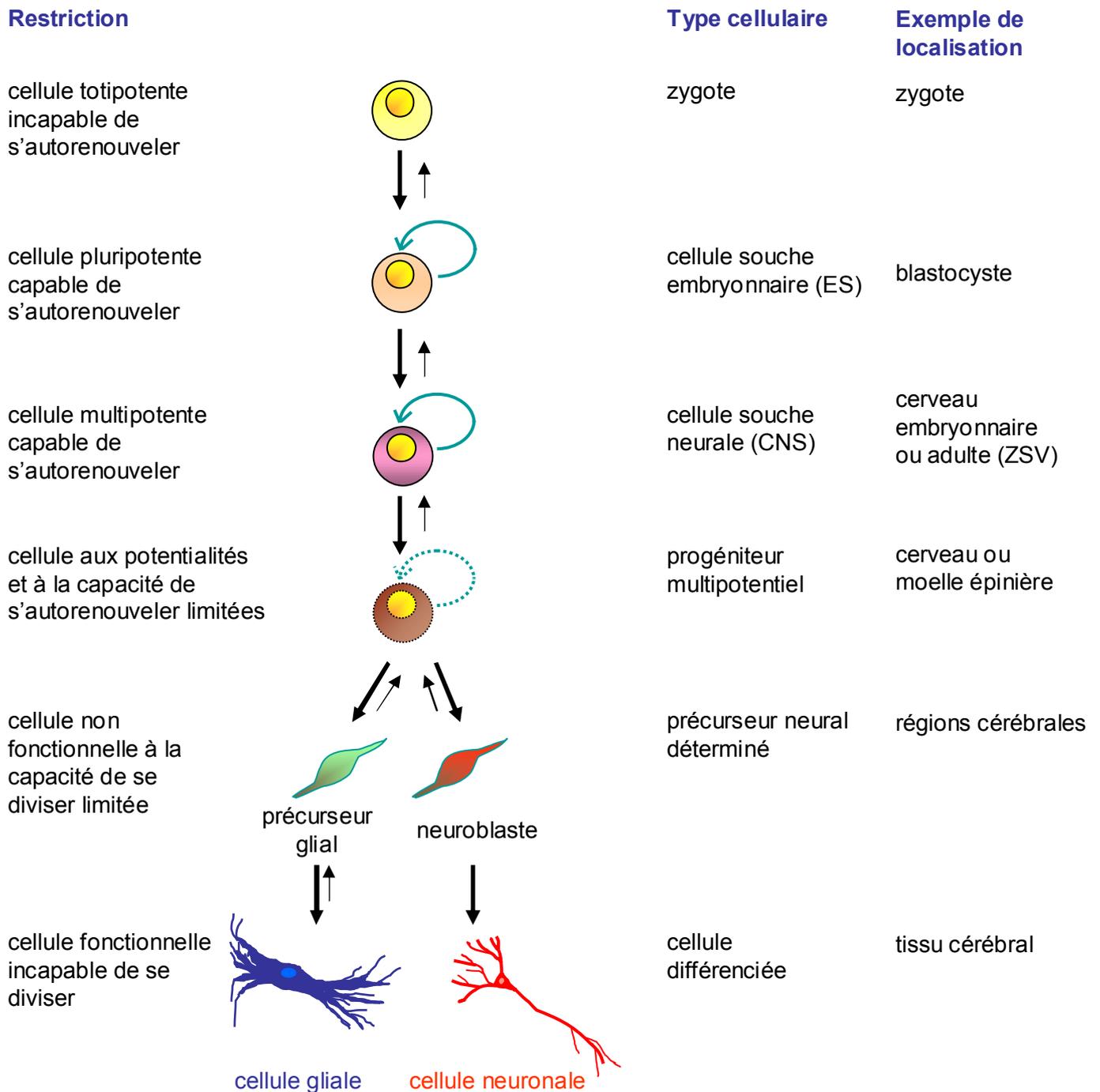


Figure 3. Types des cellules souches des mammifères donnant naissance à des neurones

Les cellules souches des mammifères qui donnent naissance à des neurones sont représentées par ordre hiérarchique allant de la cellule la plus primitive et la plus multipotentielle à la cellule aux potentialités les plus restreintes. Les restrictions du devenir cellulaire à chaque étape et des exemples de leur localisation dans l'organisme sont également représentés.

Les petites flèches indiquent les possibilités de « dédifférenciation » des différents types cellulaires.

(adapté de Gage et al., 2002)

1.3. Concepts d'autorenouvellement, de déterminisme, de spécification et de différenciation cellulaire

La capacité d'autorenouvellement des cellules souches vient du fait qu'elles ne peuvent se diviser que par divisions symétriques ou asymétriques. Les divisions symétriques produisent deux cellules filles équivalentes à la cellule souche d'origine. Ce mécanisme contribue à l'amplification du stock de cellules souches. Les divisions asymétriques produisent une cellule souche identique, qui conserve toutes les propriétés de la cellule d'origine, et une cellule aux potentialités plus restreintes que celles de la cellule d'origine.

Il est important de noter que seules les cellules souches sont normalement capables d'autorenouvellement dans l'organisme sain. Par contre, dans le cas de nombreux cancers, certaines cellules tumorales acquièrent également cette propriété (cf. § 1.8).

A mesure que les cellules évoluent depuis l'état de cellule souche jusqu'à leur différenciation terminale, leur capacité à donner des types cellulaires différents (potentialité) diminue, tandis que leur degré de différenciation augmente. Lors de l'augmentation de leur degré de différenciation, les cellules sont orientées vers un nombre de types cellulaires de plus en plus restreint. Ainsi, il sera possible de former des neurones (figure 3), aussi bien à partir du zygote, que de cellules souches embryonnaires, de cellules souches neurales ou de précurseurs de neurones déterminés (pour revue, voir (Gage, 2000; Raff, 2003)).

Dans ce manuscrit, nous définirons par « spécification cellulaire » le processus selon lequel une cellule subit une restriction de ses potentialités développementales. Ceci correspond au choix de l'identité cellulaire (« cell fate choice » dans la terminologie anglo-saxonne). Nous utiliserons le terme « spécification » plutôt que « déterminisme » en raison de la connotation d'irréversibilité qui est parfois associé au déterminisme.

Le lignage des cellules des mammifères se fait normalement dans un seul sens. Les cellules souches vont produire des progéniteurs qui à leur tour donneront naissance à des précurseurs qui finalement se différencieront. La cellule en développement voit ses potentialités développementales de plus en plus restreintes à chaque étape et ne peut normalement pas faire marche arrière (d'où le terme de « déterminisme » utilisé par certains auteurs). L'exemple classique de la restriction développementale est la gastrulation au cours de laquelle les trois feuillets primitifs sont formés. Chaque feuillet va alors donner naissance à différents types cellulaires. L'endoderme va ainsi former le tube digestif, le foie, le pancréas et les poumons ; le mésoderme va former les muscles, le sang, les os et les tissus adipeux et l'ectoderme va

former la peau et le système nerveux. Les cellules issues d'un feuillet ne produisent généralement pas de cellules des autres feuillets.

Dans ce manuscrit, nous utiliserons le terme de « différenciation cellulaire » pour caractériser le processus de différenciation cellulaire s'exerçant sur une cellule spécifiée, par lequel par exemple un précurseur de neurone se transforme progressivement en un neurone morphologiquement et fonctionnellement différencié. Ce processus est également appelé « maturation » par certains auteurs. Le processus de différenciation cellulaire est caractérisé par l'apparition de « marqueurs de différenciation », spécifiques à chaque lignage cellulaire et à l'état de maturité de la cellule, et correspondant à leurs fonctions physiologiques finales. Pour identifier une cellule différenciée mature, il est donc très important de choisir des marqueurs de différenciation hautement spécifiques du type cellulaire étudié.

Il est à noter que certains auteurs utilisent le terme de « différenciation » pour définir un changement du programme d'expression génique, certains gènes ne pouvant plus être transcrits alors que d'autres pourront l'être, définition que nous appliqueront au terme de « spécification » dans ce manuscrit.

1.4. Totipotentialité, pluripotentialité, multipotentialité et unipotentialité

Il est possible de classer les cellules souches selon leurs potentialités développementales. Les cellules souches embryonnaires (isolées en culture à partir de la masse interne des blastocytes) et les cellules souches germinales (isolées en culture à partir de la zone germinale primordiale d'embryons précoces) sont dites pluripotentes car capables de produire l'ensemble des cellules d'un organisme, y compris les cellules germinales. Le zygote issu de la fécondation, bien que n'étant pas considéré comme une cellule souche car il ne possède pas la capacité d'autorenouvellement, est totipotent. La différence entre la pluripotentialité des cellules souches embryonnaires et la totipotentialité du zygote réside dans le fait que les cellules souches embryonnaires peuvent uniquement former des cellules nécessaires à la formation de l'embryon alors que le zygote totipotent peut également former les cellules nécessaires à la formation des annexes extra-embryonnaires telles que le placenta.

Les autres cellules sont dites multipotentes si elles peuvent produire plusieurs types cellulaires (exemple : cellules souches neurales), et unipotentes si elles ne peuvent produire qu'un seul type de cellule (exemple : cellules souches spermatogoniales). Ces cellules souches dites cellules souches organe-spécifiques, tissu-spécifiques ou adultes, dérivent progressivement des cellules souches embryonnaires à différents stades du développement.

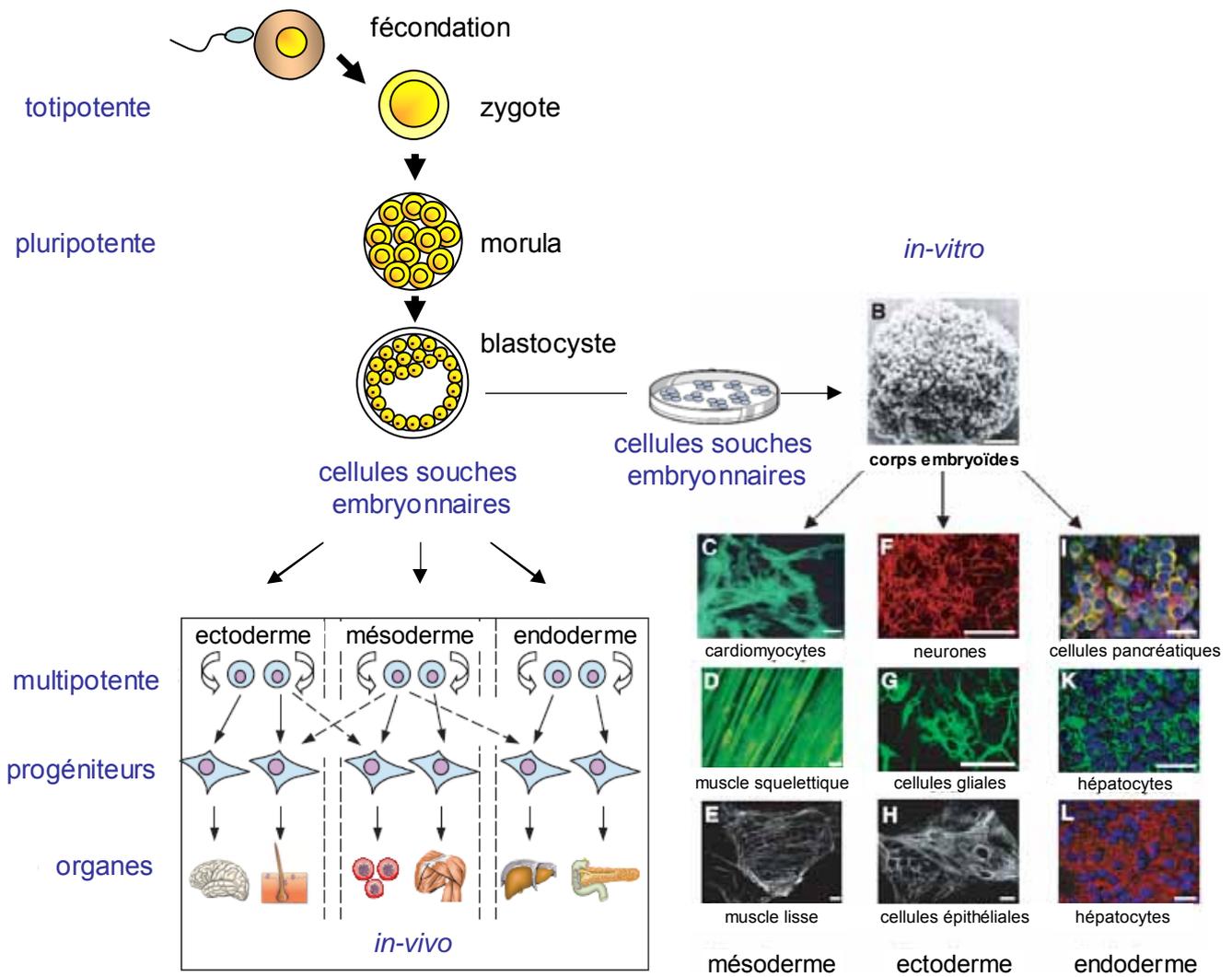


Figure 4. Potentialité des cellules souches embryonnaires et hiérarchie des cellules souches (adapté de Wobus et al., 2004)

1.5. Potentialités développementales des cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ES) ont été isolées au début des années 80 à partir du bourgeon embryonnaire des blastocystes (Evans et Kaufman, 1981).

Ces cellules peuvent être cultivées *in vitro* et peuvent générer quasiment tous les types cellulaires de l'organisme en fonction des conditions de culture (figure 4) (pour une revue exhaustive sur les cellules ES et leurs potentialités, voir (Wobus et Boheler, 2005)). Les mécanismes responsables de la spécification *in-vivo* des cellules souches embryonnaires sont encore mal connus et les conditions de différenciation vers tel ou tel type cellulaire ont souvent été définies de manière empirique.

Récemment, pour tenter de comprendre ces mécanismes, certains auteurs (Clarke et al., 2000; Niwa et al., 1998; Ying et al., 2003) ont montré *in-vitro* l'importance du LIF (via la voie STAT3), du BMP (via SMAD), et de Nanog dans l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires, ainsi que l'importance du niveau relatif de Oct3/4 dans le déterminisme des cellules souches embryonnaires vers les voies trophoblastiques ou endodermiques/mésodermique (figure 5).

1.6. Plasticité des cellules souches adultes

1.6.1. Les observations

Chez l'adulte, les cellules souches existent dans la plupart des tissus et organes. Elles sont responsables du renouvellement des cellules différenciées en régénérant continuellement les tissus et organes tels que la peau, le sang ou certaines zones du cerveau.

Une définition expérimentale des cellules souches des tissus (ou cellules souches adultes) serait, par exemple dans le cas des cellules souches hématopoïétiques, simplement des cellules capables de reconstituer l'ensemble des cellules du système sanguin (Osawa et al., 1996). On a longtemps pensé que les cellules souches adultes ne pouvaient donner naissance qu'aux types cellulaires présents dans l'organe où elles résident. Des expériences montrent en effet que, lorsque des fragments d'un organe sont transplantés dans un autre site, les tissus transplantés gardent leurs caractéristiques d'origine. De même, lorsque des cellules dissociées à partir d'un organe ou d'un tissu sont cultivées, elles tendent aussi à maintenir leur identité d'origine. Néanmoins, elles perdent certaines de leurs caractéristiques de différenciation mais elles ne se différencient généralement pas en cellules absentes du tissu d'origine.

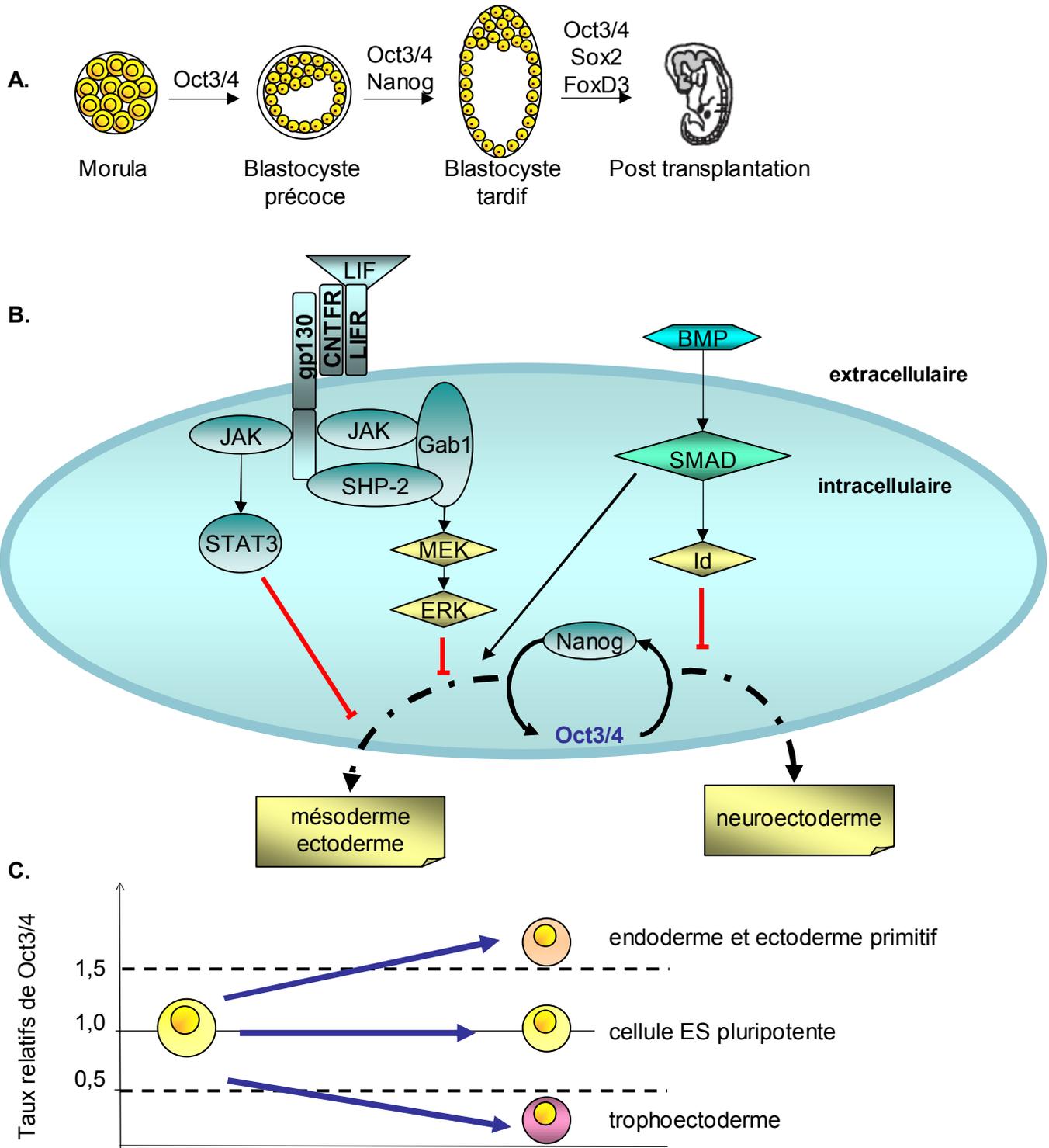


Figure 5. Régulation de l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires (ES) chez la souris par Oct3/4, Nanog, SMAD BMP-dépendant et la voie JAK/STAT3 LIF-dépendante

(A) Des facteurs de transcription tels que Oct3/4, Nanog, Sox2 et FoxD3 contrôlent les stades de développement précoce permettant le passage des cellules totipotentes aux cellules pluripotentes.

(B) L'autorenouvellement (prolifération) des cellules ES est régulé par Nanog, Oct3/4 et des fortes interactions avec la voie JAK/STAT3 LIF-dépendante ainsi que par l'activation des gènes cibles BMP-dépendants. Un mécanisme impliquant MEK et ERK empêche l'autorenouvellement des ES. Oct3/4 et Nanog empêchent leur différenciation en cellules du trophoendoderme et du mésoderme.

(C) Les taux relatifs d'expression de Oct3/4 déterminent le devenir des ES.

(adapté de Wobus et al., 2004)

Il existe cependant des exceptions. Lorsque un type cellulaire change pour donner un type de cellule normalement présent dans un autre lignage cellulaire, on parle de plasticité cellulaire, de métaplasie, de changement de lignage ou de transdifférenciation (pour revue, voir (Tosh et Slack, 2002)).

En 1997, (Eglitis et Mezey, 1997) ont montré que les cellules souches de la moelle osseuse pouvaient donner naissance à des astrocytes après transplantation dans le cerveau de souris adultes. De même, (Ferrari et al., 1998) ont montré que chez la souris les mêmes cellules de la moelle osseuse pouvaient produire des cellules musculaires lorsqu'elles sont transplantées dans des muscles endommagés par l'utilisation de toxine. Ces résultats ne furent que les premiers d'une longue liste. Il a depuis été montré que les cellules de la moelle osseuse transplantées peuvent générer des hépatocytes (Petersen et al., 1999; Theise et al., 2000), des cellules endothéliales et myocardiques (Lin et al., 2000; Orlic et al., 2001), des neurones et des cellules gliales (Brazelton et al., 2000; Mezey et Chandross, 2000; Priller et al., 2001) lorsqu'elles sont transplantées dans les organes correspondants. Il a également été montré que des populations enrichies en cellules souches hématopoïétiques peuvent produire des cardiomyocytes et des cellules endothéliales (Jackson et al., 2001), des hépatocytes (Lagasse et al., 2000) ; des cellules souches hématopoïétiques isolées peuvent également donner des cellules épithéliales de tout type (peau, intestin, poumon...). De même, il a été montré que les cellules souches neurales, préparées à partir de cerveaux adultes de souris et transplantées, ont la possibilité de générer des cellules sanguines (Bjornson et al., 1999) et des cellules musculaires squelettiques (Galli et al., 2000). Lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste, les cellules dérivées des cellules souches neurales donnent une très grande variété de types cellulaires embryonnaires (Clarke et al., 2000). Dans ces travaux menés par le groupe de Frisen, bien que le taux de reproductibilité de cette manipulation soit peu élevé et que le degré de mosaïsme varie énormément entre les embryons, la descendance des cellules transplantées a été retrouvée dans les dérivés des trois feuillets embryonnaires.

Ainsi, les cellules souches adultes sembleraient pouvoir se « transdifférencier ». La transdifférenciation étant un mécanisme par lequel une cellule souche adulte est capable de générer un ou plusieurs types cellulaires absents du tissu dont la cellule souche est originaire.

Ainsi, chaque cellule souche spécifique d'un organe semble pouvoir donner naissance à plusieurs type cellulaires (sinon tous) de l'organe en question mais mise dans des conditions artificielles, cette cellule souche peut manifester un certain nombre d'autres potentialités dépendantes du type de cellule souche et du type d'environnement qu'on lui impose (in-vivo ou in-vitro). Cela signifierait que les cellules souches sont moins spécifiées que prévu.

1.6.2. Problèmes et controverses

Il était surprenant de constater que des cellules dérivant d'un feuillet embryonnaire peuvent donner naissance à des cellules d'un autre feuillet, par exemple des dérivés ectodermiques (cellules souches neurales), pouvant se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires. Le fait que ce type de résultat n'a jamais été observé auparavant pouvait s'expliquer par le fait que les tissus et organes étaient souvent transplantés en entier. Les cellules transplantées gardaient donc le même environnement cellulaire, alors que dans les expériences plus récentes, les cellules étaient le plus souvent transplantées sous forme d'une suspension cellulaire et des cellules isolées se retrouvaient donc plongées dans un autre environnement.

Ces résultats ont causé une grande excitation car ils laissaient entrevoir de grandes potentialités thérapeutiques et qu'ils s'opposaient au dogme de la restriction de lignage qui aurait lieu au moment de la gastrulation.

Une controverse, lancée en 2001 (Anderson et al., 2001; Morrison, 2001), laissa penser qu'il y avait de sérieux problèmes avec les résultats énoncés ci-dessus (pour revue voir (Raff, 2003)). Le principal problème venait de la caractérisation des cellules semblant s'être transdifférenciées dans les tissus hôtes. Dans la plupart des études, la conclusion de transdifférenciation était tirée à partir d'études morphologiques et à partir de marquages immunohistochimiques, mais rarement à partir d'études fonctionnelles. Ainsi, les cellules pourraient avoir acquis seulement une partie des caractéristiques des nouvelles cellules, mais aucune de ses fonctions.

Par ailleurs, les cellules transplantées étaient souvent mal caractérisées. Dans la plupart des études, un très grand nombre de cellules sont transplantées et un très petit nombre d'entre elles semblent se transdifférencier. Se pose alors le problème d'une éventuelle contamination des cellules transplantées par d'autres types cellulaires, tels que des cellules ayant les caractéristiques de souches embryonnaires (« ES-like cells »), présents dans le tissu du donneur, d'autant plus que les études citées ci-dessus utilisaient rarement des populations obtenues à partir de cellules isolées clonalement.

Enfin, des études ont montré que les résultats décrits n'étaient pas toujours reproductibles ou étaient explicables par des phénomènes de fusion cellulaire spontanée. La transdifférenciation cerveau-sang en est un exemple. Les travaux de l'équipe de Van der Kooy (Morshead et al., 2002) semblent montrer que les rares transdifférenciations observées seraient dues à des altérations génétiques de certaines cellules souches neurales ou à la fusion spontanée de

certaines de ces cellules avec les cellules de l'hôte. La fusion des cellules expliquerait également que les cellules souches neurales, lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste, puissent donner une grande variété de types cellulaires embryonnaires (Clarke et al., 2000).

D'autres travaux ont récemment relancé la controverse, le groupe de Gage ayant démontré que la transdifférenciation des cellules souches neurales vers le lignage endothélial était effectivement possible. Ces travaux ont également montré que cette transdifférenciation n'était due ni à des altérations génétiques, ni à des phénomènes de fusion cellulaire (D'Amour et Gage, 2002; Wurmser et al., 2004), contredisant les hypothèses de Van der Kooy.

D'autres travaux ont également confirmé que les cellules souches de la moelle osseuse (originaires du mésoderme) peuvent se transdifférencier *in vitro* vers tous les types cellulaires de l'ensemble des feuillettes embryonnaires, en particulier vers les neurones (pour revue, voir (Lu et Tuszynski, 2005)), mais il n'a pas encore été clairement démontré si les cellules obtenues sont fonctionnelles.

En conclusion, il semblerait qu'il soit effectivement possible, en utilisant différentes conditions de culture ou en les transplantant dans d'autres niches, de transdifférencier les cellules souches adultes vers d'autres types cellulaires, même si cela reste contesté dans le cas de transdifférenciation vers des types cellulaires d'autres feuillettes embryonnaires. Des travaux restent nécessaires pour mieux comprendre les bases moléculaires de ces phénomènes et c'est l'un des grands enjeux de la recherche actuelle sur les cellules souches.

1.7. Dédifférenciation et conversion des précurseurs en cellules souches

Il est de plus en plus admis que, dans certains cas, des cellules différenciées peuvent acquérir les caractéristiques de cellules non différenciées. On parle alors de dédifférenciation.

De nombreux exemples de dédifférenciation existent chez les amphibiens (pour revue voir (Brookes et Kumar, 2002)). De même, quelques exemples de dédifférenciation cellulaire existent chez les mammifères, en particulier dans le système nerveux. Par exemple, lorsque le nerf périphérique d'une souris est coupé, les cellules de Schwann, qui sont hautement différenciées, vont se dédifférencier en précurseurs de cellules de Schwann qui vont proliférer et se redifférencier en cellules de Schwann, myélinisées ou non, en fonction du type d'axone, et cela que la cellule ait été myélinisée ou non avant la lésion (Aguayo et al., 1976; Weinberg et Spencer, 1976).

Il existe également des exemples de conversion de cellules différenciées en cellules souches. Ainsi, dans le système nerveux, il a été possible d'obtenir *in vitro* des cellules possédant les

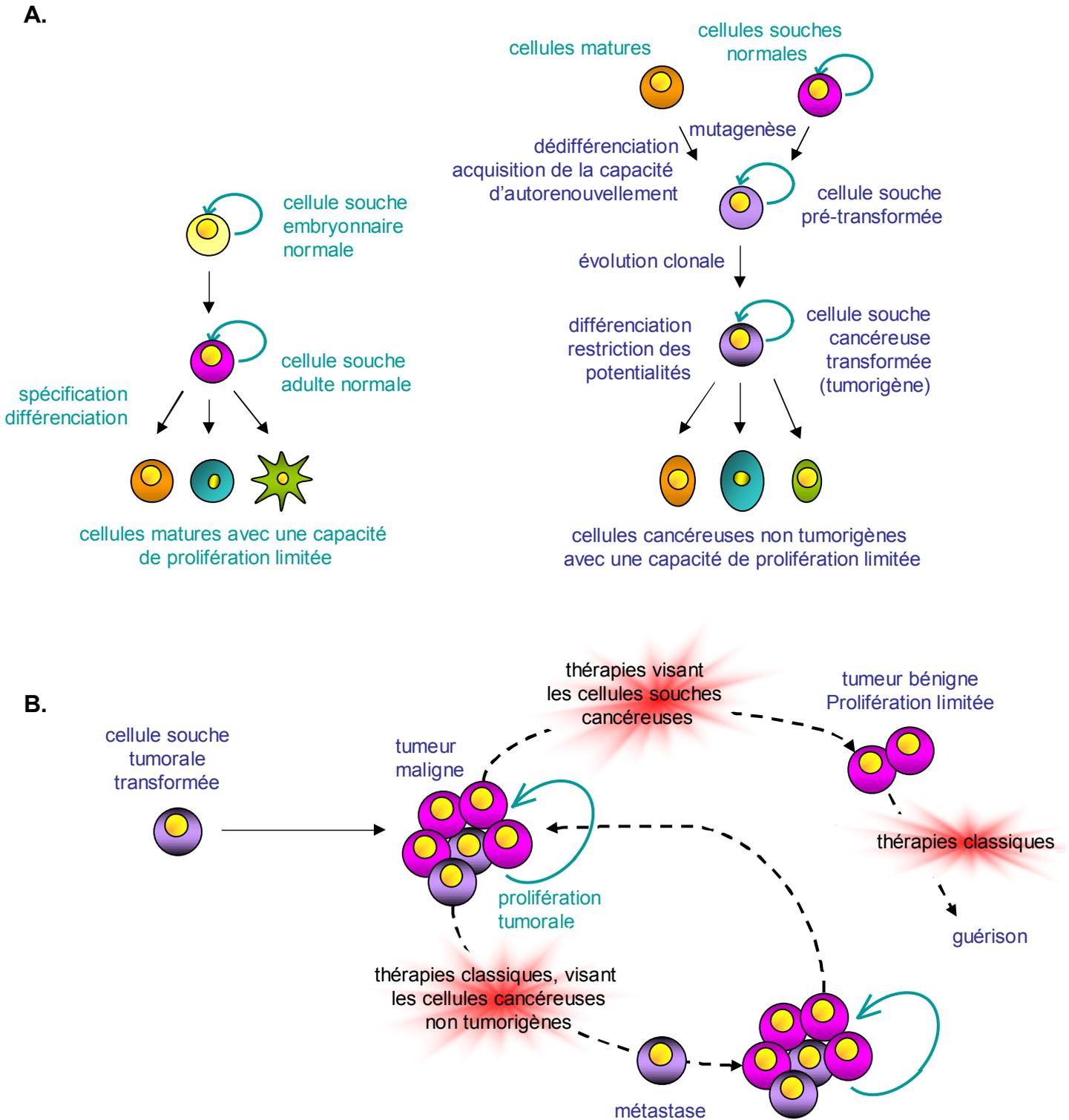


Figure 6. Cellules souches normales et cellules souches cancéreuses

(A) Il est possible d'établir un parallèle entre les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses

(B) Le parallèle entre les cellules souches normales et les cellules souches cancéreuses peut être exploité dans le cas des thérapies potentielles contre le cancer par l'utilisation de nouvelles thérapies visant les cellules souches cancéreuses.

(adapté de Pardal et al., 2003)

caractéristiques de cellules souches neurales à partir de populations purifiées de précurseurs d'oligodendrocytes (Kondo et Raff, 2000). D'autre part, certains neurones et astrocytes de la zone sous-ventriculaire ont la capacité de se convertir en cellules souches neurales *in vivo* et *in vitro* (Doetsch et al., 1999; Doetsch et al., 2002).

1.8. Des cellules souches cancéreuses ?

Les cellules souches et certaines cellules tumorales partagent la propriété de s'autorenouveler. Des études ont montré que de nombreuses voies moléculaires généralement associées avec le cancer régulent aussi l'autorenouvellement des cellules souches (pour revue, voir (Reya et al., 2001)) C'est notamment le cas des voies Wnt, Shh et Notch qui sont impliquées dans l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques, neurales, germinales et de la peau. Lorsqu'elles sont dérégulées, ces voies sont liées à l'apparition de nombreuses tumeurs chez l'humain, telles que des carcinomes du colon ou de l'épiderme (Wnt), des médulloblastomes (Shh) ou des leucémies, des tumeurs du système nerveux et des tumeurs mammaires (Notch).

Par ailleurs, des études récentes ont montré que, dans les tumeurs, seule une petite proportion des cellules ont la possibilité de proliférer et de former de nouvelles tumeurs. Ces cellules tumorigènes, appelées « cellules souches cancéreuses » ont la possibilité de s'autorenouveler et de former d'autres tumeurs mais également de produire des cellules non tumorigènes (incapables de former de nouvelles tumeurs) (figure 6A).

Selon cette hypothèse, de nombreux cancers seraient dus à des cellules souches adultes s'étant échappées de leur niche suite à des mutations touchant leurs propriétés d'autorenouvellement (Reya et al., 2001; Sell, 2004).

Une thérapie anticancéreuse classique est la « thérapie de différenciation », dans laquelle les cellules cancéreuses sont forcées à se différencier, ce qui a pour effet de réduire leur prolifération. Par exemple, l'acide rétinoïque est actuellement utilisé pour augmenter la différenciation et l'apoptose et pour ainsi diminuer la progression de certains types de cancers. Une autre approche consiste à détruire les cellules tumorales proliférantes à l'aide de drogues ou de rayonnements. Les cellules souches cancéreuses sont souvent résistantes à ces deux thérapies du fait de leur quiescence relative, ce qui pourrait expliquer les phénomènes de rechute à long terme observées chez certains patients souffrant de cancers du sein, de mélanomes ou de leucémie (pour revue voir (Pardal et al., 2003)) (figure 6B). Il est également admis que de nombreux cancers du cerveau pourraient provenir de cellules souches cancéreuses (Singh et al., 2004).

Une meilleure compréhension des mécanismes d'autorenouvellement et de différenciation des cellules souches permettrait donc de trouver de nouvelles approches en vue de thérapies contre le cancer. Le signal, contrôlant l'autorenouvellement et responsable du fait qu'une cellule souche, lorsqu'elle se divise, donne toujours naissance à au moins une autre cellule souche (division asymétrique), pourrait alors être bloqué et les cellules souches cancéreuses deviendraient de « simples » cellules cancéreuses, ayant perdu leur tumorigénicité et sensibles aux traitements actuels.

1.9. Un objectif : Contrôler le devenir cellulaire

Comme nous l'avons vu au cours de cette partie de l'introduction, les études menées sur les cellules souches embryonnaires et adultes nous incitent à remettre en question notre façon de concevoir le développement. Comme le rappelait Ron McKay (McKay, 2000), la communauté scientifique a longtemps pensé que l'organisme est le résultat d'une inexorable machine développementale : au début, il y a l'œuf totipotent qui, suite à une série d'irréversibles restrictions développementales, conduit aux cellules différenciées qui constituent l'animal. Selon cette hypothèse, la cellule différenciée n'a d'autre choix que de remplir son devoir et de mourir.

Mais comme nous l'avons vu, des données récentes ont montré que l'animal adulte contient des cellules souches capables d'une extraordinaire plasticité développementale. Le comportement des cellules souches dépend à la fois de leur histoire (spécification) et de leur environnement (niche). Mais il semblerait que leur spécification ne soit pas inflexible. Nous devons « juste » comprendre comment les guider vers la voie désirée et comment influencer leur différenciation ou leur dédifférenciation.

2. Les cellules souches neurales (CSN)

La majorité des cellules du système nerveux central (SNC) dérive d'un précurseur multipotentiel commun, appelé cellule souche neurale (CSN). Nous rappellerons au cours de ce chapitre les différents types cellulaires constituant le SNC, ainsi que leur lignage à partir des CSN. Nous introduirons également les principaux mécanismes moléculaires responsables de la quiescence des CSN et de la génération et différenciation des précurseurs du système nerveux.

2.1. Développement du système nerveux central et cellules souches neurales

Le SNC est caractérisé par une très grande complexité structurale et cellulaire qui fait du cerveau un organe unique et différent des autres tissus de l'organisme. Un ensemble hétérogène de cellules ultraspécialisées permet d'intégrer de nombreux stimuli pour produire une réponse complexe. Historiquement, cette complexité a été corrélée au fait que l'on était persuadé qu'il n'existait aucun renouvellement cellulaire possible au sein du cerveau. Il y a encore 10 ans, la plupart des manuels scolaires retenaient ce dogme et expliquaient que le cerveau ne pouvait se développer que pendant la vie embryonnaire et au cours de la jeune enfance.

Pendant de nombreuses années, on a pensé que les neurones et la glie du SNC étaient produits à partir de deux types distincts de précurseurs qui divergeaient très tôt au cours du développement. Cette théorie était entre autre basée sur le fait que la neurogenèse et la gliogenèse intervenaient à des stades différents du développement embryonnaire. Au contraire, il est à présent démontré que la majorité des cellules composant le SNC dérivent de CSN multipotentiels. Récemment, il a été montré que *in vivo*, ces CSN ont les caractéristiques de cellules gliales différenciées (Doetsch et al., 1999). Des cellules gliales radiaires chez l'embryon aux astrocytes de la zone sous-ventriculaire (ZSV) chez l'adulte (pour revue, voir (Doetsch, 2003a; Doetsch, 2003b)), les CSN sont donc toujours présentes, sous une forme proliférative (embryon) ou quiescente (adulte) et sont responsables de la diversité et du renouvellement cellulaire du SNC.

2.1.1. Types cellulaires présents dans le système nerveux central

Le SNC est constitué de deux ensembles principaux de cellules : les neurones et les cellules de gliales, elles même subdivisées en trois types cellulaires principaux : oligodendrocytes,

astrocytes et cellules épendymaires. Chez l'homme, les cellules gliales constituent 90% des cellules du SNC et occupent environ la moitié du volume du cerveau. Elles assurent un soutien structural et métabolique aux neurones et interviennent dans l'émission et la conduction des signaux nerveux. La glie est constituée de macroglie et de microglie. La microglie représente 5 à 20% des cellules gliales. Ce sont les macrophages résidant de SNC, petites cellules activées en réponse à une atteinte du SNC. La microglie se déplace vers le site atteint, se multiplie et peut phagocyter les cellules mortes et les corps étrangers. La macroglie est constituée par les astrocytes et les oligodendrocytes. Les astrocytes sont des cellules étoilées dont les prolongements sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins, la pie-mère et les neurones. Les astrocytes permettent l'échange de nutriments entre sang, liquide céphalorachidien et neurones. Les oligodendrocytes, dont les prolongements enveloppent les axones des neurones, ont pour fonction principale d'assurer la myélinisation. La myélinisation des neurones permet d'isoler les axones de leur environnement et donc d'assurer une meilleure conduction de l'information nerveuse. Les neurones constituent l'unité structurale fonctionnelle du système nerveux. Ils peuvent communiquer entre eux à l'aide de synapses. Leurs besoins métaboliques sont très importants (ils utilisent 20% du métabolisme du corps alors qu'ils ne constituent que 5% de sa masse). Enfin, les cellules épendymaires séparent le tissu nerveux central du liquide céphalo-rachidien contenu dans les ventricules du cerveau. Le liquide céphalo-rachidien est sécrété par les cellules des plexus choroïdes, qui ne sont pas des cellules nerveuse.

2.1.2. Précurseurs neuronaux et gliaux au cours du développement du système nerveux central

A l'exception de la microglie, toutes les cellules constituant le SNC dérivent du neuroectoderme. Neurones, astrocytes et oligodendrocytes dérivent donc d'un précurseur commun, une cellule multipotentielle présente dans le neuroépithélium (pour revue voir (Alvarez-Buylla et al., 2001)). Ce précurseur peut être considéré comme une CSN, car il possède les caractéristiques qui définissent les cellules souches : auto-renouvellement, capacité de prolifération quasi-infinie et capacité de générer les types cellulaires qui constituent le tissu dont elles sont issues.

Le neuroectoderme est un feuillet embryonnaire pseudostratifié qui s'invagine pour former la gouttière neurale qui se refermera pour former le tube neural (pour revue, voir (McConnell, 1995; Temple, 2001)). Le tube neural contient les CSN qui, au cours d'une phase d'expansion transitoire vont proliférer par division symétrique (figure 7) (Mione et al., 1997). On estime

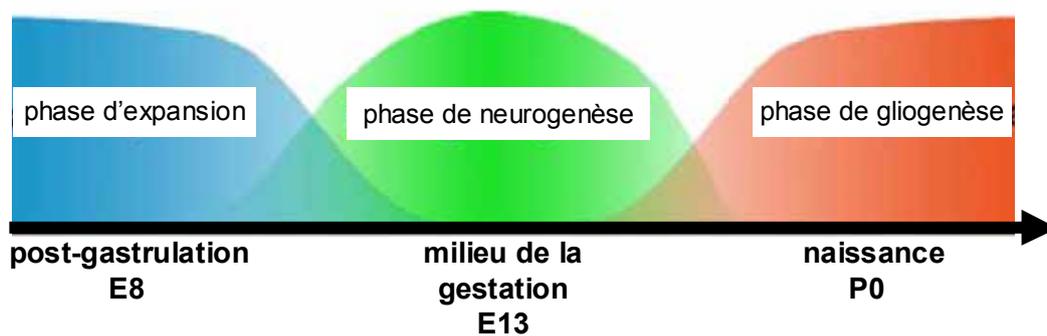


Figure 7. Phases du développement du système nerveux embryonnaire
 Durant la phase d'expansion les cellules souches neurales (CSN) primitives s'autorenouvellent par divisions symétriques. Durant la phase de neurogenèse quelques CSN se divisent de façon asymétrique pour produire une CSN et un neurone (ou un progéniteur neural). Durant la phase de gliogenèse les CSN ne génèrent plus de neurones mais des cellules gliales.

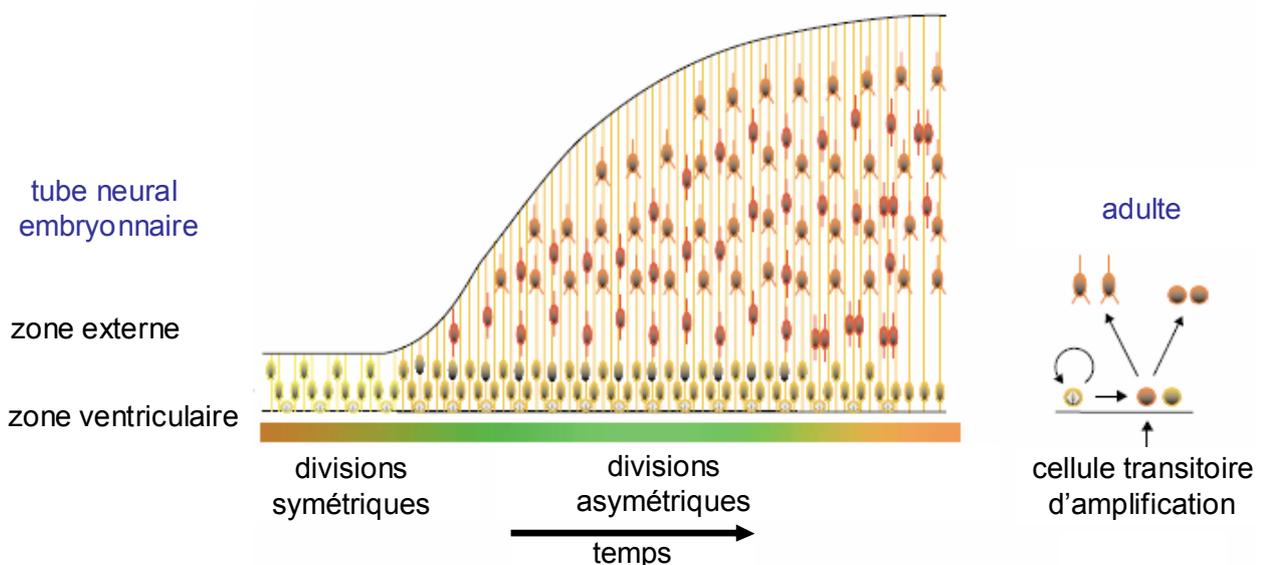


Figure 8. Migration des neuroblastes le long des cellules radiaires

Avant la phase de neurogenèse, les divisions symétriques servent à augmenter le stock des CSN, Au cours de la phase de neurogenèse des divisions asymétriques génèrent également des neuroblastes qui migrent de la zone ventriculaire où ils sont produits vers la zone externe du tube neural qu'ils colonisent en suivant les prolongements cellulaires de la glie radiaire.

Chez l'adulte dans les sites où a lieu la neurogenèse (zone sous-ventriculaire), les CSN subissent des divisions asymétriques qui vont générer des cellules intermédiaires appelées «cellules transitoires d'amplification », qui génèrent des neurones par division symétrique.

qu'au 8^{ème} jour de développement embryonnaire (E8), 50% des cellules du tube neural sont des précurseurs pouvant générer neurones, astrocytes et oligodendrocytes. La proportion de ces cellules décroît rapidement jusqu'à la naissance pour représenter moins de 1% de la population des cellules du SNC. Cette proportion de cellules souches a été estimée par des études clonales effectuées *in vitro*, quantifiant le nombre de cellules tripotentiels capables de générer neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Ces estimations peuvent varier en fonction du type de test utilisé. Ainsi, si le test de formation des neurosphères est utilisé (c'est-à-dire leur capacité à former des clones de cellules multipotentiels en culture et tenant compte de l'autorenouvellement, cf. chapitre I.2.2.), la proportion de CSN estimée sera beaucoup plus faible. Cette différence peut s'expliquer par le fait que, d'une part les CSN peuvent ne constituer qu'une petite proportion des précurseurs multipotentiels présents dans le tube neural en développement et que, d'autre part les CSN sélectionnées par cette technique ne sont qu'une partie des cellules souches répondant à l'EGF ou au bFGF (Tropepe et al., 1999). De nombreux auteurs pensent que les CSN prennent dans l'embryon l'apparence des cellules gliales radiaires, dont le soma réside à proximité de la zone ventriculaire (pour revue, voir (Alvarez-Buylla et al., 2001)). Les cellules radiaires vont ensuite prendre la forme d'astrocytes à la fin du développement du SNC, dont certains garderont des caractéristiques de CSN (Doetsch, 2003a; Doetsch, 2003b).

La phase d'expansion des CSN est ensuite remplacée par une phase neurogénique (E10-E18, chez les rongeurs) au cours de laquelle les CSN vont se diviser de manière asymétrique pour générer des précurseurs de neurones (neuroblastes), qui vont à leur tour proliférer et coloniser le tube neural. Dans le tube neural, la majorité de la prolifération a lieu dans la zone ventriculaire germinale et les neuroblastes générés au cours de la phase neurogénique vont migrer le long de la glie radiaire, dont les cellules restent en contact avec la zone ventriculaire et la couche externe pour finalement coloniser l'ensemble du tube neural (figure 8).

La dernière phase est la phase gliogénique (E18 – développement post-natal, chez les rongeurs) au cours de laquelle les cellules gliales vont être générées.

2.1.3. Mise en place des lignages cellulaires à partir des CSN

Les mécanismes par lesquels une CSN donne naissance aux trois types cellulaires du SNC sont encore mal connus. On sait cependant que ce phénomène procède par étapes successives au cours desquelles les potentialités développementales de la CSN initiale sont progressivement restreintes. Il y a ainsi production de précurseurs intermédiaires aux potentialités de plus en plus limitées qui aboutiront à des cellules différenciées. La figure 9

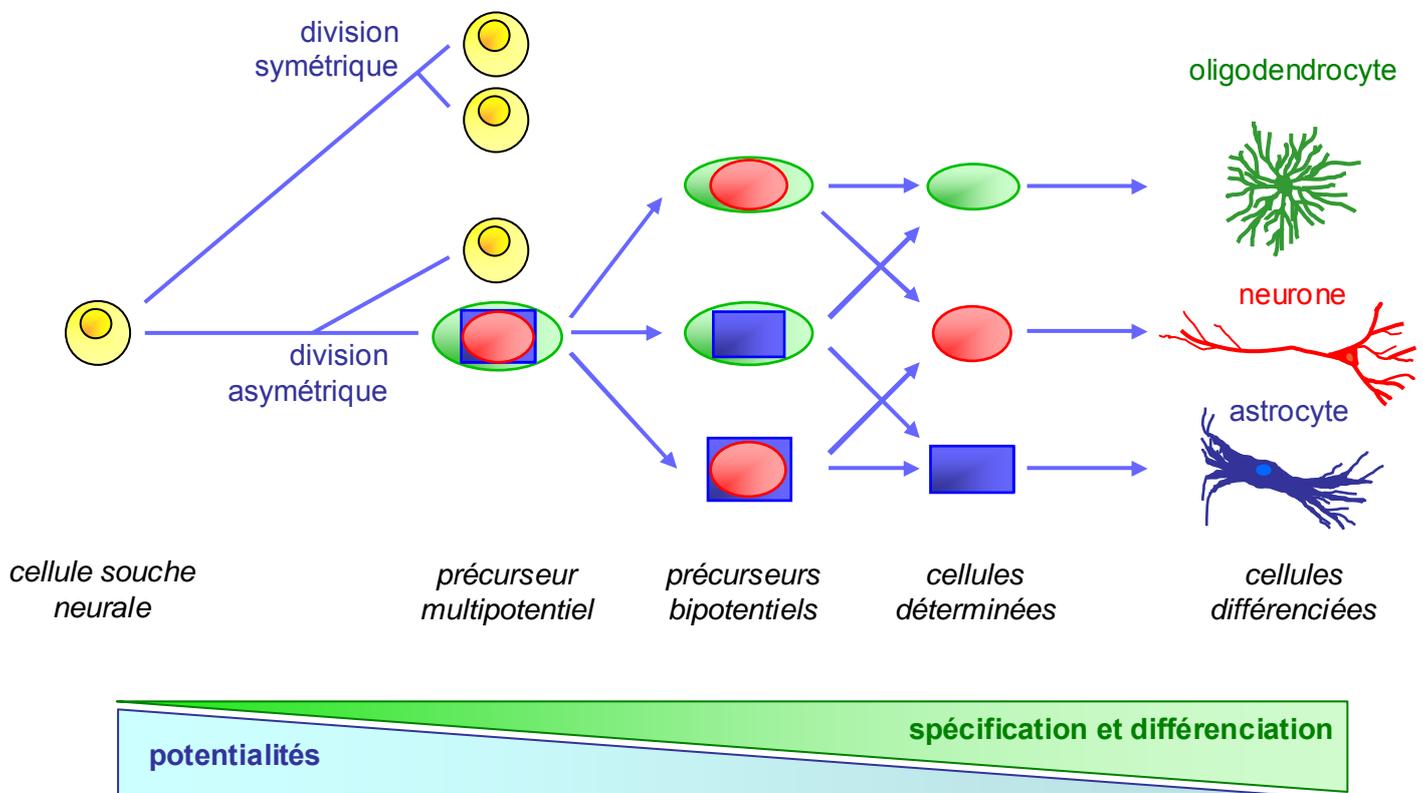


Figure 9. Représentation théorique de la production des différents lignages à partir des cellules souches neurales

Selon ce schéma hypothétique, les divisions symétriques produisent deux cellules filles équivalentes à la cellule souche d'origine. Ce mécanisme contribue à l'amplification du stock de cellules souches. Les divisions asymétriques produisent une cellule souche identique à la cellule d'origine et un précurseur multipotentiel. Ce précurseur multipotentiel subit progressivement une restriction des potentialités développementales, qui par étapes successives aboutissent à la formation des précurseurs déterminés. C'est sur ces précurseurs déterminés que s'effectuera la différenciation proprement dite. Au cours de ces différentes étapes, la capacité des cellules à donner des types cellulaires différents diminue alors que leur degré de différenciation augmente. (adapté de Lilien, 1998)

(adaptée de (Lillien, 1998)) représente le schéma de la filiation hypothétique entre la CSN d'origine et ses descendants : neurones, oligodendrocytes et astrocytes, définissant ainsi différents lignages pour chacun des types cellulaires. Même si ces lignages sont encore incertains, on peut distinguer différentes étapes grâce à la mise en évidence de précurseurs intermédiaires, identifiés in-vivo ou in-vitro.

La division asymétrique produit une cellule souche identique à la cellule mère et une autre cellule ayant conservé toutes ses potentialités développementales, mais ayant perdu la possibilité de s'autorenouveler (le précurseur multipotentiel).

Ensuite, des étapes de restriction des potentialités développementales aboutissent successivement à des précurseurs bipotentiels, puis à des précurseurs considérés comme déterminés, ne possédant plus qu'une seule possibilité de développement. Ces précurseurs de neurones, astrocytes et oligodendrocytes vont alors se différencier pour former les types cellulaires matures du SNC.

Ce modèle est théorique, essentiellement en raison de du peu de marqueurs spécifiques connus permettant d'identifier les types cellulaires intermédiaires. Cependant de nombreuses études, réalisées dans différents systèmes aussi bien in vivo que in vitro, ont permis de montrer l'existence de certains précurseurs intermédiaires, au moins dans certaines conditions.

Ainsi, l'existence de précurseurs bipotentiels a-t-elle été mise en évidence par analyse clonale in vivo et in vitro. Ces études montrent par exemple que, dans le cortex embryonnaire de Rat, il existe deux types de précurseurs bipotentiels : des cellules capables de générer in vitro, à la fois des neurones et des oligodendrocytes (N-O) et des cellules donnant naissance à des clones composés de neurones et d'astrocytes (N-A) (Grove et al., 1993). Il existe également des cellules précurseurs capables de se différencier in vitro en oligodendrocytes et en astrocytes de type 2 : les cellules O-2A, plus récemment appelées OPC (oligodendrocytes precursor cells, selon la terminologie anglo-saxonne). Mais in vivo, ces cellules ne donnent jamais naissance à des astrocytes (Bogler et al., 1990; Raff et al., 1983). En revanche, l'analyse clonale in vitro des cellules de la zone ventriculaire a mis en évidence un précurseur commun pour les astrocytes et les oligodendrocytes dans l'embryon et le nouveau-né chez le rat (Levison et Goldman, 1993).

Tester la validité de ce schéma in vivo est expérimentalement plus difficile. La plupart des études reposent sur une analyse clonale basée sur l'utilisation de virus marqués, injectés à des dilutions telles que, statistiquement, une seule cellule de la zone ventriculaire sera infectée. Les animaux sont ensuite sacrifiés à des temps variables, et la descendance de la cellule

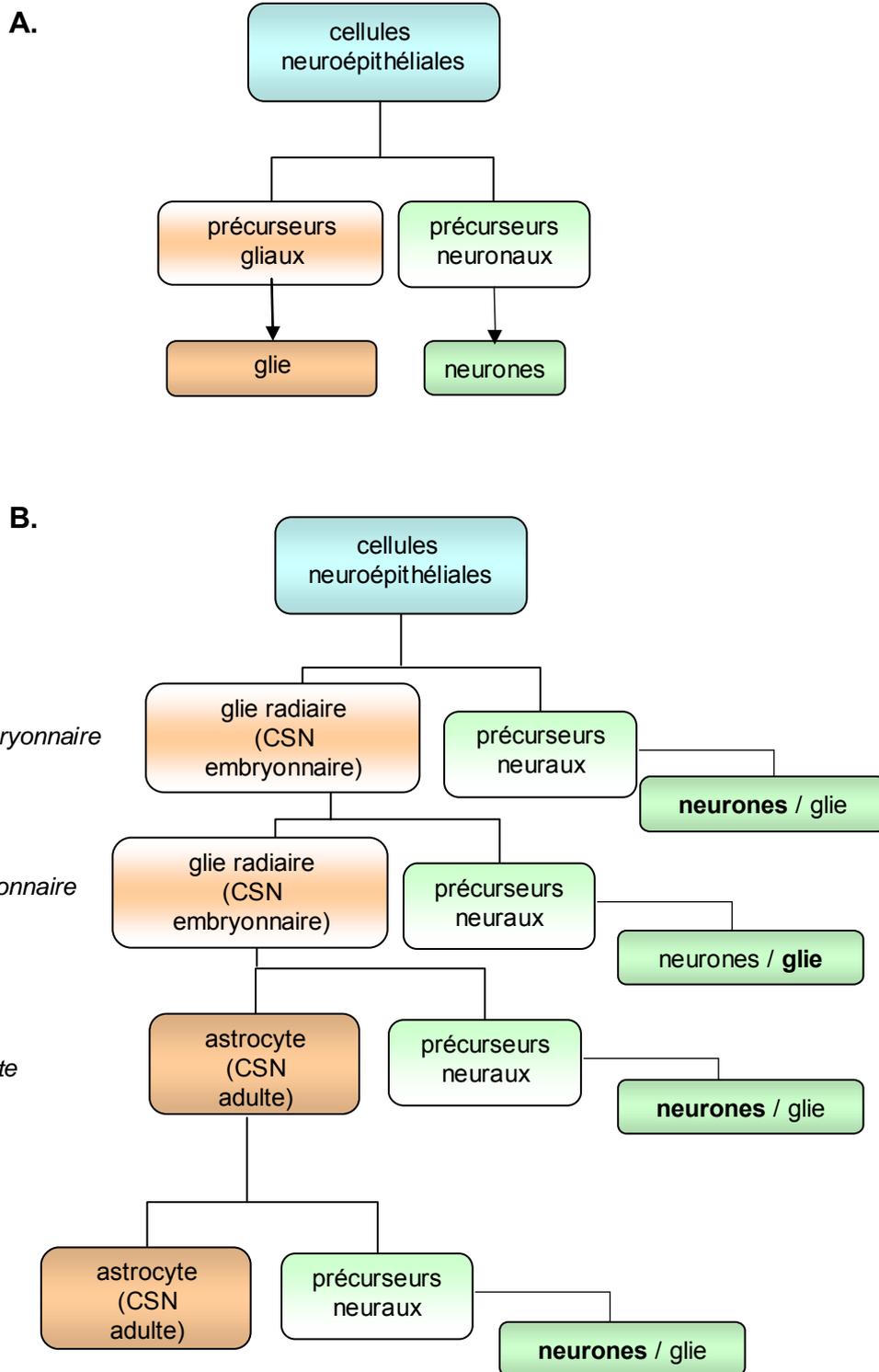


Figure 10. Diagramme résumant les modèles de lignages cellulaires à partir des cellules neuroépithéliales

(A) Ancienne hypothèse : Les cellules neuroépithéliales donneraient naissance à deux populations cellulaires, les précurseurs neuronaux et les précurseurs gliaux

(B) Hypothèses récentes : Les cellules neuroépithéliales donneraient naissance aux neurones et aux astrocytes de façon plus complexe. Les cellules souches neurales (CSN), d'abord neuroépithéliales prendraient l'apparence de la glie radiaire chez l'embryon puis celle des astrocytes de la zone sous-ventriculaire chez l'adulte. Les précurseurs neuraux résultant de la division asymétrique des cellules souches neurales seraient capables de se diviser pour amplifier les populations cellulaires intermédiaires.

(Adapté de Alvarez et al., 2001)

initiale infectée est repérée grâce à un marqueur couplé au virus et identifiée grâce à des critères morphologiques. La plupart des clones sont constitués d'un seul type de cellules (différent selon le stade auquel a lieu l'infection). Cependant quelques clones, constitués de plusieurs types de cellules, démontrent la présence de précurseurs multipotentiels dans la population des cellules injectées (Reid et al., 1995). Une étude réalisée à partir de cellules du neuroépithélium a apporté la preuve de l'existence d'une relation directe entre ces cellules souches multipotentielles et deux types de cellules précurseurs : des cellules monopotentielles qui se différencient en neurones et des cellules bipotentielles précurseurs de cellules gliales (Mayer-Proschel et al., 1997).

L'ensemble des données montre toutefois que les potentialités des cellules souches et des précurseurs qui en découlent sont souvent multiples *in vitro*, alors qu'elles semblent beaucoup plus limitées *in vivo*, vraisemblablement en raison de facteurs environnementaux présents *in vivo* qui ont pour effet de définir des voies de développement et d'en assurer la continuité.

Cette différence de comportement des CSN et de leur descendance *in vivo* et *in vitro* reflète bien la différence entre le « possible » et le « physiologique », caractéristique des cellules souches en général et des CSN en particulier. Différence qui se révélera essentielle pour l'utilisation des cellules souches à des fins thérapeutiques (pour revue, voir (Anderson et al., 2001)).

En conclusion, en substitution du modèle ancien de développement du SNC, selon lequel les cellules souches neuroépithéliales produiraient deux groupes distincts de précurseurs - neuronaux et gliaux - se substituerait un modèle de lignage des CSN (figure 10). La base de ce modèle de lignage serait occupée par les cellules neuroépithéliales, qui donneraient naissance aux cellules gliales radiaires chez l'embryon, pour finalement prendre la forme des astrocytes de la zone sous-ventriculaire après la naissance.

2.2. CSN et modèle des neurosphères

2.2.1. Présentation du système des neurosphères

Etant donné qu'on ne connaît pas de marqueurs hautement spécifiques des cellules souches, ces cellules sont souvent caractérisées *a posteriori* en fonction de leurs capacités développementales. Par ailleurs, la découverte de populations de cellules souches dans un tissu donné est souvent corrélée avec la mise en place de conditions de culture *in-vitro*, souvent de manière empirique. Comme nous l'avons expliqué au cours du premier chapitre de

Caractéristique d'une cellule souche

- auto-renouvellement
- prolifération quasi-illimitée
- multipotentialité

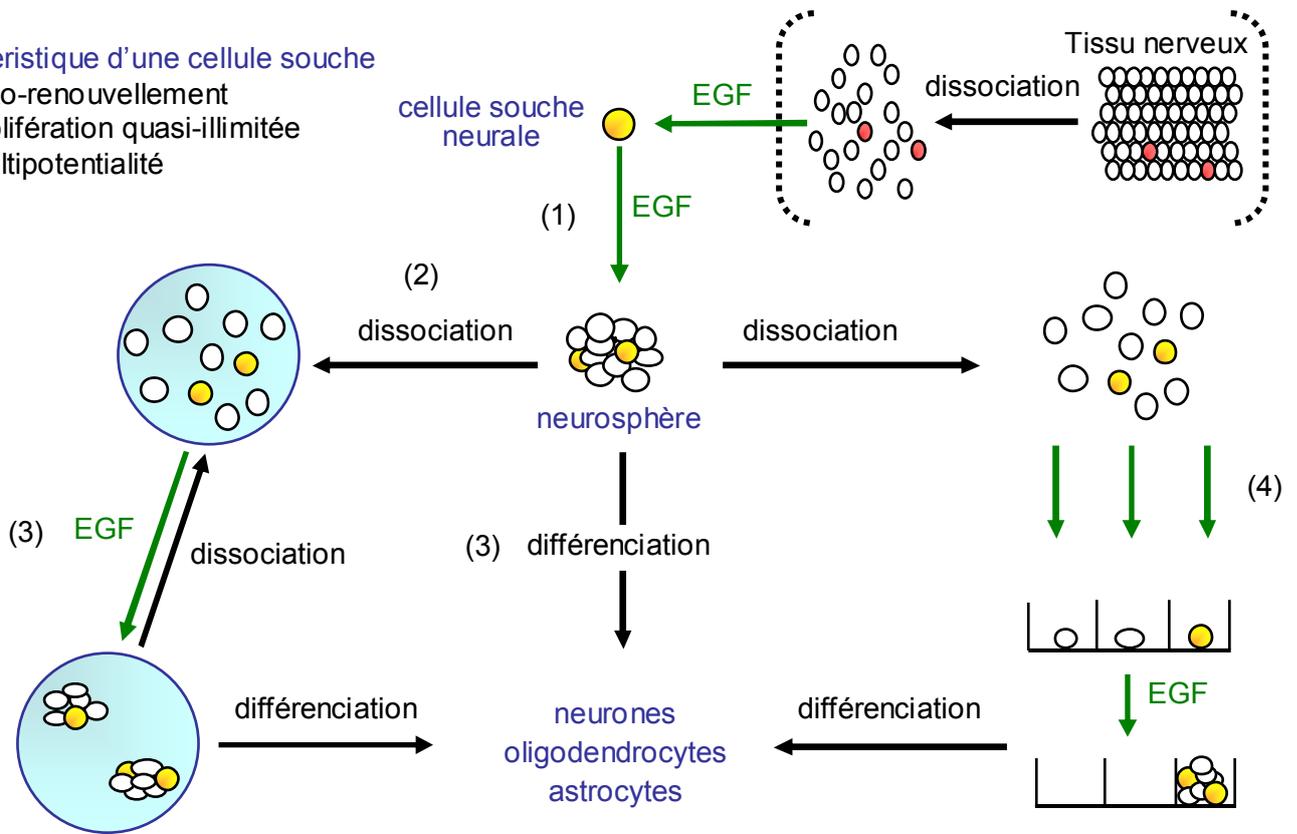


Figure 11. Les cellules souches neurales sont à l'origine des neurosphères

(1) Après dissociation du tissu nerveux embryonnaire, en présence d'EGF, les cellules souches neurales survivent et prolifèrent pour former des clones de cellules non différenciées flottant dans le milieu, les neurosphères primaires.

(2) Après dissociation, en présence d'EGF, les neurosphères primaires donnent naissance à des neurosphères secondaires. Les neurosphères secondaires peuvent ainsi être entretenues pendant de nombreux passages in vitro. Ces cellules EGF-dépendantes sont donc capables d'auto-renouvellement et de prolifération quasi-illimitée.

(3) Sur un support permettant leur adhésion, les cellules composant les neurosphères se différencient pour donner les trois types cellulaires majeurs constituant le système nerveux central: neurones, astrocytes et oligodendrocytes.

(4) En cultivant les cellules composant les neurosphères en condition clonale, seule une minorité des cellules (environ 5%) forme de nouvelles neurosphères, qui sont capables de se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Les cellules à l'origine des neurosphères sont donc multipotentielles. Ces cellules sélectionnées par l'EGF sont capables d'auto-renouvellement et de prolifération quasi-illimitée et sont capables de donner naissance aux types cellulaires présents dans le tissu d'origine (multipotentialité). Ces cellules EGF dépendantes sont donc bien des cellules souches neurales.

(Adapté de Reynolds et Weiss, 1996)

l'introduction, pour être considérée comme une cellule souche, une cellule doit répondre à trois critères décrits par (Loeffler et Roeder, 2004; Potten et Loeffler, 1990) : autorenouvellement, prolifération quasi-illimitée et multipotentialité.

Dans le cas de CSN, c'est la culture des « neurosphères » qui est le système le plus utilisé pour les sélectionner et les cultiver. Dans des conditions de culture appropriées (milieu défini, complété avec de l'EGF et/ou du FGF2), décrites dans les méthodes expérimentales du manuscrit et mises au point initialement par Reynolds et Weiss (Reynolds et Weiss, 1996), il est possible de sélectionner et d'induire la prolifération des CSN à partir de tissu cérébral embryonnaire ou adulte (figure 11) (pour revue, voir (Reynolds et Rietze, 2005)).

L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle constitue un système de sélection au cours duquel les cellules déterminées ou différenciées meurent alors que seules les CSN vont survivre et entrer dans un état de prolifération active. Dans ces conditions, chaque CSN va former un clone de cellules indifférenciées qui pousse en suspension dans le milieu et que l'on appelle neurosphère. La cellule souche d'origine va se diviser de manière symétrique et asymétrique au sein de la neurosphère pour s'autorenouveler et amplifier la population de CSN. Seules 5 à 10% des cellules composant les neurosphères sont des CSN. Cette proportion reflète la fréquence des divisions symétriques. Le reste de la neurosphère est composé de précurseurs multi, bi ou monopotentiels. Ces neurosphères dites primaires peuvent alors être dissociées et remises en culture. Dans ces conditions, seules les CSN survivent pour former à nouveau des neurosphères, dites secondaires. Il est ainsi possible d'obtenir des lignées de CSN stables pouvant être maintenues dans ce système des neurosphères pendant de longues périodes et être congelées. Certains auteurs ont suggéré que le système de maintien *in vitro* des neurosphères sur de trop longues périodes pourrait avoir des conséquences négatives sur la stabilité des lignées obtenues (réf vanderkooy). Les lignées de neurosphères auraient en effet tendance à dériver après de trop nombreux passages, certains précurseurs n'étant plus sélectionnés par l'EGF.

Lorsque les neurosphères sont déposées sur un support permettant leur adhésion et lorsque les facteurs mitogéniques (EGF) sont retirés du milieu, les cellules constituant les neurosphères vont arrêter de se diviser et vont entrer en phase de différenciation. Il est ainsi possible d'obtenir, à partir des neurosphères des neurones, astrocytes et oligodendrocytes, et ceci dans des proportions définies.

2.2.2. Applications des neurosphères

Le système des neurosphères offre de multiples utilisations en recherche fondamentale et appliquée. Il permet l'étude *in vitro* de mécanismes régulant la spécification des CSN ainsi que ceux régulant la différenciation des précurseurs neuraux. Il permet également d'obtenir des lignées de neurosphères à partir d'animaux transgéniques létaux à des stades précoces du développement et ainsi d'étudier la neurogenèse, dans des contextes génétiques ne le permettant pas *in vivo*.

Il est également possible d'étudier, grâce à ce modèle, l'effet de toutes sortes de facteurs extrinsèques tels que les facteurs de croissance sur le devenir des CSN. Dans ce cadre, les neurosphères peuvent également servir de système de criblage pour tester des chimiothèques de petites molécules et ainsi découvrir des drogues potentiellement capables de « réveiller » les cellules souches présentes dans le cerveau adulte, de stimuler leur prolifération et/ou d'orienter leur spécification vers une voie donnée, la voie neuronale par exemple. Le contrôle supplémentaire de la différenciation des neuroblastes vers un type particulier de neurones permettrait ainsi de disposer d'un matériel quasi-illimité de greffe à utiliser dans le traitement de maladies neurodégénératives (par exemple, obtention de neurones GABAergiques et DOPAminergiques dans le cas des maladies de Huntington et de Parkinson respectivement).

2.3. Plasticité des cellules souches neurales

2.3.1. Plasticité des CSN au sein du SNC

Le devenir des CSN transplantées semble être dicté par l'environnement dans lequel les cellules sont placées. Les travaux de Gage (1995) en sont une belle illustration : bien que les CSN aient la capacité de produire neurones, astrocytes et oligodendrocytes *in vitro*, les CSN, si elles sont transplantées dans l'hippocampe, ne vont générer que des neurones hippocampiques. De même, transplantées dans la zone sous ventriculaire, elles vont générer les types cellulaires présents dans la zone sous ventriculaire. Enfin, si ces mêmes cellules sont transplantées dans des zones du cerveau où aucune neurogenèse n'a lieu, elles ne formeront que des cellules gliales (Gage et al., 1995). Il est également possible d'influencer le comportement des CSN *in vivo* en modifiant leur microenvironnement. Ainsi, une micro injection locale d'EGF (Craig et al., 1996), de bFGF (Kuhn et al., 1997) ou de TGF- α (Tropepe et al., 1997) augmente la prolifération cellulaire dans les zone sous-ventriculaire et dans le hile du gyrus denté de l'hippocampe et le type de cellules générées est influencé par le facteur injecté.

La revue publiée par Klein et Fishell en octobre 2004 présente une vue générale des potentialités des CSN après transplantation dans le SNC (Klein et Fishell, 2004).

2.3.2. Potentialités des CSN pour la régénération du SNC

La plasticité des CSN au sein du SNC laisse entrevoir des perspectives pour la réparation de lésions du SNC - accidentelles ou dues à des maladies neurodégénératives - (pour revue, voir (Klein et Fishell, 2004; Romanko et al., 2004; Rossi et Cattaneo, 2002)).

Par exemple, dans le cas de la maladie de Parkinson, de nombreux travaux ont étudié les potentialités de transplantation des CSN dans des animaux modèles (pour revue, voir (Roybon et al., 2004)). Il a été montré que ces cellules s'engagent dans la voie neuronale et gliale mais que peu d'entre elles vont exprimer la tyrosine hydroxylase (TH) - une enzyme nécessaire à la synthèse de Dopamine, marqueur des neurones dopaminergiques, lésés dans le cas de la maladie de Parkinson - (Nishino et al., 2000; Svendsen et al., 1997; Svendsen et al., 1996). Pour tenter d'améliorer ces résultats, d'autres investigateurs, en particulier l'équipe de McKay, ont décidé de transplanter des populations déjà enrichies en neurones dopaminergiques, obtenus *in vitro* à partir de CSN. Dans ce cas, une amélioration significative des capacités comportementales a été observée (Sanchez-Pernaute et al., 2001; Studer et al., 1998). Des résultats analogues ont été observés en utilisant des neurones dopaminergiques obtenus à partir de cellules ES (Lee et al., 2000). Les cellules greffées ont une activité électrique normale, montrant que ces cellules ont pu s'intégrer au tissu lésé en développant des synapses fonctionnelles, si bien qu'une amélioration comportementale est observée (Kim et al., 2002).

Dans le cas de lésions mécaniques de la moelle épinière, les potentialités des transplantations de CSN ont été étudiées. Il a été montré que des CSN existent dans la moelle épinière adulte mais, après une lésion, elles semblent se différencier exclusivement en astrocytes, participant ainsi à la formation de la cicatrice gliale qui empêche la régénération des axones (Johansson et al., 1999; Namiki et Tator, 1999). La transplantation de CSN a donné différents résultats : dans certaines études, elles se différencient uniquement en astrocytes, alors que dans d'autres, elles migrent vers la lésion pour se différencier en neurones (pour revue, voir (Okano et al., 2003)). Dans les cas de différenciation en neurones, une amélioration des fonctions locomotrices a également été observée.

Comme nous l'avons vu dans ces deux exemples, selon le type de pathologie du SNC, la réparation fonctionnelle nécessite d'une part le remplacement des cellules lésées par le bon type cellulaire et d'autre part le rétablissement de connections fonctionnelles entre les cellules

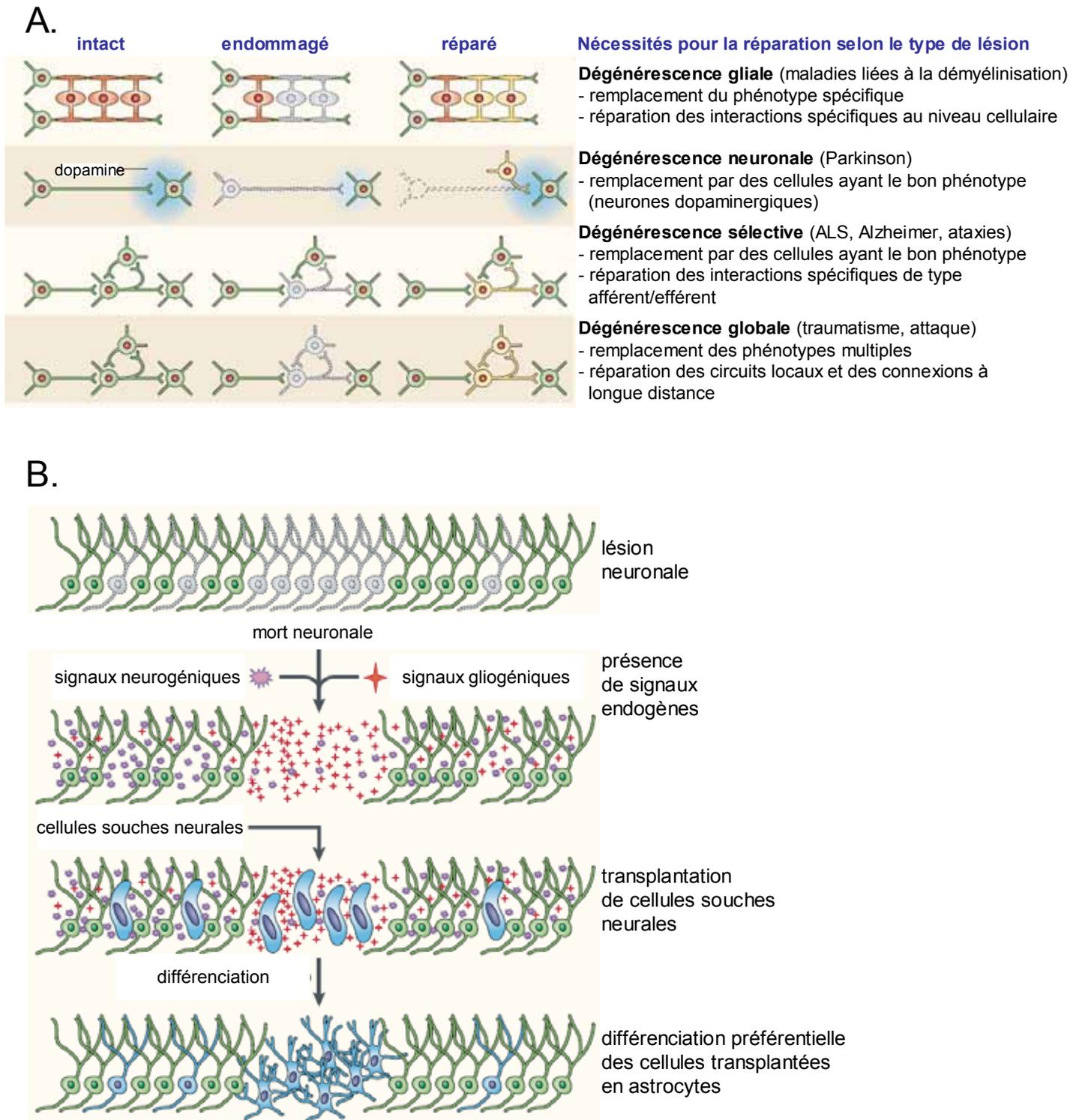


Figure 12. Utilisation de la thérapie cellulaire pour réparer des lésions du système nerveux

(A) Nécessités pour obtenir une réparation fonctionnelle en fonction du type de lésion.

Dans le cas de dégénérescence gliale (par exemple dans le cas des maladies dues à une démyélinisation) ou de mort neuronale (par exemple dans le cas de la maladie de Parkinson) les cellules transplantées doivent générer des phénotypes appropriés pour rétablir des interactions spécifiques avec les éléments natifs au niveau cellulaire. Dans ce cas la réparation fonctionnelle nécessite le remplacement des éléments cellulaires endommagés. Dans d'autres cas les cellules greffées doivent adopter le phénotype approprié afin de restaurer la structure anatomique d'origine et parfois les cellules greffées doivent restaurer les connexions des structures endommagées avec d'autres structures à distance.

(B) La transplantation de CSN multipotentes dans le cas de pathologies associées à une mort neuronale conduit souvent à la formation d'une cicatrice gliale, les cellules transplantées se différencient préférentiellement en astrocytes sous l'influence des facteurs présents dans la zone lésée.

(adapté de Rossi et Cattaneo, 2002)

remplacées (figure 12A). Généralement, il est plus prometteur de transplanter des cellules ayant acquis le bon phénotype *in vitro* que de transplanter des cellules multipotentes qui auront souvent tendance à se différencier en cellules gliales (figure 12B).

Ces observations montrent qu'il est important de comprendre les mécanismes régulant la quiescence, le déterminisme et la différenciation des CSN. Ces études permettraient d'élaborer des méthodes d'obtention des populations enrichies en neurones du type désiré à partir des cellules souches mais également de développer de nouvelles drogues pouvant par exemple activer les CSN présentes dans le SNC chez l'adulte et les orienter vers le type cellulaire adéquat.

2.4. Facteurs régulant le déterminisme et la différenciation des CSN

Lorsque j'ai rejoint le laboratoire pour y effectuer mon Master, les mécanismes, par lesquels une cellule souche multipotentielle donne naissance aux différents types cellulaires au cours du développement du système nerveux, étaient encore mal connus. On savait cependant que la spécification cellulaire, étape au cours de laquelle la cellule précurseur « choisit » de s'engager dans la voie de développement neuronale ou gliale, est contrôlée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (pour revue voir (Eklund et Jessell, 1999)).

2.4.1. Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques dépendent de l'histoire de la cellule. Ils correspondent notamment à certains facteurs de transcription. Lorsqu'ils sont inégalement répartis dans la cellule souche au cours d'une division asymétrique, ils lui permettent de générer deux cellules filles non équivalentes. Ainsi chez la drosophile, la distribution asymétrique du facteur de transcription Prospero est responsable de la spécification neurones/cellules gliales dans le SNC. En effet, Prospero active l'expression du gène *glial cells missing (gcm)* qui est nécessaire et suffisant pour qu'une cellule possédant la double potentialité neurone/cellule gliale s'engage dans la voie de différenciation gliale (Freeman et Doe, 2001). De même, la distribution asymétrique de Numb entre deux cellules peut influencer le devenir, comme cela sera décrit au §3.2.3 de l'introduction.

2.4.2. Facteurs extrinsèques

On regroupe sous le terme de facteurs extrinsèques les facteurs extérieurs à la cellule, par exemple, certains facteurs diffusibles présents dans le milieu extracellulaire, tels que certains facteurs de croissance, ainsi que les interactions entre cellules voisines (interactions

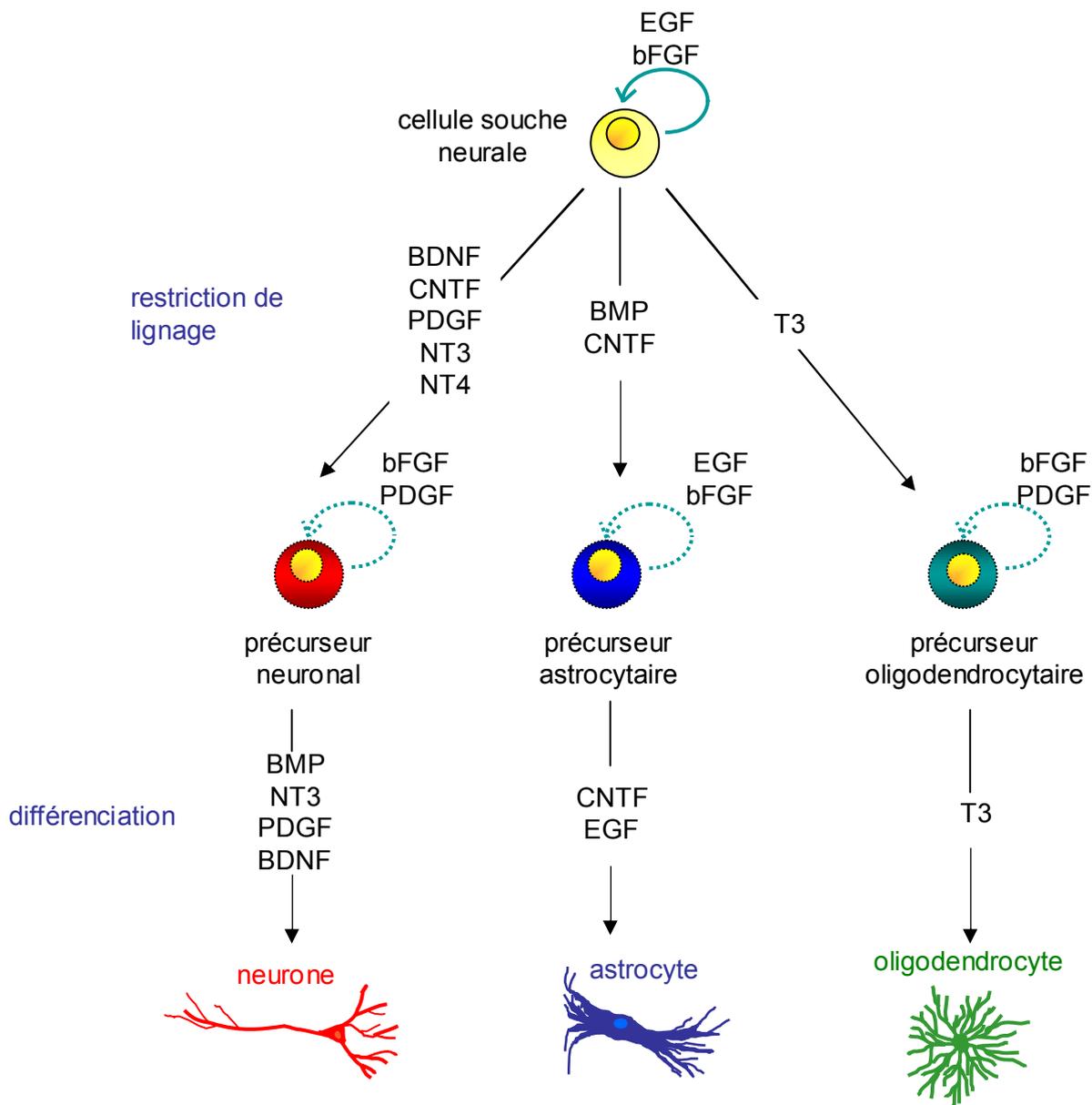


Figure 13. Influence de facteurs de croissance sur le maintien et la spécification des cellules souches neurales et sur la prolifération et la différenciation des précurseurs neuraux
(Adapté de Guillemot, 2000)

	OLIG ^{ON}	OLIG ^{OFF}
PRONEURAL ^{ON}	motoneurone	interneurone
PRONEURAL ^{OFF}	oligodendrocyte	astrocyte

Figure 14. Rôle des gènes Olig dans le déterminisme des précurseurs neuraux de la moelle épinière
(Adapté de Anderson et al., 2002)

cellulaires directes). En plus de leur activité mitogénique, certains facteurs de croissance sont capables d'orienter les CSN vers une voie de différenciation et de favoriser par exemple la production de neurones ou de cellules gliales (figure 13) (Guillemot, 2000). Ainsi, le CNTF (Johe et al., 1996) et les BMP (Rajan et McKay, 1998) orientent *in vitro* le développement des précurseurs multipotentiels vers la voie astrocytaire, alors que d'autres facteurs orientent les CSN vers la voie neuronale. C'est le cas du BDNF, du CNTF, du PDGF, de NT3 et de NT4 (Caldwell et al., 2001).

Certains facteurs ont parfois des effets différents en fonction du contexte cellulaire. C'est le cas par exemple des BMP qui sont également capables de promouvoir la différenciation neuronale à partir des précurseurs corticaux (Li et al., 1998). Ainsi, le même facteur est capable de promouvoir à la fois la production de neurones et de cellules gliales dans des contextes de développement différents (Mehler et al., 2000). De même, les protéines, sécrétées de la famille de signalisation Wnt (pour revue, voir (Cadigan et Nusse, 1997)), peuvent à la fois promouvoir la prolifération des précurseurs neuraux au début du développement (Zechner et al., 2003) et bloquer la prolifération des mêmes précurseurs aux stades tardifs du développement, tout en activant leur différenciation en neurones (Hirabayashi et al., 2004; Muroyama et al., 2004).

2.4.3. Voies moléculaires et gènes impliqués

De nombreuses voies moléculaires régulent le développement du SNC. Ces voies sont activées ou inhibées par différents facteurs extrinsèques et intrinsèques.

Parmi ces voies, la voie Notch est apparue comme un mécanisme majeur de signalisation entre cellules voisines, notamment au cours du développement du SNC. Schématiquement, la voie Notch promeut le devenir glial aux dépens du devenir neuronal, mais a également pour effet de maintenir les CSN dans un état indifférencié. Nous détaillerons le rôle de la voie Notch dans la neurogenèse dans le chapitre 3 de l'introduction.

Certains facteurs de transcription de type basic-helix-loop-helix (bHLH) sont impliqués dans le développement du système nerveux. Les facteurs HES1 et HES5, directement activés par la voie Notch, vont ainsi inhiber d'autres facteurs bHLH, tels que MASH1, Neurogenine ou NeuroD qui sont des facteurs proneuraux. L'activation de facteurs proneuraux va avoir pour effet de favoriser le devenir neuronal et la différenciation des neurones (pour revue, voir (Guillemot, 1999)).

De nouveaux facteurs de type bHLH, tels que les gènes Olig 1/2 mis en évidence en 2000, ont pour effet de moduler le devenir des précurseurs neuraux (Anderson et al., 2002). L'activation

des gènes *Olig* va avoir des effets différents selon le contexte cellulaire (figure 14). Ainsi, dans la moelle épinière, si les gènes proneuraux sont activés, l'activation de *Olig* conduira à la différenciation des précurseurs de neurones en motoneurones, alors que si *Olig* est inactivé, les neuroblastes deviendront des interneurones. Si les gènes proneuraux sont inactivés (précurseurs gliaux), l'activation ou l'inactivation de *Olig* orienteront respectivement les précurseurs vers la voie oligodendrocytaire ou astrocytaire.

La famille des facteurs de transcription SOX joue également divers rôles dans les CSN (pour revue, voir (Pevny et Placzek, 2005)). L'expression de certains de ces facteurs (*Sox 1* et *2*), régulée par les signaux extrinsèques tels que la BMP ou les FGF, semble définir les potentialités neurales des cellules au cours du développement du neuroectoderme. L'expression de ces gènes maintient les potentialités neurales de ces cellules. Certains auteurs proposent donc d'utiliser SOX comme marqueur des CSN.

La voie JAK/STAT, activée par les cytokines telles que le CNTF ou le LIF, joue un rôle aussi bien dans le maintien des CSN (Shimazaki et al., 2001) que dans la différenciation des astrocytes (Bonni et al., 1997).

On observe que l'activation ou l'inactivation de ces différentes voies moléculaires peuvent conduire à des phénotypes semblables. Cela conduit à supposer qu'il existe des interactions entre ces voies. De plus, il apparaît que le phénotype de différenciation observé dépend souvent d'un équilibre entre différentes voies de signalisation.

2.4.4. Contrôles épigénétiques

Des études récentes ont montré que le contrôle de la spécification cellulaire à partir des CSN se fait également par une modulation de l'expression des gènes de manière épigénétique (pour revue, voir (Hsieh et Gage, 2004)).

Le terme de « contrôle épigénétique » regroupe les mécanismes qui imposent à la descendance d'une cellule un pattern d'expression des gènes et donc une restriction développementale donnée. Ce contrôle se fait sans altération physique de la séquence de l'information codée par l'ADN, mais utilise des mécanismes qui vont remodeler la structure de l'ADN, masquant ainsi les sites permettant l'expression de certains gènes. Ces changements de structure de l'ADN peuvent être aussi bien dus à des facteurs intrinsèques qu'extrinsèques.

Parmi ces modifications épigénétiques, l'acétylation des histones joue un rôle aussi bien dans la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes (Marin-Husstege et al., 2002) que dans le déterminisme neurones / cellules gliales à partir des CSN (Hsieh et al., 2004). Des études

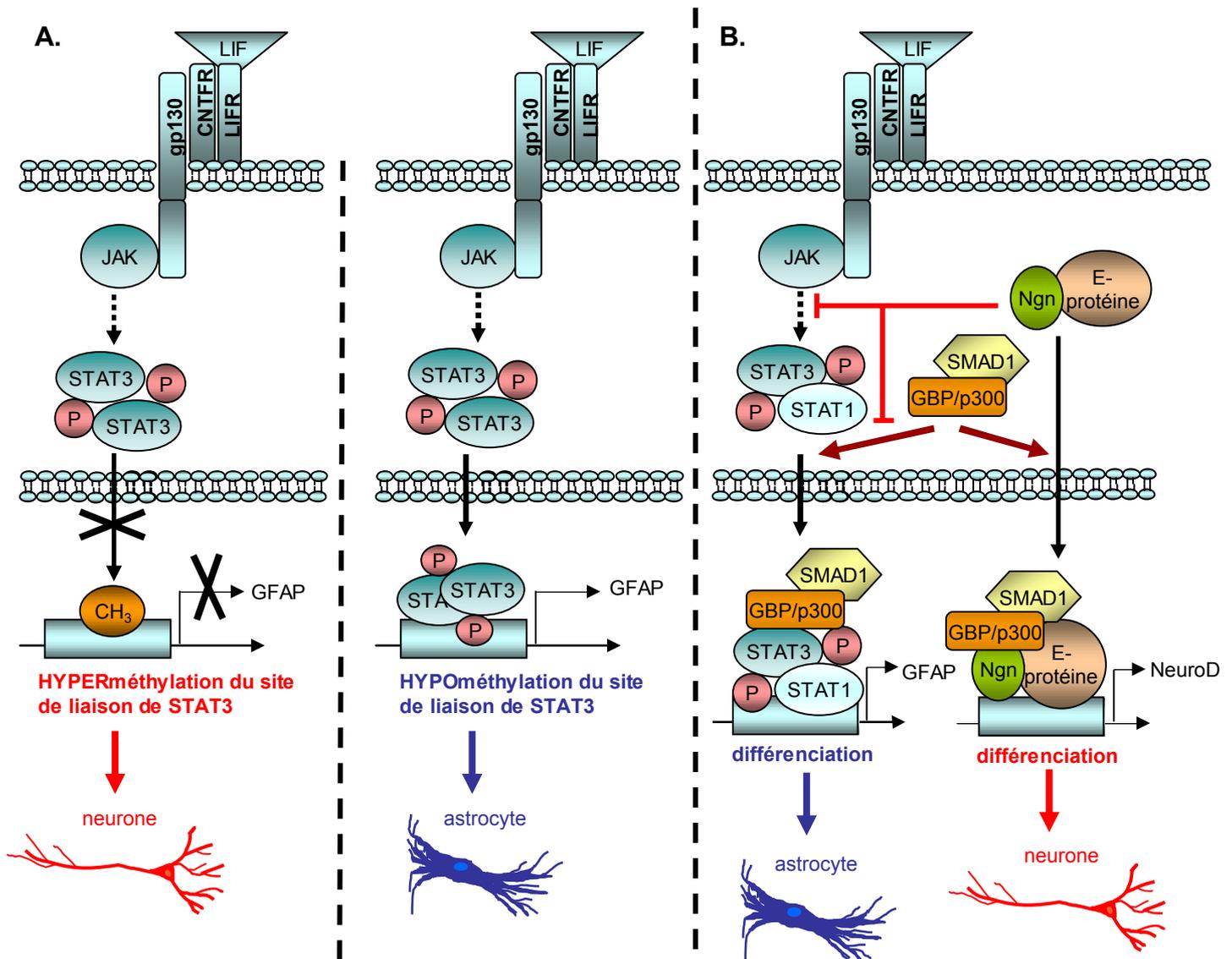


Figure 15. Contrôle épigénétique de l'expression des gènes spécifiques aux lignages glial et neuronal.

(A) Les changements du degré de méthylation du site de liaison de STAT3 à l'ADN contrôlent le passage de la neurogenèse à la gliogenèse durant le développement du télencéphale. Dans les cellules télencéphaliques neuroépithéliales (E11.5) et dans les neurones post-mitotiques, l'activation du gène de la GFAP par STAT3 est inhibé par CpG méthylation. Dans les cellules télencéphaliques neuroépithéliales plus tardives (E14.5) la déméthylation du site de liaison de STAT3 à l'ADN induit l'activation du gène de la GFAP et la différenciation astrocytaire.

(B) Dans le modèle de séquestration, des facteurs neurogéniques de la famille des bHLH tels que *Ngn1* recrutent des complexes activateurs loin des gènes gliaux (tels que la *Gfap*) et près des gènes neuronaux (tels que *NeuroD*). La diminution de l'expression de *Ngn1* permet aux complexes activateurs de se lier aux gènes gliaux, ce qui induit la gliogenèse.

(Dans le schéma, P signifie phosphorylé)

(Adapté de Hsieh et al., 2004)

ont également montré l'importance de la modulation de la chromatine par modification des histones ou par la méthylation de l'ADN dans les phénomènes de neurogenèse, de plasticité neuronale et de mémorisation (Crosio et al., 2003; Martinowich et al., 2003; Zhao et al., 2003).

Un exemple de contrôle épigénétique permet d'expliquer comment STAT3 et le bFGF interviennent dans le choix cellulaire entre neurones et astrocytes au cours du développement (figure 15) (Song et Ghosh, 2004). La voie bFGF peut moduler la méthylation du site promoteur de la *Gfap* sur lequel STAT3 peut se fixer. Une hyperméthylation de ce site suite à l'activation d'une voie bFGF dépendante inhibe l'activation de la transcription de la GFAP et permet au précurseur de s'engager dans la voie neuronale, alors qu'une hypométhylation de ce site permet à STAT3 d'activer l'expression de *Gfap* et poussera le précurseur à se différencier en astrocyte.

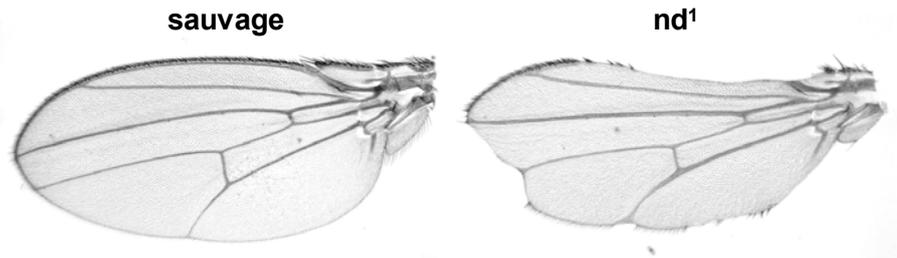


Figure 16. Phénotype des mutants Notch^{+/-} de drosophile
 Comparaison de l'aile d'une drosophile sauvage et d'une drosophile hétérozygote mutante pour Notch (souche nd¹). Le nom de la mutation Notch provient des encoches ("notch" en anglais) visibles à l'extrémité des ailes.
 (photo : J. Royer, IBMC, Strasbourg)

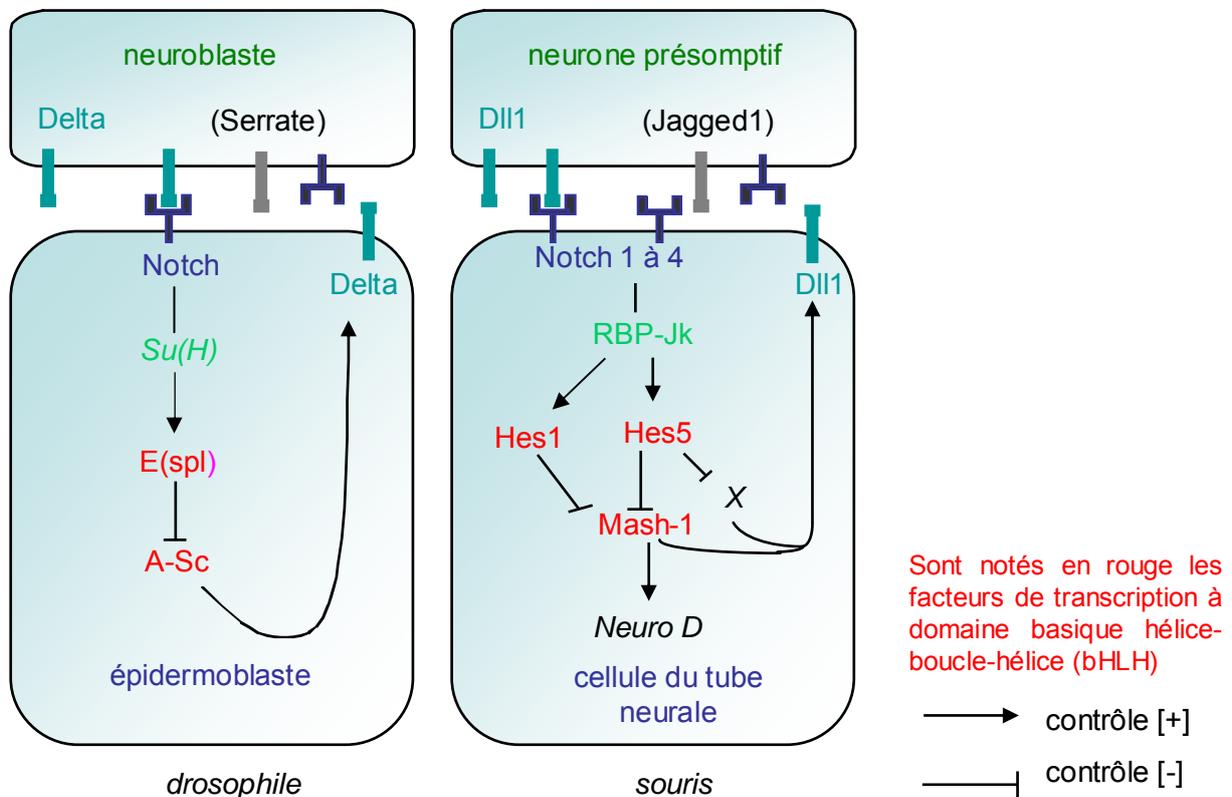


Figure 17. Conservation de la voie de signalisation latérale Notch chez la drosophile et chez la souris.

Moléculairement, NOTCH a été caractérisé comme un récepteur trans-membranaire dont l'activation par la fixation de la partie extra-cellulaire de DELTA ou de SERRATE déclenche une cascade de transduction de signal : Après activation, le domaine intra-cellulaire de NOTCH est clivé et s'associe avec le produit de Su(H) pour activer l'expression d'E(spl). E(Spl) code pour une protéine de type bHLH qui se comporte comme un inhibiteur de Ac-Sc, un gène proneural, facteur de transcription également de type bHLH dont l'expression est nécessaire pour que la cellule s'engage dans la voie neuroblastique.

La voie Notch est bien conservée au cours de l'évolution. Des orthologues ont été trouvés pour chacun des gènes de la voie Notch dans de nombreux organismes. C'est le cas chez la souris où des mutants pour plusieurs de ces gènes ont été produits par transgénèse.

(adapté de De la Pompa et al., 1997)

3. La voie Notch

3.1. Introduction générale à la voie Notch

La mutation Notch a été mise en évidence chez la drosophile au début du XX^e siècle. Dans le cas de perte de fonctions partielles, la drosophile hétérozygote pour *Notch* présente des encoches (notch en anglais) à l'extrémité des ailes (figure 16). A la fin des années 30 Poulson a montré que la perte de fonctions totales de Notch entraînait un phénotype embryonnaire létal, caractérisé par une surproduction de neurones, appelé phénotype « neurogénique » (Poulson, 1937; Poulson, 1940).

La voie de signalisation Notch définit un mécanisme d'interactions cellulaires qui s'exerce essentiellement entre cellules voisines et qui contrôle de nombreux processus développementaux, parmi lesquels le choix de l'identité cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose (pour revue, voir (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999)).

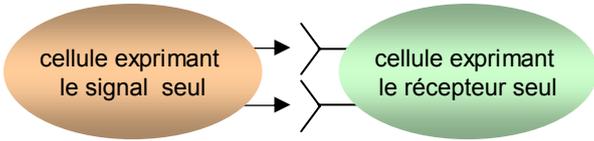
Initialement caractérisée chez la drosophile, la voie Notch repose sur un récepteur transmembranaire, NOTCH, activé par liaison avec un ligand également transmembranaire, DELTA, présent sur une cellule voisine. Une fois NOTCH activé, son domaine intracellulaire de Notch (ICN) est clivé et transloqué dans le noyau où il va jouer le rôle de facteur de transcription en s'associant avec d'autres protéines (Suppressor of Hairless (Su(H))). Le complexe ainsi formé va réguler la transcription de certains gènes, de type bHLH (Enhancer of Split (E(Spl))), qui vont à leur tour inhiber la transcription d'autres gènes (Achaete Scute), qui contrôlent l'expression de gènes neurogéniques (figure 17). La voie Notch est bien conservée au cours de l'évolution et chacun des gènes compte de nombreux orthologues chez les mammifères.

3.2. Voie Notch et spécification

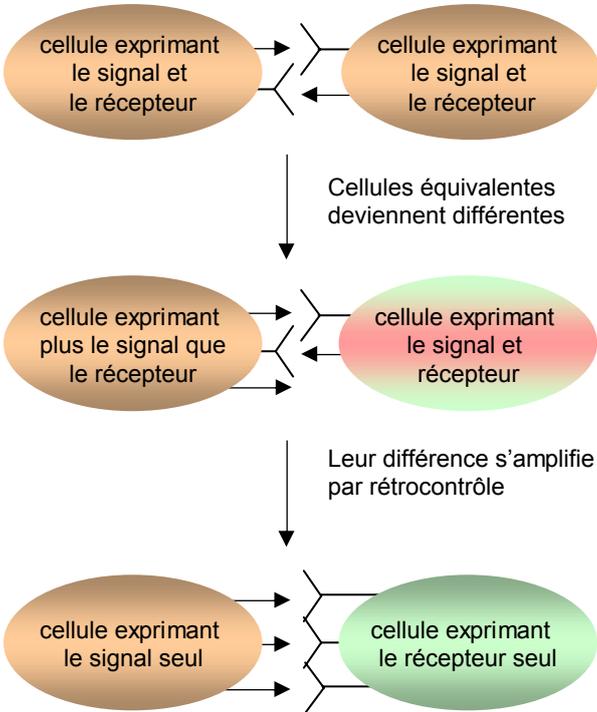
La voie Notch peut jouer sur le devenir cellulaire selon trois mécanismes principaux : (i) le mode inductif, unidirectionnel, (ii) le mode permissif par inhibition latérale, bidirectionnel, (iii) et par division asymétrique (pour revue, voir (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et Simpson, 1991; Kimble et Simpson, 1997; Lai, 2004)).

Dans la plupart des cas, la fonction Notch ne définit pas directement l'identité des cellules sur lesquelles elle s'exerce, mais définit plutôt un état de « compétence » d'une cellule pour répondre à des signaux extrinsèques. Le rôle de la voie Notch dans le déterminisme cellulaire

A. Signalisation par induction



B. Signalisation par inhibition latérale



C. Régulation du signal par ségrégation linéaire

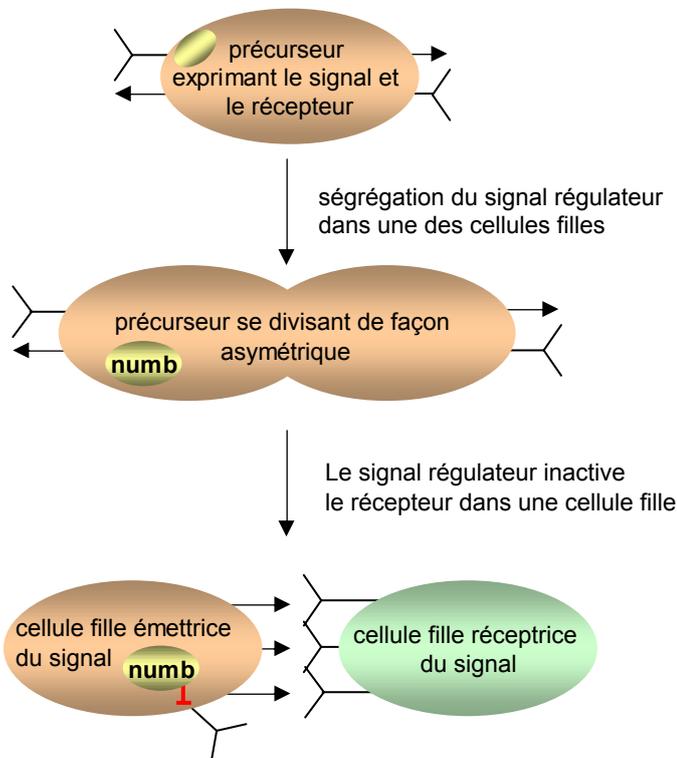


Figure 18. Voie Notch et spécification cellulaire

(A) Signalisation par induction

Les deux types cellulaires contigus ne sont pas équivalents et sont représentés en rose et en vert. Seule la cellule rose exprime le ligand (flèche), alors que seulement la cellule verte exprime le récepteur Notch (forme en Y). Notch agit via des signaux unidirectionnels entre deux cellules. La cellule émettrice du signal (rose) active la voie Notch dans la cellule réceptrice du signal (verte). En réponse à ce signal, la cellule change de potentialité.

(B) Signalisation par inhibition latérale

Notch agit via des signaux inhibiteurs réciproques entre deux cellules qui, à l'origine, ont des potentialités identiques. Deux cellules sont représentées ici pour simplifier le schéma. Des signaux réciproques (inhibition mutuelle) deviennent des signaux d'inhibition unidirectionnelle. Notch inhibe la capacité de la cellule réceptrice du message (verte) de produire elle-même un signal inhibiteur, alors que la cellule émettrice du signal (rose) amplifie le signal inhibiteur par une boucle d'autorégulation.

(C) Signalisation au cours de la division asymétrique

Une cellule précurseur se divise de façon asymétrique pour générer deux cellules filles distinctes. La cellule mère contient un facteur distribué asymétriquement. Une des cellules filles contiendra le facteur, régulant négativement l'activité du récepteur (ici numb), et devient cellule émettrice du signal. L'autre cellule fille devient alors cellule réceptrice et changera de potentialité.

(Adapté de Kimble et Simpson 1997)

est le plus souvent de maintenir la cellule, dans laquelle Notch est activé, dans un état indifférencié, la rendant capable de répondre à des signaux ultérieurs. Cette cellule est alors dite compétente.

Le mode permissif (inhibition latérale) implique que la cellule, dans laquelle Notch est activé, peut s'engager dans la voie de différenciation après la cessation de l'activation de Notch ; il y aurait donc réversibilité. En revanche, le mode instructif (induction) suggère que le choix de devenir cellulaire a été fait de manière irréversible.

3.2.1. Signalisation unidirectionnelle (mode inductif)

La signalisation par induction se fait entre deux cellules exprimant différemment la voie Notch (figure 18A). Une des cellules exprime uniquement le ligand alors que la cellule voisine n'exprime que le récepteur. Les cellules adopteront donc un devenir différent. L'induction permet ainsi d'établir des frontières entre deux groupes de cellules voisines différentes. Le groupe de cellules exprimant le ligand communique avec l'autre groupe de cellules exprimant le récepteur, ce qui a pour effet d'engager les cellules situées à l'interface des deux groupes vers un autre devenir cellulaire.

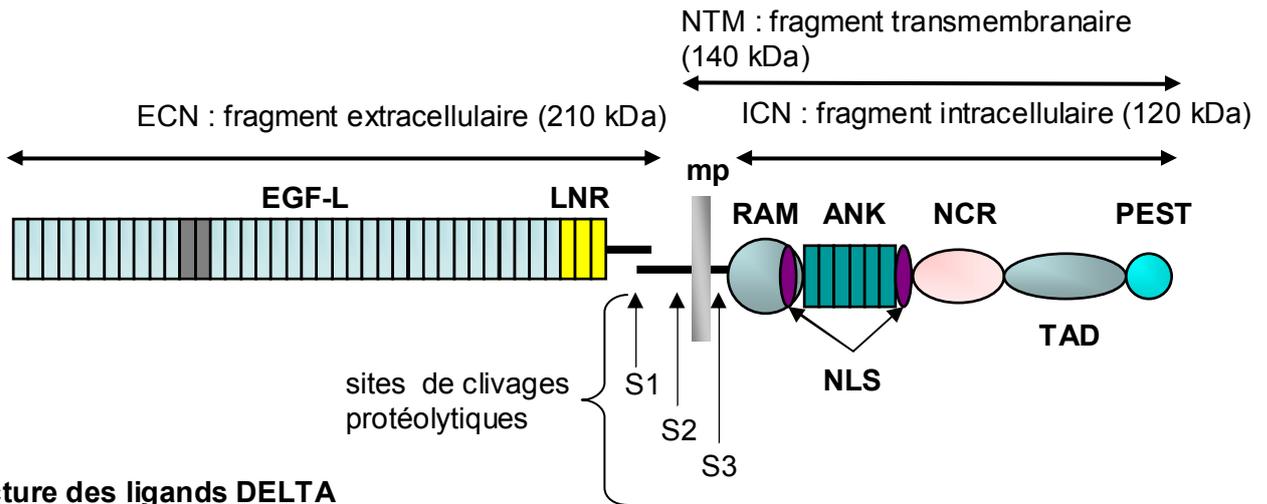
3.2.2. Signalisation bidirectionnelle par inhibition latérale (mode permissif)

L'inhibition latérale est le mécanisme d'action de la voie Notch le plus étudié. Il s'exerce au sein d'un groupe de cellules ayant les mêmes potentialités développementales. Ce mécanisme a été initialement étudié dans le déterminisme neuronal chez la drosophile (Artavanis-Tsakonas et al., 1991; Artavanis-Tsakonas et Simpson, 1991; Heitzler et Simpson, 1991).

L'inhibition latérale semble impliquer trois étapes (figure 18B). (i) Dans une première étape, toutes les cellules expriment ligand et récepteur dans les mêmes proportions. (ii) Ensuite, une des cellules exprime plus de signal que de récepteur suite à une induction par des signaux extrinsèques ou suite à un dérèglement spontané de l'équilibre ligand/récepteur. (iii) Finalement, le déséquilibre est amplifié par une boucle de régulation de la voie Notch. En effet, une des cellules exprime le ligand majoritairement et l'autre le récepteur.

Cette dernière étape ressemble à la signalisation par induction décrite ci-dessus. Cette autorégulation vient du fait que les cellules dans lesquelles la voie Notch est inhibée vont exprimer plus de ligands et activeront ainsi plus facilement les cellules voisines. Dans ces dernières, la voie Notch sera suractivée ce qui aura pour conséquence une diminution de l'expression des ligands.

A. Structure type des récepteurs NOTCH



B. Structure des ligands DELTA

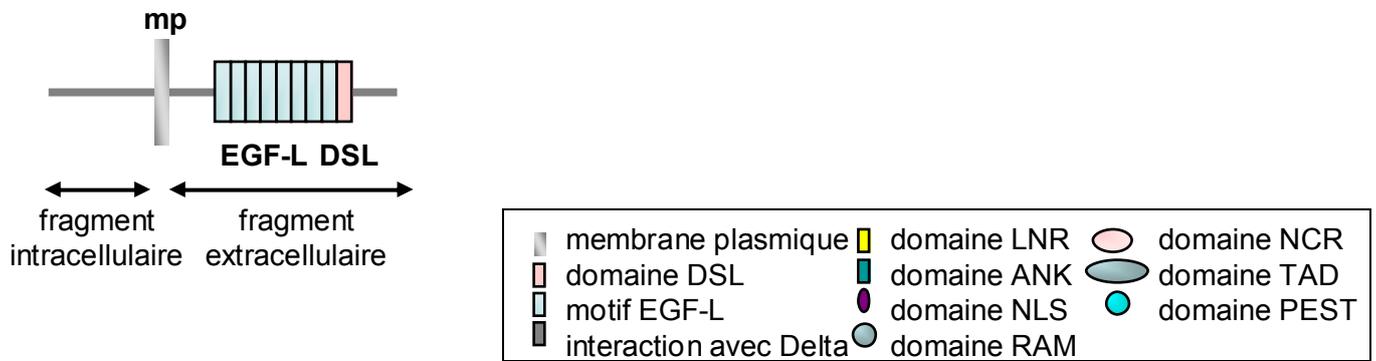


Figure 19. Structure type des récepteurs NOTCH et des ligands DELTA

Les récepteurs NOTCH et les ligands DELTA sont des protéines transmembranaires

(A) NOTCH est synthétisé à l'état de précurseur inactif de 300 kDa qui subit trois clivages consécutifs. Dans l'appareil de Golgi, le précurseur de Notch est clivé au niveau luminal par une furine (S1) pour générer deux fragments : un fragment extracellulaire et un fragment transmembranaire. Ces deux fragments sont liés par une liaison non-covalente pour créer un hétérodimère, constituant la principale forme de NOTCH détectée à la surface cellulaire (330 kDa).

Le fragment extracellulaire (**ECN**) est constitué de motifs de type EGF (Epidermal Growth Factor-Like ; **EGF-L**) et de motifs **LNR** (LIN12/NOTCH repeats). Le fragment transmembranaire est composé d'un court domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire (**ICN**). Le domaine ICN comporte un domaine **RAM**, deux domaines de localisation nucléaire (**NLS**), des domaines ankyrine répétés (**ANK**) et une région **PEST** (Pro-Glu-Ser-Thr). Les récepteurs NOTCH1, -2 et -3 des mammifères ont également une région de réponse aux cytokines (**NCR**) et un domaine **TAD** (transcriptional activation domain).

Chez la drosophile, le récepteur NOTCH interagit avec le ligand DELTA par les motifs EGF 11 et 12 de son fragment extracellulaire.

(B) DELTA est constitué d'un fragment intracellulaire, d'un fragment transmembranaire et d'un fragment extracellulaire qui comporte des motifs de type EGF et une région DSL.

Chez la drosophile, avant le déterminisme neuronal, toutes les cellules du neuroectoderme sont identiques et expriment toutes de la même manière la voie Notch. Sous l'effet de facteurs extrinsèques, des groupes de cellules exprimant Achaete Scute (un gène proneural inhibé par l'activation de la voie Notch) apparaissent pour former les ensembles proneuraux. Une des cellules, le neuroblaste présomptif, va exprimer plus fortement que les autres Achaete Scute ce qui va augmenter l'expression du ligand *Delta* dans cette cellule. Delta va donc activer la voie Notch dans les cellules voisines qui ne vont ainsi pas pouvoir s'orienter vers la voie neuroblastique. Ainsi, lorsqu'une cellule s'engage dans une voie de différenciation au sein d'un groupe de cellules ayant les mêmes potentialités, elle émet des signaux qui ont pour effet de maintenir les cellules voisines dans un état indifférencié.

3.2.3. Signalisation au cours de la division asymétrique

La voie Notch peut aussi être déséquilibrée au cours des divisions asymétriques, ce qui aura pour effet l'adoption de devenir cellulaires différents (pour revue voir (Jan et Jan, 1998; Matsuzaki, 2000; Roegiers et Jan, 2004) (figure 18C).

Par exemple, au cours de la neurogenèse chez la drosophile, c'est la distribution asymétrique à la surface des neuroblastes d'un inhibiteur de Notch, Numb, qui va conduire à la production de deux cellules filles différentes. En effet, Numb ne reste présent que dans l'une des cellules filles où il inhibera la voie Notch. Cette cellule, où la voie Notch est inhibée, deviendra un neuroblaste de type dorsal et activera la voie Notch dans sa cellule sœur qui deviendra un neuroblaste de type ventral.

3.3. Mécanismes moléculaires de la voie Notch

La voie de signalisation Notch est bien conservée au cours de l'évolution et participe à la spécification cellulaire chez tous les organismes pluricellulaires étudiés jusqu'à présent, des nématodes aux humains. Pour revue, voir (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Baron, 2003; Kimble et Simpson, 1997; Mumm et Kopan, 2000; Weinmaster, 1997).

3.3.1. Structure des récepteurs et ligands de la voie Notch

3.3.1.1. Les récepteurs Notch

Au niveau moléculaire, le récepteur NOTCH est une protéine transmembranaire de type I, composée d'un fragment extracellulaire (ECN) et d'un fragment transmembranaire (NTM) (figure 19A). Le fragment extracellulaire est constitué de motifs de type EGF (Epidermal

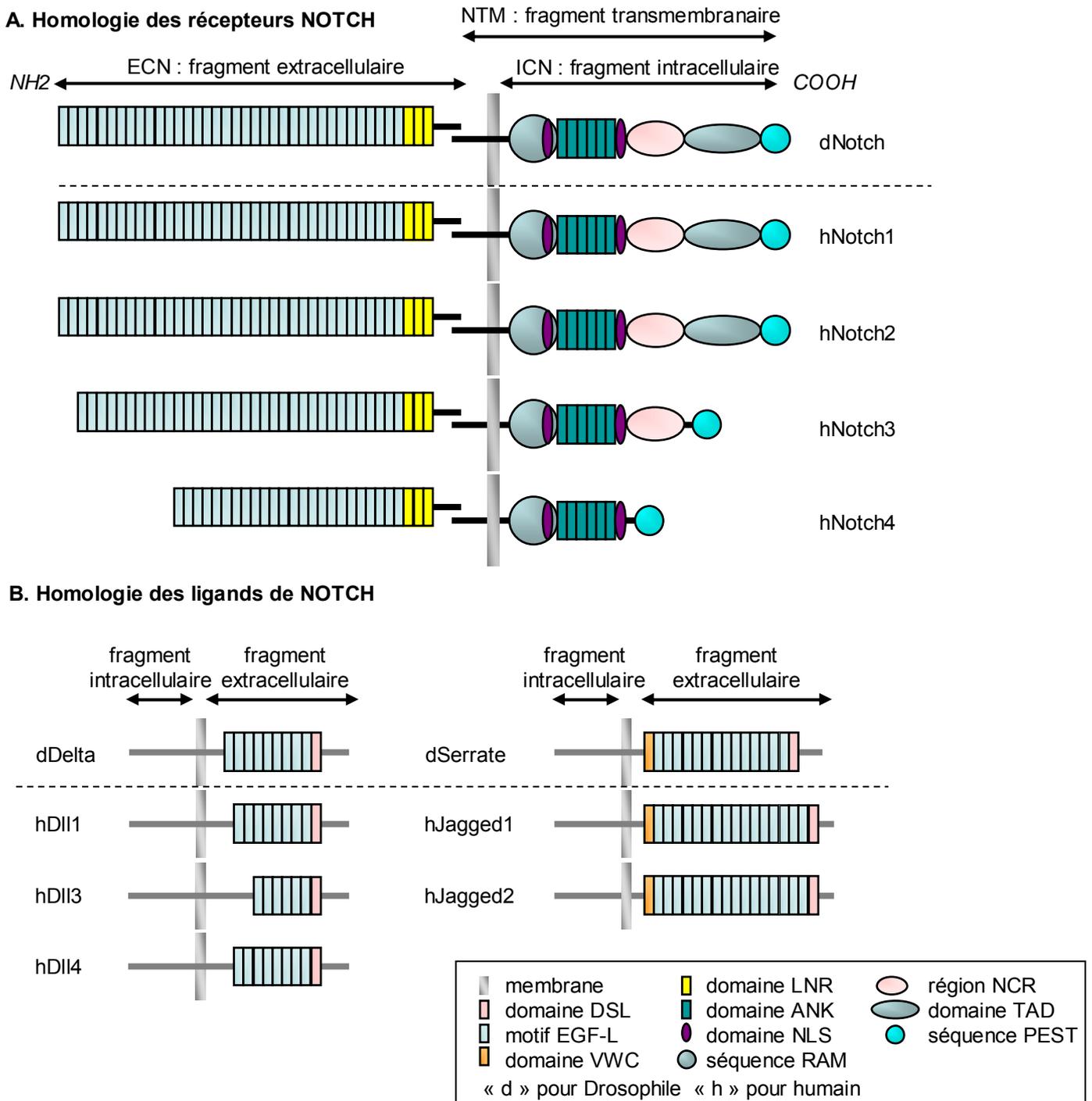


Figure 20. Les récepteurs NOTCH et leur ligands chez la Drosophile et chez l'Homme

(A) Le plus fort degré d'homologie entre les récepteurs NOTCH se trouve au niveau des domaines **ANK** alors que la partie C-terminale montre la plus grande variabilité. Les récepteurs NOTCH1, -2 et -3 des mammifères ont également une région de réponse aux cytokines (**NCR**) et un domaine **TAD** (transcriptional activation domain). Chez la Drosophile, la protéine NOTCH contient 36 motifs de type **EGF**, suivis de 3 motifs **LNR**, un domaine transmembranaire, et un domaine intracellulaire avec une région **RAM**, 7 domaines **ANK**, une région **NLS** avec une région **PEST**. Chez les mammifères, NOTCH1 et NOTCH2 ont 36 domaines EGF, alors que NOTCH3 et NOTCH4 en ont 34 et 24, respectivement

(B) Deux ligands ont été décrits chez la drosophile, codés par des gènes *Delta* et *Serrate*. La partie extracellulaire du ligand DELTA contient 1 motif **DSL** suivi de 9 motifs type **EGF**. Chez les mammifères 3 variantes du gène *Delta* ont été décrites, les DELTA LIKE 1, -3 et 4 (DII1, DII3 et DII4) qui contiennent chacun un domaine DSL et 8, 6 et 8 domaines de type EGF, respectivement. La deuxième famille de ligands Notch est appelée SERRATE chez la Drosophile et JAGGED (1 et 2) chez les mammifères. Leur domaine extracellulaire est composé d'un domaine DSL et de 14 motifs de type EGF pour SERRATE et 16 pour les JAGGED1 et JAGGED2, ainsi que d'un domaine de von Willebrand de type C (**VWC**).

Growth Factor-Like ; **EGFL**) et de motifs **LNR** (LIN12/NOTCH repeats). Les LNR semblent restreindre l'activation non spécifique du récepteur (qui ne résulterait pas seulement d'une liaison avec l'un de ses ligands). Le fragment **NTM** est composé d'un court domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire (**ICN**). L'**ICN** est composé d'un domaine **RAM**, de deux domaines de localisation nucléaire (**NLS**), de domaines ankyrine répétés (**ANK**) (Blaumueller et Artavanis-Tsakonas, 1997; Wharton et al., 1985) et d'une région **PEST** (Pro-Glu-Ser-Thr), qui pourrait intervenir dans le processus de sa dégradation par ubiquitination (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Greenwald, 1998). Les récepteurs NOTCH1-2 et -3 des mammifères ont également une région de réponse aux cytokines (**NCR**) et un domaine **TAD** (transcriptional activation domain) (figure 20A).

Chez la drosophile, le récepteur NOTCH interagit avec le ligand DELTA par les motifs EGF 11 et 12 de sa partie extracellulaire (Fehon et al., 1990).

Le récepteur NOTCH est synthétisé sous forme d'un précurseur de 300 kDa, qui est clivé constitutivement dans le Golgi par une furine (S1) (Blaumueller et Artavanis-Tsakonas, 1997; Guidos, 2002; Logeat et al., 1998). Ce clivage conduit à la formation de deux sous-unités ECN et NTM, qui restent associées de manière non-covalente et calcium-dépendante sous forme d'hétérodimères (Annaert et De Strooper, 1999). L'hétérodimère est adressé à la surface cellulaire où il reste inactif, jusqu'à ce qu'il lie un de ses ligands présents à la surface d'une cellule contiguë.

3.3.1.2. Les ligands de Notch : familles Delta et Serrate

Les ligands de ces récepteurs sont également bien conservés. Chez la drosophile (figure 19B), les ligands de Notch sont codés par les gènes *Delta* et *Serrate*. La partie extracellulaire du ligand DELTA contient un domaine DSL (nommée ainsi sur la base du nom des ligands de Notch : Delta et Serrate chez la Drosophile et Lag-2 chez *C. elegans*) suivi de 9 motifs de type EGF. Chez les mammifères (figure 20B), 3 variants du gène Delta ont été décrits, les Delta-like 1, 2 et 3 (Dll1, Dll3 et Dll4), qui contiennent chacun un domaine DSL et 8, 6 et 8 domaines de type EGF respectivement. Il existe un quatrième ligand pour NOTCH chez les mammifères, structurellement proche des gènes de la famille DELTA, appelé PREF1 ou DELTA LIKE (Dlk) (Baladron et al., 2005; Kaneta et al., 2000). Le deuxième ligand de NOTCH est appelé SERRATE chez la Drosophile et JAGGED1 et JAGGED 2 chez les mammifères (Fleming, 1998; Lissemore et Starmer, 1999). Ce sont également des protéines transmembranaires. Leur fragment extracellulaire est composé d'un domaine DSL et de 14 motifs de type EGF pour SERRATE et 16 pour les JAGGED1 et JAGGED2, ainsi que d'un

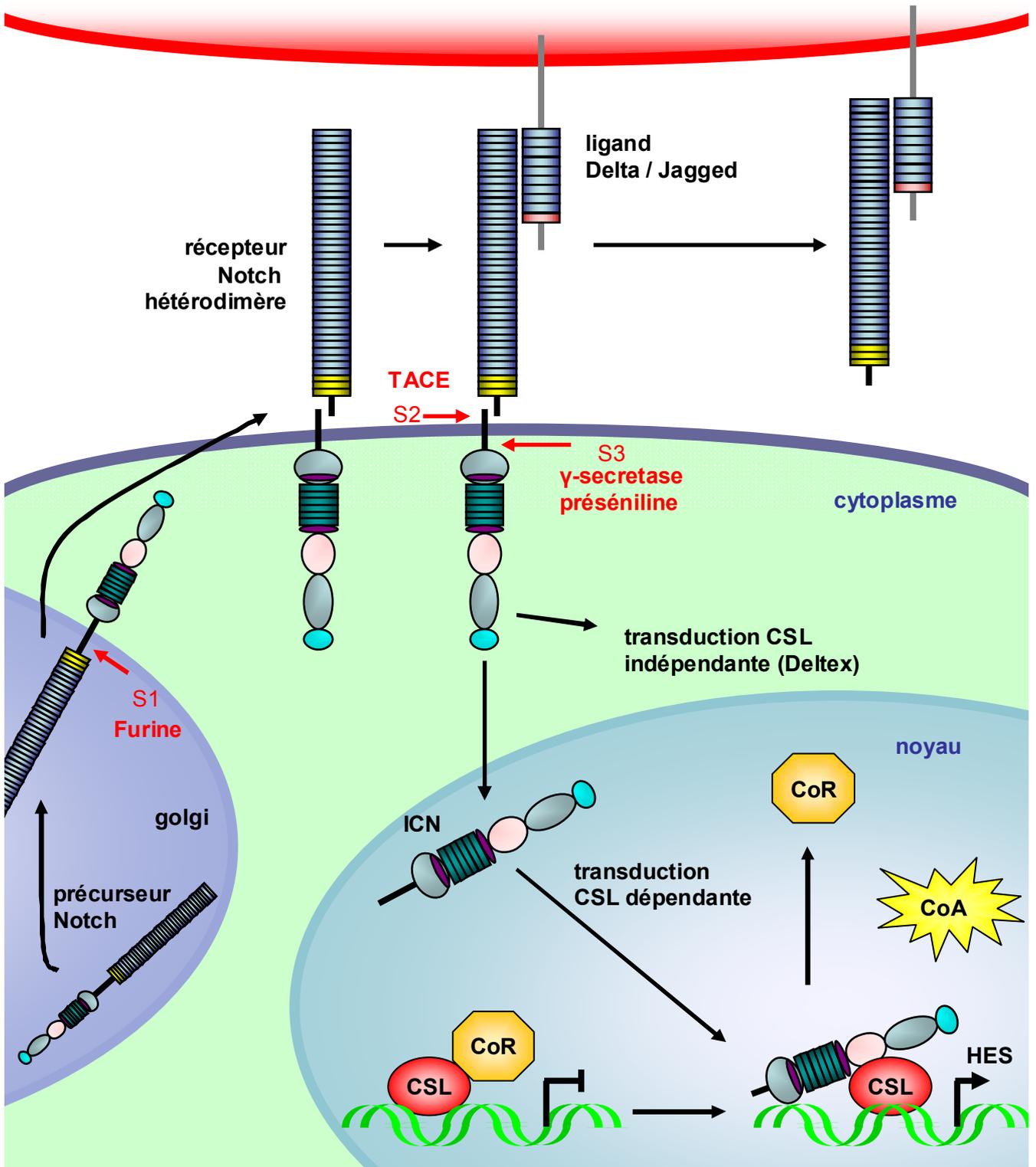


Figure 21. Transduction intracellulaire de Notch

La liaison du récepteur avec un de ces ligands déclenche un clivage extracellulaire assuré par la protéase TACE, une enzyme de type métalloprotéase, membre de la famille ADAM. Ceci permet la formation de l'ICN qui est transloqué dans noyau grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) où il régule l'expression de gènes cibles comme *Hes*, en association avec d'autres facteurs nucléaires comme les membres de la famille CSL (C promoter binding factor/Suppressor of hairless/Lag-1 transcription factor). La liaison de l'ICN aux CSL dans le noyau se fait au niveau de la séquence RAM et lève l'effet répresseur de CSL. Ainsi, Notch active la transcription des gènes cibles comme les facteurs de transcription de la famille HES.

troisième domaine impliqué probablement dans les processus de dimérisation (domaine de von Willebrand de type C ; VWR). Les séquences 5' et 3' terminales des gènes de la famille *Delta* et *Serrate* sont moins conservées mais toutes deux contiennent un domaine riche en cystéines dans la partie N terminale, probablement impliqué dans la spécificité des liaisons ligand – récepteur (fig.). De nouveaux ligands de NOTCH ont été décrits, tels que la F3/CONTACTINE et la NB3 qui activent la voie Notch et jouent un rôle dans la différenciation des oligodendrocytes (Cui et al., 2004; Hu et al., 2003).

Cette multiplication des gènes a pour corollaire une augmentation de la complexité de la fonction Notch, de telle sorte qu'à l'heure actuelle, ses modes de fonctionnement restent mal connus.

3.3.2. Fragment intracellulaire de Notch et effecteurs

La transduction intracellulaire de Notch est détaillée dans la figure 21. La liaison du récepteur avec un de ses ligands déclenche un clivage extracellulaire assuré par la protéase TACE, une enzyme de type métalloprotéinase, membre de la famille ADAM (Brou et al., 2000; Okochi et al., 2002). Le clivage au site 3 (S3) est effectué par le complexe γ -sécrétase.

La γ -sécrétase est un complexe multiprotéique du type préséniline – nicastrine (De Strooper, 2003; Fortini, 2001). Les présénilines (PS1 et PS2 chez les mammifères) constituent la partie active du complexe protéique. La nicastrine serait un facteur permettant de stabiliser les fragments des PS. D'autres protéines (Aph, GLP) assurent l'assemblage de la forme active du complexe enzymatique. Il semblerait que la γ -sécrétase dépendante de PS1 soit également responsable d'un clivage à un site 4 qui est situé à 12 acides aminés en amont de S3, libérant le peptide de NOTCH (N β) dans l'espace extracellulaire (Okochi et al., 2002).

Le clivage S3 de Notch par le complexe γ -sécrétase permet la libération de la partie active de Notch, l'ICN. L'ICN est transporté dans noyau, grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS), où il régule l'expression de gènes cibles en s'associant avec d'autres facteurs nucléaires comme les membres de la famille CSL (C promoter binding factor/Suppressor of hairless/Lag-1 transcription factor) (Fortini, 2002).

La liaison de l'ICN aux CSL dans le noyau se fait au niveau de la séquence RAM et lève l'effet répresseur de CSL. Ainsi, NOTCH active la transcription des gènes cibles comme les facteurs de transcription de la famille *Hes* (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Chen et al., 2002; Egan et al., 1998).

Les facteurs HES constituent une famille de répresseurs transcriptionnels de type bHLH (basic helix-loop-helix), importants dans la neurogenèse et l'hématopoïèse (Kawamata et al.,

2002; Nakamura et al., 2000). Ils régulent négativement l'expression de facteurs de transcription tissus spécifiques (Iso et al., 2003; Ohsako et al., 1994) tels que les gènes neurotrophiques (dont NeuroD chez les mammifères) dans le système nerveux.

Les différents facteurs de la cascade moléculaire Notch chez la Drosophile, *C. elegans* et les mammifères sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Organismes	Ligands principaux familles DSL	Récepteurs famille LNG	Effecteurs familles CSL	Gènes cibles
Drosophile	DELTA SERRATE	NOTCH	Su(H)	E(spl)
Mammifères	DELTA-LIKE 1, -3, -4 JAGGED 1, -2	NOTCH 1, -2,-3,-4	CBF1 (RBP-Jk)	Hes 1 à 7
<i>C.elegans</i>	LAG-2 APX-1	LIN-12 GLP-1	LAG-1 EMB-5	Lin-22

Tableau 1 : Orthologues des ligands, récepteurs et effecteurs de la voie Notch

3.4. Modulations de l'activité de la voie Notch

La voie Notch peut-être régulée à différents niveaux. Plusieurs revues ont été consacrées à ce sujet (Baker, 2000; Kadesch, 2004; Katsube et Sakamoto, 2005; Kimble et Simpson, 1997; Le Borgne et al., 2005; Schweisguth, 2004).

3.4.1. Considérations évolutives

Comme nous l'avons vu dans le §3.3, la voie Notch est hautement conservée au cours de l'évolution et compte de nombreux homologues structuraux constituant les familles de ligands DSL (Delta Serrate Lag), récepteurs LNG (Lin Notch Glp) et effecteurs CSL (CBF1 Su(H) Lag). La multiplication des ligands et récepteurs de la voie de signalisation Notch permet une modulation plus fine des effets de cette voie et participe ainsi à l'organisation si complexe des organismes supérieurs. Il n'est donc pas étonnant de trouver plus d'homologues de Notch et de Delta chez les mammifères que chez le nématode ou la drosophile. Par ailleurs, il existe des voies de régulation différentes en fonction du ligand ou du récepteur considéré. Néanmoins, il semblerait que pour certaines fonctions, les éléments de la voie Notch soient interchangeable.

3.4.2. Modulation par des formes clivées des ligands

Des études biochimiques ont montré que Delta, Serrate et leurs homologues peuvent être clivés pour former des domaines extracellulaires et intracellulaires fonctionnels.

La partie extracellulaire des DSL est active et peut dans certains cas remplacer des formes manquantes d'un autre ligand. Ainsi, chez les nématodes, la forme clivée de APX-1 peut sauver le phénotype du mutant LAG-2 (Fitzgerald et Greenwald, 1995). De même, comme ce

sera décrit dans ce manuscrit, la forme extracellulaire clivée de Jagged1 peut sauver le phénotype de neurosphères mutantes pour Dll1 (Grandbarbe et al., 2003). Par contre, dans certains systèmes, des formes clivées des DSL semblent inhiber la voie Notch au lieu de l'activer (Sun et Artavanis-Tsakonas, 1997).

La partie intracellulaire de Delta peut également être clivée et être transloquée dans le noyau, ce qui laisserait envisager une forme bidirectionnelle de signalisation (Bland et al., 2003; Klueg et al., 1998). D'autre part, certaines études ont également montré que clivage du domaine intracellulaire de Delta pourrait favoriser le clivage S3 de Notch et donc la libération de l'ICN dans la même cellule (Shimizu et al., 2002).

3.4.3. Modulation des interactions récepteur/ligand

Chez la drosophile comme chez les mammifères, les récepteurs Notch subissent des modifications post-transcriptionnelles de types fucosylation et glycosylation. Ces modifications vont moduler l'affinité des récepteurs pour leurs ligands (pour revue, voir (Haines et Irvine, 2003; Schweisguth, 2004)).

La fucosylation des motifs EGF de Notch est nécessaire pour permettre l'interaction entre Notch et ses ligands. Plus les motifs seront fucolysés, plus l'affinité des DSL pour Notch sera importante (Okajima et Irvine, 2002; Panin et al., 2002; Sasamura et al., 2003; Shi et Stanley, 2003).

La glycosylation de certains motifs EGF de Notch par Fringe va quant à elle moduler spécifiquement les interactions de Notch avec ses récepteurs (Bruckner et al., 2000; Ju et al., 2000; Lei et al., 2003; Moloney et al., 2000). Ainsi, la glycosylation de Notch va potentialiser l'activation de Notch par Delta, alors qu'elle inhibera l'interaction entre Notch et Serrate chez la drosophile. De même, chez les mammifères, Lunatic Fringe (L-Fng) potentialise la signalisation Dll1/Notch1 alors qu'il inhibe celle initiée par Jagged1.

La modulation des interactions ligands/récepteurs par la glycosylation est explicable par le fait que les sucres peuvent modifier la conformation tridimensionnelle des récepteurs et des ligands et ainsi masquer ou créer certains sites d'interactions. Les DSL ont une propriété de type lectine (protéines pouvant se fixer à des sucres de manière monocovalente sans les modifier), en se fixant différemment au récepteur en fonction de leur niveau et de leur pattern de glycosylation. D'autre part, il semblerait que la glycosylation de Notch permet de réduire la cis-activation des récepteurs Notch de la cellule par ses propres ligands, en particulier lors de la synthèse des ligands et récepteurs au niveau du Golgi (Sakamoto et al., 2002).

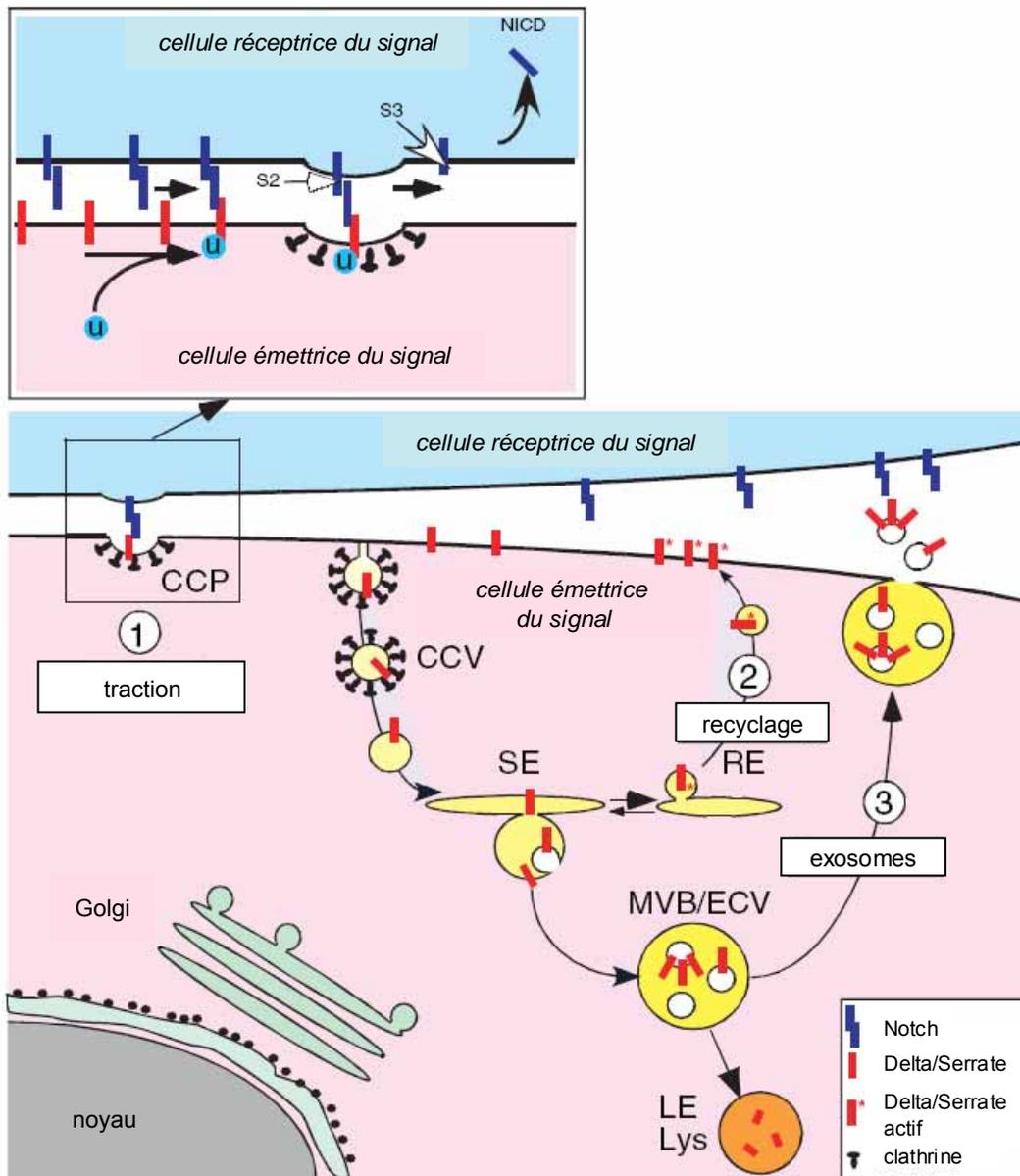


Figure 22. Modèle du rôle de l'endocytose des ligands et des récepteurs NOTCH dans la régulation du signal de la voie Notch

Trois modèles ne s'excluant pas mutuellement ont été proposés pour expliquer le paradoxe selon lequel l'activation de Notch dans la cellule réceptrice du signal nécessite l'endocytose du ligand DELTA/SERRATE dans la cellule émettrice du signal, ce qui enlève les ligands de la surface cellulaire et empêche leur interaction avec les récepteurs NOTCH.

(1) L'endocytose de NOTCH lié au ligand peut créer des forces de traction qui induisent des changements conformationnels associés et la libération du site de clivage S2.

(2,3) Les ligands inactifs néo-synthétisés deviennent actifs après avoir subi des modifications dans les compartiments de l'endosome.

(2) Selon le deuxième modèle, les DSL internalisés transitent via les endosomes de recyclage (RE) où ils pourraient être activés grâce à des modifications post-transcriptionnelles encore inconnues.

(3) Selon le troisième modèle, les DSL endocytés sont dirigés dans le lumen des MVBs, ce qui conduit soit à leur dégradation par maturation des MVBs en lysosomes soit à leur relargage dans l'espace extracellulaire dans des vésicules de sécrétion, appelées exosomes, ce qui implique la fusion des MVBs avec la membrane plasmique.

CCP : puits à clathrine; CCV : vésicule d'endocytose à clathrine; ECV: vésicules véhiculant l'endosome; LE: endosome tardif; Lys : Lysosome; MVBs: corps multivesiculaires; NICD: Domaine intracellulaire de NOTCH; RE: endosome recyclant; SE : endosome sortant; U: Ubiquitine.

(Adapté de Le Borgne et al., 2005)

3.4.4. Modulation par des phénomènes d'endocytose

La voie Notch est également régulée par des phénomènes d'endocytose des ligands comme des récepteurs (pour revue, voir (Le Borgne et al., 2005; Le Borgne et Schweisguth, 2003)).

L'endocytose et la dégradation du ligand devraient réduire l'activité du récepteur. Or, des études semblent montrer que l'endocytose de DELTA augmente l'activité de Notch dans les cellules voisines. Différentes hypothèses peuvent expliquer ce phénomène (figure 22). (i) Une tension sur NOTCH, fixé à DELTA au moment de l'endocytose, pourrait entraîner un changement conformationnel du récepteur, facilitant le clivage S2 nécessaire à son activation. (ii) L'endocytose des ligands pourrait éviter une activation cis de Notch dans la cellule émettant le ligand. (iii) Enfin, l'endocytose des ligands pourrait permettre la formation de vésicules hypothétiques riches en DSL, qui pourraient ensuite être exocytées pour activer massivement la cellule voisine.

La voie de signalisation Notch peut également être régulée par l'endocytose de son récepteur (figure 22). L'endocytose de récepteurs et leur dégradation est un mécanisme général de désensibilisation qui pourrait être appliqué à la voie Notch. Mais des études ont montré chez la drosophile qu'une endocytose de Notch est nécessaire pour que la voie Notch soit fonctionnelle (Seugnet et al., 1997). Ces résultats ont été retrouvés chez les mammifères et des travaux récents (Gupta-Rossi et al., 2004) laissent penser que l'endocytose de Notch pourrait être nécessaire à son clivage S3 et donc à son activation par la libération de l'ICN dans l'espace intracellulaire.

3.4.5. Modulation par les mécanismes de protéolyse

Comme nous l'avons vu plus haut, une des spécificités de la voie de signalisation Notch vient du fait que l'activation de Notch nécessite le clivage protéolytique de son domaine intracellulaire. Cette nécessité a plusieurs conséquences. D'une part, le clivage protéolytique est irréversible et chaque récepteur ne pourra servir qu'une seule fois. D'autre part, la signalisation est directe et ne nécessite aucun second messager, ce qui limite les possibilités d'amplification du signal et d'interactions avec d'autres voies de signalisations.

Lorsque le ligand s'est fixé au récepteur, il rend NOTCH susceptible d'être clivé par les TACE et par le complexe γ -sécrétase. La modulation de la voie passe donc également par la modulation des complexes clivants Notch. L'utilisation d'inhibiteurs de la γ -sécrétase permet ainsi de bloquer la signalisation Notch.

3.4.6. Régulation des effecteurs et cibles de Notch : transduction CSL dépendante et indépendante

La forme activée de Notch (ICN) est transloquée dans le noyau où elle se lie à des protéines de la famille CSL (CBF1, Suppressor of Hairless (Su(H)), Lag-1). Les CSL sont des répresseurs de transcription qui, lorsqu'ils se lient à l'ICN, jouent le rôle de facteurs de transcription. Les cibles du complexe CSL-ICN sont variables en fonction du type cellulaire et du type de signalisation. Par exemple, dans le cas de la signalisation latérale, Enhancer of Split (HES chez les vertébrés) sera transcrit alors que vestigial ou single-minded pourront être transcrits chez la drosophile au cours du développement de l'aile ou pendant la mise en place du mésoectoderme respectivement.

L'analyse du mutant Su(H) chez la drosophile a montré que le phénotype mutant de Su(H) est moins fort que celui de Notch (Rusconi et Corbin, 1998), ce qui, avec d'autres études, suggère que la voie Notch peut agir indépendamment des CSL (pour revue, voir (Martinez Arias et al., 2002)). Dans ce cas, l'ICN n'est pas transloqué dans le noyau et forme un complexe avec une protéine cytoplasmique, Deltex. Les médiateurs de la voie de signalisation Deltex restent peu connus, mais il a été montré que cette voie a pour effet d'inhiber Ac-Sc et ses homologues (Ramain et al., 2001). Il a également été montré que l'activation de la voie Notch par la voie CSL dépendante augmente le taux de Deltex dans la cellule. Deltex permettrait donc d'entretenir et d'amplifier la signalisation Notch.

3.5. Maladies et cancers liés à un dysfonctionnement de la voie Notch

Les perturbations d'un mécanisme de signalisation aussi important que la voie Notch sont associées à de nombreuses maladies et cancers. L'ensemble de ces pathologies est résumé dans le tableau 2, qui détaille également les phénotypes résultant de pertes et de gains de fonctions des récepteurs et ligands de la voie Notch chez les mammifères (adapté de (Harper et al., 2003)).

Eléments de la voie Notch	Maladies humaines associées	Phénotype des souris homozygotes mutantes	Effet d'un gain de fonction chez la souris
Notch-1	T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemias (Ellisen et al., 1991) (voir texte)	Létalité embryonnaire (E11,5) Défauts de la neurogenèse, de la somitogenèse, et de la vasculogenèse (Swiatek et al., 1994) Déficits mnésiques chez les mutants +/- (Costa et al., 2003)	Pas de production de cellules B à partir des précurseurs lymphoblastiques (Pui et al., 1999) Promotion de la différenciation et inhibition des kératinocytes (Rangarajan et al., 2001) Induction de T-ALL chez la souris (Beverly et Capobianco, 2003)
Notch-2		Létalité embryonnaire (E11,5) Défauts dans le déterminisme et à la mort des cellules neurales (Hamada et al., 1999)	
Notch-3	Syndrome CADASIL (voir texte)	Pas de défaut phénotypique dans les souris Notch3 -/- (Krebs et al., 2003)	Néoplasie des cellules T (Bellavia et al., 2002) et inhibition de l'apoptose médiée par Fas (Wang et al., 2002)
Notch-4	Schizophrénie : association controversée (McGinnis et al., 2001; Wei et Hemmings, 2000). Augmentation de Notch4 ICD dans certains cancers (Imatani et Callahan, 2000)	Pas de défaut phénotypique dans les souris Notch4 -/- (Krebs et al., 2000)	Létalité embryonnaire à E10.5 suite à des défauts de vasculogenèse (Uytendaele et al., 2001) Augmentation observée de Notch4 ICD dans les cancers mammaires (Gallahan et Callahan, 1997)
Dll1		Létalité embryonnaire (E11,5) Défauts de la neurogenèse et de la somitogenèse (Hrabe de Angelis et al., 1997) Diminution de HES5, production accrue de neurones dans le télencéphale (Yun et al., 2002)	
Dll-3	Spondylocostal dysostosis (voir texte)	Viable mais défauts de la segmentation axiale, des vertèbres (Dunwoodie et al., 2002)	
Dll-4		Létalité embryonnaire des mutants -/- et +/- Défauts de la vasculogenèse. (Krebs et al., 2004)	L'expression ectopique de Dll-4 dans les cellules souches hématopoïétiques cause des leucémies lymphoprolifératives des cellules T (Yan et al., 2001)
Jagged-1	Tétralogie de Fallot Syndrome Alagille (voir texte)	Létalité embryonnaire (E11,5) Défauts de la vasculogenèse. Pas de défauts de la somitogenèse (Xue et al., 1999)	
Jagged-2		Létalité post natale suite à des anomalies craniofaciales et de développement du thymus et des membres (Jiang et al., 1998)	

Tableau 2 : Effets des pertes et gains de fonctions des principaux gènes de la voie Notch

3.5.1. Voie Notch et maladies héréditaires

Chez l'homme, le lien avec des mutations de la voie Notch a été mis en évidence dans quatre maladies héréditaires : la Tétralogie de Fallot, le syndrome Alagille, la spondylocostal dysostosis et le syndrome CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy) que nous allons décrire brièvement (pour revue, voir (Gridley, 2003)).

Des mutations du ligand Jagged1 peuvent conduire à la Tétralogie de Fallot et au syndrome Alagille. La Tétralogie de Fallot est la forme la plus fréquente de malformation cardiaque congénitale. Le syndrome Alagille est une maladie autosomique dominante rare caractérisée par de graves troubles du développement du cœur, du foie, des yeux et du squelette.

Des mutations de Dll3 sont liées à une forme de nanisme, la spondylocostal dysostosis, dont des formes autosomales dominantes ou récessives ont été décrites, se traduisant par une mauvaise segmentation des vertèbres, ainsi que la fusion ou la délétion de certaines côtes.

Des mutations de Notch3 sont quant à elles liées au syndrome CADASIL, qui se traduit par des déficits autosomiques dominants de la vascularisation. Parmi les nombreux symptômes, on retrouve des migraines, des troubles du comportement, des ischémies sous corticales et une diminution rapide des capacités cognitives avec l'âge.

Enfin, certaines formes de schizophrénie pourraient être associées à Notch4 par des mutations de type substitution dans le promoteur du gène et des altérations du premier exon du gène de Notch4 (Wei et Hemmings, 2000). Ces études ont toutefois été nuancées par d'autres travaux publiés depuis.

3.5.2. Voie Notch et cancers

Nous avons vu précédemment que la voie Notch participe à des processus fondamentaux du développement comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Comme pour toutes les voies de signalisation impliquées dans ces processus, des mutations conduisant au dérèglement de la voie Notch peuvent entraîner la formation de cancers. En fait, Notch peut se comporter comme un oncogène ou comme un suppresseur de tumeur selon les types cellulaires (pour revue, voir (Allenspach et al., 2002; Jang et al., 2000; Nickoloff et al., 2003)).

Le lien entre dysfonctionnement de la voie Notch et cancer a été établi pour la première fois lorsqu'une translocation chromosomique conduisant à une forme tronquée, constitutivement active de Notch1, a été identifiée de façon récurrente dans plusieurs types de leucémies lymphoblastiques (T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukemias) (Ellisen et al., 1991). Expérimentalement, l'expression de formes actives de Notch aboutit à une transformation des cellules. Ainsi, chez la souris, la transfection de cellules par ICN2 ou d'ICN3 provoque des lymphomes (Bellavia et al., 2000), tandis qu'ICN4 favorise l'apparition de tumeurs mammaires (Gallahan et Callahan, 1997). D'autre part, ICN1 et ICN2 sont capables de transformer des lignées de cellules de rein de hamster in-vitro (Capobianco et al., 1997).

D'autres cancers s'accompagnent d'une hyperactivité de la voie Notch due à une surexpression d'acteurs de cette voie. Cette corrélation indique que dans ces cas, la voie Notch exerce une activité oncogénique (Nam et al., 2002).

Au contraire, dans certains types cellulaires, Notch peut se comporter comme un suppresseur de tumeurs ; c'est le cas par exemple dans les kératinocytes et, en conséquence, dans certains

cancers de la peau (Nicolas et al., 2003). C’est aussi le cas de certains cancers cervicaux de l’utérus dans lesquels NOTCH1 est sous-exprimé et où sa surexpression induit un arrêt de la prolifération cellulaire (Talora et al., 2005).

3.6. Modulation thérapeutique de la voie Notch

La voie Notch apparaît ainsi comme une cible thérapeutique pour de nombreux cancers (Allenspach et al., 2002; Nickoloff et al., 2003). Le contrôle de son hyperactivité peut être théoriquement réalisé à différents niveaux : principalement en bloquant l’interaction ligand-récepteur ou en inhibant le clivage protéolytique de NOTCH. Une autre possibilité, considérée comme plus prometteuse, car inhibant totalement la voie Notch, consiste à réduire l’expression des gènes impliqués dans la voie Notch et en premier lieu de ceux codant les différents récepteurs NOTCH. Cette approche n’était possible que par “genetic silencing” à l’aide d’anti-sens ou de RNAi (Nickoloff et al., 2003).

Pour les cancers associés à une altération de la voie Notch agissant comme suppresseur de tumeur, la thérapie serait d’activer la voie Notch.

Les principaux types de cancers liés à un dérèglement de la fonction Notch chez l’Homme ainsi que les thérapies potentielles sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Mécanisme moléculaire	Exemple possible des tumeurs	Thérapies potentielles
Mutations résultant en un gain de fonction de Notch	T-ALL Carcinomes mammaires Neuroblastomes	Inhibiteurs intracellulaires
Dérèglement de l’activation ligand - récepteur non spécifique	Cancers lymphoprolifératifs	Inhibiteurs intra - ou extracellulaires
Diminution de la voie Notch	Adénocarcinomes de la prostate	Activation de la voie Notch

Tableau 3 : Dérèglements de la voie Notch et cancers humains

3.7. Voie Notch et neurogenèse chez les mammifères

3.7.1. Voie Notch et développement du SNC des mammifères, l’apport des souris mutantes

Lorsque j’ai commencé mon travail de thèse, peu de données étaient disponibles sur le rôle de la voie Notch dans la neurogenèse des mammifères.

Les études du phénotype des souris transgéniques mutantes pour Notch1 (Conlon et al., 1995), RBP-Jκ (Oka et al., 1995) et Dll1 (Hrabe de Angelis et al., 1997) avaient montré l’importance de ces gènes dans la segmentation de l’embryon mais n’avaient pas pu montrer leur effet sur la neurogenèse en raison de la létalité embryonnaire précoce qui accompagne ces mutations. Les embryons homozygotes mutants pour Notch1, RBP-Jκ et Dll1 meurent

respectivement aux jours E9,5 E11,5 et E10,5 de gestation, c'est-à-dire au début de la phase neurogénique et bien avant la phase gliogénique du développement du SNC. Les travaux menés sur des souris mutantes pour des gènes bHLH tels que Mash1, Ngn-1 et Ngn-2 avaient cependant montré quelques défauts de la neurogenèse (pour revue, voir (Guillemot, 1999)), étant donné que les souris mutantes sont viables.

Les travaux de De la Pompa (de la Pompa et al., 1997) avaient tout de même montré le rôle de Notch1 et RBP-Jκ dans la neurogenèse chez les mammifères. Ces auteurs avaient montré que les mutations de Notch1 et RBP-Jκ inhibent l'expression de Hes5 et ont pour effet de favoriser la neurogenèse. De plus, la mutation RBP-Jκ a des effets phénotypiques plus importants que la mutation Notch1, laissant penser que les orthologues de Notch chez les mammifères ont une redondance fonctionnelle.

Les travaux du groupe de Verdon Taylor (Lutolf et al., 2002), ont quant à eux montré par l'utilisation de mutants conditionnels Cre-Lox, que Notch1 est important dans le développement du neuroépithélium où il maintient les précurseurs neuronaux dans un état indifférencié et contrôle leur différenciation. Une inhibition de Notch1 apparaît suffisante pour induire la neurogenèse mais ne permet pas la différenciation des neurones produits. De plus, les neurones et cellules gliales produits sont éliminés par apoptose. De nombreuses autres études sur des souris mutantes pour les gènes de la voie Notch ont depuis été menées sur le rôle de la voie Notch dans la neurogenèse chez les mammifères (pour revue, voir (Yoon et Gaiano, 2005)). Le tableau 4 résume les phénotypes au niveau du SNC des différents mutants de la voie Notch.

Gènes	Phénotype	Références
Notch1	Différenciation neuronale précoce Hes5↓, Mash1↑, NeuroD↑, Dll1↑	(de la Pompa et al., 1997; Lutolf et al., 2002)
	Apoptose neuronale massive tardive ↓formation des neurosphères	(Lutolf et al., 2002) (Hitoshi et al., 2002)
	Déficits de la neurogenèse, perte neuronale massive tardive ↓formation des neurosphères	(Shen et al., 1997) (Hitoshi et al., 2002)
PS1, PS2	Déficits mémoire spatiale apprentissage ↓formation des neurosphères	(Saura et al., 2004) (Yun et al., 2002)
	Dll1	Hes5↓, ↑neurones dans le télencéphale ↑neurones, ↓gliales dans les neurosphères, Hes5↓
Hes1	Différenciation neuronale précoce, ↑Hes5	(Ishibashi et al., 1995)
	↑neurones dans les neurosphères, ↓formation des neurosphères	Résultats décrits dans ce manuscrit
Hes5	30-40% de réduction de la glie de Müller dans la rétine	(Hojo et al., 2000)
Hes1, Hes5	Notch1 constitutif ne peut inhiber la différenciation neuronale ↓formation des neurosphères	(Ohtsuka et al., 1999) (Ohtsuka et al., 2001)
	Différenciation neuronale précoce	(Hatakeyama et al., 2004)

Tableau 4 : Brève description du phénotype du SNC chez des souris mutantes pour les principaux gènes de la voie Notch (adapté de (Yoon et Gaiano, 2005))

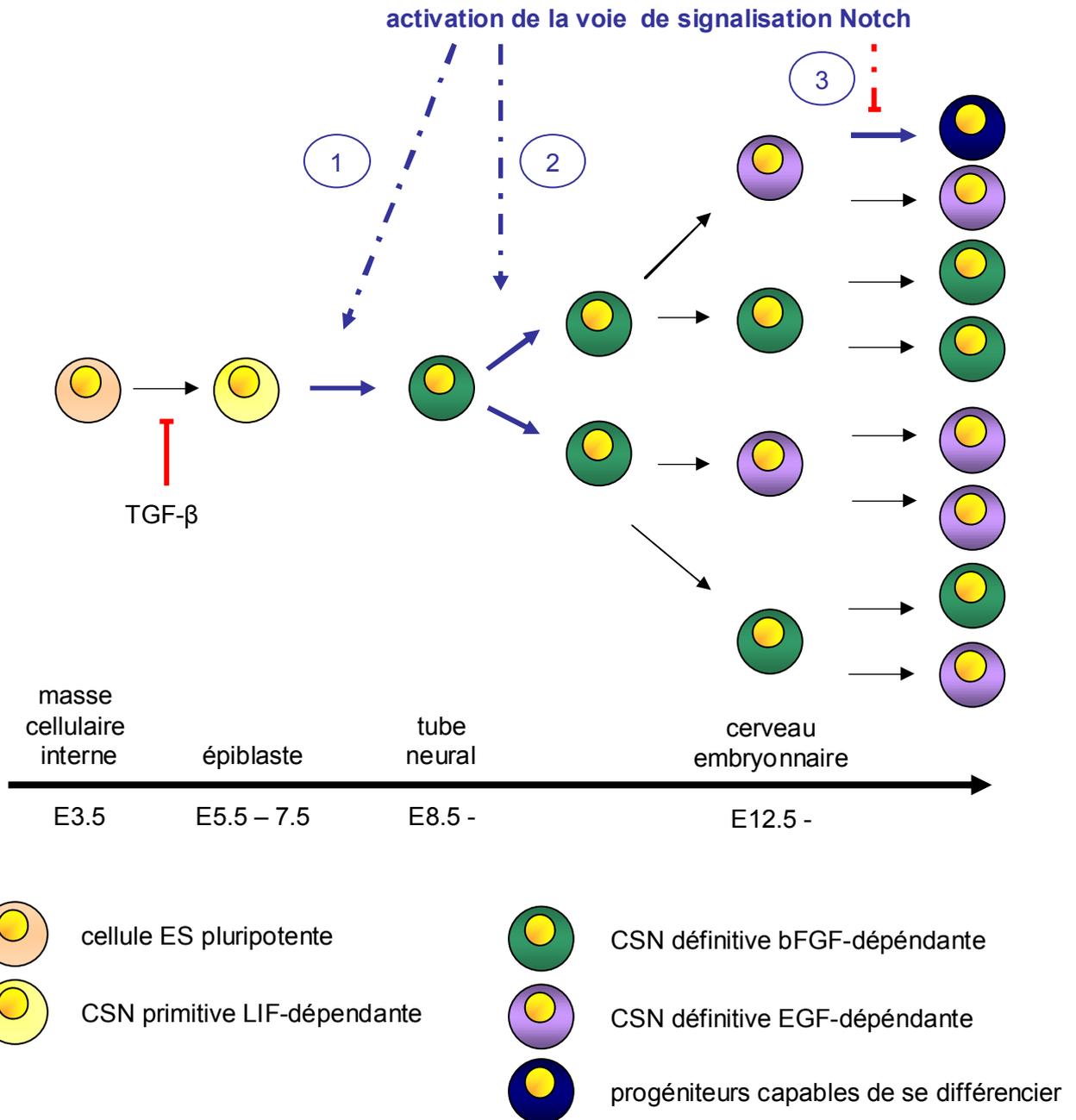


Figure 23. Modèle de filiation des cellules souches neurales

Les cellules souches neurales primitives LIF-dépendantes peuvent être générées directement à partir des cellules ES pluripotentes in-vitro après avoir levé l'inhibition du TGF-β. Elles ont été mises en évidence (du moins in-vitro et potentiellement in-vivo) dans l'épiblaste/neuroectoderme de souris au stade développemental E5.5 – 7.5.

L'activation de la voie Notch semble requise (1) pour la transition des cellules souches neurales primitives aux cellules souches neurales définitives et / ou (2) pour leur maintien à l'état de cellules souches neurales définitives et pour ainsi (3) réprimer leur différenciation en cellules du lignage neuronal ou glial.

(Adapté de Hitoshi et al., 2004)

3.7.2. Rôle de Notch dans la génération et le maintien des CSN

Quelques études menées dans le système des neurosphères ont montré récemment l'importance de la voie Notch dans le maintien des CSN. Les auteurs de ces travaux ont généré des neurosphères à partir d'embryons de souris mutantes pour HES1 (Nakamura et al., 2000), HES1/HES5 (Ohtsuka et al., 2001), RBP-Jκ, Notch1 et presenilin-1 (Hitoshi et al., 2002).

L'inactivation de ces gènes a permis d'obtenir des neurosphères dans lesquelles la voie Notch est inhibée. L'obtention de neurosphères primaires montre que l'inactivation de la voie Notch n'empêche pas la génération des CSN, mais la difficulté à maintenir ces lignées de neurosphères au cours des passages montre que la voie Notch est nécessaire au maintien des CSN. Des travaux plus récents ont montré que les CSN primitives du neuroectoderme et embryonnaires du télencéphale, sont maintenues grâce à des interactions entre Notch1 et la voie du bFGF (Yoon et al., 2004). L'équipe de van der Kooy a montré en 2004 l'importance de la voie Notch dans la filiation des CSN primitives, LIF dépendantes, vers les CSN définitives, EGF dépendantes (Hitoshi et al., 2004) (figure 23).

Enfin, il a été montré récemment l'importance des gènes *Hes1* et *Hes5* dans le maintien in-vivo des CSN dans un état indifférencié (Hatakeyama et al., 2004). Dans les mutants *Hes*, les cellules formées à partir du neuroépithélium ne sont pas maintenues dans un état indifférencié et les cellules de la glie radiaire se différencient prématurément en neurones, d'où une déplétion en cellules formées tardivement au cours de la neurogenèse.

3.7.3. Rôle de Notch dans la spécification neurone / cellules gliales à partir des CSN

La plupart des études menées chez les mammifères montrent que l'inhibition de la voie Notch a pour effet de stimuler la neurogenèse (cf. § 3.7.1). et quelques travaux montrent que la voie Notch, lorsqu'elle est activée, stimule la gliogenèse (Furukawa et al., 2000; Gaiano et al., 2000; Tanigaki et al., 2001)

Peu de travaux ont par contre montré le rôle de la voie Notch dans la spécification entre neurones et cellules gliales à partir des CSN et c'est là l'une des particularités des travaux présentés dans ce manuscrit.

3.7.4. Rôle de Notch dans la différenciation des neurones et des cellules gliales

Quelques travaux menés in-vitro ont également montré spécifiquement le rôle de la voie Notch dans la différenciation des neurones, astrocytes et oligodendrocytes.

Parmi ces travaux, Sestan et al. ont montré en 1999 le rôle de la voie Notch dans la croissance neuritique dans des cultures de neurones corticaux (Sestan et al., 1999). Cette étude a montré que la croissance neuritique est bloquée lorsque les cellules entrent en contact suite à une activation contact-dépendante de la voie Notch. Ainsi, la voie Notch, et plus particulièrement Notch1 inhibe la différenciation des neurones en culture.

En 1998, l'équipe de Ben Barres a montré le rôle de la voie Notch dans la différenciation des oligodendrocytes, in-vivo et in-vitro (Wang et al., 1998). Ces travaux ont démontré que l'activation de Notch1 par Jagged1 ou Dll1 active la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) et est nécessaire à leur myélinisation. Plus récemment, des travaux ont montré que l'activation de la différenciation des oligodendrocytes par Notch fait intervenir la voie Deltex, activée par un nouveau ligand de Notch1, la F3/Contactine (Hu et al., 2003). La F3/Contactine est sécrétée à la surface des axones des neurones et va permettre aux oligodendrocytes de se différencier et ainsi de myéliniser les axones des neurones. La même équipe a montré en 2004 que NB-3, un membre de la famille des F3/Contactines, favorise la génération d'OPC à partir des précurseurs neuraux et la différenciation des OPC en oligodendrocytes myélinisés en activant Notch1 et la voie Deltex1 (Cui et al., 2004).

La spécification des astrocytes à partir des CSN et leur différenciation est généralement associée à la voie de signalisation JAK/STAT (Bonni et al., 1997; Rajan et McKay, 1998). Mais des études ont également montré que la voie Notch, décrite comme agissant indépendamment de la voie JAK/STAT, favorise l'astrogenèse à partir des CSN (Tanigaki et al., 2001). Il a également été montré que, tout comme STAT3, le domaine intracellulaire de Notch régule directement la transcription du gène de la Gfap (Ge et al., 2002).

4. Petites molécules non peptidiques et cellules souches

L'évolution des connaissances sur la régulation du devenir des cellules souches ouvre de grandes perspectives thérapeutiques pour le traitement de nombreuses maladies telles que les troubles neurodégénératifs, les pathologies musculaires et cardiaques, ou certains cancers. Une meilleure connaissance des mécanismes responsables de la quiescence, du déterminisme et de la différenciation des cellules souches, aussi bien *in vivo* que *in-vitro*, est encore nécessaire pour concevoir des thérapies ciblées. Cependant, des études pharmacologiques ont été entreprises pour tester l'effet de petites molécules non peptidiques, naturelles ou de synthèse, sur le devenir des cellules souches.

Voilà plusieurs décennies que les méthodes de criblage sont utilisées par les laboratoires pharmaceutiques pour isoler des petites molécules utilisables en tant que médicaments, mais cela ne fait que quelques années que ces tests sont appliqués aux cellules souches. Plusieurs tests de criblage que nous détaillerons ici sont actuellement utilisés pour obtenir des « touches » thérapeutiques, de nouvelles entités chimiques influençant le devenir des cellules souches. Ces molécules pourraient avoir une application intéressante dans le cadre de la médecine régénérative par thérapie cellulaire.

Mais une fois qu'une « touche » est obtenue, c'est-à-dire une fois qu'un effet phénotypique ou moléculaire est attribué à une molécule, il reste à répondre à plusieurs questions essentielles : (i) Quel est l'effet général de cette petite molécule et agit-elle directement ou indirectement sur le phénomène observé ? (ii) Existe-t-il des différences fonctionnelles entre les types cellulaires générés par l'action de la molécule et ceux obtenus par des processus naturels ? (iii) Les effets observés sur le système ayant servi au criblage sont-ils généralisables à d'autres systèmes ? (iv) Les effets observés *in vitro* peuvent-ils être extrapolés *in vivo* ? (v) Enfin, le degré de sélectivité d'action de la molécule est-il suffisant pour que l'on puisse envisager une application thérapeutique ?

4.1. Avantage des petites molécules non peptidiques

L'intérêt des petites molécules non peptidiques repose sur leur biodisponibilité. La biodisponibilité se traduit par plusieurs caractéristiques : absorption, distribution, métabolisme et élimination/excrétion (ADME).

La biodisponibilité des petites molécules non peptidiques est souvent meilleure que celle des peptides et protéines pour plusieurs raisons. Les peptides sont moins stables *in vivo* que les molécules non peptidiques sélectionnées pour les tests. La métabolisation des molécules

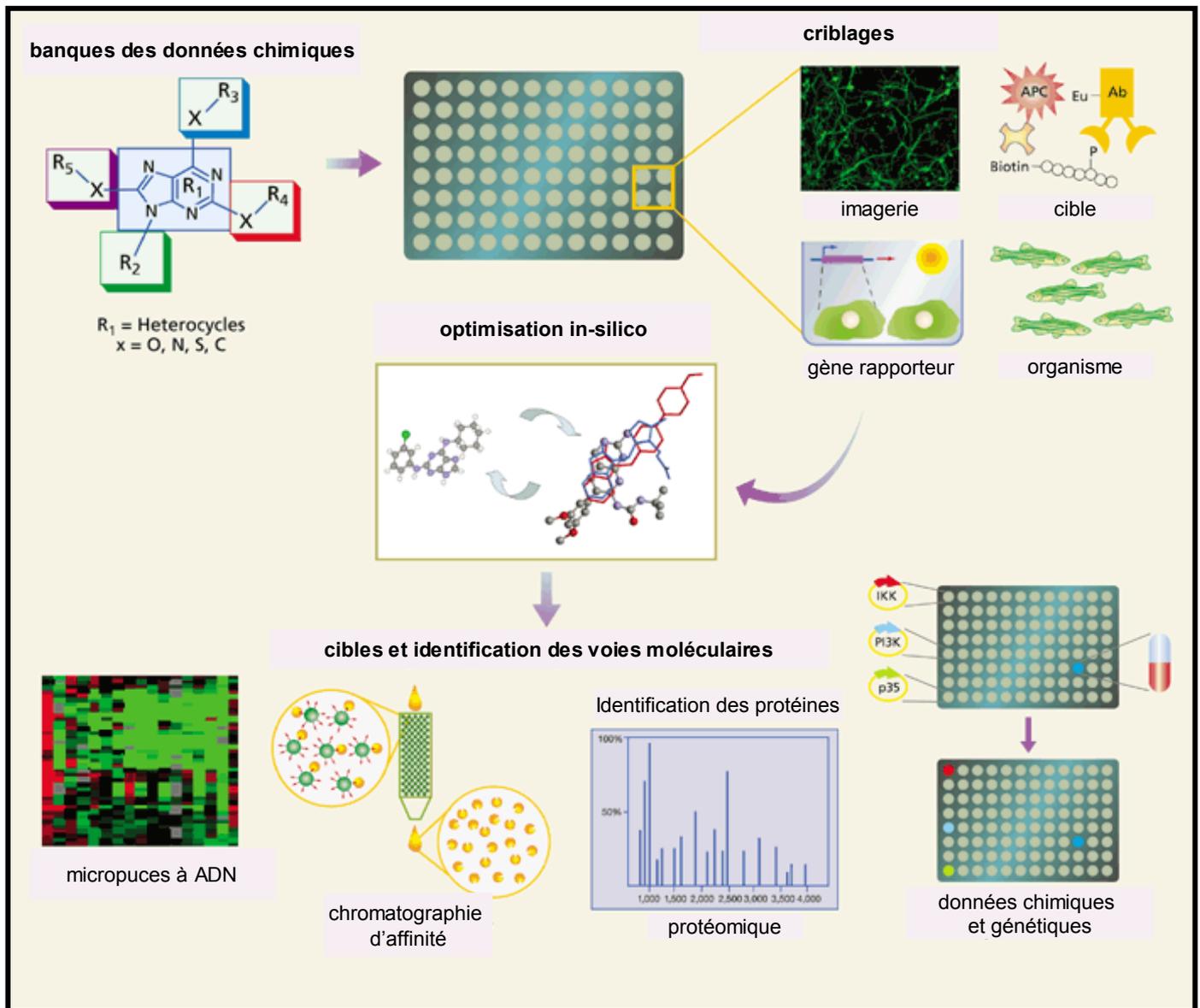


Figure 24. Criblage et caractérisation de petites molécules qui pourraient contrôler le devenir des cellules souches.

Méthodologie de criblages pour étudier le rôle d'agents pharmacologiques sur le déterminisme et sur la différenciation des cellules souches.

(Adapté de Ding et Schultz 2004)

peptidiques et leur dégradation par le système digestif est en effet beaucoup plus rapide, ce qui rend leur administration par voie orale très difficile. De plus, dans le cas de l'utilisation de drogues agissant sur le SNC, la plupart des peptides ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, il est souvent nécessaire d'administrer les peptides par voie systémique (sanguine ou intra-ventriculaire dans le cas du SNC), ce qui peut représenter une contrainte évidente pour le patient. D'autre part, il est facile de synthétiser des drogues ou pro-drogues lipophiles, ce qui améliore leur distribution au sein de l'organisme en facilitant leur perméabilité membranaire.

Un autre avantage des molécules non peptidiques est qu'il est relativement simple de créer par chimie combinatoire de larges chimiothèques d'analogues structuraux de molécules potentiellement actives. Il est également possible de modifier les petites molécules synthétisées pour affiner leurs propriétés.

Enfin, la synthèse de petites molécules non peptidiques est souvent moins onéreuse pour les industriels que celle de molécules peptidiques. Il en est de même pour leur conditionnement et leur stockage.

4.2. Méthodes de criblages

Une approche pour rechercher l'activité éventuelle des petites molécules sur le devenir des cellules souches consiste à utiliser des méthodes de criblage basées sur le phénotype cellulaire ou sur l'expression de gènes connus pour jouer sur le déterminisme cellulaire (figure 24) (pour revue voir (Ding et Schultz, 2004; Ding et Schultz, 2005)).

Pour identifier des molécules permettant d'induire le phénotype d'intérêt (par exemple le déterminisme des cellules souches neurales vers la voie neuronale), des méthodes de criblages basées sur le phénotype ont été développées. Les systèmes utilisés pour le criblage peuvent être des lignées cellulaires (primaires ou immortalisées), mais également des organismes modèles simples (larve de xénope ou de poisson zèbre par exemple). L'observation du phénotype peut se faire par imagerie classique ou tests ELISA détectant l'expression de marqueurs de différenciation par les cellules. Il est également possible de cribler une banque de molécule sur leur possibilité de moduler certaines voies de transduction connues pour leur rôle dans le déterminisme et la différenciation.

Une fois que des molécules ayant l'activité biologique requise sont isolées, il peut être utile de caractériser leur mécanisme d'action. Ceci peut être réalisé au niveau protéomique et génomique (micropuces à ADN).

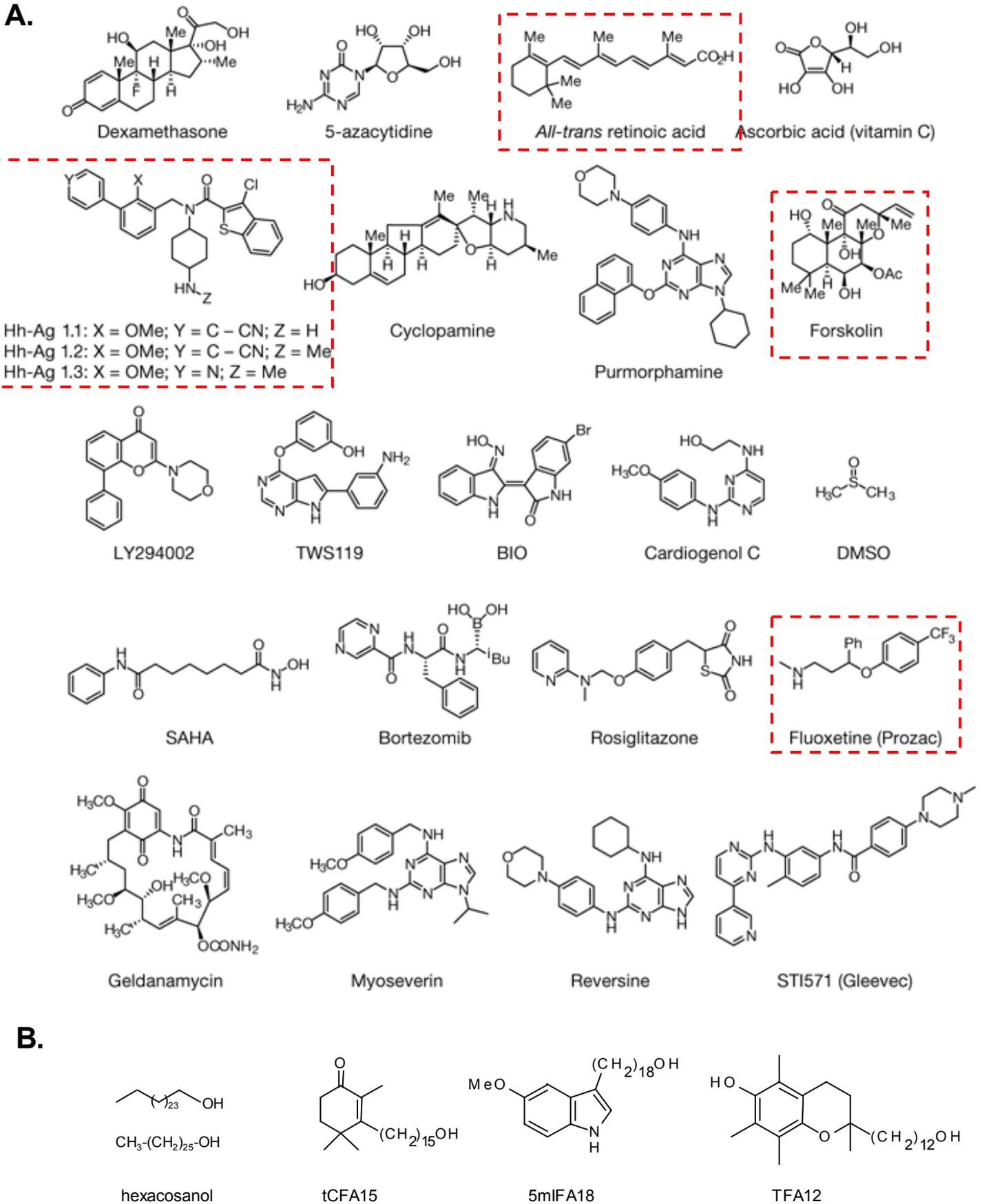


Figure 25. Structure de petites molécules régulant le devenir des cellules souches

(A) Petites molécules non peptidiques dont le rôle sur le devenir des cellules souches est connu (encadré en rouge, celles jouant sur les cellules neurales). (adapté de Ding et Schultz 2004)

(B) Hexacosanol et Petites molécules non peptidiques dérivant de l'hexacosanol, synthétisées par l'UMR 7123, dont nous avons démontré les effets neurotrophiques dans le système des neurosphères.

4.3. Petites molécules non peptidiques régulant le devenir cellulaire

Peu de petites molécules non peptidiques sont actuellement connues pour réguler le déterminisme et la différenciation des cellules souches (figure 25A) (pour revue voir (Ding et Schultz, 2004)). Néanmoins, l'effet de certaines de ces molécules sur les CSN a déjà été démontré.

La famille des Hh-Ag (Hedgehog-Agonistes), une série d'agonistes et antagonistes de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh), a été synthétisée (Frank-Kamenetsky et al., 2002). L'utilisation de ces molécules comme outils pharmacologiques a permis la compréhension des effets du bFGF via la voie Shh sur les CSN *in vivo* et *in vitro* (Gabay et al., 2003). La cyclopamine, un agoniste de Shh qui a pour effet d'inhiber la prolifération et d'activer la différenciation des cellules de médulloblastomes *in vitro* et *in vivo* (Berman et al., 2002).

La forskoline et l'acide rétinoïque sont connus pour promouvoir la différenciation neuronale des CSN (Palmer et al., 1997), en activant la signalisation de l'AMPc et de la PKA, ce qui a pour effet d'inactiver la voie Shh.

Un autre exemple intéressant est celui de la fluoxétine. Il a été démontré que la fluoxétine (Prozac), utilisée depuis longtemps dans le traitement de la dépression chronique, a pour effet de stimuler la neurogenèse dans l'hippocampe, suggérant la possibilité d'une relation entre neurogenèse et dépression (Santarelli et al., 2003).

4.4. A la recherche de nouvelles petites molécules non peptidiques neurotrophiques

Avec les progrès des technologies d'automatisation et de détection, des milliers de molécules peuvent être criblées très rapidement par l'industrie. Par ailleurs, la chimie combinatoire permet la synthèse d'un grand nombre de molécules avec une très grande diversité structurale. Mais il est nécessaire de choisir les bons systèmes de criblage et en amont de bien choisir les propriétés chimiques des molécules candidates.

Ainsi, dans le cas de la recherche de molécules actives pour le traitement des maladies neurodégénératives, il peut être intéressant de synthétiser des molécules ayant un effet à la fois anti-oxydant (neuroprotection) et neurotrophique. Pour qu'un composé puisse être assimilé à un facteur neurotrophique, il doit (i) *in vitro*, promouvoir la croissance, la différenciation et la survie des neurones et/ou (ii) *in vivo*, protéger les neurones, voire réparer les dégâts causés aux neurones par des lésions.

Certaines petites molécules endogènes sont neurotrophiques. L'acide rétinoïque, connu entre autre pour ses potentialités à induire la différenciation des cellules ES en neurones (Wichterle

et al., 2002)), en est un bon exemple. La mélatonine, quant à elle, est une petite molécule ayant des propriétés anti-oxydantes (Reiter, 1998), dont les potentialités dans le traitement de la maladie d'Alzheimer sont reconnues (Poeggeler et al., 2001)).

La thématique du Laboratoire de chimie organique des substances naturelles (UMR 7123 CNRS, Strasbourg), dirigée par le Dr Bang LUU avec qui nous collaborons, se place dans cette optique. Ils ont isolé il y a près de 20 ans un alcool gras neurotrophique, l'hexacosanol (figure 25B), à partir d'une plante utilisée dans la médecine traditionnelle vietnamienne et indienne pour ses propriétés cicatrisantes (*Hygrophila erecta*, famille des Acanthacées) (Borg et al., 1987). Ils ont depuis synthétisé de nombreuses molécules neurotrophiques en greffant cette chaîne alcool sur différents cycles (Luu et al., 2000).

Céline Guirlanda-Junges a synthétisé en 2000 le 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexène-1-one (ou tCFA15, figure 25B) (Girlanda-Junges et al., 2000). Cette molécule, ayant un cycle proche de celui de l'acide rétinoïque et une chaîne de type hexacosanol, a été sélectionnée parmi d'autres analogues structuraux synthétisés pour leurs propriétés neurotrophiques (Gonzalez de Aguilar et al., 2001; Hanbali et al., 2004).

De même, Djilil Coowar a développé une nouvelle famille de molécules, les IFA (indole fatty alcohol, alcools gras indoliques, Figure 25B), dérivée de la mélatonine et de l'hexacosanol.

Nous avons testé l'effet de ces molécules sur la différenciation des neurosphères, comme nous le décrirons dans le présent manuscrit (Bouissac et al., soumis ; Coowar et al., 2004).

Chapitre 2

Méthodes expérimentales

1. Culture cellulaire

1.1. Animaux et principaux produits utilisés

1.1.1. Animaux et animaleries

1.1.1.1. Origine des lignées de souris transgéniques

Les animaux utilisés dans le cadre de ce travail ont été élevés dans l'animalerie du Centre de Neurochimie (CNRS, Strasbourg) puis dans celle de la Faculté de Pharmacie (Université Louis Pasteur, Strasbourg) lors de la fermeture de notre animalerie pour rénovation. Les expériences sur les souris athymiques « nudes » nu -/- (Charles River) ont été réalisées à l'animalerie du laboratoire INSERM - U682 (Strasbourg, Hautepierre).

Les souris transgéniques, mutantes pour le gène *DIII* (Hrabe de Angelis et al., 1997), nous ont été fournies par Martin Hrabé de Angelis (GSF, Institute for Mammalian Genetics, Munich, Allemagne). Les souris transgéniques mutantes pour *HESI* (Ishibashi et al., 1995) nous ont été fournies par François Guillemot (IGBMC, Strasbourg, France).

1.1.1.2. Elevage et obtention d'embryons

Dans le cadre de notre étude, nous avons préparé des lignées de neurosphères provenant de souris transgéniques pour les gènes *DIII* et *HESI* (protocole d'obtention des neurosphères décrit au §1.3). Les embryons mutants homozygotes (-/-) et hétérozygotes (+/-) sont obtenus par croisement de souris hétérozygotes (identifiées par PCR). Une femelle gestante est ainsi porteuse d'embryons sauvages (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes mutants (-/-) pour la mutation d'intérêt.

Trois femelles (+/-) sont mises en présence d'un mâle (+/-) durant une nuit. L'apparition du bouchon vaginal (dans les douze heures suivant l'accouplement) marque le stade embryonnaire E0,5. Un suivi du poids des femelles confirme que les souris sont bien gestantes. La perte de la fonction des gènes entraînant une létalité embryonnaire, les femelles sont sacrifiées avant la fin de la gestation (respectivement aux stades embryonnaires E10,5 et E13,5 pour les embryons *DIII* et *HESI*).

Les femelles sont sacrifiées par dislocation cervicale. L'utérus est prélevé en conditions stériles et transféré dans des boîtes de pétri contenant du PBS (Phosphate Buffer Saline tamponné à pH7,4 : NaCl 150mM ; NaH₂PO₄.H₂O 2,5mM ; Na₂HPO₄.2H₂O 13mM). Chaque

deciduale, une fois disséquée est rincée au PBS afin d'enlever l'excès de sang. Sous une loupe à dissection, les sacs amniotiques sont isolés et les embryons, une fois extraits, sont transférés dans de nouvelles boîtes de pétri contenant du PBS frais.

1.1.1.3. Phénotype des embryons mutants pour *Dll1* et *HES1*

Dans le cas de la mutation *Dll1*, les embryons homozygotes mutants (-/-) sont létaux au stade embryonnaire E11,5 et présentent tous une malformation des somites ainsi qu'une forte hémorragie cérébrale permettant de les identifier sans problème (Hrabe de Angelis et al., 1997). Par contre, la distinction entre embryons sauvages et hétérozygotes (ne présentant pas de phénotype) nécessite une analyse moléculaire plus poussée. Nous avons choisi la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) décrite dans le §3.1.

Dans le cas de la mutation *HES1*, les embryons homozygotes mutants présentent des défauts de la neurulation et sont létaux au stade E13,5. Deux phénotypes homozygotes mutants (-/-) existent : les embryons présentant une absence de fermeture du tube neural et des somites sans bordure nette sont létaux au stade embryonnaire E14,5 (20% des embryons). Les embryons ne présentant pas de phénotype visible meurent au stade post-natal P-1 (80% des embryons) (Ishibashi et al., 1995). Nous avons donc eu recours à la technique de PCR pour distinguer embryons sauvages (+/+), hétérozygote (+/-) et homozygote (-/-).

1.1.2. Origine des principaux produits utilisés pour la culture cellulaire

Les produits utilisés pour les cultures cellulaires sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Composés	Source
Milieux DMEM et DMEM/F12	Gibco, Life Technologies, Invitrogen
Sérums de veau (FCS) et de fœtus bovin (FBS)	Gibco, Life Technologies, Invitrogen
BSA, insuline, transferrine, putrescine, sélénite de sodium, pénicilline, streptomycine, poly-L-lysine, poly-L-ornithine, poly-HEMA, EGF, LIF, bromodésoxyuridine (BrdU)	Sigma
bFGF recombinant humain	Pharma Biotechnologie
PDGF et CNTF	R&D System

Tableau 5 : Origine des principaux produits utilisés en culture cellulaire

1.2. Produits utilisés pour traiter les cellules

1.2.1. Petites molécules non peptidiques

1.2.1.1. Le tCFA15

Le tCF15 (2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexène-1-one) est une molécule synthétisée par le groupe de Bang Luu, de l'UMR 7123 (CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg) (Girlanda-Junges et al., 2000) (Figure 26). Il est soluble dans l'éthanol. Une

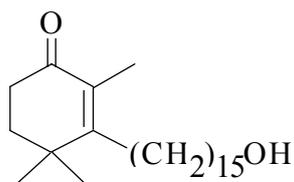


Figure 26. Structure du

de culture afin d'obtenir des concentrations finales de 10^{-5} M à 10^{-8} M. Le tCFA15 ayant une demi-vie de quelques heures en solution aqueuse, le milieu additionné de tCFA15 est généralement renouvelé chaque jour. Le tCFA15 étant solubilisé dans l'éthanol, la même quantité d'éthanol (v : v) est ajoutée dans les conditions témoin.

1.2.1.2. Les molécules de la famille des IFA

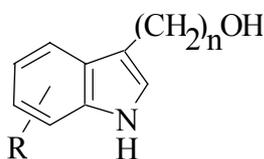


Figure 27. Structure des

ce manuscrit) (Figure 27). Ces molécules sont solubles dans l'éthanol. Comme pour le tCFA15, une solution stock d'IFA à 10^{-3} M est préparée dans 1 ml d'éthanol et lors du traitement des cellules, le milieu de culture est généralement renouvelé chaque jour. Les IFA étant solubilisés dans l'éthanol, la même quantité d'éthanol (v : v) est ajoutée dans les conditions témoin.

1.2.2. Modulation de la voie Notch

1.2.2.1. Fragment extracellulaire de Jagged1

Des cellules NIH-3T3 ont été transfectées de façon stable, par un plasmide contenant la séquence du domaine extracellulaire de Jagged1 humain ainsi qu'un gène de résistance au G418. Les lignées hJagEC-3T3, cultivées dans un milieu contenant 10% de FBS, sont périodiquement sélectionnées grâce au G418 (0,8mg/ml) et ne sont pas utilisées plus de 5 passages. Ces cellules hJagEC-3T3, lorsqu'elles arrivent à confluence, libèrent dans le milieu de culture la forme soluble de Jagged1 (J1EC), capable d'activer la voie Notch dans certains systèmes (Sestan et al., 1999; Varnum-Finney et al., 1998). Ces lignées cellulaires nous ont été fournies par le Dr Spyros Artavanis-Tsakonas (Harvard Medical School, Boston, USA). Pratiquement, lorsque les cellules hJagEC-3T3 arrivent à confluence, les cellules sont rincées au PDS et le milieu d'intérêt (du milieu « neurosphères » dans nos expériences, cf. ci-dessous)

est conditionné (10 ml par boîte de Petri de 100 mm) pendant 24 heures avant d'être centrifugé pour éviter toute contamination cellulaire et utilisé immédiatement. Le milieu conditionné par des cellules NIH-3T3 non transfectées constitue le milieu contrôle. Le milieu conditionné est stable 3 à 5 jours si il est conservé à 4°C mais il ne peut être congelé.

1.2.2.2. Oligonucléotides antisens dirigés contre Notch1 et Notch4

Un oligonucléotide antisens est une courte séquence d'ADN simple brin (10 à 20 nucléotides), complémentaire d'une séquence spécifique de l'ARNm du gène d'intérêt. Cet oligonucléotide s'hybride avec l'ARNm afin d'empêcher sa liaison au ribosome et donc sa traduction.

Les oligonucléotides antisens spécifiques de Notch1 sont dirigés contre les régions EGF-like du gène Notch1 (Austin et al., 1995; Faux et al., 2001). La séquence de l'oligonucléotide antisens Notch1 utilisé est 5'-GAAGTCATTAACACGCTGCACAC, et celle de l'oligonucléotide témoin (non-sens, séquence aléatoire choisie avec la même composition de bases et ne s'hybridant avec aucun ARNm connu) est 5'-TACATCAGCAGACTACA CGAGTC.

Les oligonucléotide antisens dirigés contre Notch4 ont été dessinés à l'aide du logiciel OLIGO 6.1 (Molecular Biology Insights) et leurs séquences sont 5' - CCA TGA GCT TTC GGG TTC et 5' - AAG GCG TTG GCT AAA. Nous avons utilisé comme contrôle des oligonucléotides sens de séquence 5' - GAA CCC GAA AGC TCA TGG et 5' - TTT AGC CAA CGC CTT.

Les oligonucléotides ont été gracieusement synthétisés par le service commun de l'IGBMC (Strasbourg, Illkirch). Les oligonucléotides sont dissous dans de l'eau stérile à la concentration de 10 mM, et la concentration optimale d'utilisation est de 10 µM.

1.2.2.3. Inhibiteur de gamma sécrétase de classe XII (GSI)

L'inhibiteur de gamma sécrétase (GSI, Novagen) de classe XII permet de bloquer le clivage du récepteur Notch1 (Weijzen et al., 2002). La partie intracellulaire fonctionnelle de Notch1 (domaine intracellulaire de NOTCH1, ICN1) ne peut donc pas être libérée dans la cellule.

Le GSI est utilisé à des concentrations allant de 1 à 5 mM en fonction du type de cellules. Le GSI étant solubilisé dans du DMSO, le DMSO est utilisé comme témoin (concentration finale 0,1%).

1.2.2.4. Transfection transitoire des cellules par le domaine intracellulaire de Notch1 (ICN1)

La plasmide pcDNA3-ICN1 codant la partie intracellulaire du récepteur NOTCH1 humain a été fourni par le Dr. Jon Aster (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA) (Aster et al., 1997). L'ADN plasmidique a été purifié selon le protocole du Kit QIAGEN (QIAGEN Plasmid maxi kit).

Les cellules sont transfectées par la méthode au phosphate de calcium. $5 \cdot 10^6$ cellules à transfecter sontensemencées la veille dans des boîtes (ou flacons). Un mélange contenant 10 µg d'ADN, 62,5 µl de CaCl_2 2 M, et de l'eau pour compléter le volume de 500 µl est préparé. Après une incubation à température ambiante de 10 mn, 500 µl d'HBS 2X (50 mM HEPES ; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 280 mM NaCl ; 10 mM KCl ; 12 mM dextrose ; pH 7,05) sont ajoutés sous agitation et l'incubation est poursuivie pendant 20 mn à température ambiante. 100 µl du complexe transfectant ainsi obtenu sont ajoutés goutte à goutte sur les cellules en culture, dans 500 µl de milieu de culture. Le milieu est changé 12 heures après transfection.

1.2.3. Modulation de l'activité de STAT3

1.2.3.1. Utilisation de CNTF et de LIF pour activer STAT3

Le « leukemia inhibitory factor » (LIF) est un ligand du LIFR et le « ciliary neurotrophic factor (CNTF) est un ligand du CNTFR alpha (associé au LIFR). Ces récepteurs n'ont qu'une partie extracellulaire, ils s'associent à la gp130. Lorsqu'elle est activée, la gp130 active JAK qui va phosphoryler STAT3. Sous sa forme phosphorylée, STAT3, se dimérise et le dimère est transporté dans le noyau où il exerce un rôle de régulateur de la transcription pour certains gènes.

Nous avons utilisé des facteurs recombinants humains, rhCNTF (R&D Systems) et rhLIF (PeproTech Inc.) pour provoquer la phosphorylation et donc l'activation de STAT3. Le CNTF et le LIF sont solubilisés dans du PBS puis dilués dans le milieu de culture (0,1%) pour obtenir une concentration finale de 10 ng/ml.

1.2.3.2. Peptide bloquant de la dimérisation de STAT3

Le peptide utilisé a été décrit par Turkson (Turkson et al., 2001) pour inhiber l'activité de STAT3 en se complexant au domaine SH2 de la protéine, empêchant ainsi la formation des homodimères actifs. Le peptide a pour séquence PY*LKTK (PpYLKTK=STAT3 bp) et a été synthétisé par le service de synthèse peptidique de l'IFR37 de Neurosciences (Strasbourg). Le peptide est solubilisé dans de l'eau stérile (à une concentration de 200 mM) et utilisé à une concentration finale de 2 mM.

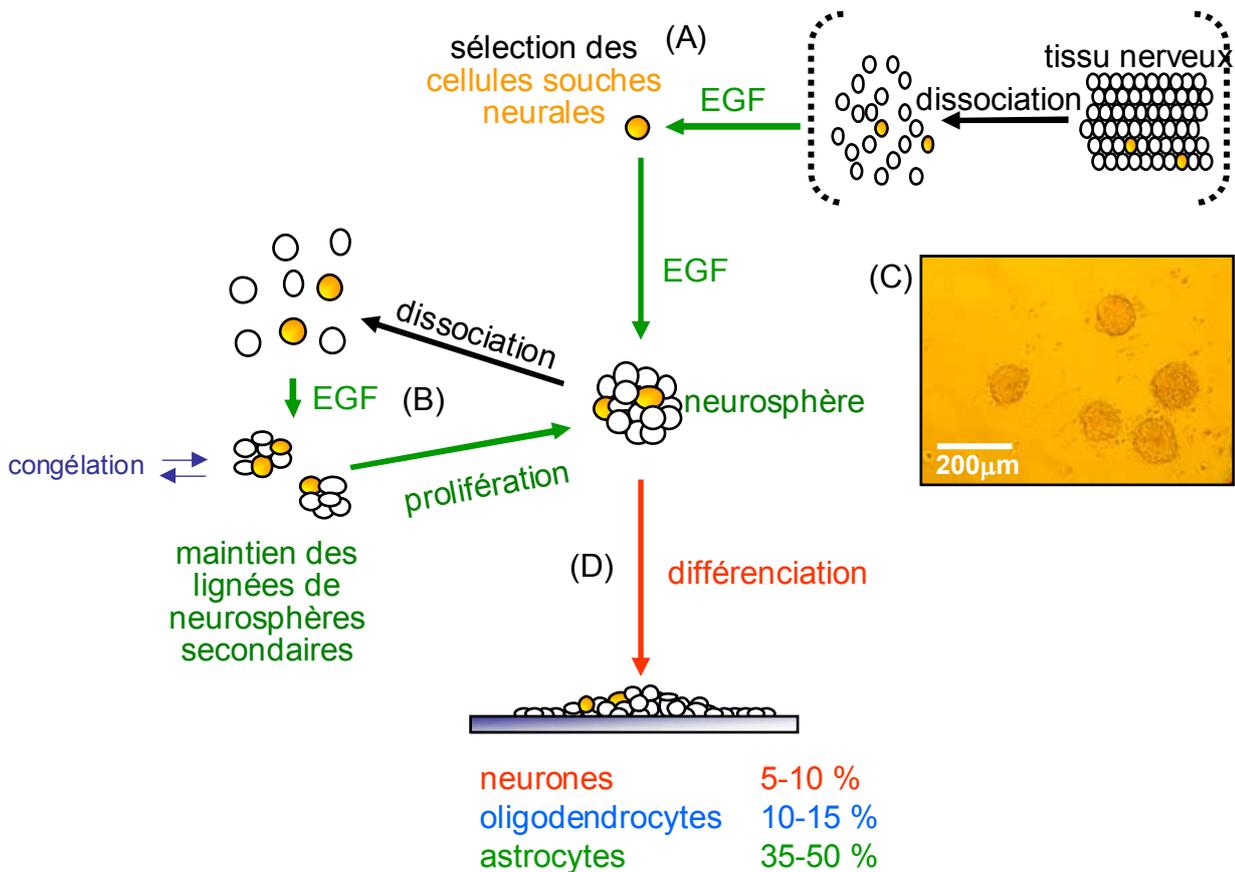


Figure 28. Protocole d'obtention et d'entretien des lignées de neurosphères

(A) Le tissu cérébral embryonnaire est dissocié mécaniquement et mis en culture dans un milieu défini en présence d'EGF. Seule une infime partie des cellules ($\ll 1\%$) va proliférer pour former des clones de cellules indifférenciées flottant dans le milieu : les neurosphères.

(B) Ces neurosphères primaires, dissociées et remises en culture, vont donner naissance à des neurosphères secondaires, plus nombreuses. Cette opération est renouvelée régulièrement, ce qui permet de maintenir et d'amplifier la population de neurosphères à chaque passage. Les neurosphères peuvent également être congelées et conservées dans l'azote liquide.

(C) Neurosphères en suspension, microscopie optique.

(D) Les neurosphères peuvent se différencier sur un support permettant leur adhésion et vont donner les trois principaux types cellulaires présents dans le système nerveux central, et ce dans des proportions reproductibles.

Les neurosphères dérivant clonalement d'une cellule souche multipotentielle, la proportion de neurosphères primaires obtenues reflète la proportion de cellules souches neurales présente dans le tissu d'origine. De même, le nombre de neurosphères secondaires obtenues reflète le nombre de cellules souches neurales présente dans les neurosphères primaires dissociées.

1.3. Culture de neurosphères dérivant des cellules souches neurales

1.3.1. Obtention de neurosphères primaires

Nous utilisons la méthode décrite par Reynolds et Weiss (Reynolds et Weiss, 1992; Reynolds et Weiss, 1996), avec quelques modifications (figure 28). Les embryons sont prélevés respectivement au 14^{ème}, 13^{ème} et 10^{ème} jours de gestation pour les croisements résultants de couples sauvages, HES1 ou Dll1. Le cerveau de chaque embryon est disséqué et débarrassé de ses méninges. Le télencéphale est prélevé et dissocié mécaniquement à l'aide d'une pipette Pasteur effilée. Les cellules sont cultivées dans un milieu défini, sans sérum, composé d'un mélange 1:1 de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) et de milieu F12 (Gibco, Invitrogen) additionné de :

Composés	Fournisseur - Références	Concentration finales
Milieu DMEM / F12	Gibco - 31331-028	/
Bicarbonate de sodium	/	3 mM
D-glucose	Sigma G-7528	6 g/l
Insuline bovine	Sigma I-5500	25 µg/ml
Transferrine bovine	Sigma T-1283	100 µg/ml
Progestérone	Sigma P-0130	20 nM
Putrescine	Sigma P-7505	60 µM
Sélénite de sodium	Sigma S-5261	30 nM
Pénicilline G	Sigma P-3032	60 µg/ml
Streptomycine	Sigma S-9137	50 µg/ml
EGF	Sigma E-9644	20 ng/ml

Tableau 6 : Composition du « milieu neurosphères »

Ce milieu permet de sélectionner les cellules souches neurales (CSN). Nous l'appellerons « milieu neurosphères ».

Après 8 jours de culture en incubateur (37°C, 95% H₂O, 5% CO₂), la plupart des cellules sont

mortes. Seules quelques cellules (<<1% des cellules dissociées), les cellules souches qui répondent à l'EGF (« EGF responsive neural stem cell ») ont proliféré et constituent des clones sphériques de cellules non différenciées flottant dans le milieu de culture : les neurosphères primaires.

1.3.2. Entretien des cultures secondaires de neurosphères

Les sphères sont récoltées par centrifugation (800 rpm, 5 mn) et dissociées chimiquement dans du milieu de dissociation (Sigma, Cell Dissociation Solution, composition non communiquée par le fabricant) puis mécaniquement, à l'aide d'une pipette Pasteur effilée. Les cellules dissociées sont cultivées dans des fioles de 75 cm² (Falcon), dans 20 ml de milieu de culture de neurosphères, en présence d'EGF à 20 ng/ml. On obtient alors des neurosphères secondaires. Cette opération est renouvelée tous les 5-7 jours, ce qui permet d'amplifier la population de neurosphères à chaque passage. Les fioles de culture peuvent être traitées au poly-HEMA (poly (2-hydroxy-ethyl-methacrylate ; Sigma) pour empêcher l'adhésion des

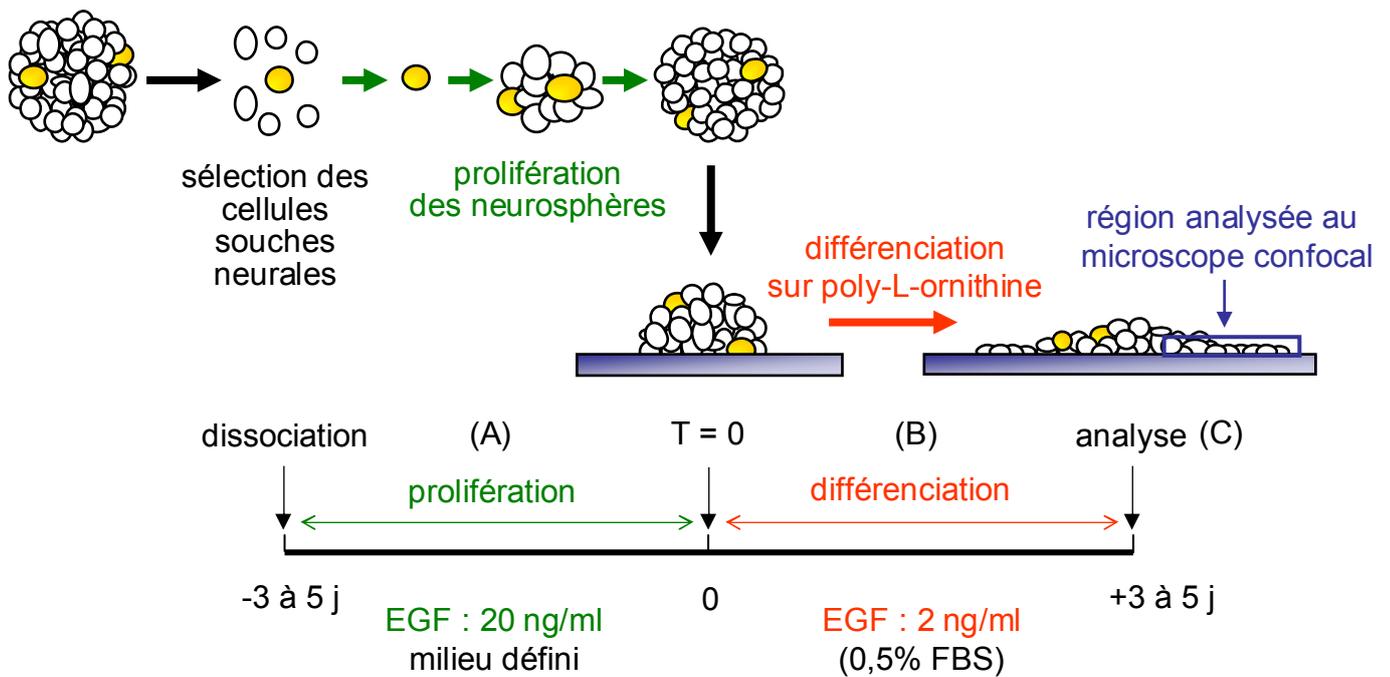


Figure 29. Protocole de différenciation des neurosphères

(A) Les neurosphères secondaires sont dissociées et mises en culture à faible concentration ($15\text{-}30 \cdot 10^3$ cellules / ml) dans un milieu défini en présence d'EGF (20 ng/ml). Dans ce milieu, les cellules souches neurales sont sélectionnées et prolifèrent pour former des neurosphères. Dans ces conditions, chaque neurosphère représente la descendance clonale d'une cellule souche neurale. La durée de la phase de prolifération conditionne la taille des neurosphères.

(B) Après 3 à 5 jours, les neurosphères sont récoltées par centrifugation (500 rpm, 5 mn) et sont déposées sur un support permettant leur adhésion (poly-L-ornithine) dans un milieu permettant leur différenciation (2 ng/ml d'EGF et éventuellement 0,5% de FBS). D'un clone tridimensionnel de cellules indifférenciées, la neurosphère tend vers une monocouche de cellules différenciées.

(C) Après 3 à 5 jours de différenciation, les cellules sont fixées (PFA 4%) et analysées par immunocytochimie et microscopie confocale. Le plan d'observation passe toujours par la base de la sphère, permettant de suivre les prolongements des cellules différenciées.

cellules. En effet, les neurosphères et surtout les mutants homozygotes *DIII^{-/-}* adhèrent au plastique des fioles non traitées.

Les neurosphères peuvent être cultivées pendant de longues périodes ou conservées congelées dans du milieu DMEM en présence de 50% de FBS et de 10% de DMSO. Au cours de nos expériences, nous avons utilisé des neurosphères secondaires entre le 8^e et le 20^e passage.

1.3.3. Différenciation des neurosphères

Après dissociation les neurosphères prolifèrent pendant 2 à 5 jours en présence d'EGF à 20 ng/ml, pendant une phase que nous appellerons « phase de prolifération » (figure 29). Des lamelles de verre (Marienfeld) sont dégraissées et recouvertes de poly-L-ornithine (Sigma, 30 µg/ml, dans l'H₂O) pendant deux heures à 37°C. Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois 5 mn à l'eau distillée.

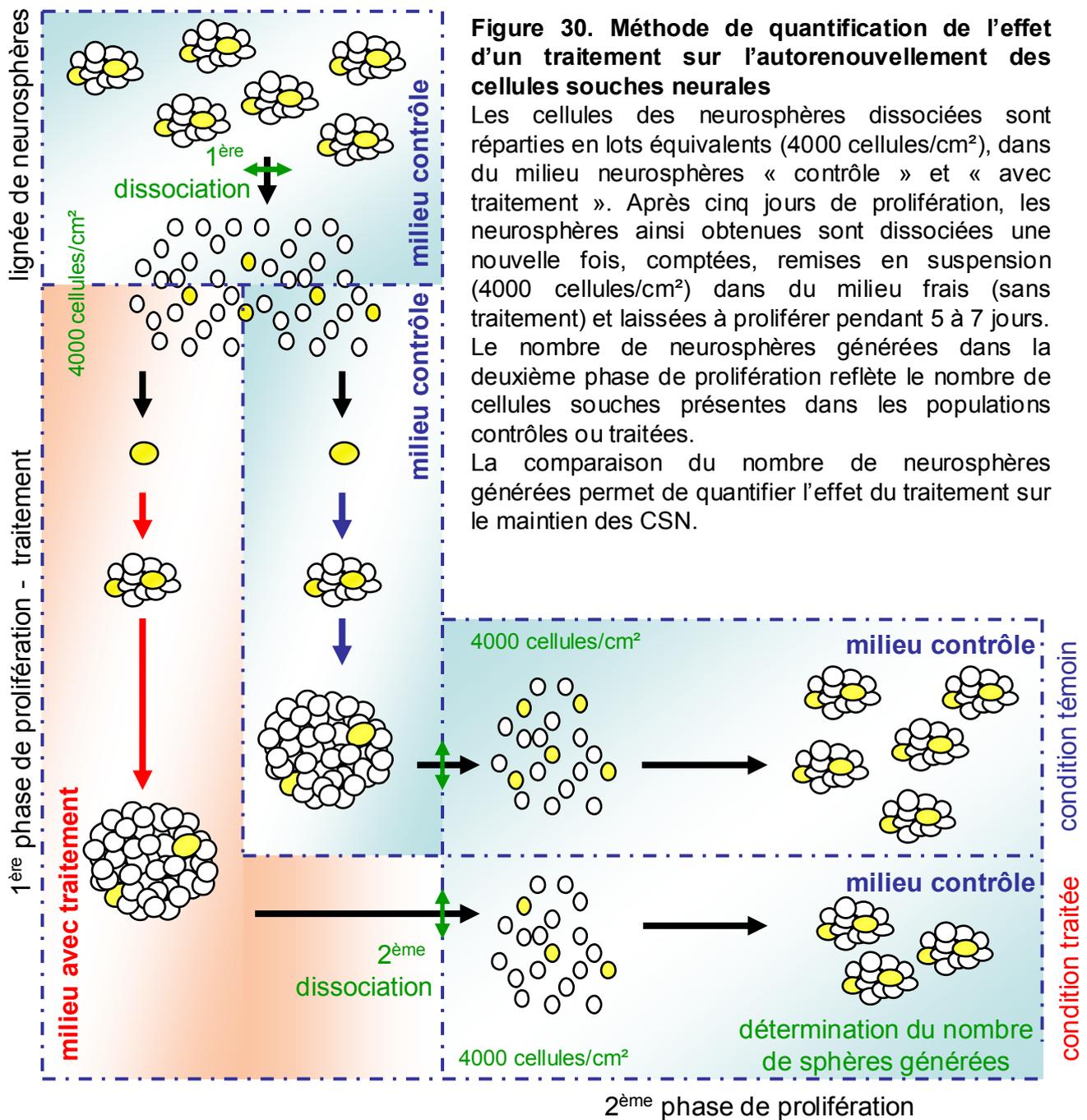
Au temps 0, les neurosphères sont collectées par centrifugation (500 tours/mn, 5 mn), déposées dans des boîtes 24 puits (Nunc), sur des lamelles en verre recouvertes de poly-L-ornithine dans du milieu de culture de neurosphères, en présence d'EGF à 2 ng/ml. Dans ces conditions, les sphères adhèrent au support et se différencient.

Après différents temps sur poly-L-ornithine, en fonction des besoins expérimentaux, les neurosphères sont fixées au paraformaldéhyde (PFA 4% dans du PBS, 20 mn), puis les lamelles sont lavées deux fois 5 mn dans du PBS. Elles sont alors prêtes pour l'immunocytochimie. Si l'immunocytochimie n'est pas effectuée immédiatement, les cellules fixées peuvent être conservées dans du PBS additionné d'azide de sodium (0,05%) à + 4°C, pendant plusieurs jours. Après immunocytochimie (cf. chapitre II.2), les préparations sont observées en microscopie confocale et les cellules positives aux différents marqueurs de différenciation sont comptées manuellement.

Une autre technique, le tri des cellules par FACS, permet d'estimer les proportions de cellules présentes dans les neurosphères différenciées (Sergent-Tanguy et al., 2003). Cependant, elle ne permet pas de visualiser la morphologie et le degré de différenciation des cellules. C'est pour cette raison qu'elle n'a pas été utilisée dans notre étude.

1.3.4. Culture de neurosphères en conditions clonales

Les neurosphères sont dissociées dans les mêmes conditions que ci-dessus. Les cellules complètement dissociées sont centrifugées (800rpm, 5mn) et le culot est remis en suspension dans du milieu neurosphères en présence d'EGF (20 ng/ml).



La suspension cellulaire est distribuée dans des puits (plaque 96 puits, 50µl/puits) par dilutions successives afin de n'avoir une cellule par puits. Une vérification minutieuse du contenu des puits permettra de ne considérer pour la suite de l'étude que les puits ne contenant qu'une seule cellule réfringente. On peut alors parler de culture en conditions clonales.

Les cellules sont ensuite incubées (37°C, 98% H₂O, 5% CO₂) pendant deux semaines et les puits précédemment repérés sont observés en microscopie optique. Le nombre de puits contenant des neurosphères est compté et rapporté au nombre de puitsensemencés par une seule cellule. Dans ces conditions, seules les CSN peuvent générer des neurosphères, ainsi, ce rapport permet de calculer la proportion de CSN présentes dans la population d'origine.

Ce type d'expérience est au niveau pratique assez fastidieux et « traumatisant » pour les cellules qui sont soumises à de nombreux chocs : choc de la dissociation chimique, choc thermique et forte variation de pH lors de la vérification des puits. Nous avons donc rapidement opté pour une autre méthodologie plus souple et donnant des résultats similaires décrite dans le § suivant.

1.3.5. Estimation de la proportion de CSN présentes dans les neurosphères en conditions semi-clonales

Les neurosphères, maintenues dans des flacons, sont récoltées par centrifugation, puis complètement dissociées de la même façon que pour leur maintien. Le nombre de cellules vivantes est compté dans une cellule de comptage de type Bürker (avec du bleu de Trypan à 0,25%). Les cellules sont alors diluées dans du milieu pour obtenir une concentration de 15.000 cellules/ml. La suspension cellulaire est répartie dans des flacons de 75 cm² (20 ml/flacon, 4000 cellules/cm²) et maintenues dans du milieu neurosphères avec EGF.

Dans ces conditions semi-clonales, la sélection des CSN est optimale. En effet, si les cellules résultant de la dissociation des neurosphères sont cultivées à trop haute concentration (>30000 cellules/ml), on peut observer une agrégation des cellules lors des premières heures de culture, conduisant à la formation de « fausses » sphères, ne résultant pas de la prolifération clonale d'une CSN.

Après 5 à 7 jours de culture, les neurosphères sont déposées dans des boîtes de Petri couvertes de poly-L-ornithine. Après un délai de deux heures, qui permet aux neurosphères d'adhérer au support, on compte le nombre de neurosphères générées, qui reflète le nombre de CSN présentes dans la population de cellules mises en culture (figure 30).

Il est également possible d'évaluer l'influence d'un traitement sur le maintien des CSN (figure 30). Les cellules dissociées sont réparties en lots équivalents (4000 cellules/cm²), contrôle et traités. Après cinq jours de prolifération, les neurosphères ainsi obtenues sont dissociées une nouvelle fois, comptées, remises en suspension (4000 cellules/cm²) dans du milieu frais (cette fois sans traitement) et laissées à proliférer pendant 5 à 7 jours. Le nombre de neurosphères générées dans la deuxième phase de prolifération reflète le nombre de cellules souches présentes dans les populations contrôle ou traitées. La comparaison de ces nombres permet de quantifier l'effet du traitement sur le maintien des CSN.

Il est à noter que cette méthode repose sur la sélection des CSN par le milieu défini de manière empirique par Reynolds et Weiss (1992). Elle est fréquemment utilisée et permet également d'étudier l'influence de différents traitements sur la prolifération des neurosphères, en comparant la taille des neurosphères générées.

Il est également possible d'estimer le nombre de cellules souches présentes par tri cellulaire (FACS), notamment par l'utilisation combinée de différents marqueurs de surfaces des CSN : syndecan-1, Notch-1, et integrine-beta1 (Nagato et al., 2005) mais nous n'avons pas utilisé ce type de technique au laboratoire. L'utilisation combinée de cet ensemble de marqueurs, bien que non individuellement spécifiques des CSN, permet d'obtenir une population hautement enrichie en CSN.

1.4. Cultures primaires de neurones, astrocytes et oligodendrocytes

1.4.1. Culture primaire de neurones corticaux

Des embryons de souris (E14, 14^e jour de gestation) sont disséqués dans une boîte de Pétri contenant du PBS stérile complété avec un mélange de pénicilline (60 µg/ml) et de streptomycine (50 µg/ml). Les hémisphères des embryons sont détachés, les méninges retirées. Les hémisphères sont ensuite dissociés par passage au travers d'un tamis (taille des mailles 48 µm), dans du milieu de culture de neurosphères sans EGF. Les cultures sontensemencées sur des boîtes de Pétri en plastique ou sur des lamelles de verre, les deux types de support étant prétraités à la poly-L-ornithine (30 µg/ml, dans H₂O) pendant 1 heure à 37°C et rincé deux fois à l'eau. Les cellules sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C et à 95% d'humidité, contenant un mélange d'air et de 5% de CO₂.

1.4.2. Cultures primaires d'astrocytes

Dans cette étude nous avons utilisé uniquement des cultures primaires d'astrocytes de type 1. Les cultures sont préparées à partir d'hémisphères cérébraux de souris nouveau-nées. Les cerveaux sont prélevés après ouverture de la boîte crânienne et placés dans une boîte de Pétri contenant du PBS. Les hémisphères sont séparés et les méninges détachées à l'aide de pinces. Les hémisphères ainsi isolés sont ensuite dissociés par passage à travers un tamis (taille des mailles 48 μm), dans du milieu de culture composé de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de fœtus bovin inactivé par la chaleur (56°C, 30 mn) et d'antibiotiques. Le volume de la suspension cellulaire est complété avec du milieu de culture pour atteindre un volume de 30 ml par hémisphère. Cette suspension est répartie, à raison de 10 ml par boîte, dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre. Les cellules, très dispersées au départ, sont confluentes après 8 à 10 jours de culture in-vitro. Cette méthode, initialement mise au point en 1972 (Booher et Sensenbrenner, 1972), a été améliorée par la suite dans le laboratoire (Pettmann et al., 1981). Elle permet d'obtenir des cultures composées d'au moins 95% d'astrocytes, les cellules contaminantes étant en général de la microglie et des fibroblastes.

1.4.3. Cultures de précurseurs d'oligodendrocytes

Ces cellules peuvent être obtenues en cultures secondaires à partir de cultures primaires mixtes des cellules gliales, qui contiennent des astrocytes protoplasmiques (ou astrocytes de type 1) et des cellules précurseurs d'oligodendrocytes encore appelées OPC.

1.4.3.1. Cultures primaires mixtes enrichies en cellules oligodendrogiales

La méthode utilisée est adaptée de méthodes publiées (Labourdette et al., 1979; Labourdette et al., 1980). La culture primaire est préparée comme celle d'astrocytes mais avec les changements suivants :

- 1) les boîtes de Pétri sont préalablement traitées au moins deux heures à 37°C avec 5 ml d'une solution de poly-L-lysine. Cette solution contient 20 μg de poly-L-lysine par ml d'eau.
- 2) 10% de sérum de veau sont utilisés à la place du FBS.
- 3) Les cellules sont suspendues dans un volume 2 fois moins important (15 ml par hémisphère) avant l'ensemencement des boîtes. Dans ces conditions, les cellules forment un tapis continu après environ dix jours de culture. Ce tapis est composé de deux couches distinctes de cellules : une couche inférieure d'astrocytes, sur laquelle se développent une couche de précurseurs d'oligodendrocytes. Ces derniers se présentent comme des cellules de petite taille avec peu de prolongements, paraissant sombres en contraste de phase.

1.4.3.2. Cultures secondaires de précurseurs d'oligodendrocytes

Nous avons préparé des cultures secondaires de précurseurs d'oligodendrocytes à partir des cultures primaires mixtes âgées de 10 à 12 jours. Ces précurseurs sont détachés de leur support astrocytaire par aspersion de milieu à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille. La suspension cellulaire obtenue est préincubée 4 à 12 heures à 37°C dans des boîtes de Pétri non traitées à la poly-L-lysine. Cette étape, réalisée avant la mise en culture secondaire, permet d'éliminer les cellules contaminantes, comme les macrophages et les astrocytes qui adhèrent plus rapidement et plus fortement au plastique que les OPC. Les précurseurs sont ensuite détachés en tapotant légèrement sur les côtés de la boîte. Ils sont ensuite sédimentés par centrifugation à 100 g pendant 10 mn. A l'aide d'une seringue, les culots cellulaires sont redissociés dans 10 ml de milieu, par passages répétés à travers une aiguille de 2 mm de diamètre. Les cellules sont comptées dans un hématimètre (cellule de Bürker) et le volume total est ajusté afin de les ensemercer à raison de 500 000 cellules par ml dans des boîtes de Pétri de 100 mm de diamètre préalablement traitées à la poly-L-lysine puis rincées. Après une à deux heures d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du milieu de neurosphères sans EGF.

1.5. Culture de lignées tumorales et transformées

1.5.1. Culture des lignées cellulaires

Toutes les lignées de rat (cellules C6 et cellules B104) ainsi que les lignées humaines utilisées (cellules SH-SY5Y, cellules U373 et cellules TC620) ont été cultivées dans les mêmes conditions, dans des boîtes de polystyrène (Falcon) de 10 cm et dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum de fœtus bovin (DF10). Lorsque les cellules arrivent à confluence, les cellules sont dissociées à la trypsine et remises en culture après les avoir diluées 10 à 50 fois. Pour les traitements, les cellules ont été cultivées dans du milieu DF5 (DMEM + 5% FBS).

1.5.2. Test de prolifération clonale en milieu semi-solide (agarose mou)

Les lignées cellulaires tumorales et les lignées normales transformées ont la capacité de former des colonies lorsqu'elles sont cultivées dans du milieu semi-solide à base d'agarose mou. Par contre, la grande majorité des cellules normales ne peut pas proliférer dans ces conditions (à l'exception par exemple des cellules cartilagineuses). Cette technique permet donc de mesurer la tumorigénicité de cellules cancéreuses ou transformées et permet

également de mesurer l'effet d'un traitement sur la tumorigénicité de ces lignées. Les tests sont effectués dans des boîtes de Pétri de 35 mm (Nunc) ou dans des boîtes 6 puits (Nunc) en utilisant du milieu DMEM complémenté avec 5% de FBS. Les boîtes contiennent deux couches de milieu semi-solide. La couche inférieure est composée d'agarose à 1,25% et la couche supérieure d'agarose à 0,635%. Les cellules sont mises en suspension dans la solution chaude qui formera la couche supérieure en refroidissant.

Expérimentalement, du Bacto-Agar (Difco), un agarose purifié ne contenant pas de polysaccharides sulfatés, a été utilisé lors de cette étude. Une solution à 2,5% d'agarose est préparée dans de l'eau stérile. Cette solution autoclavée peut-être conservée à + 4°C pendant plusieurs mois. Il faut faire fondre la solution d'agarose (au bain marie à 100°C ou au four à micro-ondes) et la conserver au bain marie à 45°C avant utilisation. La couche inférieure (2 ml/boîte) est obtenue en mélangeant 50% de solution d'agarose à 2,5% (45°C) avec 50% de milieu DMEM concentré deux fois, complémenté avec 10% de FBS (45°C). La couche inférieure contient donc 1,25% d'agarose, du milieu DMEM (1x) et 5% de FBS. Une fois la couche inférieure coulée, elle est laissée pendant 30 mn à température ambiante. La couche supérieure est obtenue en mélangeant 50% du milieu utilisé pour obtenir la couche inférieure avec 50% du milieu DMEM (1x) complémenté avec 5% de sérum. Le milieu utilisé pour la couche supérieure contient donc 0,635% d'agarose, du DMEM (1x) et 5% de sérum. Les cellules (prétraitées ou non pendant 3 jours dans du milieu DMEM contenant 5% de FBS) sont dissociées à la trypsine, comptées etensemencées dans le milieu de la phase supérieure (à une concentration de 10 000 cellules/ml) avant que ce milieu ne soit déposé doucement dans boîtes contenant la phase inférieure (2 ml/boîtes). Le point le plus important de cette méthode est de garder le milieu avec agarose à 45°C avant que les cellules n'y soient ajoutées. Il faut ensuite immédiatement les déposer dans les boîtes de Pétri, afin d'éviter que le milieu ne se solidifie ou que les cellules ne soient endommagées par la chaleur. Les boîtes sont ensuite laissées 30 mn à température ambiante (les cellules ont ainsi le temps de sédimenter entre les deux couches et pour laisser le milieu se solidifier en refroidissant) et 2 ml de milieu DMEM complémenté avec 5% de FBS sont ajoutés doucement au dessus des deux phases solidifiées, afin d'éviter le dessèchement du milieu semi-solide, ainsi que pour pouvoir renouveler le traitement des cellules en changement ce milieu.

Les couches supérieures et inférieures de milieu semi-solide peuvent être traitées à l'aide du produit testé. Le milieu liquide (3^e couche) est changé délicatement deux fois par semaine par du milieu frais (DMEM complémenté avec 5% de FBS dans lequel le produit à tester est ajouté).

Les boîtes sont ensuite conservées dans l'incubateur (5% CO₂, 95% H₂O) pendant 3 à 6 semaines, jusqu'à ce que les colonies soient visibles à l'œil nu. Les boîtes sont ensuite photographiées et le nombre de colonies visibles est compté. Le nombre de colonies obtenues dans la condition traitée est alors rapporté au nombre de colonies obtenues dans la condition témoin.

1.5.3. Souris athymiques et modèles de tumeurs

Toutes les études effectuées ont été faites en suivant les règles éthiques et lois françaises. Les souris suisses athymiques « nude » (homozygotes nu/nu, provenance Charles River), ont été maintenues dans des conditions aseptisées. La nourriture et la litière étaient autoclavées et les manipulations étaient effectuées sous flux laminaire. Les souris utilisées sont des mâles âgés de 6 semaines ou plus.

L'implantation des lignées tumorales dans les souris anesthésiées à l'isoflurane est réalisée à partir de cellules en phase exponentielle de croissance récoltées par trypsinisation et resuspendues dans du milieu DMEM contenant 5% FBS. Une suspension de 5×10^6 cellules est inoculée par injection sous-cutanée dans les flancs droit et gauche de souris âgées de 7 à 9 semaines. Les souris sont ensuite traitées par voie intra-péritonéale et locale. Les souris témoins ont été traitées dans des conditions similaires mais avec une solution qui ne contenait pas la molécule active.

Pour ces expériences, le tCFA15 a été solubilisé de la manière suivante : 20 mg de tCFA15 sont dissous dans 0,4 ml d'éthanol. 9,6 ml d'une solution de Tween80 (3%) et d'eau physiologique (97%) sont ajoutés. La solution est ensuite chauffée au bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution totale du tCFA15. La solution de Tween 80/eau physiologique est préparée en dissolvant 1,6 g (soit 1,5 ml) de Tween 80 dans 48,5 ml d'eau physiologique (H₂O + 0.9% NaCl₂). La solution obtenue a une concentration de 2 mg/ml de tCFA15. La solution témoin a été préparée dans les mêmes conditions sans ajouter de tCFA15. Le tCFA15 est injecté par voie intrapéritonéale ou localement dans la tumeur à la concentration finale de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Après 2 à 5 semaines de traitement, les souris sont anesthésiées et euthanasiées par dislocation cervicale et les tumeurs sont disséquées, mesurées et pesées.

1.6. Test de prolifération et de mortalité cellulaire

1.6.1. Essais Colorimétriques MTT

Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la capacité des cellules à réduire un composé tétrazolium, le bromure de 3-(4-5 diméthylthiazol-2-yl)-diphényl tétrazolium (MTT), en formazan bleu par les déshydrogénases mitochondriales présentes uniquement dans les cellules vivantes métaboliquement actives. Le produit absorbe fortement vers 570 nm. Il est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques. L'intensité de la coloration est considérée comme proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Les cellules sontensemencées à la concentration de 10 000 cellules/ml dans des plaques de 96 puits (Nunc) contenant 200 µl de milieu. Le test de toxicité n'est effectué que lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance (généralement après un jour de prolifération dans les conditions optimales de milieu). Après trois jours de traitement, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans sérum ni indicateur de pH, contenant 50 µg/ml de MTT (Sigma). Les plaques sont ensuite incubées pendant 1 heures à 37°C. En fin d'incubation, le milieu contenant le MTT est aspiré avec précaution au moyen d'une aiguille, pour ne pas perturber les cristaux formés. Les puits sont ensuite à nouveau remplis avec 150 µl de DMSO (Merck) et incubés pendant 30 mn à 37°C sous agitation. Après agitation vigoureuse, la lecture des plaques se fait à une longueur d'onde de 570 nm avec un lecteur de plaques ELISA.

1.6.2. Essais permettant de détecter les cellules vivantes et les cellules mortes

Ce test a été effectué à l'aide du « Live/Dead viability/Cytotoxicity Kit », commercialisé par Molecular Probes. Il s'agit d'un test fluorométrique permettant de déterminer la proportion de cellules vivantes et mortes en utilisant deux marqueurs spécifiques de la viabilité cellulaire : la Calcéine AM marque les cellules ayant une activité estérase intracellulaire et l'éthidium homodimère (EthD-1) s'intègre aux cellules dont la membrane plasmique est endommagée. Les cellules vivantes sont caractérisées par une activité estérase ubiquitaire permettant de convertir la Calcéine AM (possédant une bonne perméabilité membranaire) en une Calcéine, émettant une fluorescence dans le vert (excitation/émission : 495/515 nm). L'EthD-1 peut entrer dans les cellules endommagées. Il peut ensuite se lier aux acides nucléiques, ce qui augmente sa fluorescence de 40 x dans le rouge (excitation/émission : 495/635 nm). L'EthD-1 est par contre exclu par la membrane plasmique des cellules vivantes. La détermination de la

survie cellulaire à un traitement cytotoxique est donc dépendante de ces paramètres biochimiques et les traitements affectant ces paramètres cellulaires peuvent ne pas être adaptés à l'utilisation de cette méthode.

Les cellules sont ensemencées à la concentration de 10 000 cellules/puits dans des plaques de 24 puits (Nunc) sur des lamelles traitées à la poly-L-lysine contenant 1 ml de milieu. Le test de toxicité n'est à nouveau effectué que lorsque les cellules sont en phase exponentielle. Les cellules sont ensuite traitées pendant 24 h avant d'être lavées deux fois au D-PBS (Dulbecco PBS) afin d'éliminer le sérum présent dans le milieu de culture (les estérases présentes dans le sérum peuvent augmenter la fluorescence extracellulaire en hydrolysant la Calcéine-AM). Un des puits sert de témoin pour l'activité EthD-1/Calcéine-AM en tuant les cellules par incubation 5 mn dans une solution de D-PBS contenant 0,1% de saponine. La solution est préparée en ajoutant à 10 ml de D-PBS 20 µl d'EthD-1 (stock à 2 mM, concentration finale : 4 µM) et 5 µl de Calcéine-AM (stock à 4 mM, concentration finale à 2 µM). Après agitation, cette solution est déposée directement à la surface des cellules non fixées et les cellules sont incubées 30 mn à température ambiante. Les lamelles sont ensuite fixées 5 mn au PFA 4% et montées sur des lames à l'aide d'une solution de montage aqueuse (Aqua-polymont, Polysciences). Les lamelles peuvent ensuite être observées en microscopie à fluorescence ou confocale et les cellules marquées à la Calcéine AM hydrolysée (vertes, vivantes) et à l'EthD-1 (rouges, mortes) sont comptabilisées.

1.6.3. Détection des cellules en mitose par incorporation de la bromodésoxyuridine (BrdU)

Pour estimer le pourcentage des cellules en mitose, nous avons utilisé un protocole permettant de marquer les cellules en phase S de la mitose, au cours de laquelle les cellules incorporent de la bromodésoxyuridine (BrdU) dans leur ADN. L'uridine est normalement un composant de l'ARNm, mais la forme désoxyuridine (et bromodésoxyuridine) constitue un analogue de la thymidine et sera incorporée à sa place dans l'ADN. Par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre la bromodésoxyuridine il est possible de détecter spécifiquement les cellules ayant traversé une phase S de mitose pendant la durée d'incorporation de la BrdU. Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 24 puits contenant 1 ml de milieu à la concentration de 10 000 cellules/ml. Le traitement est effectué lorsque les cellules sont en phase exponentielle. Après 24 heures de traitement, les cellules sont traitées 6 h à 12 h à la BrdU (50 µM, Sigma). La durée d'incorporation de la BrdU peut être modifiée en fonction de la vitesse de prolifération de la lignée de cellules utilisée. Les cellules sont ensuite fixées au

PFA (4% dans du PBS) et soumises à une perméabilisation acide afin de dénaturer l'ADN et permettre ainsi une reconnaissance plus facile des épitopes intranucléaires par l'anticorps. Une perméabilisation classique est d'abord effectuée au TritonX100 (0,5% dans du PBS, 5 mn) puis une perméabilisation acide est effectuée à l'HCl 2 N (30 mn). L'acidité est ensuite neutralisée avec du NaOH 0,02 N (10 secondes) et le pH des préparations est tamponné par l'utilisation de borate de sodium 0,1 M (2 mn). Une immunocytochimie classique est ensuite réalisée (cf. chapitre suivant des méthodes expérimentales) à l'aide d'anticorps monoclonal de souris (Becton Dickinson, 1/150, 12 h à 4°C), révélé à l'aide d'un anticorps secondaire Alexa 555 (Molecular Probes, 1/500, 1 h à température ambiante). Les noyaux sont ensuite marqués au TOPRO-3 (Molecular Probes, 1/5000) et les lamelles sont montées sur des lames avant d'être observées en microscopie confocale.

1.6.4. Détection des cellules en apoptose par la méthode TUNEL

Le marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL ("Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling") est réalisée à l'aide d'un kit ("DeadEndTM fluorometric TUNEL system", Promega). Ce marquage permet de mettre en évidence in situ la fragmentation de l'ADN nucléaire résultant de l'activation des endonucléases au cours de l'apoptose. Cette méthode est basée sur le marquage des extrémités 3'-OH libres de l'ADN par la terminal transférase (TdT) : cette enzyme catalyse l'accrochage de nucléotides marqués à la fluorescéine aux extrémités 3'-OH libres.

Les cellules sont fixées au PFA (4% dans du PBS). Après perméabilisation (TritonX100 0,5%, 5 mn) et pré-équilibre des cellules à l'aide d'un tampon, la réaction enzymatique est effectuée une heure à 37°C en mettant les cellules en présence d'une solution contenant le tampon d'équilibre, l'enzyme TdT et les nucléotides marqués. La réaction est arrêtée en rinçant les lamelles avec une solution fournie avec le kit. Après coloration des noyaux au TOPRO-3 et montage des lamelles, les cultures sont examinées au microscope confocal.

Les cellules apoptotiques sont caractérisées par un marquage nucléaire vert et les cellules non apoptotiques par l'absence de marquage. Le comptage de ces 2 catégories de cellules permet d'établir le pourcentage de mort cellulaire apoptotique dans les différentes conditions expérimentales étudiées. Un témoin négatif est réalisé au cours de chaque expérimentation : sur une lamelle, la réaction est effectuée en remplaçant l'enzyme TdT par de l'eau distillée. Aucun marquage ne doit être détecté. Un témoin positif peut-être inclus en traitant les cellules déjà fixées à la DNase I (10 unités/ml, 5 mn à température ambiante).

2. Immunocytochimie

2.1. Principaux anticorps utilisés

Pour les études immunocytochimiques les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre (Marienfeld) préalablement recouvertes de poly-L-lysine (Sigma, 20 µg/ml, dans l'H₂O) pour les cultures primaires et les lignées tumorales ou de poly-L-ornithine (Sigma, 30 µg/ml, dans l'H₂O) pour les neurosphères. Il est possible de révéler deux ou trois antigènes différents sur une même cellule si leurs anticorps spécifiques ont été préparés dans des espèces animales différentes. Chacun des deux types de complexes antigène-anticorps sera reconnu par un second anticorps dirigé spécifiquement contre l'une ou l'autre des deux espèces immunisées. Par immunofluorescence ces deux antigènes pourront être distingués en utilisant les seconds anticorps couplés à deux fluorochromes différents. Toutefois il est possible d'utiliser les deux premiers anticorps fabriqués dans la même espèce animale s'ils sont de type différents (par exemple IgG et IgM) et révélés par les anticorps secondaires reconnaissant uniquement leurs fragments Fab spécifiques.

Les anticorps primaires que nous avons utilisés sont présentés ci-dessous :

Antigène	Anti-corps	Type de cellule marquée	Hôte	Type	Dilutions	Provenance
MAP2(2a+2b)	Anti-MAP2	précurseur de neurone	Souris	M (IgG)	200	Sigma
β3-tubuline	Anti-β3-tubuline	neurone post-mitotique	Lapin	P (IgG)	300	Covance
β3-tubuline	TUJ1	neurone post-mitotique	Souris	M (IgG)	300	Covance
Gangliosides #	A2B5	précuseurs de neurones et d'oligodendrocytes	Souris	M (IgG)	20	Dr. Raff
PDGFR-α #	Anti-PDGFR	précurseur oligodendrocyte	Lapin	P (IgG)	500	Santa Cruz
Sulfatides #	O4	oligodendrocyte immature	Souris	M (IgG)	25	Boehringer
GFAP	Anti-GFAP	astrocytes	Souris	M (IgG)	1000	Sigma
GFAP	Anti-GFAP	astrocytes	Lapin	P (IgG)	1000	Dako
Nestine humaine	Anti-h-nestine	précurseurs nerveux	Lapin	P (IgG)	100	Chemicon
Nestine souris	Anti-m-nestine	précurseurs nerveux	Lapin	P (IgG)	50	Dr. Lendahl
BrdU	Anti-BrdU	/	Souris	M (IgG)	150	Becton Dickinson

épitope de surface, ne nécessite pas de perméabilisation ; M : anticorps monoclonal ; P : anticorps polyclonal

Tableau 7 : Anticorps primaires utilisés

Les anticorps secondaires et tertiaires (commercialisés par Molecular Probes) utilisés sont :

Antigène	Couplé à	Hôte	Dilution	Excitation/Emission (nm)
IgG lapin	Alexa 488	Chèvre	1000	495/519 (vert)
IgG souris	Alexa 555	Chèvre	1000	555/565 (rouge)
IgM souris	Biotine	Chèvre	1000	/
Streptavidine	Alexa 488	/	1000	495/519 (vert)
Streptavidine	Alexa 555	/	1000	555/565 (rouge)
ADN	TOPRO-3	/	5000	642/661 (bleu)

Tableau 8 : Anticorps secondaires utilisés.

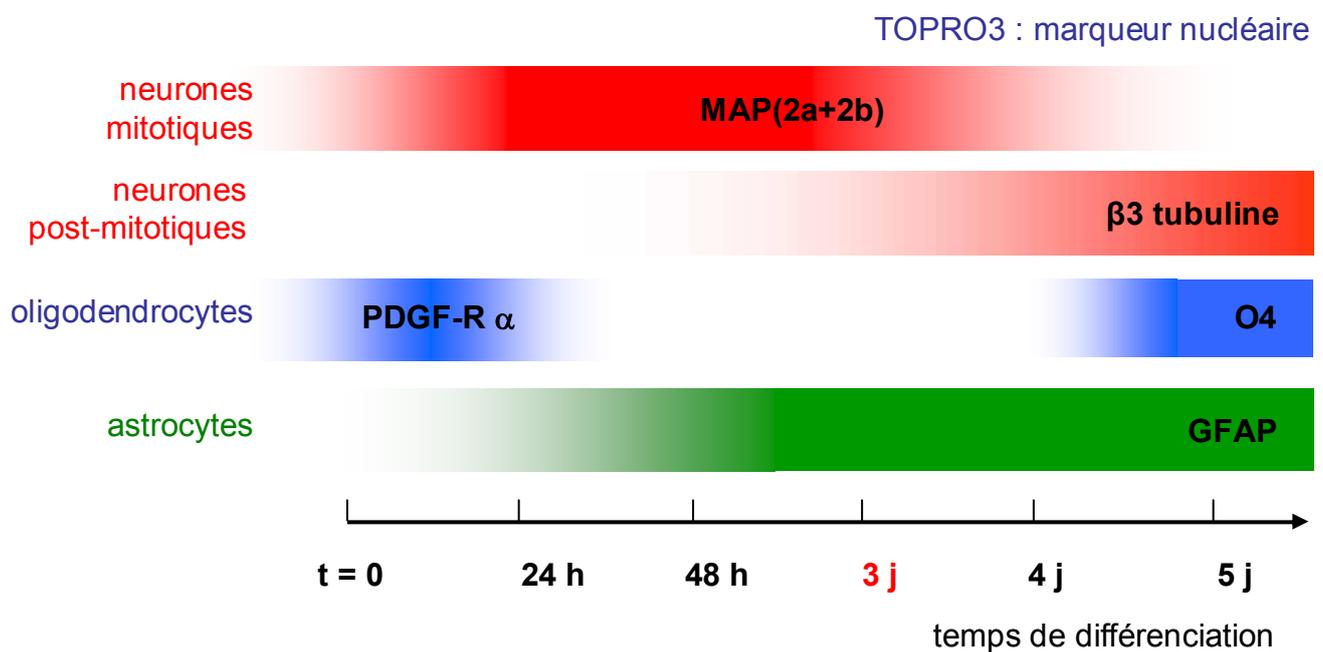


Figure 31. Cinétique d'apparition des principaux anticorps utilisés pour caractériser la différenciation des principaux types cellulaires issus des neurosphères par immunocytochimie

La cinétique d'apparition dans le système des neurosphères des principaux marqueurs utilisés pour caractériser les types cellulaires présents est indiquée dans la figure 31.

2.2. Fixation et perméabilisation des cellules

Les cellules sont rapidement rincées 1 fois avec du milieu de culture puis 1 fois avec du PBS à température ambiante. Les cellules sont ensuite fixées avec une solution de PFA (paraformaldéhyde) dilué à 4% dans du PBS pendant 20 mn à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées au PBS. Il est possible de les conserver quelques jours à + 4°C dans du PBS (avec de l'azide de sodium à 0,05% qui permet d'empêcher une éventuelle prolifération bactérienne) avant de procéder à l'immunocytochimie.

Si l'épitope recherché est intracellulaire, les cellules sont ensuite perméabilisées avec du Triton X-100 (0,5%, 5 mn). Cette perméabilisation rend accessibles les structures internes de la cellule.

Dans le cas des réactions dirigées contre des épitopes intranucléaires difficilement accessibles (ex : immunodétection de la BrdU), il peut être nécessaire de réaliser une perméabilisation acide à l'aide d'HCl 2N (30 mn). L'acidité est ensuite neutralisée avec NaOH 0,02 N (10 secondes) et le pH des préparations est tamponné par l'utilisation de borate de sodium 0,1 M (2 mn).

Si l'épitope recherché est exprimé à la surface de la cellule, le premier anticorps peut être incubé avec les cellules vivantes. Le premier anticorps est alors dilué dans du milieu de culture. Il est laissé au contact des cellules pendant 15 mn à l'incubateur et les cellules sont ensuite rapidement rincées dans du PBS avant d'être fixées dans du PFA à 4% dans du PBS pendant 10 mn à température ambiante. Après 3 rinçages successifs de 5 mn au PBS, les complexes antigène-anticorps sont révélés suivant les méthodes décrites ci-dessous.

2.3. Saturation des sites aspécifiques et incubation avec les anticorps primaires

Les sites aspécifiques sont saturés à l'aide de BSA (3% dans du PBS) afin de réduire au maximum la création de liaisons aspécifiques entre l'anticorps primaire et l'épitope d'intérêt. Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS contenant 1,5% de BSA. Les dilutions des divers anticorps polyclonaux et monoclonaux utilisés sont indiquées dans le Tableau 7. Les cellules fixées, perméabilisées puis saturées sont incubées avec les premiers anticorps, soit 2 heures à température ambiante, soit une nuit à 4°C. Cette incubation est suivie de 3 rinçages d'au moins 5 mn dans du PBS.

2.4. Incubation avec les anticorps secondaires/tertiaires

Les complexes antigènes-anticorps sont révélés en incubant pendant 1 heure à température ambiante avec un second anticorps dirigé contre les immunoglobulines (Ig) du premier (tableau 8). Ce deuxième anticorps est couplé soit à un fluorochrome de type fluorescéine (Alexa 488 ; Molecular Probes) ou de type rhodamine (Alexa 555 ; Molecular Probes), soit à un anticorps secondaire biotinylé. Ces anticorps secondaires sont dilués dans du PBS contenant 3% de BSA pour éviter les liaisons aspécifiques. Après incubation les cellules sont rincées (3x 5 mn) dans du PBS. Si l'épitope est peu exprimé dans la cellule, le signal peut être amplifié par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à la biotine qui sera révélé par l'utilisation d'un anticorps tertiaire couplé à la streptavidine et à un fluorochrome (Alexa 488 ou Alexa 555, Molecular Probes).

2.5. Marquage des noyaux

Afin de marquer les noyaux, nous utilisons du « TOPRO-3 » (Molecular Probes), dilué dans du PBS au 1/5000. L'incubation se fait à température ambiante durant 20 mn et les cellules marquées sont soumises à au moins deux rinçages de 5mn au PBS. Cet agent s'intercalant dans l'ADN est couplé à un fluorochrome pouvant être détecté en microscopie confocale et permet de marquer les noyaux afin d'estimer le nombre de cellules présentes. Ce marqueur peut être utilisé sur des cellules perméabilisées ou non.

2.6. Observation du marquage immunocytochimique

Pour les observations en fluorescence, il n'y a pas de révélation particulière car c'est la molécule de fluorochrome couplée à l'anticorps secondaire qui est détectable. Les lamelles sont rincées à l'eau puis montées sur lame avec un milieu de montage aqueux (Aqua-polymount, Polyscience) et observées avec un microscope confocal Zeiss LSM 510. Un contrôle négatif est préparé (immunocytochimie réalisée sans anticorps primaires) pour faciliter les réglages du microscope confocal et estimer le bruit de fond dû à l'anticorps secondaire. Un contrôle positif a été préparé lorsque nous disposions du matériel biologique nécessaire (ex : lignées U373 pour détecter la nestine humaine).

2.7. Quantification des résultats et analyse statistique

Après avoir contrasté les images à 180% pour réaliser un comptage plus objectif, la proportion de cellules exprimant un marqueur donné est estimée en faisant le rapport entre le nombre de cellules marquées et le nombre de noyaux marqués au TOPRO-3. Environ 15

champs sont analysés pour chaque condition et les données statistiques (moyenne +/- S.E.M) sont représentées sous forme d'histogrammes. Les données statistiques sont soumises à une analyse ANOVA. Lorsque des différences statistiques sont mises en évidence entre les groupes ($P \leq 0.05$), les données sont soumises à un test de comparaison multiple utilisant la méthode de Turkey-Kramer. Dans les figures, N.S. signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre la condition témoin et la condition testée, * signifie que $P \leq 0.05$, ** que $P \leq 0.01$ et *** que $P \leq 0.001$. Tous les tests statistiques ont été effectués suivant cette méthode.

3. Techniques de biologie moléculaire

3.1. Techniques relatives aux ADN (génotypage des animaux)

Bien que les embryons homozygotes soient identifiables par leur phénotype (cf. § 1.1.1.3), nous avons choisi la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) pour distinguer les embryons homozygotes mutants, hétérozygotes et sauvages. Plus rapide et plus pratique que le Southern Blot, cette technique est également utilisée pour définir le génotype des souris adultes ou pour vérifier celui des cultures.

3.1.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait selon la méthode classique d'extraction au phénol/chloroforme. Du tissu (fragment de queue d'adulte, membres embryonnaires) ou le culot de centrifugation d'une culture de neurosphères, sont incubés en présence de Protéinase K (0,2mg/ml, Sigma), dans un tampon d'extraction (Tris-Cl 200mM, pH 7,5 ; EDTA 25mM ; NaCl 300mM) en présence de SDS 1% pendant une nuit à 55°C.

Les protéines dénaturées par la Protéinase K sont extraites dans un volume équivalent de phénol saturé d'eau (pH 7,2). Après agitation et centrifugation (5000tr/mn, 10mn), la phase aqueuse, contenant l'ADN est prélevée. L'opération est répétée sur la phase aqueuse une deuxième et une troisième fois en présence d'un volume équivalent de phénol/chloroforme (1:1) puis chloroforme seul. L'ADN purifié, contenu dans la phase aqueuse, est précipité en présence de sels (NaOAc 0,2M ; pH5,5) dans deux volumes d'éthanol absolu à -20°C.

Le culot de centrifugation (10000tr/mn, 10mn) est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 70µl de tampon TE (Tris-Cl 10mM, pH7,8 ; EDTA 1mM).

La pureté de l'ADN peut-être contrôlée par spectrophotométrie (le rapport DO 260nm pour l'ADN / DO 280nm pour les protéines doit être proche de 2) et la concentration d'ADN peut-être ajustée entre les tubes.

3.1.2. Technique PCR

3.1.2.1. Principe de la technique d'amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR)

L'ADN est dénaturé (par chauffage à 95°C), puis apparié à un excès de deux oligonucléotides (environ 20 nucléotides chacun) complémentaires aux brins opposés de l'ADN, de part et d'autre de la séquence à amplifier (séquence cible). Chaque oligonucléotide sert d'amorce

(primer) à une DNA polymérase (Taq polymérase, résistante à des températures de 100°C) pour la copie de chacun des brins d'ADN. Ce cycle peut être répété, de manière automatisée, par dénaturation - renaturation successives : 20 cycles permettent ainsi une amplification théorique de $2^{20} = 10^6$ fois de la séquence cible initiale.

3.1.2.2. Amorces oligonucléotidiques utilisées (primers)

Pour le mutant Dll1, nous utilisons les amorces décrites par (Hrabe de Angelis et al., 1997):

- *sens* 5'-ATCCCTGGGTCTTTGAAGAAG-3', - *anti-sens* 5'-ATACGCGAAAGAAGGTCCTG-3'
amplifiant un fragment de 482pb de l'allèle sauvage ;

- *sens* 5'-ATCCCTGGGTCTTTGAAGAAG-3', - *anti-sens* 5'-ATCCTCTGCATGGTCAGGTC-3'
amplifiant un fragment de 578db de l'allèle muté.

Pour le mutant HES1, nous utilisons les amorces décrits par (Ishibashi et al., 1995):

- *sens* 5'-CCCCTTTGCAGTCATCAAAG-3', - *anti-sens* 5'-GCATTGCTCACTTACATCTTTC-3'
amplifiant un fragment de 122pb de l'allèle sauvage ;

- *sens* 5'-ATGGATTGCACGCAGGTTCTC-3', - *anti-sens* 5'-CTGATGCTCTTCGTCCAGATC-3'
amplifiant un fragment de 476pb de l'allèle muté.

3.1.2.3. Protocole expérimental

Nous avons utilisé un protocole PCR standard. Par microtube, nous avons ajouté à 1µl d'ADN extrait (100 à 200ng) : 3µl mix PCR 10x (Appligene), 1,8µl MgCl₂ 25mM (concentration finale 1,5mM), 0,6 µl dNTP 10mM (mélange des 4 dNTP, à une concentration finale de 10mM chacun), 0,6µl de primer1 (12,5pmol/µl), 0,6 µl de primer2 (12,5pmol/µl), 0,2µl de Taq polymérase (Appligene) et 22,2 µl H₂O (qsp 30µl).

Le programme PCR utilisé est le suivant : 6 mn à 94°C ; 30 s à 94°C (dénaturation), 30 s à 55°C (hybridation des amorces), 30 s à 72°C (polymérisation du fragment à amplifier) (30 cycles) ; 5 mn à 72°C ; 4°C (stockage) (appareil PCR Perkin-Elmer)

Les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% dans du TBE 0,5x (pH 8,0 ; Tris 5,4g, acide borique 2.75g et EDTA 1,85g, H₂O qsp 1l) contenant du Bromure d'Ethidium (0,5µg/ml), qui est un composé fluorescent s'intercalant entre les bases d'ADN pour permettre sa visualisation sous UV. 12µl du produit d'amplification, ajouté à 2µl de tampon de charge (xylène cyanol, bleu de bromophenol, glycerol 20%) sont déposés sur le gel en même temps qu'un marqueur de poids moléculaire. La migration se fait dans un tampon TBE 0,5x, sous une tension de 100V, pendant 1h environ. La visualisation des bandes d'ADN se fait sous UV au « Baby Imager » (Fisher Bioblock).

3.2. Techniques de biologie moléculaire relatives aux ARN

3.2.1. Extraction des ARN totaux

La technique utilisée est celle décrite par Chojnacki (Chojnacki et al., 2003).

Brièvement, les cellules en culture sont lysées par addition d'une solution dénaturante (guanidinium thiocyanate 4 M, N-lauroylsarcosine 0,5%, citrate de sodium 25 mM, DTT 20 mM, pH 7). Ces extraits peuvent être conservés congelés.

Pour l'extraction des ARN, il faut d'abord ajouter 1/9 du volume d'acétate de sodium (2M, pH 4), 1,1 volume de phénol saturé d'eau et 0,55 volume de chloroforme/isoamylalcool (49:1) et agiter les tubes. Après centrifugation, les ARN de la phase aqueuse sont précipités à -20°C par addition d'1 volume d'isopropanol.

Après sédimentation par centrifugation (13000 g, 20 mn, 4°C), les ARN sont redissous dans la solution dénaturante de départ et reprécipités à -20°C au minimum 1 h avec 1 volume d'isopropanol. Les culots d'ARN obtenus suite à une seconde centrifugation sont ensuite lavés dans de l'éthanol à 75% puis séchés. Ils sont finalement repris dans de l'eau traitée au DMPC (diméthyl pyrocarbonate, Sigma).

Les concentrations des échantillons d'ARN sont estimées par la mesure de la DO à 260 nm. L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% contenant du formaldéhyde à 6% dans un tampon MOPS x1 (cf. §3.2.4.2).

3.2.2. Reverse transcription

La réaction de transcription inverse est réalisée à partir d'1 µg d'ARN dans un milieu de réaction contenant 40 U de reverse transcriptase MMLV-RT (Invitrogen), 20 ng d'oligonucléotides hexamériques aléatoires, 1 mM de DTT, 0,4 mM de dNTP et 10 U d'inhibiteur de RNase, dans un tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂. La réaction s'effectue par dénaturation des ARN pendant 5 mn à 65°C suivie de la transcription inverse à 37°C pendant 1 h et finalement par l'inactivation de l'enzyme à 95°C pendant 10 mn.

3.2.3. Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

100 ng d'ADNc obtenus par la réaction de RT sont incubés avec 1 U de Taq polymérase (Perkin Elmer), 1 µM de chaque amorce, 0,5 mM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, dans un tampon contenant 10 mM de Tris-HCl pH 8,3 et 50 mM de KCl.

Les amorces pour les différents gènes analysés sont décrites dans le tableau 9, ainsi que le nombre de cycles. Les amorces ont été synthétisées afin d'être compatibles avec la séquence des gènes de la souris et du rat (tableau ci-dessous).

Gènes	Séquences	Taille du fragment
Notch1 <i>F</i>	5'- TGC CAA ATG CCT GCC AGA AT -3'	630 pb
Notch1 <i>R</i>	5'- CAT GGA TCT TGT CCA TGC AG -3'	
Notch2 <i>F</i>	5'- GAG GCG ACT CTT CTG CTG TTG AAG A -3'	475 pb
Notch2 <i>R</i>	5'- ATA GAG TCA CTG AGC TCT CGG ACA G -3'	
Notch3 <i>F</i>	5'- ACA CTG GGA GTT CTC TGT GAG -3'	469 pb
Notch3 <i>R</i>	5'- GCT GTC TGC TGG CAT GGG ATA -3'	
Notch4 <i>F</i>	5'- CTT CTC GTC CTC CAG CTC AT -3'	377 pb
Notch4 <i>R</i>	5'- GCT GAC ATC AGG GGT GTC AC -3'	
Dll1 <i>F</i>	5'- GAA AGA CTC ATC AGC CGC CT -3'	480 pb
Dll1 <i>R</i>	5'- TTC CTG CAC GGC TTA TGG TG -3'	
Jagged1 <i>F</i>	5'- TTA CTG TGG GAC TCA TCA GC -3'	450 pb
Jagged1 <i>R</i>	5'- TCA CAG TTC TGA CCC ATC CA -3'	
Jagged2 <i>F</i>	5'- CTG ATT GGC GGC TAT TAC TG -3'	400 pb
Jagged2 <i>R</i>	5'- GCA CTG AGC AGT TCT TGC CA -3'	
Hes1 <i>F</i>	5'- CAG CCA GTG TCA ACA CGA CAC -3'	310 pb
Hes1 <i>R</i>	5'- CTC GTT CAT GCA CTC GCT GA -3'	
Hes5 <i>F</i>	5'- CGC ATC AAC AGC AGC ATA GAG-3'	270 pb
Hes5 <i>R</i>	5'- TGG AAG TGG TAA AGC AGC TTC -3'	
Gapdh <i>F</i>	5'- GAG TAT GTC GTG GAG TCT AC -3'	410 pb
Gapdh <i>R</i>	5'- TGA GCT TCC CGT TCA GCT CT -3'	

F: séquence « forward » ; *R*: séquence « reverse »

Tableau 9 : séquence des amorces utilisées pour étudier les gènes de la voie Notch

Les conditions de PCR sont les suivantes : dénaturation initiale à 94°C pendant 1 minute ; pour les cycles de PCR : dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation (“annealing”) à 55°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 30 s. Le dernier cycle est suivi d’une élongation finale à 72°C pendant 7 mn. Pour le gène Hes5 l’hybridation se fait à 63°C et l’élongation pendant 2 mn.

Le nombre de cycles dépend du taux du transcrit à amplifier (tableau ci-dessous) :

Gènes	Nombre de cycles			
	Neurosphères	Neurones	Oligodendrocytes	Astrocytes
Notch1	30	30	36	36
Notch2	30	32	32	32
Notch3	32	35	35	35
Notch4	34	38	37	34
Dll1	32	32	35	35
Jagged1	30	30	30	30
Jagged2	30	30	30	30
Hes1	34	38	38	34
Hes5	35	35	38	38
Gapdh	23	23	23	23

Tableau 10 : Nombre cycles de PCR en fonction des gènes et cellules étudiés.

Le nombre de cycles doit être ajusté pour obtenir un signal d’intensité moyenne n’atteignant pas le seuil de saturation, de façon à se trouver dans des conditions où l’intensité des bandes

est proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ (méthode semi-quantitative). On peut ainsi visualiser d'éventuelles variations de ce signal, dans un sens ou dans l'autre, dans les divers échantillons analysés. Cette réaction de PCR est réalisée dans un thermocycler Perkin Elmer 9700.

Pour vérifier que les concentrations en ADNc dans les différentes conditions sont équivalentes, des PCR sont réalisées en parallèle pour détecter le transcrit Gapdh exprimé constitutivement et à un taux relativement constant dans toutes les cellules.

3.2.4. Electrophorèse des acides nucléiques

3.2.4.1. Séparation électrophorétique des ADNc

Les ADNc sont séparés dans un gel d'agarose à 1% contenant 0,5 µg/ml de BET et du tampon TBE 1 X concentré (Tris 40 mM, borate de sodium 5 mM pH 8, EDTA 1 mM). Le gel est coulé dans un appareil d'électrophorèse horizontal, et une fois solidifié, il est immergé dans du tampon de TBE 1 X concentré. 10 µl de chaque produit de PCR sont mélangés avec 2 µl de tampon de charge (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de cyanol xylène FF et 15% de Ficoll 400 dans de l'eau) dans des microtubes Eppendorf. L'électrophorèse est réalisée à une intensité de 100 mA. Les gels sont ensuite observés et numérisés au « Baby Imager » (Fisher Bioblock) et les images ainsi obtenues sont traitées par NIH image 1.36. Chaque PCR a été effectuée en double et les résultats quantifiés sont exprimés en pourcentage d'expression du gène dans les cellules traitées en comparaison avec les cellules témoins non traitées (fixé à 100% après normalisation par rapport à la Gapdh). Le taux relatifs des ARNm sont représentés sous forme d'histogrammes (\pm S.E.M.).

3.2.4.2. Séparation électrophorétique des ARN

Les ARN sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1%, formaldéhyde 6%, et contenant du tampon MOPS 1 X concentré (MOPS 25 mM, EDTA 1 mM, acétate de sodium 0,5 mM, pH 7). Toutes ces manipulations sont effectuées sous une hotte aspirante en raison de la toxicité du formaldéhyde. Le gel est préparé de la façon suivante : une suspension d'agarose à 1% (p/v) dans 180 ml d'eau est portée à ébullition pour permettre à l'agarose de se dissoudre. Après l'avoir laissée refroidir jusqu'à 65°C environ, 20 ml de tampon MOPS 10 X concentré sont ajoutés, ainsi que 34 ml de formaldéhyde. Le gel est coulé horizontalement, et une fois solidifié, il est immergé dans du tampon MOPS 1 X concentré. Les échantillons d'ARN sont préparés dans un volume final de dépôt de 25 µl. Chaque échantillon déposé

contient 7 à 10 µg d'ARN dans un mélange composé de MOPS 1 X concentré, 6% de formaldéhyde, 50% de formamide désionisée, 0,25 mg/ml de BET et quelques grains de bleu de bromophénol. Les échantillons sont chauffés à 64°C pendant 5 mn, refroidis rapidement dans de la glace, et déposés dans les puits du gel. L'électrophorèse est réalisée entre 100 et 150 mA, jusqu'à ce que le bromophénol atteigne les deux tiers du gel.

3.3. Techniques relatives aux protéines (Western-Blot)

3.3.1. Préparation des échantillons

Les cellules sont lysées par addition d'un tampon contenant : SDS 3%, Tris HCl 62,5 mM, glycérine 10% et β-mercaptoéthanol 3,3%. Extemporément, un cocktail d'inhibiteurs de protéases est ajouté dans ce tampon de lyse selon les instructions de la fiche technique (Sigma) et 5 mM d'orthovanadate sont ajoutés afin de pouvoir étudier la phosphorylation de STAT3. Les protéines sont dosées par un test colorimétrique basé sur la méthode de Lowry, modifié pour être compatible avec les agents réducteurs et les détergents (RC DC protein assay, BioRad). Les échantillons sont ensuite homogénéisés et placés 8 mn à 70°C dans un bloc chauffant afin de dénaturer les protéines.

3.3.2. Séparation par SDS-PAGE

Pour les Western Blot, 50 µg de protéines sont séparées (appareil Mini Protean II, Biorad) en conditions dénaturantes sur des gels de polyacrylamide à 10% (acrylamide 10%, Tris 1M, pH 8,8, SDS 10% ; tampon de migration : Tris 25 mM, glycine 200 mM, SDS 0,1%, pH 8,3). La migration est effectuée à 110 volts pendant 1 h 30 et contrôlée avec la migration des marqueurs de poids moléculaires précolorés (Sigma). Les quantités relatives de protéines déposées sont vérifiées par coloration au bleu de Coomassie.

3.3.3. Transfert liquide sur membrane de nitrocellulose

Après séparation, le transfert des protéines est effectué sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (Amersham) par transfert liquide (Biorad). Le transfert est effectué à voltage maximum (100 v) pendant 1 heure, sous agitation magnétique dans un tampon de transfert à 4°C (Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; méthanol 20%), selon les instructions du constructeur.

3.3.4. Immunodétection des protéines

Après transfert, la membrane est rincée plusieurs fois dans du PBS-T (PBS, 3% (v/v) Tween20), puis saturée 12 heures à 4°C sous agitation, pour bloquer les sites aspécifiques, dans du PBS-T contenant 5% de lait écrémé (m/v). La membrane est incubée pendant 2 heures, à température ambiante et sous agitation constante, en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBS-T additionné de lait écrémé à 5%. Les anticorps primaires utilisés sont : anti-Notch1 de chèvre (1:100; Santa Cruz Biotechnology), anti-STAT3 de lapin (1/3000, Cell Signaling), anti-phospho-STAT3 de lapin (Tyr705) (1/1500, Cell Signaling) et anti-HES5 de lapin (1/400, Chemicon). La membrane est ensuite rincée (3x ; 15 mn) dans du PBS-T, avant d'ajouter l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (âne anti-chèvre 1/4000, Santa Cruz; chèvre anti-lapin 1/4000, Jackson ImmunoResearch). Après 30 mn d'incubation sous agitation constante à température ambiante, la membrane est rincée (3x ; 15 mn) dans du PBS-T. Le signal est révélé à l'ECL (Enhanced chemiluminescence) avec un kit de détection (ECL plus, Amersham). Différents temps d'exposition sont pratiqués en fonction de l'intensité du signal.

Chapitre 3

Résultats principaux

Publication 1

La signalisation Delta/Notch agit sur la
spécification et la différenciation des CSN
en deux étapes

1. La signalisation Delta/Notch agit sur la spécification et la différenciation des CSN en deux étapes

1.1. Contexte « historique » de ces travaux

Lorsque nous avons commencé à travailler sur ce projet, le rôle de la voie Notch dans le déterminisme des cellules souches neurales (CSN) et dans la différenciation des précurseurs de neurones et cellules gliales était peu connu. Il était néanmoins connu que la voie Notch intervenait dans la neurogenèse en inhibant le développement neuronal in-vivo et in-vitro dans de nombreux organismes (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Fortini et al., 1993; Henrique et al., 1997; Nye et al., 1994; Struhl et al., 1993). Le rôle inhibiteur de Notch sur la différenciation des oligodendrocytes (Wang et al., 1998) et des neurones (Sestan et al., 1999) avait également décrit. Son rôle activateur dans la différenciation des astrocytes avait également été décrit par des travaux contemporains de ceux décrits ici (Lutolf et al., 2002; Tanigaki et al., 2001).

Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, l'étude de la neurogenèse in-vivo dans des animaux transgéniques de la voie Notch est impossible du fait que les embryons homozygotes mutants pour la plupart des gènes ne sont pas viables et meurent entre les 9^{ème} et 12^{ème} jours de développement embryonnaire.

Nous avons donc eu recours au modèle de substitution des neurosphères, caractérisé quelques années auparavant par Reynolds (Reynolds et Weiss, 1996) pour étudier le rôle de la voie Notch dans certains des phénomènes de la neurogenèse des mammifères. Au cours de cette étude, il est apparu que le système des neurosphères permettait de dissocier expérimentalement la phase de prolifération, au cours de laquelle avait lieu la spécification des différents types cellulaires, et la phase de différenciation, au cours de laquelle avait lieu la différenciation proprement dite des précurseurs déjà engagés dans une voie de développement (maturation). Ce système permet ainsi de déterminer si un facteur (génétique ou épigénétique) agit sur l'un ou l'autre de ces deux processus.

Nous nous sommes donc posé la question du rôle de la voie Notch dans chacune de ces deux phases des lignages des CSN.

Notre stratégie a consisté à préparer des neurosphères à partir d'embryons mutants pour certains gènes de la voie Notch et à étudier leur différenciation en comparaison avec des neurosphères préparées à partir d'embryons de type sauvage.

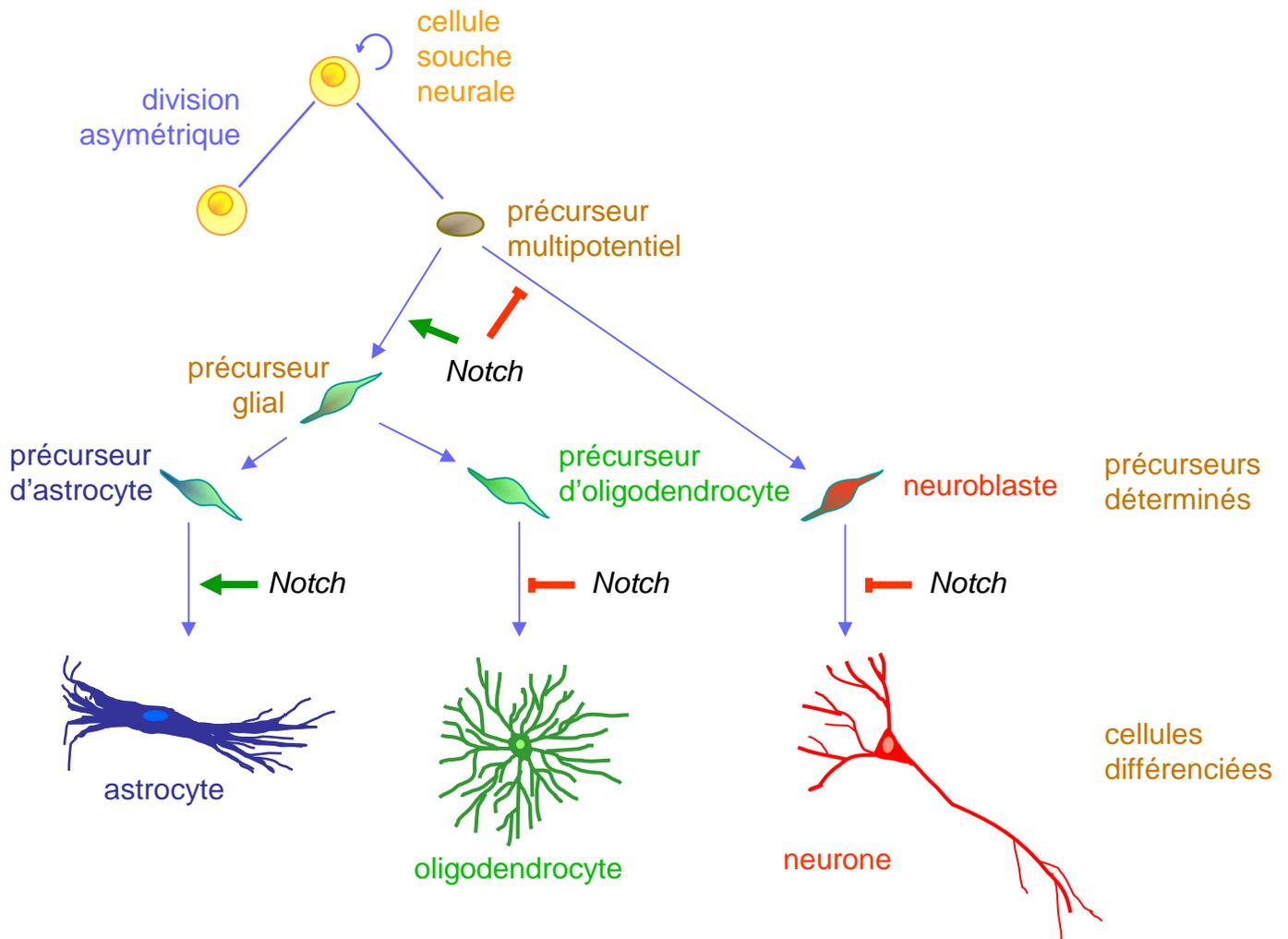


Figure 32. Rôle de la voie Notch dans la génération des neurones et des cellules gliales à partir des cellules souches neurales dans le système des neurosphères

Nous avons montré que la voie Notch joue un rôle dans la neurogenèse versus gliogenèse, en deux étapes : dans une première étape, la voie de signalisation Notch réprime le choix de l'identité neuronale tandis qu'elle favorise le choix de l'identité gliale. Dans une seconde étape, la voie Notch agit sur la différenciation de ces précurseurs aux potentialités développementales restreintes (générés au cours de la première phase) : elle favorise la différenciation des astrocytes tandis qu'elle réprime celle des neurones et des oligodendrocytes.

(adapté de Grandbarbe et al., 2003)

Nous avons ainsi tenté d'établir des lignées de neurosphères à partir d'embryons mutants pour les gènes *Notch1*, *Hes1* et *Dll1*. Nous n'avons pas réussi à établir de lignées homozygotes mutantes *Notch1* au laboratoire mais des lignées *Hes1* (cf. données complémentaires, §1.4) et *Dll1* ont été obtenues.

1.2. Résumé des travaux publiés

La première lignée de neurosphères mutantes que nous avons étudiée a été celle mutante pour *Delta-like-1 (Dll1)*. Les embryons homozygotes mutants pour *Dll1* sont létaux au 10^{ème} jour de vie embryonnaire et sont caractérisés par un phénotype hémorragique et par des défauts de la segmentation des somites (Hrabe de Angelis et al., 1997). Cette létalité précoce des embryons a empêché Hrabe de Angelis d'étudier l'effet de l'inactivation de *Dll1* sur la neurogenèse.

Après avoir préparé à partir d'embryons provenant de la même portée des lignées de neurosphères sauvages et homozygotes mutantes pour *Dll1*, nous avons montré que la perte de fonction Notch résultant de l'inactivation du ligand *Dll1* s'accompagnait d'une augmentation de la production des neurones (de 10% dans le WT à 40% dans les sphères homozygote mutantes pour *Dll1*); et que cette augmentation avait lieu aux dépens des cellules gliales, particulièrement des astrocytes (50% dans les sphères WT contre 5 à 10% dans les sphères *Dll1*^{-/-}). Ces résultats confirmaient des données préalables obtenues dans d'autres types de culture et qui indiquaient que la voie Notch exerçait un effet inhibiteur sur les neurones et les oligodendrocytes, tandis qu'elle favorisait la différenciation des astrocytes. Parallèlement à cette étude, nous avons montré qu'il était possible de « sauver » le phénotype mutant *Dll1*^{-/-}, en incubant les sphères mutantes, avec du milieu conditionné par des sphères de type sauvage. Le sauvetage était encore plus efficace lorsque l'incubation avait lieu avec du ligand *Jagged1* soluble (autre ligand de Notch). Nous disposions ainsi d'un moyen d'activer à volonté la voie Notch dans des neurosphères où elle était initialement inactivée consécutivement à l'inactivation du ligand *Dll1*. Nous avons alors étudié les effets de la modulation quantitative et temporelle de Notch en faisant varier les concentrations de ligand pendant la phase de prolifération et /ou de différenciation des neurosphères.

Les résultats nous ont permis de montrer que Notch agissait sur la différenciation des CSN en deux étapes (figure 32) : (i) dans une première étape, il agit sur le choix du lignage en réprimant la voie neuronale et en favorisant la voie gliale (précurseurs d'oligodendrocytes et d'astrocytes). (ii) Dans une seconde étape, il agit sur la différenciation des précurseurs

générés au cours de la première étape en favorisant la différenciation des astrocytes et réprimant celle des neurones et des oligodendrocytes.

1.3. Article 1 : Delta - Notch signaling controls the generation of neurons / glia from neural stem cells in a stepwise process

L'article présenté ici a constitué l'essentiel du travail de thèse de Luc Grandbarbe, ancien doctorant de l'équipe (thèse soutenue le 28 mai 2002, disponible au service commun de documentation de l'Université Louis Pasteur) et a été publié en avril 2003 dans *Development* (Volume 130, Issue 7, April 2003, Pages 1391-1402).

J'ai pris part activement à ces travaux lors de mon arrivée dans l'équipe d'Eliane Mohier et j'ai également étudié le phénotype de différenciation de neurosphères mutantes pour Hes1 (résultats non publiés, présentés dans le §1.4).

Development

Volume 130, Issue 7, Pages 1391-1402, April 2003

Delta-Notch signaling controls the generation of neurons / glia from neural stem cells in a stepwise process

Luc Grandbarbe¹, Julien Bouissac¹, Matt Rand², Martin Hrabé de Angelis³, Spyros Artavanis-Tsakonas^{4,5} and Eliane Mohier^{1,#}.

1. Laboratoire de Neurobiologie du Développement et de la Régénération - CNRS, 5 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France.

2. Department of Anatomy and Neurobiology, College of Medicine, University of Vermont, Burlington, VT 05405, USA.

3. GSF, Institute for Mammalian Genetics, Ingolstaedter Landstrasse 1, D-85764 Neuherberg, Germany.

4. Massachusetts General Hospital Cancer Center, Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Charlestown, Massachusetts 02129, USA.

5. Laboratoire d'embryologie cellulaire et moléculaire - Collège de France, 49B, Av. de la Belle Gabrielle 94736 Nogent sur Marne, France.

Author for correspondence

KEYWORDS

Neural stem cells / Notch-Delta signaling / Cell fate specification / Neurospheres

SHORT TITLE

Notch controls neuron/glia from neural stem cells

SUMMARY

We examined the role of Notch signaling on the generation of neurons and glia from neural stem cells by using neurospheres which are clonally derived from neural stem cells. Neurospheres prepared from *Dll1^{lacZ/LacZ}* mutant embryos segregate more neurons at the expense of both oligodendrocytes and astrocytes. This mutant phenotype could be rescued when *Dll1^{lacZ/LacZ}* spheres were grown and/or differentiated in the presence of conditioned medium from WT neurospheres. Temporal modulation of Notch by soluble forms of ligands indicates that Notch signalling acts in two steps. Initially, it inhibits the neuronal fate while promoting the glial cell fate. In a second step, Notch promotes the differentiation of astrocytes while inhibiting the differentiation of both neurons and oligodendrocytes.

INTRODUCTION

Multipotent neural stem cells differentiate into neurons and glial cells in a progressive process, generating (first uncommitted, then gradually committed) precursor cells with restricted developmental capacities, which ultimately differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes (for review, see Anderson, 2001).

Due to the absence of specific markers, neural stem cells cannot be identified prospectively and their developmental behavior is therefore difficult to address *in vivo*.

As neurospheres are clonally derived from neural stem cells (Weiss et al., 1996), they provide a good experimental system for studying the mechanisms involved in the proliferation and differentiation of these multipotent cells in development.

The production of neurospheres relies on the selection of neural stem cells from embryonic (or adult) brain through the action of EGF. In the presence of EGF, neural stem cells proliferate and form clonally derived clusters of cells floating in the medium which are referred to as neurospheres (or spheres). Each neurosphere represents the clonal progeny of a neural stem cell; as such, it consists of a heterogeneous population of cells, including the neural stem cells themselves (representing less than 5% of the cells) and their progeny. This progeny consists of uncommitted (early progenitors) as well as committed (late) progenitor cells. These cells remain in an undifferentiated state until they are induced to differentiate by providing a solid support, on which they attach and give rise to neurons, oligodendrocytes and astrocytes in reproducible proportions (Reynolds and Weiss, 1992; Weiss et al., 1996).

The Notch signaling pathway has been shown to define a fundamental cell interaction mechanism that influences cell fate decision by interaction between cellular neighbors. The involvement of Notch signaling in neuronal development has been extensively documented in invertebrates and its action has been shown to be highly pleiotropic and indeed context dependent. During neurogenesis, Notch has been shown to inhibit neuronal differentiation in many organisms *in vivo* and *in vitro* (Fortini et al., 1993; Struhl et al., 1993; Nye et al., 1994; Artavanis-Tsakonas et al., 1995, 1999; Henrique et al., 1997). Notch activation has also been shown to suppress oligodendrocyte development from oligodendrocyte precursor cells (OPCs) (Wang et al., 1998). Recently, Notch signaling has been found to trigger the differentiation of several types of glial cells, including radial glia (Gaiano et al., 2000), Schwann cells, (Morrison et al., 2000), Müller cells in retina (Furukawa et al., 2000), and astrocytes (Tanigaki et al., 2001; Lütolf et al., 2002).

In the present study, we used neurospheres to examine the involvement of Notch in the generation, the maintenance and the differentiation of neural stem cells by comparing neurospheres produced from mice embryos deficient for *Delta-like gene 1* ($Dll1^{lacZ/LacZ}$) (Hrabé de Angelis et al., 1997), with wild type neurospheres produced from the littermate controls. We find that $Dll1^{lacZ/LacZ}$ mutation affects neither the generation nor the maintenance of neural stem cells in vitro. In contrast, the $Dll1^{lacZ/LacZ}$ mutation strongly affects the developmental potential of neurospheres. Neurospheres prepared from $Dll1^{lacZ/LacZ}$ mutant embryos display an increase in the production of neurons at the expense of both oligodendrocytes and astrocytes. This mutant phenotype could be rescued when $Dll1^{lacZ/LacZ}$ spheres differentiated in the presence of wild type spheres conditioned medium. Temporal modulation of Notch activation by soluble forms of ligands indicates that Notch acts in two steps. Initially, it controls a switch between neuronal fate to glial fate, repressing neuronal fate and promoting glial fate (including both astrocytes and oligodendrocytes). In a second step, Notch affects the differentiation decisions of precursors already committed to a neuronal or a glial lineage; it promotes the differentiation of astrocytes while inhibiting the differentiation of both neurons and oligodendrocytes.

MATERIALS AND METHODS

Production and maintenance of WT and mutant $Dll1^{lacZ/LacZ}$ neurospheres

The $Dll1^{lacZ}$ mutant mouse line was kindly provided by Dr A. Gossler. The mutation resulted from the in frame replacement of exon1 by the *lacZ* gene, as described by Hrabé de Angelis et al. (1997). Homozygous $Dll1^{lacZ/LacZ}$ embryos die at embryonic day (E) 11.5 i.e. before gliogenesis begins. The homozygous embryos display a well defined mutant phenotype with strongly haemorrhagic brain, somites boundaries not clearly defined and a kinked neural tube (Hrabé de Angelis et al., 1997).

Neurospheres have been prepared as described in Tropepe et al. (1999). Telencephales of embryos (E10.5), were dissected and mechanically dissociated in the serum-free neurosphere culture medium as described in Vescovi et al. (1993) (DMEM:F12 (1:1), supplemented with 25 µg/ml Insulin; 100 µg /ml transferrin; 20 nM progesterone; 60 µM putrescine; 30 nM selenium and 20 ng/ml EGF). The dissociated cells were plated in 24-well plates (Nunc). After 7 DIV, most of the cells died, whereas a small percentage of cells proliferated by forming clusters of undifferentiated cells floating in the medium, referred to as the neurospheres (spheres). These primary spheres were spun down (600 rpm / 5 min) and were

dissociated mechanically and chemically, making use of a “dissociation solution” (Sigma) and were further expanded by transfer into fresh neurosphere culture medium in which they were cultured for generating secondary spheres. Secondary cultures were transferred into 250 ml flasks (Falcon). Culture flasks were coated with poly(2-hydroxy-ethyl-methacrylate) (polyHEMA; Sigma, 1.6 mg/cm²) to prevent cell attachment. Neurospheres could be maintained for long periods of times by successive passages involving dissociation and proliferation, or were frozen in neurosphere culture medium containing 10% DMSO, when necessary. Out of 7 *Dll1^{lacZ/LacZ}* mutant embryos, 3 lines of spheres could be obtained, 2 of which have been maintained. We checked that these two lines behaved in the same way and showed similar differentiating potentials (see below). Many of the reported experiments have been carried out in the second line and showed similar results (data not shown).

J1^{EC} and 3T3 conditioned medium

Conditioned medium enriched with a soluble form of human Jagged, was produced from stably transfected NIH-3T3 cells (Sestan et al., 1999). HJaggedEC-3T3 cells, and untransfected NIH-3T3 cells (used as a control) were cultured until confluence, in DMEM containing 10% FBS. When the culture became confluent, the medium was removed and replaced by the neurosphere culture medium for another 3 days. The cells were then harvested by centrifugation and the resulting conditioned supernatant was filtered through a 0.22 µm filter unit millex-GS (Millipore). This conditioned medium (referred to as J1^{EC}) was added undiluted to the *Dll1^{lacZ/LacZ}* spheres for various time windows during either the proliferation and/or the differentiation phase(s) as described in the experimental diagrams. Conditioned medium from untransfected NIH-3T3 cells (3T3) was used as a control.

Differentiation and analysis of neurospheres

After various times of proliferation, 50 to 100 neurospheres were plated onto polyornithine (poly-L-ornithine Sigma) coated (14 mm) coverslips, in a 24 wells plate (Nunc) to differentiate. Differentiation of neurospheres is often described as requiring the withdrawal of EGF, which is replaced by fetal bovine serum (FBS) (Vescovi et al., 1993; Tropepe et al., 1999). In order to avoid the hazardous effect of FBS, while preserving cell survival, we reduced EGF concentration to 2 ng/ml during the differentiation phase, which is sufficient to allow cell survival but minimizes proliferation. Under these conditions, the differentiating sphere remains a dynamic structure where generation of new cells (stem cells and progenitors) is diminished but not totally abolished.

Notch activation experiments

Fully dissociated *Dll1^{lacZ/LacZ}* spheres were grown in J1^{EC} conditioned medium, (or in NIH-3T3 control medium) in 50 ml flasks coated with polyHEMA. At various times, as indicated on the diagrams, the growing spheres were collected by centrifugation, washed out in PBS, and the incubation was continued either in 3T3 control medium or in fresh J1^{EC}. After the proliferation phase, neurospheres were harvested and plated on polyornithine-coated coverslips either in J1^{EC} or in the control medium. After various times of differentiation, the samples were processed for immunostaining for identification of the cell types.

Immunostaining

Neurospheres were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde in PBS, pH7.4, washed in PBS and permeabilized 5 min with PBS / 0.5% triton X100 (Sigma). The neurospheres were incubated overnight at 4°C in PBS containing 3% BSA and the appropriate mixture of antibodies. Primary antibodies used were mouse monoclonal anti-MAP2 (2a+2b) (1/400, Sigma) specific for neurons; rabbit polyclonal anti-GFAP (1/600, Dako) for astrocytes and rabbit polyclonal PDGFR α (1/500, Santa Cruz), mouse monoclonal anti-O4 (1/20, Boehringer), for oligodendrocytes precursors cells (OPCs) and immature oligodendrocytes, respectively. After washing in PBS, differentiating spheres were incubated 1 h with Cy2, Cy3 and Cy5 conjugated secondary antibodies (1/300 Amersham) or Alexa 488 conjugated antibodies (1/1000, Molecular Probes). Preparations were counterstained with TO-PRO (1/15000, Molecular Probes), mounted in Aquamount (Polyscience), and viewed for triple immunofluorescence using a Zeiss LSM 410 confocal microscope.

Quantitative results

Data are based on three or four independent experiments in which an average of more than 10 spheres were analysed per treatment, per experiment. Under the conditions employed, of cell concentration after full dissociation (1.10^5 cells / ml) and plating (50-100 spheres / coverslip), each neurosphere may be considered as the clonal progeny of a single neural stem cell. For cell type quantitative estimation, neurospheres were chosen of approximate same size. The confocal plane was at the basis of the neurosphere, i.e. where the cells differentiate. The optical slice was ≤ 2 μ m. The results are expressed in percentage of total cell number assessed from TO-PRO staining. The graphed results are shown as means \pm S.E.M.. Group changes were assessed using one-way ANOVA. When statistical differences were obtained at the $p \leq$

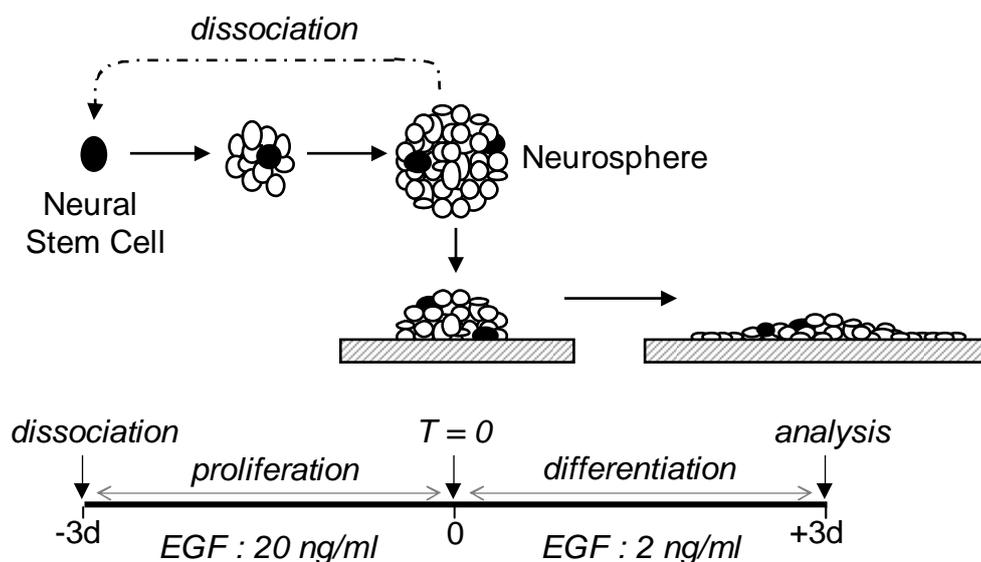


Figure 1. Schematic representation of the protocol used for analyzing the differentiation potential of neurospheres.

Fully dissociated neurospheres were grown in serum-free neurosphere culture medium, containing EGF (20 ng/ml) for various times, generally not exceeding 3 days in order to minimize necrosis which might affect the core of larger spheres, and the generation of new stem cells, which might be at the origin of a "subclone" whose developmental potential could interfere with interpretation. At T=0, spheres (50-100), were deposited on coverslips coated with polyornithine and allowed to differentiate in neurosphere culture medium containing 2 ng/ml EGF, in order to reduce proliferation. After various times of differentiation, spheres were fixed and processed for immunocytochemistry, and analyzed by confocal microscopy, the observation plane being at the basis of the spheres, that is where the cells differentiate.

0.05 level between groups, multiple pair-wise comparisons were made using the Turkey-Kramer method. In the text, p values indicate statistical significant differences.

RESULTS

The generation and maintenance of neural stem cells are not affected by the $Dll1^{lacZ/lacZ}$ mutation.

Neural stem cells can be empirically and functionally identified by their capacity to respond to EGF by proliferating and generating neurospheres. We have prepared neurospheres from embryos homozygous for $Dll1^{lacZ/lacZ}$. The possibility to obtain neurospheres from embryonic brains deficient for the *Dll1* gene suggests that *Dll1* is not essential for the generation of neural stem cells. The decrease in the number of spheres obtained from the mutant brains compared with their littermate wild type controls could be attributed to the hemorrhagic phenotype of the mutant brains (Hrabé de Angelis et al., 1997).

The early death of $Dll1^{lacZ/lacZ}$ mutant embryos (around day 12) prevented further analysis of the role of *Dll1* in the maintenance of neural stem cells in vivo. In vitro, we observed no difference in the maintenance of mutant and wild type neurospheres. Based on the neurosphere assay, the estimation of neural stem cell percentage from the dissociated neurospheres cellular population was similar in mutant and wild type neurospheres and was below 5% of total cell number, showing little variation through successive passages (data not shown). These observations suggest that wild type and $Dll1^{lacZ/lacZ}$ neural stem cells behave approximately the same, undergoing the same number of symmetrical and asymmetrical divisions.

$Dll1^{lacZ/lacZ}$ mutant spheres display an increase in neurons at the expense of glial cells.

After verifying that wild type (WT) neurospheres differentiated according to a pattern qualitatively and quantitatively reproducible under the culture conditions employed, we compared the differentiation potential of $Dll1^{lacZ/lacZ}$ and WT neurospheres. The general experimental protocol is schematized in Fig. 1. Three day-old spheres were plated on polyornithine in the presence of 2 ng / ml of EGF, and allowed to differentiate for various times depending on the temporal pattern of expression of the markers employed for immunocytochemistry. The percentage of each of the cell types was determined by triple immunostaining including a combination of two specific markers, in addition to TO-PRO, a marker for nuclei, and analyzed by confocal microscopy. Cell types were identified using

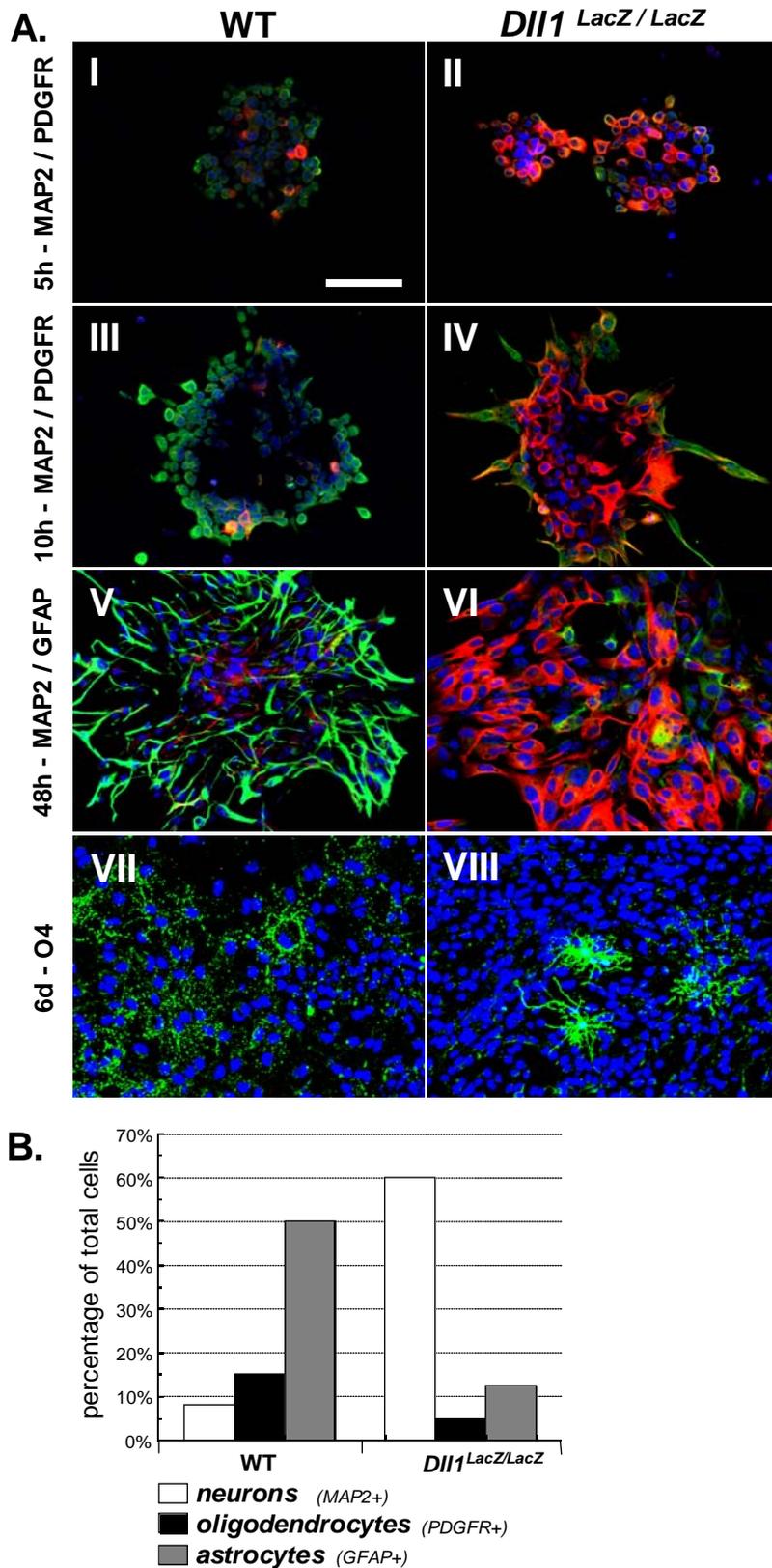


Figure 2. Compared differentiation potential of WT and *Dll1*^{LacZ/LacZ} mutant neurospheres.

(A) Kinetics of differentiation were analyzed for WT (I, III, V, VII) and *Dll1*^{LacZ/LacZ} (II, IV, VI, VIII) spheres. Three day-old spheres were fixed after 5 h (I, II), 10 h (III, IV), 48 h (V, VI) and 6 days (VII, VIII) on polyornithin. Markers used for immunostaining were: anti-MAP2 (I-VI) coupled to Cy3, for neurons (red), anti-PDGFR (I-IV) coupled to Alexa 488, for OPCs (green); anti-GFAP (V, VI) coupled to Alexa 488, for astrocytes (green) and anti-O4, coupled to Cy2 (green) (VII, VIII). In all cases, nuclei were visualized by TO-PRO (blue). **(B)** Approximate quantification of the results. Each of the cell type was quantified at various differentiation times: MAP2-positive cells after 48h; GFAP-positive cells after 48 h; oligodendrocytes were estimated from PDGFR-positive cells after 10 h on polyornithin. The data were cumulated and expressed as percentages of total cell number estimated from TO-PRO staining. Bar scale: 50 μ m

antibodies against MAP2 for neurons, GFAP for astrocytes, PDGFR for oligodendrocyte precursor cells (OPCs) (Hutchins, 1995) and O4 for immature oligodendrocytes.

After 5 h on polyornithine (Fig. 2I), a few cells in WT spheres started expressing MAP2. Low production of neurons (which do not exceed 10% of total cell number), is a characteristic of WT neurospheres (Fig. 2B). In contrast, GFAP-positive cells which appear after 48 h on polyornithine, represent more than 50% of total cell number and indicate that astrocytes are the major cell type generated from WT neurospheres (Fig. 2V). Oligodendrocytes are difficult to quantify accurately due to the aspect of the O4 marker (Fig. 2VII); however, PDGFR-positive cells indicate that OPCs represent about 15-20% of total cell number (Fig. 2B). In keeping with the expression of PDGFR, after 6 days on polyornithine, many cells in WT neurospheres continue to express O4, indicative of an oligodendroglial lineage commitment. Note however, that these O4-positive cells exhibit no processes and appear therefore as morphologically poorly differentiated (Fig. 2VII).

Contrasting with WT spheres, *Dll1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres show an increase in MAP2-expressing cells which represent more than 50% of total cell number, indicating that neurons are the major cell type generated by *Dll1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres. This increase in neurons takes place at the expense of both glial lineages as evidenced by the decrease in GFAP-positive cells (Fig. 2V,VI) as well as in PDGFR-positive cells (Fig. 2III,IV), indicating a decrease in astrocytes and OPCs, respectively. Interestingly, the few remaining O4-expressing cells exhibited many processes, suggesting that they were morphologically more differentiated than in the WT neurospheres (Fig. 2VII, VIII). Note that, together, neurons, oligodendrocytes and astrocytes did not amount to 100%, consistent with the observation that many cells in the core of the sphere failed to express any marker, and were likely to correspond to early uncommitted precursors (Fig. 2B). We sought to determine whether the alteration in the differentiation potential of WT and *Dll1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres could be accounted for by Notch selectively acting on the different lineages by affecting their survival or proliferation.

In order to examine whether the quantitative variations between wild type and *Dll1^{lacZ/lacZ}* mutant phenotypes might be due to selective apoptosis, we searched for dying cells in individual spheres, making use of TUNEL analysis, counterstained with TO-PRO, at various times after the induction of differentiation. Up to two days on polyornithine, the number of apoptotic cells remained low, representing less than 5% of total cells. For longer periods of differentiation, it increased (up to 15% after 5 days on polyornithine). No significant difference was found however between WT and *Dll1^{lacZ/lacZ}* neurospheres (data not shown). Pulses of BrdU incorporation, combined to either MAP2 or GFAP, in WT versus *Dll1^{lacZ/lacZ}*

spheres showed no difference between the two lineages, eliminating the possibility that the higher number of neurons seen in *Dll1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres was the result of an increased lineage specific proliferation event (data not shown).

The examination of the *Dll1^{lacZ/lacZ}* phenotype showed that the lack of *Dll1* activity, which presumably results in the inability to activate the Notch receptor is consistent with the previous finding that Notch signaling represses neurogenesis, and the more recent finding that Notch promotes the generation of astrocytes. Despite the difficulty to quantify the oligodendrocytes, we think that our results are consistent with the notion that Notch promotes the OPCs production (from a quantitative estimation of PDGFR-positive cells) while it inhibits their further differentiation into more mature structures (from a qualitative estimation of morphological changes of O4-positive cells).

Dll1 has a gene-dosage effect on the differentiation potential of neural stem cells.

Heterozygous *Dll1^{lacZ/+}* mouse embryos are phenotypically normal (Hrabé de Angelis et al., 1997; Beckers et al., 1999). After 24 h on polyornithine, neurospheres heterozygous for *Dll1* showed a two-fold increase in the number of MAP2-positive cells, but no variation in the number of GFAP-positive cells (data not shown). After 3 days of differentiation (Fig. 3A,B), the increase in neurons was confirmed (from 20.3±4.3% to 27.7±3.1%; $p \leq 0.01$) and as in homozygous *Dll1^{lacZ/lacZ}* neurospheres, this increase seemed to take place at the expense of astrocytes (from 50.3±6.9% to 23.2±4.6%; $p \leq 0.001$) even though the increase in neurons does not quantitatively compensate for the decrease in astrocytes. This quantitative variation was accompanied by a clear morphological modification, with neurons exhibiting longer processes, whereas astrocytes appeared with thinner processes and lacking the star-like morphology characteristic of mature astrocytes.

J1^{EC} rescues the Dll1^{lacZ/lacZ} mutant phenotype with thresholds different for neurons and astrocytes.

It is well established that *Drosophila* Notch is acting through interaction with membrane-bound ligands, including Delta (Vassin et al., 1985) and Serrate (Fleming et al., 1990). However, recent data have shown that under particular circumstances, invertebrate and vertebrate Notch activation can be mediated by apparently soluble forms of ligands that are found in the conditioned medium of ligand expressing cells (Klug et al., 1998; Qi et al., 1999; Sestan et al., 1999). We found that it was indeed possible to “rescue” the mutant *Dll1^{lacZ/lacZ}* spheres to differentiate normally in the presence of WTCM (data not shown).

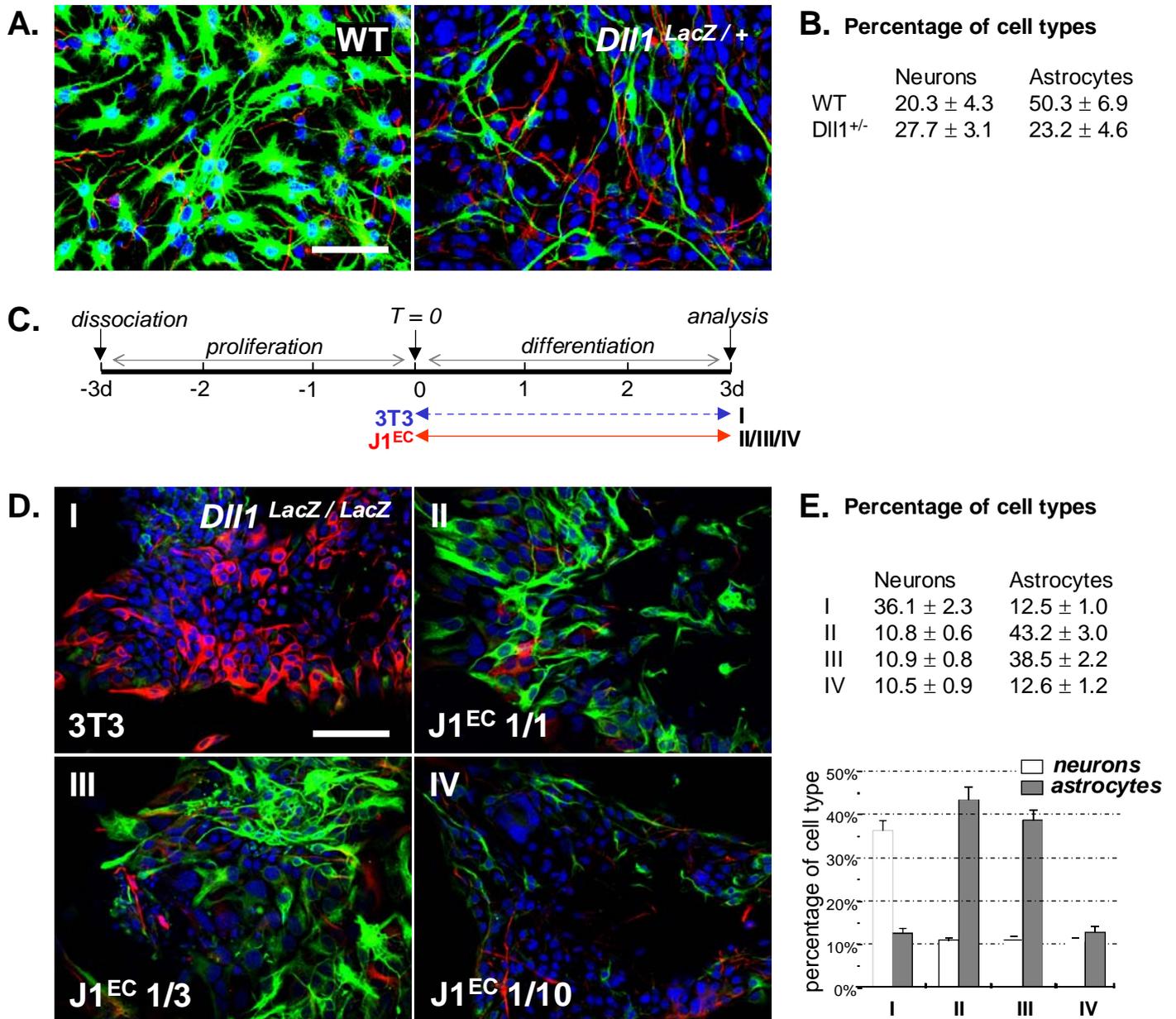


Figure 3. Neurospheres differentiate in response to Notch signaling with different sensitivity for neurons and astrocytes

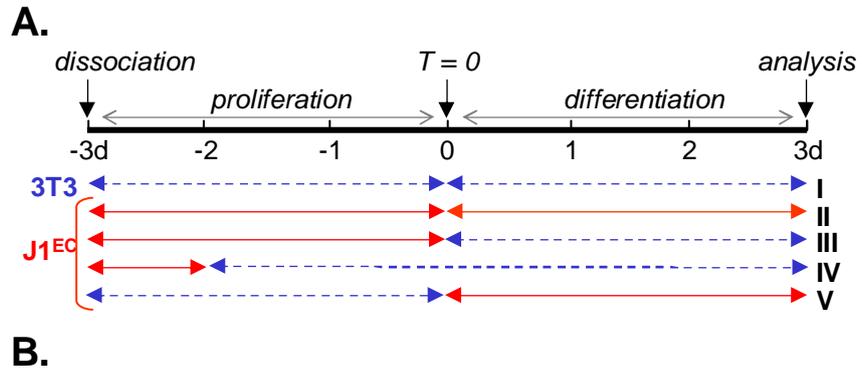
(A) Partial inactivation of Notch signaling in *DII1^{lacZ/+}* heterozygous spheres induces a moderate increase in neurons (MAP2, in red), a decrease in astrocytes (GFAP, in green) and dramatically alters their morphology (after 3 days of differentiation). (B) Quantitative estimation for (A). Data are representative of three independent experiments. (C-E) Differentiation of *DII1^{lacZ/lacZ}* homozygous spheres in response to various concentrations of J1^{EC}. (C) Experimental protocol: *DII1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres were allowed to differentiate in the presence of various concentrations of J1^{EC}. (D) Triple immunostaining using anti-MAP2 (red), anti-GFAP (green) and TO-PRO (blue). (E) Quantitative results of (D). Data are representative of three independent experiments. Bar scale: 50 μm

The *DIII*-dependent activity present in the WTCM, provided us with a tool for temporally modulating Notch activation, making it possible to analyze the effect of Notch signaling at various steps of the complex differentiation process leading from the neural stem cell to the differentiated cell types. However, repeated experiments showed an inconsistency in the potency of the WTCM to trigger the rescue of the *DIII^{lacZ/lacZ}* mutant phenotype. We were thus obliged to resort to a more reliable source of Notch ligand.

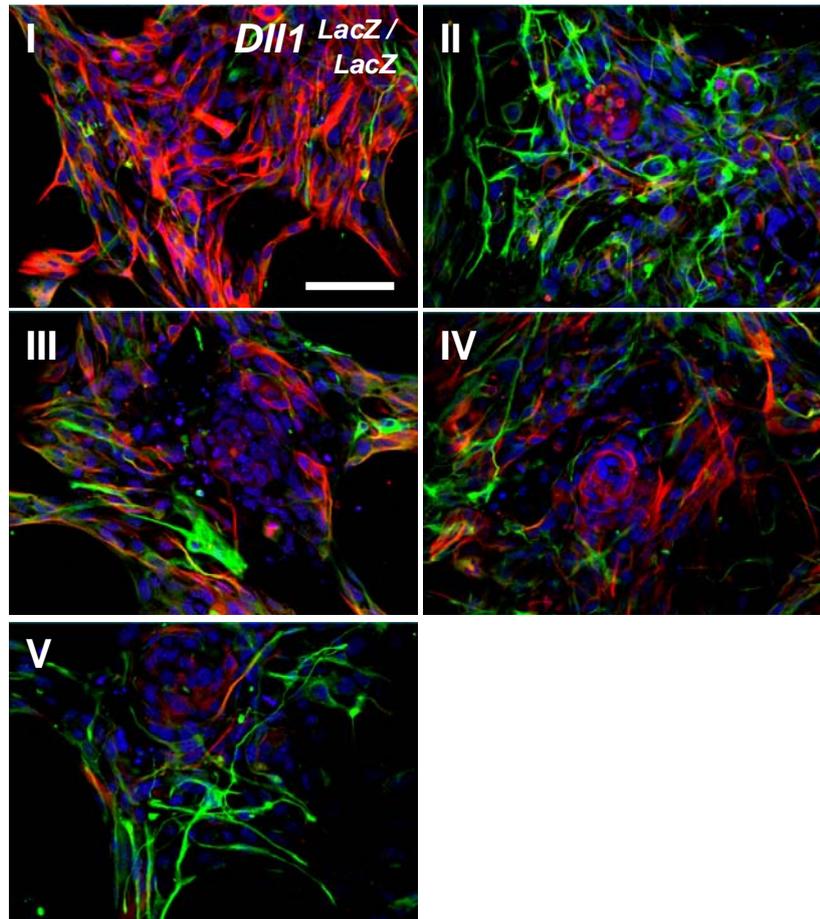
We used NIH-3T3 cells transfected with the human Jagged extracellular domain (hJagEC-3T3 cells), which was shown to be released in the medium. Conditioned medium from these cells (hereafter referred to as J1^{EC}), has been shown capable of regulating neurite outgrowth and Notch-dependent gene expression (Sestan et al., 1999). Jagged1 is the vertebrate counterpart of Serrate, the second Notch ligand in *Drosophila*. Jagged and soluble forms thereof, like Delta, were shown to activate the Notch receptor (Lindsell et al., 1995; Shimizu et al., 2000a; Shimizu et al., 2000b; Solecki et al., 2001; Varnum-Finney et al., 1998).

In order to check whether a soluble form of Jagged1 product could rescue *DIII^{lacZ/lacZ}* in the same way as WTCM, three day-old *DIII^{lacZ/lacZ}* mutant neurospheres were exposed to dilutions (up to twenty-fold) of J1^{EC} during the differentiation period and were further analyzed by immunostaining for their differentiation capacities in comparison with mutant spheres treated with untransfected NIH-3T3 cells conditioned medium (referred to as 3T3) used as a control, as described in Fig. 3C. Consistent with the effects observed with WTCM, the results (Fig. 3D,E) showed that addition of J1^{EC} resulted in a decrease in the number of differentiated neurons (a twenty-fold dilution was necessary to abolish this effect, data not shown). The decrease in neurons was accompanied by an increase in astrocytes only for higher concentrations of J1^{EC} (Fig. 3, compare II, III and IV). Quantitative data show little variation in the number of neurons and astrocytes in response to decreasing doses of J1^{EC} (for neurons: from 36.1 to 10.8, 10.9 and 10.5 for the three dilutions of J1^{EC}, respectively; for astrocytes: from 12.5 and 12.6 under non rescuing conditions, to 43.2 and 38.5 for higher concentrations of J1^{EC}). These data suggest that for the tested dilutions, the response is all-or-nothing, with different thresholds for neurons and astrocytes. Also note that the few GFAP-positive cells that were generated in response to low concentrations of J1^{EC} (Fig. 3IV), exhibited a poorly differentiated morphology, reminiscent of that observed in *DIII^{lacZ/+}* neurospheres (Fig. 3A).

Notch activation represses both neuronal specification and differentiation.



B.



C. Percentage of cell types

	Neurons	Astrocytes
I	47.9 ± 2.0	11.2 ± 1.1
II	10.3 ± 0.8	22.2 ± 1.9
III	18.8 ± 1.8	11.5 ± 1.0
IV	12.7 ± 1.7	8.20 ± 0.8
V	8.00 ± 0.7	17.2 ± 1.0

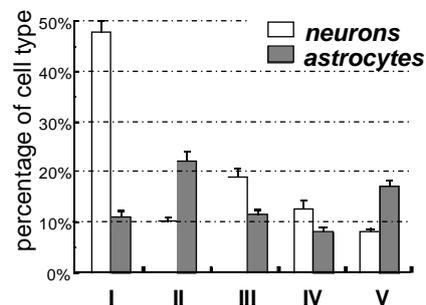


Figure 4. Effect of time-dependent activation of Notch in $DII1^{lacZ/lacZ}$ mutant spheres on neurons and astrocytes.

(A) Three day-old $DII1^{lacZ/lacZ}$ mutant spheres were incubated in the presence of $J1^{EC}$ for various time-intervals as described in the schematic protocol. (B) Spheres were immunostained with antibodies against MAP2 (red), GFAP (green). (C) Quantitative estimation was as described in experimental procedures. Data are representative of three independent experiments. Bar scale: 50 μ m

We investigated further the effect of Notch activation on *Dll1^{lacZ/lacZ}* spheres by treating them with J1^{EC} or control (3T3) for different lengths of time. The results are shown in Figs 4, 5, 6. Exposure of *Dll1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres to J1^{EC} resulted in all cases in a decrease in the production of neurons, in comparison with *Dll1^{lacZ/lacZ}* spheres treated with 3T3 conditioned medium used as a control. The strongest effect was observed when J1^{EC} was provided during both the proliferation and differentiation phases (Fig. 4I,II; from 47.9±2.0% to 10.3±0.8%; $p \leq 0.001$). These data are consistent with the previous observations indicating that Notch inhibits neurogenesis (Fortini et al., 1993; Struhl et al., 1993; Nye et al., 1994; Artavanis-Tsakonas et al., 1995, 1999; Henrique et al., 1997).

A decrease in the proportion of neurons was not only seen when J1^{EC} was provided during the proliferation phase (Fig. 4I,III; from 47.9±2.0 to 18.8±1.8%; $p \leq 0.001$), but also when it was provided transiently during the first 24 h at the initiation of proliferation and then washed out (Fig. 4IV; 12.7±1.7%; $p \leq 0.001$). In fact, an exposure to J1^{EC} for only 5 h was sufficient to significantly repress neurogenesis (data not shown), whereas a treatment for 3 h was not enough (Fig. 6I,III; from 47.8±2.3% to 40.4±2.1%; n.s., $p > 0.05$). These results are consistent with earlier findings in the PNS neural crest stem cells (Morrison et al., 2000) and suggest that a transient activation of Notch is capable of repressing the neurogenic potential of neural stem cells. Moreover, it appears that this inhibition was irreversible, since neurogenesis did not resume after J1^{EC} removal.

We found that treatment of *Dll1^{lacZ/lacZ}* spheres with J1^{EC} during the differentiation phase also resulted in a decrease in neurons (Fig. 4I,V; from 47.9±2.0% to 8.0±0.7%; $p \leq 0.001$). This observation suggests that precursors which were allowed to adopt a neuronal fate in response to the Notch inactivity during the proliferation phase, were prevented from further differentiating into MAP2-positive cells upon Notch activation during the differentiation phase. Together, these data suggest that Notch signaling inhibits neuronal differentiation not only by preventing uncommitted precursors to acquire a neuronal fate but also at a later stage, when precursors which were already committed to a neuronal fate, will take on the decision to differentiate into MAP2-positive neurons.

Notch activation promotes the specification and accelerates the differentiation of astrocytes.

The effects of Notch activation on the production of astrocytes can be inferred from the same experiment (Fig. 4), which shows that the decrease in neurons is generally accompanied by an increase in the number of GFAP expressing cells. This gain of function effect is opposite to

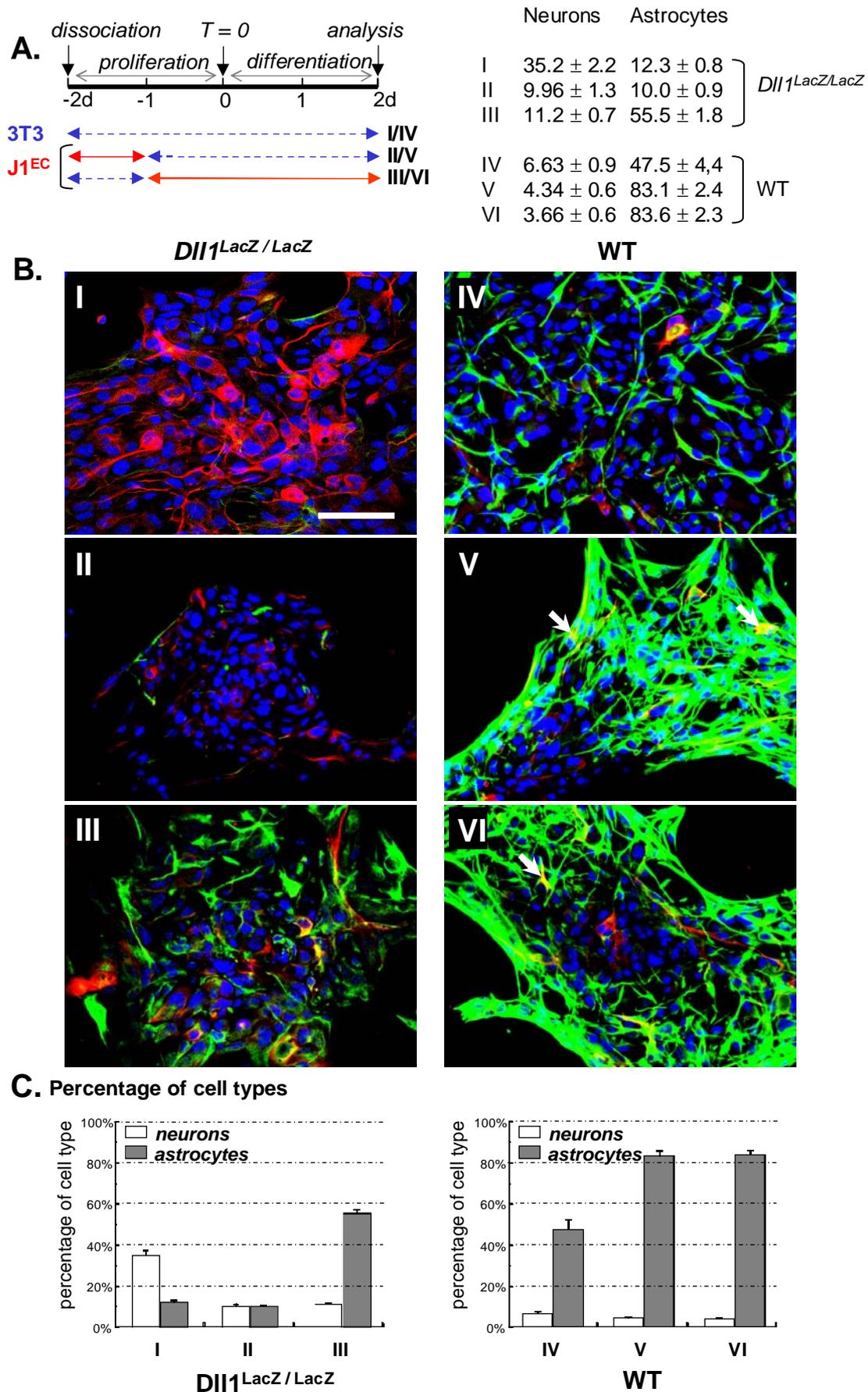


Figure 5. Effect of Notch activation on astrocytes differentiation in *Dll1*^{lacZ/lacZ} and wild type spheres.

Two-day old *Dll1*^{lacZ/lacZ} mutant (I, II, III) or WT (IV, V, VI) spheres were exposed to J1^{EC} for various time-intervals as described in (A). (B) Triple immunostaining involved anti-MAP2 (red), anti-GFAP (green) and TO-PRO (blue). Co-localized markers are rarely observed, and are likely to result from overlapping cells since they appear in fields that are particularly dense, and are probably biologically not significant; therefore, we consider the yellow signals (V, VI, arrows) as the presence of neurons (red) overlapping astrocytes (green). (C) Data are representative of two independent experiments. Bar scale: 50 μ m

the $Dll1^{lacZ/lacZ}$ phenotype, where the inability to activate the receptor (loss of function) resulted in an increase in neurons (compared to WT spheres) at the expense of astrocytes. Together these observations suggest that neurons versus astrocytes define a developmental decision controlled by Notch.

We find however that a transient exposure to $J1^{EC}$ for only 24 h, even though it was reproducibly sufficient to induce a decrease in neurons, was not always accompanied by a substantial increase in astrocytes (Fig. 4IV). Exposure to $J1^{EC}$ for longer times, reproducibly resulted in an increase of the production of mature astrocytes (Fig. 4I,II; from $11.2 \pm 1.1\%$ to $22.2 \pm 1.9\%$; $p \leq 0.001$), and to a lesser extent in Fig. 4V, (from $11.2 \pm 1.1\%$ to $17.2\% \pm 1.0\%$; $p \leq 0.05$).

These experiments were repeated under narrower time intervals on both $Dll1^{lacZ/lacZ}$ mutant and WT spheres (Fig. 5). The results showed that an activation time of 24 h after dissociation was sufficient to repress differentiation of neurons (from $35.2 \pm 2.2\%$ to $9.96 \pm 1.3\%$; $p \leq 0.001$, Fig. 5I,II) but not to trigger GFAP expression ($12.3 \pm 0.8\%$ and $10.0 \pm 0.9\%$; n.s., $p > 0.05$). In contrast, when the activation took place later and for longer time periods (from d-1 to d+2, Fig. 5III), GFAP-positive astrocytes increased up to more than 55% of total cell number. These results could be correlated to $J1^{EC}$ dilution experiments (Fig. 3C,D) and showed that the decrease in neurons was not necessarily accompanied by a correlative increase in astrocytes; these two phenomena could be disconnected by the temporal modulation of Notch function (transient activation during the proliferation phase) as well as by lowering the concentration of the inducing signal during the differentiation phase. We assume that these “disconnecting” conditions generate non-differentiated cells which appear as immuno-negative in the neurospheres and which may account for the strong decrease of the added percentage of neurons and astrocytes under the mutant and rescuing conditions (for instance in Fig. 4, from 59.1% in condition I versus 20-30% in conditions II-V). These cells are likely to undergo cell death by apoptosis as usually described for cells which were misdirected and do not differentiate properly (Lütolf et al., 2002). TUNEL analysis carried out under these experimental conditions showed an increase in TUNEL-positive cells with time (from 5.3% after 24 h on polyornithine to 13.3% after 5 d of differentiation); however, no difference could be observed between the different experimental conditions, suggesting that apoptosis due to the “misdirection” of cell lineage, could not be distinguished from apoptosis normally occurring in neurospheres differentiating in serum-free medium.

The early as well as late activation of Notch in WT spheres led to an increase in the number of GFAP-positive cells (Fig. 5IV,V,VI; from $47.5 \pm 4.4\%$ to more than 80%) in both cases. In

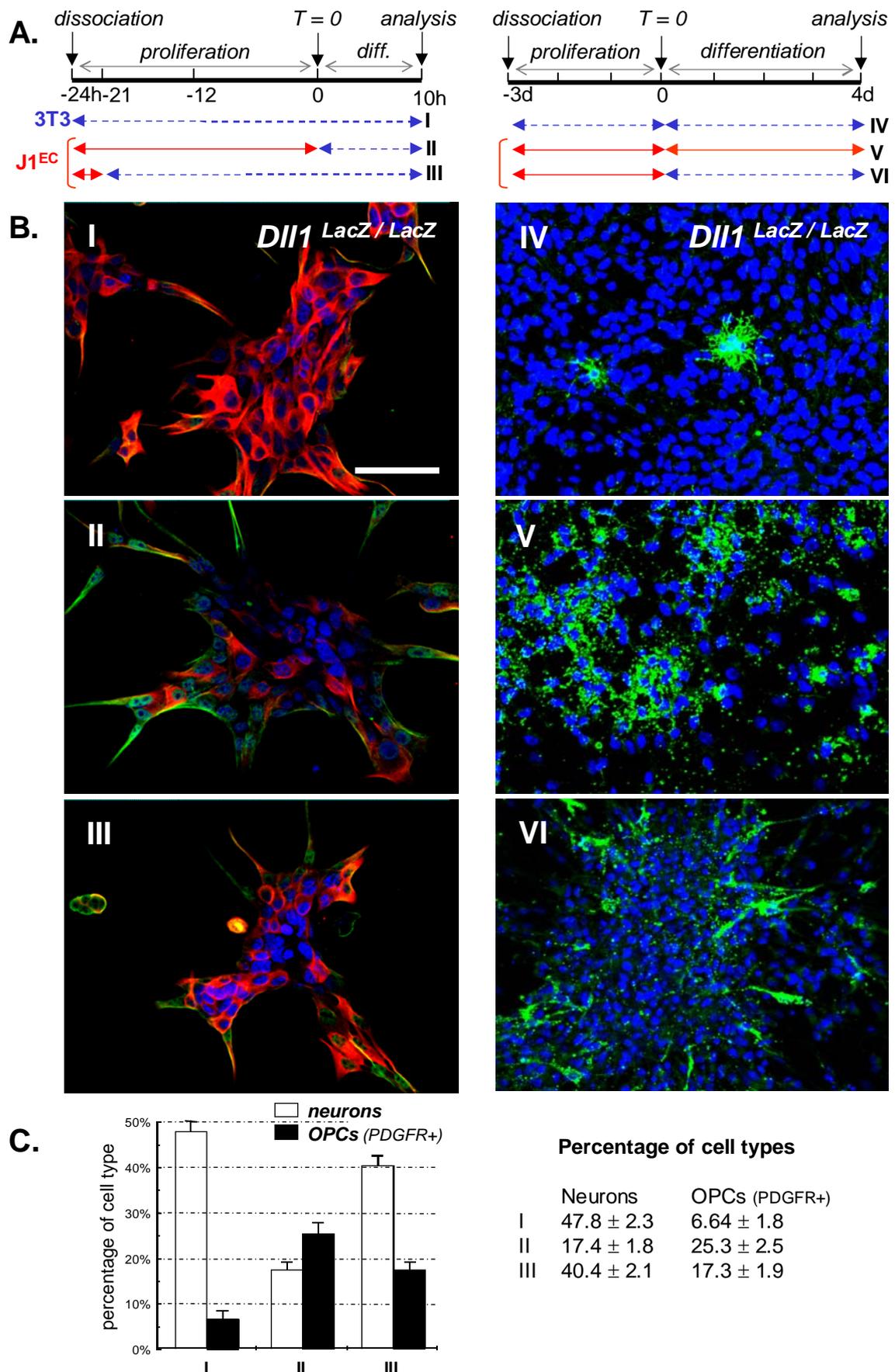


Figure 6. Effect of time-dependant activation of Notch in *DII1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres on the production of OPCs (left panel) and on oligodendrocytes (right panel).

(A) Experimental protocol: 24 h (left panel) or three day-old (right panel) *DII1^{lacZ/lacZ}* mutant spheres were incubated in the presence of J1^{EC} for various time-intervals as described in the schematic protocol. (B) Spheres were immunostained with anti-MAP2 (red), and anti-PDGFR (green) for OPCs production (left panel); anti-O4 (green) for oligodendrocytes production (right panel). (C) Quantitative estimations of neurons and OPCs (from I, II, III) was as described in experimental procedures. Data are representative of three independent experiments. Bar scale: 50 μ m

addition, GFAP-positive cells displayed a different morphology, indicative of a more mature state of development (a similar phenotype of WT spheres normally requires at least 5 days on polyornithine). These data suggest that the activation of Notch in WT spheres not only increases the number of astrocytes but also their rate of production and differentiation. We also noted that this increase in astrocytes was never accompanied by a total suppression of neurons (Fig. 5V,VI).

Notch activation promotes the production of OPCs and inhibits their subsequent differentiation into mature oligodendrocytes.

Examination of the $Dll1^{lacZ/lacZ}$ neurospheres showed that lack of $Dll1$ activity resulted in a decrease in the number of PDGFR-expressing cells. Paradoxically however, the few resultant O4-positive cells exhibited a well differentiated morphology when compared to poorly differentiated WT oligodendrocytes (Fig. 2VII,VIII). Together, these observations suggested that Notch signaling regulates the production of oligodendrocytes in two steps: first, by promoting the production of OPCs, and secondly, by inhibiting the differentiation of O4-expressing cells into more mature oligodendrocytes. This statement predicts that a transient treatment of $Dll1^{lacZ/lacZ}$ neurospheres with $J1^{EC}$ would result in an increase in PDGFR-positive cells and in their increased capacity to differentiate.

The positive effect of Notch signaling on the production of OPCs was observed when $Dll1^{lacZ/lacZ}$ spheres were transiently exposed to $J1^{EC}$ during the proliferation protocol and resulted in a significant increase in PDGFR-positive cells (Fig. 6I,II; from $6.64 \pm 1.8\%$ to $25.3 \pm 2.5\%$; $p \leq 0.001$). When $Dll1^{lacZ/lacZ}$ spheres were constantly treated with $J1^{EC}$ during both proliferation and differentiation (Fig. 6V), a large number of O4-expressing cells were observed (even though no precise quantitative estimation could be done), indicating that most of the PDGFR-positive cells turned into O4-positive cells, thereby suggesting that this process is not inhibited by Notch activity. However, these cells appeared as poorly differentiated, with morphology reminiscent of O4-positive cells in WT spheres (Fig. 2VII). In contrast, when $Dll1^{lacZ/lacZ}$ neurospheres were transiently exposed to $J1^{EC}$ (during the proliferation phase), a large number of O4-positive cells were observed, some of which displayed a rather differentiated morphology (compare V and VI in Fig. 6). Unfortunately, this assessment cannot be further substantiated by the use of markers for mature oligodendrocytes, such as MAG or MBP, since our cultures die before the oligodendrocytes can reach such a degree of maturation.

DISCUSSION

The generation and maintenance of neural stem cells in vitro, are not affected by the *Dll1*^{lacZ/lacZ} mutation.

Our observations contrast with earlier data showing that the *Hes1* and *Hes5* mutations were accompanied by a decrease in the number of embryonic neural stem cells which resulted in the generation of smaller and fewer neurospheres which could not be maintained over long periods of time (Ohtsuka et al., 2001; our unpublished observations). Furthermore, we could not obtain neurospheres from homozygous *Notch1* mutant embryos (our unpublished observations), consistent with the recent finding that neural stem cells were depleted in the embryonic brains of *RBP-Jk*^{-/-} and *Notch1*^{-/-} mice (Hitoshi et al., 2002); based on the analysis of *presenilin1* (*PS1*^{-/-}) mutant embryos, these authors found that Notch signaling had a role in the maintenance of neural stem cells in vivo. Due to the early lethality of *Dll1*^{lacZ/lacZ} embryos, we could not address the role of *Dll1* in the maintenance of neural stem cells in vivo; however, we observed no outstanding difference in behavior between WT and *Dll1*^{lacZ/lacZ} neurospheres in vitro, even though additional investigations are needed to further characterize the early steps of neurosphere formation and the respective contribution of symmetric and asymmetric divisions, for example.

Neurospheres recapitulate many of the pleiotropic effects of Notch signaling on neurogenesis.

Dll1^{lacZ/lacZ} mutant derived neurospheres show that Notch signal modulation affects qualitatively and quantitatively the outcome of neural stem cell differentiation. The differentiation phenotype of *Dll1*^{lacZ/lacZ} mutant spheres compared with that of WT spheres, exemplifies many earlier findings of Notch effects on neurogenesis: (i) Notch signaling inhibits neurogenesis (Fortini et al., 1993; Struhl et al., 1993; Nye et al., 1994; Artavanis-Tsakonas et al., 1995; 1999; Henrique et al., 1997); (ii) Notch signaling represses oligodendrocyte differentiation from OPCs (Wang et al., 1998) whereas recently, it has been found to promote the differentiation of astrocytes (Tanigaki et al., 2001; Lütolf et al., 2002). Whereas many of these data were obtained from systems comprising essentially one single cell type, neurospheres provide a global insight of Notch function on all three major cell types comprising the CNS, in an integrated system, making possible the analysis of their interactions.

Neural stem cells differentiate in response to Notch signaling with different sensitivity for neurons and astrocytes.

Gene-dosage effect can be inferred from the phenotype of *Dll1^{lacZ/+}* heterozygous neurospheres showing a similar (but weaker) phenotype of differentiation to that of homozygous neurospheres (Fig. 3A,B). We note however that the percentage of astrocytes in heterozygous spheres is strongly decreased (from 50.3% in WT to 23.2%), while the increase in neurons is restrained (from 20.3% in WT to 27.7% in *Dll1^{lacZ/+}*). This observation indicates that half a dose of Dll1 in heterozygous spheres is still sufficient to partly repress neurogenesis while insufficient to promote astrocytic differentiation.

This statement is further corroborated by the dilution experiment (Fig. 3D,E) where all dilutions of J1^{EC} result in the decrease in neurons, whereas the exogenous ligand triggers the appearance of GFAP-positive cells only for the highest concentrations. Together these results suggest that the inhibition of neurons is more sensitive to ligand induction than the promotion of astrocytes. The quantitative analysis of the results indicates that the response is “all-or-nothing” with different thresholds for neurons and astrocytes. A molecular support of these observations has been provided with the recent finding that *Ngn1*, a neural bHLH gene activated downstream of *MASH1*, was shown to directly inhibit the transcription of the astrocyte marker gene, *Gfap*, in a mechanism independent of its effect to promote neuronal differentiation (Sun et al., 2001). It is thus conceivable that a decrease in ligand concentration would induce a modulation in *Ngn1* production and would subsequently result in distinct and separate effects of *Ngn1* in activating neuronal differentiating genes and suppressing glial-specific genes. The finding that astrocytes are requiring more ligand to achieve differentiation may account for the variation of the percentage of astrocytes from one experiment to the other (compare astrocytes in Fig. 3, 4, 5) and may be attributed to the variation in the efficiency of the rescuing agent.

Neuronal versus glial lineage defines a developmental decision controlled by the Notch pathway.

Together the analysis of the *Dll1^{lacZ/lacZ}* mutant differentiation phenotype and the time-dependent modulation of the Notch pathway are consistent with the tentative model of lineage tree of neural stem cells described in Fig. 7.

We found that cells expressing neuronal markers are present in the small spheres that underwent few cells divisions. Moreover, a few neurons were always found in differentiating neurospheres, even under conditions where Notch was over-activated by addition of

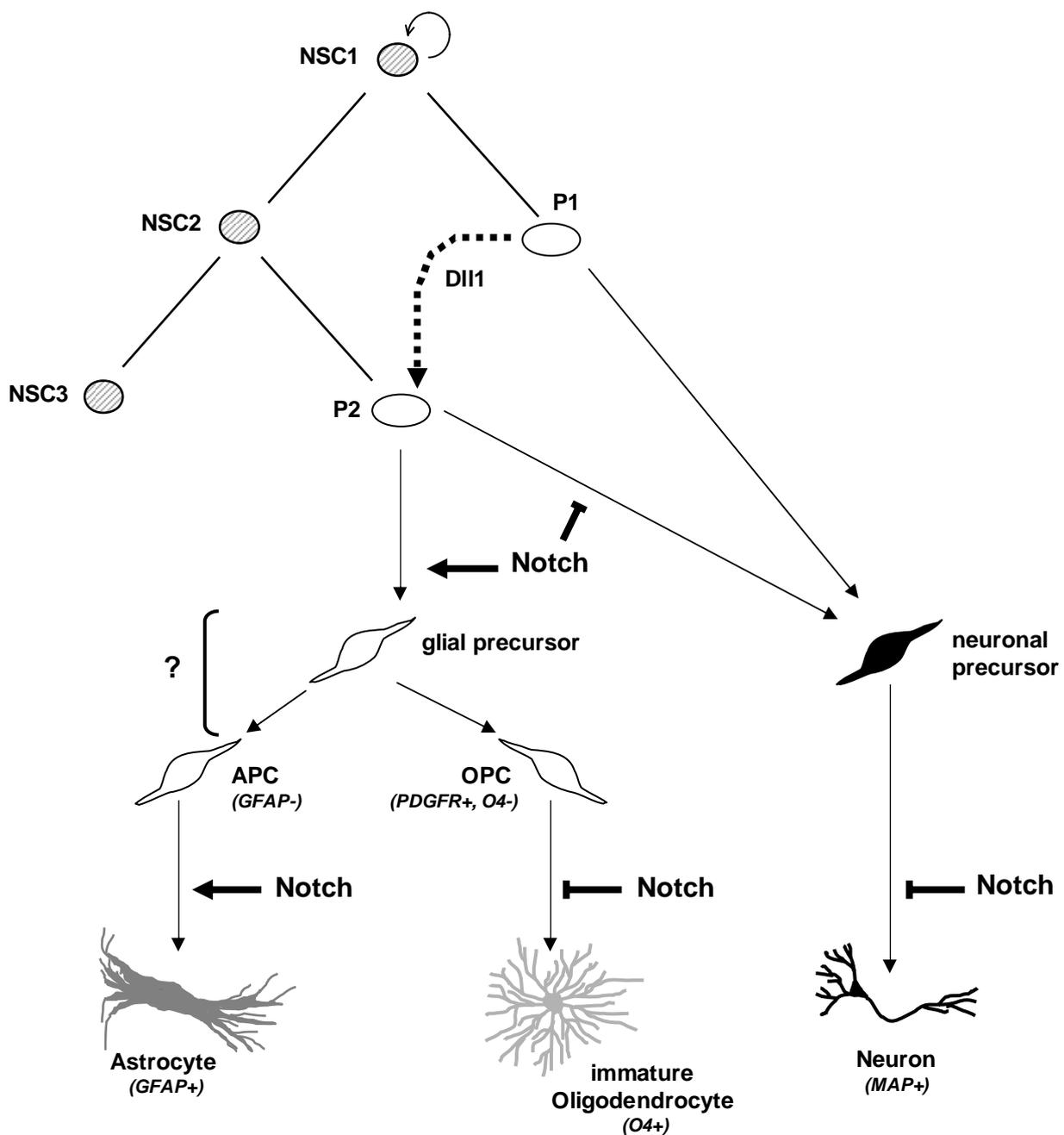


Figure 7. Tentative model for the role of Notch in the generation of neurons/glia from neural stem cell in neurospheres.

An initial EGF-responsive neural stem cell (NSC1), asymmetrically divides giving rise to a second stem cell (NSC2) and a progenitor (P1) which appears as inevitably fated to a neuronal identity. As a neuronal precursor, this cell is endowed with a limited proliferation capacity and is responsible for the few neurons generated under all circumstances. The asymmetrical division of NSC2 generates a second precursor (P2). The activation of Notch by (P1)-produced DII1 prevents (P2) from adopting a neuronal fate. Instead, P2 becomes irreversibly committed to a glial fate. The model postulates that P2 has the potential to acquire either the astrocytic or the oligodendroglial identity through a mechanism independent of Notch signaling. In a second step, Notch would affect the differentiation decision of the precursors already committed to a neuronal or a glial lineage. It would inhibit the differentiation of neurons and oligodendrocytes while promoting the differentiation of astrocytes.

1. La signalisation Delta/Notch agit sur la spécification et la différenciation des CSN en deux étapes

exogenous J1^{EC} to wild type neurospheres. Together, these observations suggest that, (i) in neurospheres, neurons are generated before glia and represent therefore the primary fate of neural stem cells; (ii) cells at the origin of neurospheres maintain their multipotency even after extensive ex vivo expansion (some of our neurosphere lines are more than two years old), contrary to the progressive loss of neurogenic capacity described for neural crest stem cells (Morrison et al., 2000; Kubu et al., 2002); (iii) P1 precursor, issued from the first asymmetrical division of the neural stem cell, adopts a neuronal fate and may be recalcitrant to exogenous Notch signals.

In contrast, our model predicts that Notch can be activated in P2 which as a result, would be prevented from adopting a neuronal fate. We anticipate that P1, being a neuronal precursor is likely to express *Dll1*, thus providing the signal capable of activating Notch in P2, thereby suppressing its neuronal fate. In the absence of reliable markers for Notch ligands, it is difficult to further argue this hypothesis.

The observation that the transient activation of Notch in *Dll1^{lacZ/lacZ}* spheres is sufficient to inhibit the production of neurons, and that this production does not resume upon removal of the ligand, suggests that Notch activation in P2 causes an apparently irreversible loss of neuronal potential. P2 is therefore committed to a glial fate instead of being maintained in an undifferentiated and multipotential state. This is consistent with the finding that in the PNS, transient activation of Notch in the neural crest stem cells was sufficient to cause an irreversible loss of neurogenic capacity accompanied by an accelerated glial differentiation (Morrison et al., 2000).

In contrast, our data are inconsistent with the recent finding that Notch signaling does not appear to have a role in the neuronal/glial fate switch (Hitoshi et al., 2002). Beside the trivial explanation that this discrepancy was due to differences in the experimental procedures, we believe it is more likely to be due to the fact that these authors were specifically addressing Notch1 behavior. This interpretation is further supported by recent experiments involving conditional ablation of Notch1 in neurospheres (V. Taylor, personal communication) and by our own results showing that neurospheres originating from embryos heterozygous for Notch1 (contrary to *Dll1^{lacZ/+}* spheres) show no quantitative modification in the proportion of neurons / astrocytes. (J.B; E.M. data not shown). This assumption also suggests that the manipulation of each of the ligands (*Dll1* or *Jagged1*) we are describing in the present study is likely to affect more than the Notch1 receptor.

Notch signaling controls the differentiation decisions of precursors already committed to a neuronal or glial lineage.

As a result of Notch function, precursors are generated that are fated either to a neuronal (P1), or a glial fate (P2). However, these precursors do not necessarily give rise to the more mature cell type expressing the appropriate differentiation marker. The experimental temporal modulation of Notch activity is consistent with the notion that neuron precursors as well as glial precursors could be blocked in a non-differentiating state, and that their further differentiation depends on secondary Notch signaling.

Neuronal precursors that were normally generated in *DIII^{lacZ/lacZ}* mutant spheres, due to the absence of Notch activity during the proliferation phase, do not develop into MAP2-expressing cells when Notch is activated during the differentiation phase (Fig. 4V).

On the contrary, precursors that were fated to a glial cell type upon transient activation of Notch will not differentiate into GFAP-expressing astrocytes (Fig. 4III,IV and 5II) unless Notch is re-activated through the presence of soluble ligand during the differentiation phase. We assume that these cells which were blocked in a non-differentiated state, are likely to undergo cell death by apoptosis as usually described for cells which were misdirected and do not differentiate properly (Lütolf et al., 2002).

In keeping with its role in the specification of cell types, Notch is positively acting for the differentiation of astrocytes and negatively acting for the differentiation of neurons. In contrast, Notch signaling has two contradictory effects on the production of oligodendrocytes. In a first step it acts positively to promote OPCs production, whereas it negatively regulates their subsequent differentiation into oligodendrocytes; only, the latter effect has been previously reported in other systems that were already committed to the oligodendroglial lineage (Wang et al., 1998; Kondo and Raff, 2000).

Our model postulates that P2 is restricted to a glial fate with the potential to differentiate into either astrocytes or oligodendrocytes. Due to the absence of specific markers, P2 cannot be identified in neurospheres. The existence of such a precursor with both astrocytic and oligodendroglial potential is controversial *in vivo*. The OPCs (formally called 0-2A) have long been investigated and have been shown to differentiate *in vitro* (in the presence of 10% FBS) into both oligodendrocytes and type-II astrocytes that are positive for both GFAP and A2B5. We never observed cells with characteristics of type-II astrocytes. P2 is therefore different from PDGFR cells which, we assume, are already committed to an oligodendroglial lineage and which are likely, under the conditions employed, to give rise only to 04-expressing oligodendrocytes.

Unfortunately, GFAP is likely to be a marker of astrocyte maturation rather than of lineage commitment, thereby hindering the direct comparison of OPCs with astrocyte precursors regarding Notch signaling. However, our observations show that in no case were oligodendrocytes and astrocytes mutually exclusive regarding Notch activation. We therefore conclude that the segregation between oligodendrocyte and astrocyte lineages is independent of Notch signaling and might derive from another mechanism, involving for example the transcription factors OLIG1 and OLIG2 (Zhou and Anderson, 2002).

It is clear that further experimentation will be necessary to test the validity of the differentiation model we propose. It is also clear however, that Notch signals seem to play an important role in the differentiation of the neural stem cells lineages. Further analysis of the exact role that Notch signals play in neural stem cells will not only provide insights into the biology and underlying mechanisms of these cells but also provide a potential tool for manipulating their fate for therapeutic purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Frank Pfrieder and Dr. Jeremy Garwood for critical reading of the manuscript. L. G. was a recipient of a fellowship from « Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) » and from « La Ligue contre le Cancer ». This work was supported by Grant from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) to E.M. We acknowledge the confocal microscopy facility service of IFR37.

REFERENCES

- Anderson, D. J.** (2001). Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron* **30**, 19-35.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Beckers, J., Clark, A., Wunsch, K., Hrabe De Angelis, M. and Gossler, A.** (1999). Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech Dev* **84**, 165-8.
- Fleming, R. J., Scottgale, T. N., Diederich, R. J. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). The gene Serrate encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* **4**, 2188-201.
- Fortini, M. E., Rebay, I., Caron, L. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1993). An activated Notch receptor blocks cell-fate commitment in the developing *Drosophila* eye. *Nature* **365**, 555-7.
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z. Z., Morrow, E. M. and Cepko, C. L.** (2000). *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* **26**, 383-94.

1. La signalisation Delta/Notch agit sur la spécification et la différenciation des CSN en deux étapes

- Gaiano, N., Nye, J. S. and Fishell, G.** (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**, 395-404.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J.** (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* **7**, 661-70.
- Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A. J., Nye, J. S., Conlon, R. A., Mak, T. W., Bernstein, A. and van der Kooy, D. (2002). Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* **16**, 846-58.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd and Gossler, A.** (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DIII. *Nature* **386**, 717-21.
- Hutchins, J. B.** (1995). Platelet-derived growth factor receptors of mouse central nervous system cells in vitro. *J Comp Neurol* **360**, 59-80.
- Klueg, K. M., Parody, T. R. and Muskavitch, M. A.** (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during *Drosophila* development. *Mol Biol Cell* **9**, 1709-23.
- Kondo, T. and Raff, M.** (2000). Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development* **127**, 2989-98.
- Kubu, C., Orimoto K., Morrison S., Weinmaster G., Anderson D. and Verdi D.** (2002). Developmental changes in Notch1 and numb expression mediated by local cell-cell interactions underlie progressively increasing delta sensitivity in neural crest stem cells. *Dev. Biol.* **244**, 199-214.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J. and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**, 909-17.
- Lütolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U. and Taylor, V.** (2002). Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* **129**, 373-85.
- Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G. and Anderson, D. J.** (2000). Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**, 499-510.
- Nye, J. S., Kopan, R. and Axel, R.** (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* **120**, 2421-30.
- Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* **276**, 30467-74.
- Qi, H., Rand, M. D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S. (1999). Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* **283**, 91-4.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S.** (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-10.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. and Rakic, P.** (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* **286**, 741-6.
- Shimizu, K., Chiba, S., Hosoya, N., Kumano, K., Saito, T., Kurokawa, M., Kanda, Y., Hamada, Y. and Hirai, H.** (2000a). Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2. *Mol Cell Biol* **20**, 6913-22.
- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K. and Hirai, H.** (2000b). Physical interaction of Delta1, Jagged1, and Jagged2 with Notch1 and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 385-9.
- Solecki, D. J., Liu, X. L., Tomoda, T., Fang, Y. and Hatten, M. E.** (2001). Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* **31**, 557-68.
- Struhl, G., Fitzgerald, K. and Greenwald, I.** (1993). Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* **74**, 331-45.
- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G. and Greenberg, M. E.** (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**, 365-76.

1. La signalisation Delta/Notch agit sur la spécification et la différenciation des CSN en deux étapes

Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H. and Honjo, T. (2001). Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**, 45-55.

Tropepe, V., Sibilio, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F. and van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* **208**, 166-88.

Varnum-Finney, B., Purton, L. E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K. A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G. et al. (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* **91**, 4084-91.

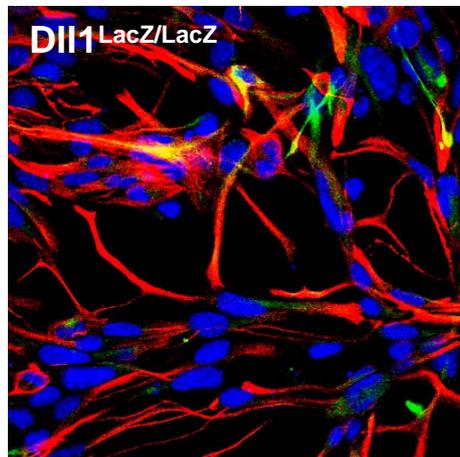
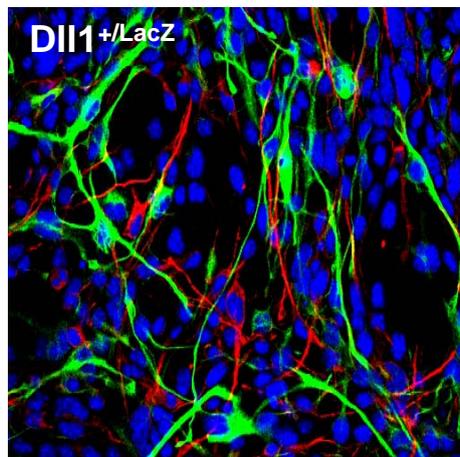
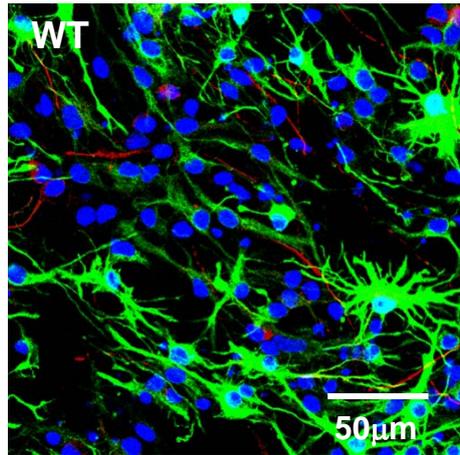
Vassin, H., Vielmetter, J. and Campos-Ortega, J. A. (1985). Genetic interactions in early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* **2**, 291-308.

Vescovi, A. L., Reynolds, B. A., Fraser, D. D. and Weiss, S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* **11**, 951-66.

Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G. and Barres, B. A. (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**, 63-75.

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C. and Reynolds, B. A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* **16**, 7599-609.

Zhou, Q. and Anderson, D. J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**, 61-73.



MAP2 (2a+2b) GFAP TOPRO

Figure 33. Phénotype des neurosphères hétérozygotes et homozygotes mutantes pour le gène *DII1*

1.4. Données complémentaires

1.4.1. Haploinsuffisance de *Dll1* dans la spécification et la différenciation des CSN

L'étude du phénotype de différenciation des neurosphères hétérozygotes pour *Dll1* (+/-), a montré que la perte d'une des deux copies du gène avait un effet sur la spécification et la différenciation des CSN dans le système des neurosphères (figure 33).

Cette observation est en contradiction avec le fait que in-vivo, les souris hétérozygotes pour *Dll1* ne présentent pas de phénotype particulier (Hrabe de Angelis et al., 1997). Plusieurs explications peuvent être avancées. La perte d'une copie de *Dll1* pourrait être fonctionnellement compensée par la présence d'autres ligands (Jagged par exemple) qui sont peu exprimés dans les neurosphères où ils se révèlent incapables de sauver le phénotype mutant. D'autre part, l'activation de la voie Notch par les différents ligands, dépend fortement du contexte génétique et notamment de l'activation des autres voies de signalisation Shh et Wnt. On ignore pour l'instant si ces voies sont à l'œuvre dans les neurosphères.

1.4.2. HES1 est nécessaire à l'autorenouvellement des CSN et inhibe la neurogenèse dans le système des neurosphères

1.4.2.1. Objectif de ces travaux

Faisant partie intégrante de la voie Notch, la cascade de régulation de facteurs basic helix-loop-helix (bHLH) joue un rôle essentiel dans la neurogenèse (Guillemot, 1999). Les gènes bHLH « positifs » tels que *Mash-1* ou *NeuroD* sont des gènes proneuraux dont l'expression est nécessaire pour que la cellule s'engage dans la voie neuroblastique. D'autres gènes bHLH, tel que *HES1* inhibent les gènes bHLH positifs. *HES1* est l'homologue murin de *Enhancer of Split (E(Spl))* qui régule négativement la neurogenèse chez la Drosophile. L'activation du récepteur Notch-1 par Delta-like-1 entraîne directement la transactivation de *HES1*, (Jarriault et al., 1998) c'est pourquoi nous sommes intéressés au rôle de *HES1* dans le système des neurosphères.

Les travaux décrits ici ont été les premiers travaux que j'ai entrepris lors de mon arrivée au laboratoire, lors d'un stage volontaire de Maîtrise et lors de mon DEA. Ces travaux n'ont pas été concrétisés par une publication, des résultats similaires et plus complets ayant été publiés par les groupes d'Okano et de Kageyama avant que nous ne terminions ce travail (Nakamura et al., 2000; Ohtsuka et al., 2001).

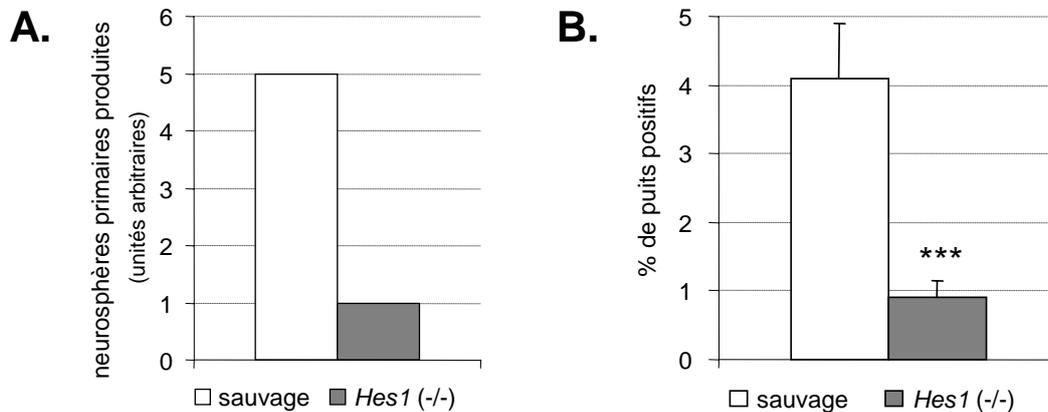


Figure 34. *Hes1* est nécessaire à l'autorenouvellement des CSN

(A) Proportion de neurosphères primaires obtenues à partir de tissu cérébral embryonnaire (E13,5)

Les valeurs données sont arbitraires. Une semaine après mise en culture du tissu cérébral embryonnaire sauvages et mutants *Hes1*(-/-), on observe la formation d'environ 5 fois moins de neurosphères primaires dans les cultures *Hes1* que dans les cultures sauvages (le nombre de neurosphères obtenues est rapporté au poids des télencéphales mis en culture).

(B) Analyse clonale de neurosphères sauvages (+/+) et *Hes1* (-/-)

Des neurosphères dissociées sont mises en culture dans des conditions clonales (une cellule par puits). Après dix jours, les puits contenant une ou plusieurs neurosphères secondaires sont comptés. On obtient significativement plus de puits contenant des neurosphères dans les cultures sauvages que dans les cultures mutantes *Hes1* (-/-).

1.4.2.2. *Obtention de neurosphères primaires à partir d'embryons mutants pour HES1*

Sur un total de 32 embryons issus de 3 portées utilisées (E13,5), 8 embryons homozygotes sauvages (+/+), 15 embryons hétérozygotes (+/-) et 9 embryons homozygotes mutants (-/-) pour le gène HES1 ont été identifiés. Il a été difficile d'obtenir des neurosphères à partir des d'embryons mutants pour HES1 : sur 9 embryons homozygotes mutants, nous n'avons pu obtenir des neurosphères qu'à partir de deux lignées. De même, seules 7 lignées hétérozygotes sur 15 embryons (+/-) ont été obtenues. Par contre, nous avons obtenu 7 lignées de sphères sauvages sur 8 embryons (+/+) montrant que la difficulté à obtenir des sphères était directement due à la perte de fonction du gène *HES1*. Pour chacun des embryons homozygotes mutants, nous avons observé la formation de près de 5 fois moins de sphères primaires que dans les cultures sauvages. La plupart des neurosphères dérivant clonalement d'une cellule souche multipotente, la proportion de sphères primaires obtenues reflète la proportion de CSN présentes dans le tissu d'origine. Ainsi, le faible nombre de sphères primaires obtenues dans les cultures HES1^{-/-} suggère une diminution de la population de CSN dans le cerveau des embryons homozygotes mutants.

Par ailleurs, la croissance des sphères HES1 à partir de cellules dissociées est beaucoup plus lente que dans le cas des sphères sauvages. Ainsi, pour obtenir des sphères de taille équivalente, utilisables dans les tests de différenciation ou de culture clonale, 5j de prolifération pour les cultures HES1^{-/-} sont nécessaires contre seulement 3j pour les sphères sauvages. De plus, nous avons perdu nos deux lignées mutantes après 4 à 7 semaines, sans avoir réussi à les amplifier, ce qui suggère que HES1 est essentiel au maintien des CSN.

1.4.2.3. *HES1 est nécessaire à l'autorenouvellement des CSN dans le système des neurosphères*

Afin d'étudier le rôle de *Hes1* sur l'autorenouvellement et le maintien des CSN, nous avons étudié les neurosphères HES1 dans des conditions de culture clonale.

Nous avons comparé deux lignées homozygotes mutantes HES1 avec quatre lignées sauvages. L'expérience a été renouvelée deux fois. Les neurosphères dissociées ont été mises en culture dans des plaques 96 puits (4 plaques par lignées) en condition clonale, à raison d'une cellule par puit (cf. méthodes expérimentales §1.3.4). Au bout de 10 jours, la plupart des cellules sont mortes. Des neurosphères ont été obtenues dans 4,1% des puits de la culture sauvage, mais dans seulement 0,9% des puits de la culture mutante HES1 (figure 34).

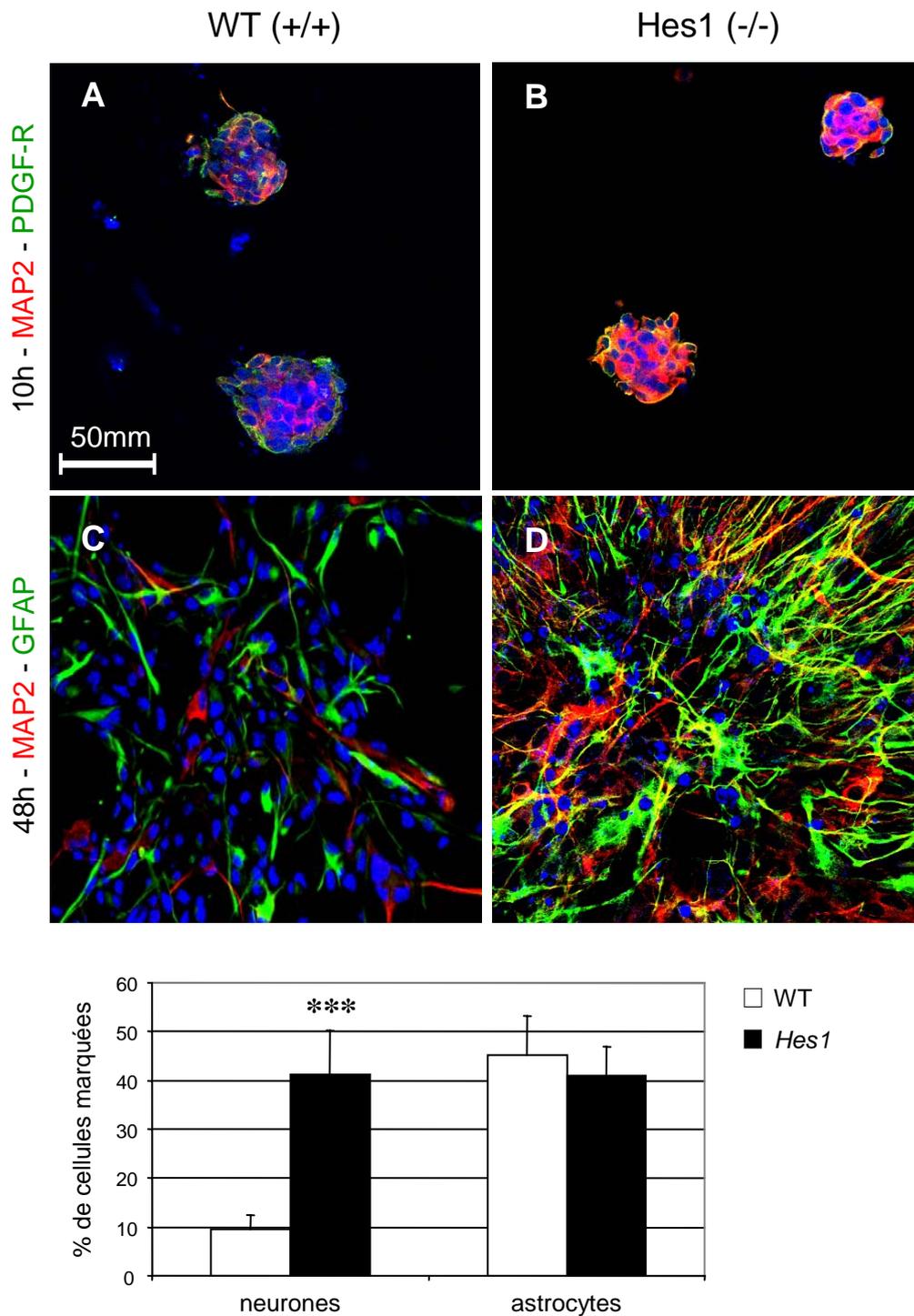


Figure 35. Phénotype de différenciation de neurosphères homozygotes mutantes pour *Hes1* comparé aux neurosphères de type sauvage.

(A, B, C, D) Phénotype de neurosphères sauvages (A et C) et homozygotes mutantes pour *Hes1* (B et D) après 10h (A, B) et 48h (C, D) de différenciation. En rouge, marquage anti-MAP2, spécifique des neurones. En vert, à 10h (A et C), marquage anti-PDGFR, spécifique des précurseurs d'oligodendrocytes ; à 48h (B et D), marquage anti-GFAP, spécifique des astrocytes. Les noyaux, marqués au TO-PRO apparaissent en bleu.

(E) Quantification des résultats.

Ce type d'expérience permet de quantifier à posteriori la proportion de CSN présentes dans les neurosphères, nous pouvons donc déduire que les neurosphères mutantes pour HES1 contiennent moins de cellules souches EGF dépendantes que les sphères sauvages. Il semblerait donc que HES1 soit nécessaire à l'autorenouvellement des CSN.

1.4.2.4. L'inactivation de HES1 entraîne une augmentation de la proportion de neurones sans modification de la proportion des cellules gliales

Nous avons montré que Dll1 joue un rôle direct dans le choix neurones/cellules gliales. Or, l'activation de Notch1 par Dll1 déclenche la transactivation directe de HES1 (Jarriault et al., 1998). Ainsi, étant donné nos résultats obtenus avec Dll1, il est légitime de se poser la question du rôle de *Hes1* dans le déterminisme neurones/cellules gliales dans le modèle des neurosphères.

Pour cela, nous avons utilisé le même protocole et les mêmes marqueurs de différenciation que pour l'étude des sphères mutantes Dll1.

Pour ne pas biaiser les résultats, nous avons étudié la différenciation de sphères de même taille. Ainsi, nous avons laissé proliférer les sphères sauvages 3 jours contre 5 jours pour les sphères HES1 homozygotes mutantes. Les sphères ont été déposées sur des lamelles de polyornithine et ont été analysées après 10h et 48h de différenciation.

Les résultats, présentés dans la figure 35, montrent que les sphères HES1^{-/-} présentent une forte augmentation de la proportion de cellules exprimant la MAP (2a+2b) en comparaison des sphères de type sauvage. Après 10h de différenciation (figure 35, AB), les cellules sauvages et mutantes apparaissent rondes, c'est à dire morphologiquement peu différenciées. Le marquage astrocytaire à la GFAP n'apparaît pas à un temps de différenciation si précoce (données non présentées) mais les marqueurs MAP(2a+2b) et PDGF-R α sont exprimés. Dans le cas des sphères mutantes HES1(-/-), on observe beaucoup plus de cellules MAP(2a+2b) positives (marquant la quasi-totalité des cellules) que dans les neurosphères sauvages. En revanche, aucune variation de PDGF-R α (marqueur oligodendrocytaire) n'est observée. Les neurosphères ne s'étant différenciées que 10 heures sont particulièrement compactes rendant tout comptage difficile.

Après 48 h de différenciation (figure 35, CD) on observe une augmentation significative de la proportion de cellules exprimant le marqueur neuronal MAP(2a+2b) dans les neurosphères mutantes pour HES1 (41,3% contre 9,5% dans les neurosphères sauvages). Par contre, aucune différence significative n'est observée pour les cellules GFAP positives.

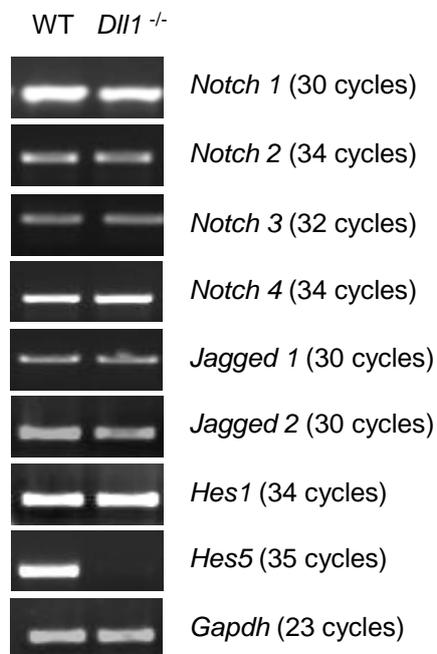


Figure 36. Comparaison de l'expression des gènes clés de la voie Notch dans les neurosphères *Dll1*^{-/-}

Des neurosphères sauvages (WT) ou homozygotes mutantes pour *Dll1* ont été dissociées et les cellules résultantes ont été mises à proliférer pendant 5 jours.

Le taux d'expression des gènes de la voie Notch a été analysé par RT-PCR. Le nombre de cycles utilisés pour chaque gène analysé est indiqué dans la figure.

Aucune expression de *Hes5* n'a été détectée dans les neurosphères *Dll1* mais aucune variation des autres gènes analysés n'a été observée.

Ainsi, nous pouvons conclure de ces observations que la mutation HES1 s'accompagne d'une augmentation de la proportion de neurones sans variation de la proportion d'astrocytes par rapport au nombre total de cellules. Ce résultat peut sembler étonnant vu que nous avons mis en évidence dans le cas des sphères mutantes pour le gène *Dll1* que l'activation de la voie Notch (dont HES1 est un des principaux effecteurs) a pour effet une inhibition de la neurogenèse et une augmentation de la gliogenèse. De plus, d'autres études ont montré que les gènes proneuraux à domaine bHLH *Mash-1* et *Ngn2* (directement inhibés par HES1) agissent doublement en activant la neurogenèse et en inhibant la gliogenèse (Nieto et al., 2001).

1.4.2.5. Les neurosphères mutantes pour HES1 se différencient plus rapidement que les sphères sauvages

Dès 48 h sur poly-ornithine (figure 35 CD), les cellules composant les sphères mutantes HES1(-/-) sont beaucoup mieux différenciées que dans le cas des sphères sauvages. Alors que les neurones et les astrocytes présents dans les sphères sauvages sont pour la plupart bipolaires, les cellules composant les sphères mutantes HES1 ont une différenciation morphologique qui n'est observable dans les sphères sauvages qu'après 4 à 6 jours de différenciation.

1.4.3. Analyse de l'expression des gènes clé de la voie Notch dans les neurosphères *Dll1*^{-/-}

Pour comprendre pourquoi *Dll1* joue sur le choix neurone/cellules gliales alors que HES1 ne semble pas le faire dans nos conditions expérimentales, nous avons analysé l'expression des principaux gènes de la voie Notch par RT-PCR semi-quantitative (figure 36).

Nous avons montré une sous-expression de HES5 dans les neurosphères homozygotes mutantes *Dll1*, laissant penser que l'activation de la voie Notch par *Dll1* pourrait avoir pour principal effet de réguler l'expression de HES5 et non de HES1 dans notre système. Ainsi, il semblerait que HES5, et non HES1 joue sur le déterminisme neurone/cellules gliales dans le système des neurosphères. Les résultats présentés dans le chapitre suivant semblent aller dans le même sens.

2. STAT3 contrôle le déterminisme entre neurones et cellules gliales par l'intermédiaire de Notch1

2.1. Contexte de ces travaux

Parallèlement au travail décrit dans le chapitre précédent, et dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR7123 (Equipe Bang LUU, Strasbourg) et la société MEIJI (Japon) qui a financé une partie de ce travail, j'ai entrepris de tester l'effet éventuel de petites molécules non peptidiques sur la différenciation des neurosphères.

Le laboratoire du Dr Bang LUU au cours de travaux effectués sur des neuroblastes en culture avaient en effet mis en évidence les propriétés neurotrophiques (caractérisées par une augmentation de la survie et de la croissance neuritique) du n-hexacosanol, un alcool gras à longue chaîne carbonnée (N=26), isolé à partir d'une plante tropicale aux propriétés cicatrisantes (Borg et al., 1987). Nous avons testé les effets de molécules dérivées du n-hexacosanol sur les neurosphères pour examiner leurs effets neurotrophiques éventuels, et leurs effets éventuel sur la spécification des CSN et sur la différenciation des neurones et cellules gliales du SNC.

L'une de ces molécules, la 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexen-1-one (tCFA15), brevetée par la société MEIJI, était déjà connue pour ses propriétés neurotrophiques (Gonzalez de Aguilar et al., 2001).

2.2. Résumé des travaux présentés

2.2.1. Effet du tCFA15 sur la différenciation des neurosphères

Nos résultats ont montré que le tCFA15 agit sur la différenciation des CSN en augmentant la proportion de neurones aux dépens des astrocytes et ceci d'une façon dose-dépendante. Cet effet rappelle celui qui avait été observé après inhibition de la voie Notch consécutivement à l'invalidation du gène codant le ligand Dll1. Ceci suggérait que le tCFA15 pouvait interagir avec la voie Notch. Pour tester cette hypothèse, nous avons examiné l'effet du tCFA15 sur l'expression de gènes clés de la voie Notch, par RT-PCR semi-quantitative. Nous avons trouvé que le tCFA15 diminue l'expression du récepteur Notch1 (effet observé dès 30 minutes après l'application du tCFA15). En revanche, les autres récepteurs Notch (-2, -3, -4) ne sont pas significativement affectés, pas plus que les ligands Jagged et Delta. Par contre, on observe

une diminution attendue de l'expression de HES5, cible directe de l'activation de Notch1, mais pas celle de HES1.

Nous nous sommes ensuite demandé si l'effet du tCFA15 pouvait être étendu aux types cellulaires constituant les neurosphères, c'est-à-dire à des cultures primaires de neurones, oligodendrocytes et astrocytes. Là encore, les effets du tCFA15 ont rappelé ceux généralement attribués à une inhibition de la voie Notch dans ces systèmes cellulaires (cf. également §2.4.1 pour les analyses immunocytochimiques). Le tCFA15 favorise en effet la différenciation des neurones alors qu'il inhibe celle des astrocytes.

2.2.2. Le tCFA15 passe par STAT3 pour inhiber Notch1

Puisque le tCFA15 agit sur le niveau d'expression de Notch1, nous avons recherché son action éventuelle sur les facteurs qui contrôlent cette expression. Malheureusement, cet aspect de la voie Notch était très peu documenté lorsque nous avons initié ces travaux, l'essentiel des travaux portant sur les mécanismes en aval de l'expression des gènes.

Notre attention a toutefois été attirée par deux facteurs de croissance, le CNTF et le LIF, qui agissent sur les CSN. Ces facteurs semblent à la fois maintenir les CSN dans un état indifférencié et favoriser leur différenciation en astrocytes. Ces propriétés, apparemment paradoxales rappellent celles décrites pour la fonction Notch et plus particulièrement Notch1 et suggèrent qu'un lien pourrait exister entre les deux voies.

Pour le montrer, nous avons traité les neurosphères simultanément au tCFA15 et au CNTF (ou LIF). Dans ces conditions, le tCFA15 n'a plus exercé d'effet inhibiteur sur l'expression de Notch1. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le CNTF stimule l'expression de Notch1 dans le système des neurosphères, comme cela a été également montré (Chojnacki et al., 2003). Le tCFA15 pourrait ne plus inhiber un trop fort taux de Notch1.

Comme le CNTF agit principalement par la voie de signalisation JAK/STAT, il était logique de penser que le CNTF stimule l'expression de Notch1 par l'intermédiaire de cette voie. Par extrapolation, nous avons émis l'hypothèse qu'en absence de CNTF dans les neurosphères, l'expression de Notch1 se trouvait également sous le contrôle de cette voie.

Nous nous sommes donc demandé si le tCF15 pouvait agir sur cette voie de signalisation et nous avons démontré que c'est le cas puisque le tCFA15 inhibe la tyrosine-phosphorylation de STAT3 (effet observé quelques minutes après l'application du tCFA15).

2.2.3. STAT3 régule l'expression de Notch1

Cette hypothèse, confirmée par des expériences d'inhibition/activation combinées de STAT3 et de Notch1, nous a permis d'établir un lien entre la voie JAK/STAT et la voie Notch : Nous avons montré que STAT3 régule l'expression de Notch1 ainsi que son effet dans la spécification neurones / cellules gliales à partir des CSN alors que son effet sur la différenciation des astrocytes semble indépendant de Notch.

2.2.4. Existence d'une boucle de régulation entre STAT3 et Notch1

Des travaux contemporains aux nôtres, publiés récemment par l'équipe de Gotoh (Kamakura et al., 2004) ont démontré que Notch1, par l'intermédiaire de HES et de JAK2 régule la phosphorylation de STAT3. Après avoir vérifié dans notre système que Notch1 régulait également l'activation de STAT3, nous avons proposé le modèle présenté en figure 6 de l'article, complétant les données que nous avons obtenues précédemment (Grandbarbe et al., 2003). Ainsi, nous proposons l'existence d'une boucle de régulation positive de Notch1 par STAT3 menant à une suractivation réciproque des deux voies. Nous discuterons du rôle éventuel de cette boucle dans la conclusion du manuscrit.

2.3. Article 2 : Notch1 is functionally and molecularly downstream of STAT3 in the determinism of neurons / glia from neural stem cells

Les travaux présentés dans cet article sont actuellement soumis à publication.

Publication 2

STAT3 contrôle le déterminisme entre
neurones et cellules gliales
par l'intermédiaire de Notch1

Notch1 is functionally and molecularly downstream of STAT3 in the determinism of neurons / glia from neural stem cells

Julien Bouissac ^{1,#}, Marie Paschaki ^{1,#}, Céline Girlanda-Jungès ², Gérard Labourdette ³, Jeremy Garwood ⁴, Bang Luu ² and Eliane Mohier ^{1,*}

¹ Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine, UPR 2356 CNRS, Strasbourg, France

² Chimie Organique des Substances Naturelles, UMR 7123, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

³ Physiopathologie du Système Nerveux, INSERM U375, Strasbourg, France

⁴ Centre de Neurochimie, CNRS, Strasbourg, France

J.B. and M.P. contributed equally to this work

* Corresponding author:

E. Mohier - UPR 2356 CNRS - 5 rue Blaise Pascal - 67084 Strasbourg Cedex – France
mohier@neurochem.u-strasbg.fr

RUNNING TITLE

STAT3 controls Notch1 in neurospheres

KEYWORDS

Neural stem cells, Notch1, STAT3, neurosphere, synthetic compound

SUMMARY

In a search for cell fate modifiers we found that tCFA15, a non-peptidic compound, increases the production of neurons at the expense of astrocytes in neural stem cell-derived neurospheres, an effect reminiscent of the Notch pathway inactivation. Molecular analysis showed that tCFA15 downregulates the expression of *Notch1* and subsequently of *Hes5*. In addition, tCFA15 decreased the level of STAT3 Y705 phosphorylation, suggesting a link between the two pathways. STAT3 and Notch signalings are known to promote astrocytic differentiation and to be involved in cell fate decision from multipotent progenitors. To establish a functional hierarchy between the two genes, we used gain and loss-of-function strategies. It showed that *Notch1* and STAT3 promote astrocyte differentiation, independently. In contrast, it showed that the effect of STAT3 on cell fate decision is mediated through *Notch1*, thereby raising the hypothesis that STAT3 could be a regulator of *Notch1* expression. Molecular analysis confirmed that STAT3 stimulates *Notch1* mRNA and protein expression. These findings brought together with recent data showing that *Notch1* activates STAT3 phosphorylation through the interaction of HES with JAK2 and STAT3 proteins, suggest that *Notch1* is involved in a positive regulatory feedback mechanism mediated through STAT3.

INTRODUCTION

The understanding of the mechanisms that regulate cell fate decisions and the subsequent possibility to influence them is particularly relevant in the case of neural stem cells regarding both the knowledge of their basic properties as well as their use as a source for cell therapy of neurological disorders.

Neural stem cells give rise to neurons and glia in a stepwise process, during which the progeny of neural stem cells progressively loses potential and gains differentiated properties. This process can be recapitulated in vitro: isolated neural stem cells proliferate to form floating colonies known as neurospheres. Neurospheres comprise neural stem cells (about 5%, ensuring self-renewal) and progenitors at various stages of development. When provided with a solid support where they attach, neurosphere cells ultimately differentiate into neurons, oligodendrocytes and astrocytes.

Because they allow distinguishing experimentally between the proliferation phase (when cell fate decisions are assumed to occur) and the differentiation phase (when differentiation strictly speaking occurs), neurospheres allow determining whether an agent is acting on cell fate decision or on differentiation, according to whether it is acting during either the proliferation or the differentiation phase, respectively.

Among the factors known to influence neural stem cell fate, Notch signaling plays a key role in cell fate decision and differentiation (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Gaiano and Fishell, 2002). Notch signaling is mediated by interactions between transmembrane receptor molecules encoded by the *Notch* genes (*Notch1-4*), and transmembrane ligands encoded by members of the *Delta* and *Jagged* gene families. Notch activation controls the expression of several bHLH transcription factors which ultimately influence developmental processes like differentiation, proliferation and apoptosis. In a previous study we have shown that the genetic impairment of Notch signaling in neurospheres caused a shift in the production of neurons versus glia which could be rescued by temporally restoring Notch activity. From those results, we have inferred that Notch signaling is acting in two steps. (i) first, it is acting as a switch to promote glial cell fate while it represses neuronal fate. (ii) In a second step, it acts on differentiation, promoting that of astrocytes while inhibiting that of neurons and oligodendrocytes (Grandbarbe et al., 2003).

In a screening for small molecules acting as cell fate modifiers, we selected 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one (hereafter reported as tCFA15), a compound combining a retinol-like ring with the partial structure of hexacosanol, a fatty alcohol

originally isolated from *Hygrophila erecta*, a tropical plant (Borg et al., 1987). We had shown previously, that tCFA15 promoted the survival and the differentiation of neurons of various origins (Gonzalez de Aguilar et al., 2001).

In the present study, we report that in neurospheres, tCFA15 promotes neurogenesis versus gliogenesis, in a manner reminiscent of Notch attenuation. In an attempt to characterize its mechanism of action, tCFA15 was shown to decrease specifically *Notch1* expression and to decrease STAT3 Y705 phosphorylation. This led us to investigate the correlation between the two pathways. Making use of gain and loss-of-function strategies, combined to the possibility of discriminating between cell fate decision and differentiation, we showed that *Notch1* and STAT3 promote astrocytes differentiation independently. In contrast, we showed that STAT3 effect on cell fate decision is mediated by *Notch1*, thus suggesting that STAT3 could be a regulator of *Notch1* expression. Molecular analysis confirmed that modulation of STAT3 results in a parallel variation in *Notch1* mRNA and protein. These findings, brought together with recent data (Kamakura et al., 2004) showing that *Notch1* activates STAT3 phosphorylation through the interaction of HES with JAK2 and STAT3 proteins, suggest a positive regulatory feedback mechanism of *Notch1* expression mediated through STAT3.

MATERIALS AND METHODS

Production, maintenance and differentiation of neurospheres

Primary neurospheres were prepared from telencephalons of wild type embryos (E14.5) and maintained as secondary neurospheres by successive passages in "neurosphere medium", a serum-free culture medium (Reynolds and Weiss, 1996) containing 10 ng/ml EGF (Sigma). After an average of 3 days, 50-100 neurospheres were plated onto poly-L-ornithine (Sigma)-coated coverslips in the presence of 2 ng/ml of EGF and 0.5% FBS (Gibco) to allow differentiation. *Delta-like-1* mutant neurospheres (*Dll1^{LacZ/LacZ}*) were prepared from homozygote mutant embryos (Grandbarbe et al., 2003).

Cell primary cultures

Primary cell cultures of murine cortical neurons were prepared from mouse embryos (E13.5) (Gensburger et al., 1986). Briefly, cells were plated at a concentration of $2 \cdot 10^5$ cells per cm^2 in poly-D-lysine coated Petri dishes (Nunc), in neurosphere medium without EGF. 24 hours after plating, the medium was replaced by fresh medium complemented with tCFA15 (see below). Cultures of astrocytes were established from newborn rat brains as described (Perraud et al.,

1988). The cells were grown in DMEM basal medium (Gibco) containing 10% FBS, for 30 days. One day before treatment, the culture medium was replaced by the neurosphere medium without EGF. Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) were established from cerebral hemispheres of newborn rats (Tryoen-Toth et al., 1998). They were grown for 2 days in the neurosphere medium without EGF in order to allow their differentiation into oligodendrocytes.

Treatment of cultures with tCFA15, CNTF and LIF

The 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one, designated as tCFA15 (Girlanda-Junges et al., 1998) was freshly dissolved in ethanol and added to cultures at the desired concentration, at a final dilution of 1 µl/ml. Medium was changed everyday with tCFA15 or ethanol. Recombinant human ciliary neurotrophic factor (CNTF, R&D Systems) and recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF, PeproTech Inc.) were added at 10 ng/ml.

Treatment with antisense oligonucleotides, STAT3 blocking peptide and GSI

The *Notch1* antisense oligonucleotides were designed against the EGF-like repeat region of the *Notch1* gene (Austin et al., 1995; Faux et al., 2001). The sequence of the *Notch1* antisense was 5'-GAAGTCATTAACACGCTGCACAC, and for the control-nonsense oligonucleotide it was 5'-TACATCAGCAGACTACACGAGTC. The antisense oligonucleotide for STAT3 was 5'-TCCAGTTTCTTAATTTGTTG, and for the control-sense oligonucleotide, was 5'-CAACAAATTAAGAAACTGGA (adapted from (Konnikova et al., 2003)). The oligonucleotides were added to neurosphere cultures at the concentration of 10 µM. The STAT3-SH2 domain-binding peptide (STAT3 blocking peptide; STAT3-bp) which blocks STAT3 activity by preventing the formation of STAT3 homodimers (Turkson et al., 2001) was added at 2 mM. Class XII γ-secretase inhibitor (GSI, Novagen) was added to neurospheres cultures at 2.5 mM (Weijzen et al., 2002). As GSI was dissolved in Dimethylsulfoxide (DMSO) and added to cultures at a final dilution of 0.1%, the control consisted in adding 1 µl/ml of DMSO (at this concentration, DMSO elicits no effect on the differentiation of neurospheres).

Transient transfection by intracellular Notch-1

Neurospheres were dissociated prior to transfection with expression vectors coding for intracellular *Notch1* (i.c. *Notch1*) (Aster et al., 1997) kindly provided by Dr Jon C. Aster. The

Genes	Sequence	Neurospheres	Neurons	Oligodendrocytes	Asrocytes
Notch1 F	5' - TGC CAA ATG CCT GCC AGA AT -3'	30	30	36	36
Notch1 R	5' - CAT GGA TCT TGT CCA TGC AG -3'				
Notch2 F	5' - GAG GCG ACT CTT CTG CTG TTG AAG A -3'	30	32	32	32
Notch2 R	5' - ATA GAG TCA CTG AGC TCT CGG ACA G -3'				
Notch3 F	5' - ACA CTG GGA GTT CTC TGT GAG -3'	32	35	35	35
Notch3 R	5' - GCT GTC TGC TGG CAT GGG ATA -3'				
Notch4 F	5' - CTT CTC GTC CTC CAG CTC AT -3'	34	38	37	34
Notch4 R	5' - GCT GAC ATC AGG GGT GTC AC -3'				
Dll-1 F	5' - GAA AGA CTC ATC AGC CGC CT -3'	32	32	35	35
Dll-1 R	5' - TTC CTG CAC GGC TTA TGG TG -3'				
Jagged1 F	5' - TTA CTG TGG GAC TCA TCA GC -3'	30	30	30	30
Jagged1 R	5' - TCA CAG TTC TGA CCC ATC CA -3'				
HES-1 F	5' - CAG CCA GTG TCA ACA CGA CAC -3'	34	38	38	34
HES-1 R	5' - CTC GTT CAT GCA CTC GCT GA -3'				
HES-5 F	5' - CGC ATC AAC AGC AGC ATA GAG-3'	35	35	38	38
HES-5 R	5' - TGG AAG TGG TAA AGC AGC TTC - 3'				
GAPDH F	5' - GAG TAT GTC GTG GAG TCT AC -3'	23	23	23	23
GAPDH R	5' - TGA GCT TCC CGT TCA GCT CT -3'				

Table 1. Sequence of primers and number of PCR cycles for each gene studied

empty vector (pcDNA3) was used as control. In all experiments 10 µg DNA and 120 mM CaCl₂ (Sigma) were used. The cells were then treated and harvested as described for immunostaining and western blot analyses.

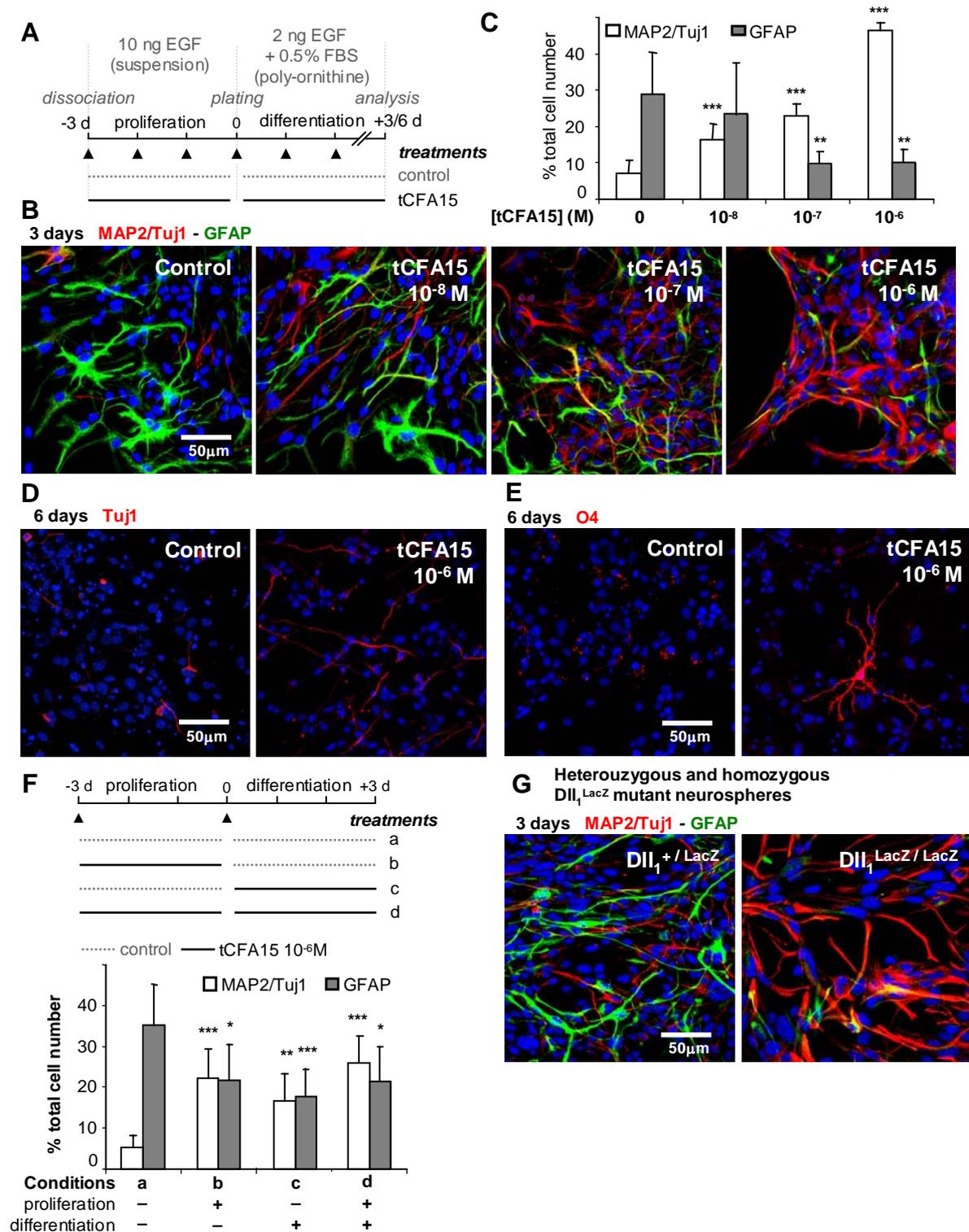
Immunostaining and statistical analysis

The treatment was as previously described (Grandbarbe et al., 2003). Cells were fixed for 20 minutes in 4% paraformaldehyde. Primary antibodies used were mouse monoclonal anti-MAP(2a+2b) (1/800, Sigma) specific for mitotic neurons, mouse monoclonal anti β3-tubulin for post-mitotic neurons (TuJ-1, 1/500, Convance), rabbit polyclonal anti-GFAP (1/1000, Dako) for astrocytes, rabbit anti-GalC (1/20, Boehringer) and mouse monoclonal O4 (1/50, Boehringer) for immature oligodendrocytes. Secondary antibodies were Alexa 555 conjugated (1/1000, Molecular Probes) or Alexa 488 conjugated (1/1000, Molecular Probes). Nuclei were counterstained with TOPRO-3 iodide (1/5000, Molecular Probes). Preparations were mounted in Aquamount (Polyscience) and viewed for triple immunofluorescence using a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

Data were based on three independent experiments; an average of 15 areas were randomly chosen and analysed per treatment and per experiment. The results were expressed as percentage of total cell number assessed from TO-PRO staining. The histograms are shown as means ±S.E.M. Group changes were assessed using one-way ANOVA. When statistical differences were obtained at the $P \leq 0.05$ level between groups, multiple pair-wise comparisons were made using the Turkey-Kramer method. In the figures, N.S. means that there was no significant difference between the control and the tested conditions. * means that $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

RT-PCR analysis

Three independent RNA samples (Chomczynski and Sacchi, 1987) were prepared for each experiment. The number of PCR cycles and specific primers (Table 1) were designed to be suitable for both rat and mice samples. Typical cycle conditions were 30 s at 94°C, 30 s at 55°C, and 30 s at 72°C for all the genes studied, except for *Hes5* for which the program was 30 s at 94°C, 30 s at 63°C and 2 min at 72°C. PCR experiments were performed in duplicate. Results are expressed as the percentage of gene expression in treated cells relative to untreated cells after normalisation to *Gapdh*. The relative mRNA levels were quantified by NIH Image 1.63 software and histograms are shown as means ±S.E.M.



Western-blot analysis

Briefly, cells were collected in a denaturing lysis buffer: SDS 3%, Tris HCl 62.5 mM, glycerin 10%, β -mercaptoethanol 3.3%, with protease inhibitor cocktail (Sigma) and 1 mM orthovanadate (Sigma) for phosphorylation studies. 25-50 μ g of proteins were separated by a 10% SDS-PAGE and transferred to a Hybond C nitrocellulose membrane (Amersham) before incubation with goat anti-mouse Notch1 antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-STAT3 (1/3000, Cell Signaling), rabbit anti-phospho-STAT3 (Tyr705) (1/1500, Cell Signaling) or rabbit anti-HES5 (1/400, Chemicon). Appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (anti-goat 1/4000, Santa Cruz; anti-rabbit 1/4000, Jackson ImmunoResearch) were used to detect immunoreactivity by the enhanced chemiluminescence method (Amersham). Relative amounts of proteins loaded on gels for SDS PAGE were estimated by Coomassie blue coloration. A common 33 kDa band on Coomassie stained gel was used as a loading control.

RESULTS

1. tCFA15 promotes neurons and inhibits astrocytes in neurospheres

When tCFA15 was added daily to a culture of neurospheres at different concentrations (from 10^{-8} M to 10^{-6} M), a progressive shift in the proportion of neurons versus astrocytes was observed by immunostaining with cell type-specific markers (Fig. 1B). The ratio of neurons increased from about 5% in the control to more than 45% in the presence of 10^{-6} M tCFA15 whereas astrocytes decreased from about 30% to 10% (Fig. 1C). Higher concentrations of the compound were cytotoxic as determined by MTT and Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes) viability tests (data not shown). TUNEL analysis and BrdU incorporation showed that the tCFA15 driven shift from astrocytes to neurons by tCFA15 was not due to selective glial apoptosis or neuronal proliferation (data not shown). The quantitative variations were accompanied by a drastic change in the morphology of each cell type: not only were neurons more numerous but they were also much larger with longer and more numerous processes indicating a more mature state of differentiation. Compare immunolabelling with β -III-tubulin (TuJ1 antibody) after 6 days of differentiation for tCFA15 treated and not treated neurospheres (Fig. 1D). This was consistent with the previous finding that tCFA15 has a neurotrophic activity (Gonzalez de Aguilar et al., 2001). GFAP-positive cells too, were morphologically different from those observed in the controls. They did not show the stellar shape of astrocytes and they extended instead numerous long and thin

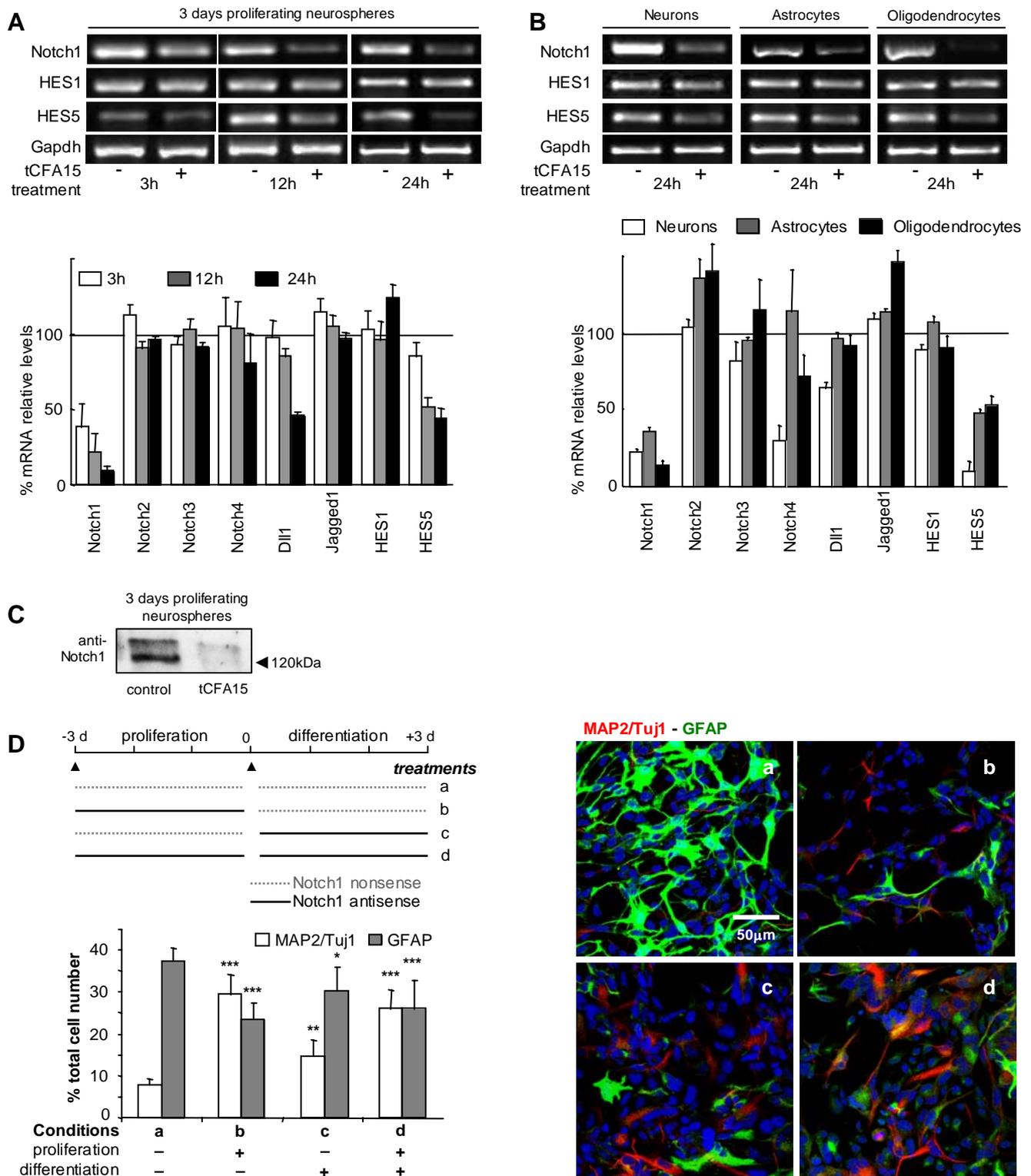


Figure 2. tCFA15 specifically decreases the level of *Notch1* mRNA and protein. (A) Neurospheres have been cultured in the absence or in the presence of tCFA15 (10^{-6} M) for 3, 12 or 24 hours before total RNA extraction for semi-quantitative RT-PCR analysis. The results are normalized relative to the level of *Gapdh* mRNA and are plotted as the amount relative to the reference sample. (B) Primary cultures of neurons, astrocytes and oligodendrocytes have been treated with tCFA15 (10^{-6} M) for 24 hours before total RNA extraction for semi-quantitative RT-PCR analysis. The quantification of the results is the same as for neurospheres. 3 independent experiments have been carried out for each condition. (C) Western blot analysis of Notch1 in neurospheres treated with tCFA15 (10^{-6} M) for 24 hours before protein extraction. The upper band identifies Notch1 transmembrane fragment. The lower band (120 kDa) identifies Notch1 intracellular fragment (ICN). (D) Effect of Notch1 down-regulation by antisense treatment on the generation of neurons and astrocytes in neurospheres. *Notch1* antisense oligonucleotides ($10 \mu\text{M}$) were added to dissociated neurospheres either at the beginning of the proliferation phase (b) or at the beginning of the differentiation phase (c) or both (d) as schematized in the diagram. The spheres were analysed after 3 days of differentiation. Neurospheres were immunostained with MAP2/Tuj1 (in red) for neurons and GFAP (in green) for astrocytes. Quantification of the results were as described in Fig. 1.

processes (Fig. 1B). The number of O4-expressing cells was strongly diminished, but the few remaining ones appeared more differentiated, suggesting that tCFA15 decreased the specification of oligodendrocytes but promoted their differentiation (Fig. 1E).

We next investigated whether tCFA15 acted on cell fate decision or differentiation. To address this, tCFA15 was added to neurospheres at the beginning of either the proliferation phase or the differentiation phase (Fig. 1F).

Preliminary time-course experiments revealed that tCFA15 was rapidly inactivated in the medium (within 6-12 hours) and that its effect progressively decreases in the treated cells (data not shown) indicating that the molecule could be used therefore for transient treatments. The observation that an application of tCFA15 (10^{-6} M) at the beginning of the proliferation phase only (Fig. 1F,b), was sufficient to induce a significant and irreversible increase in the number of MAP2/TuJ1-positive cells accompanied by a decrease in that of GFAP-positive cells, suggested that tCFA15 was acting on the cell fate decision of multipotential progenitors. When tCFA15 was applied during the differentiation phase only, a shift in neurons and astrocytes was also observed (Fig. 1F,c), suggesting that the product was also acting on the differentiation of already committed progenitors. These effects, together with those on neurogenesis and on OPC differentiation, copy closely the phenotypic modifications resulting from a genetic impairment of the Notch pathway in neurospheres derived from *Dll1^{LacZ/LacZ}* mutant embryos (Fig. 1G; Grandbarbe et al., 2003) and prompted us to investigate the effect of tCFA15 on the Notch signaling pathway.

2. tCFA15 causes a specific decrease in the level of *Notch1* mRNA

We assessed by semi-quantitative RT-PCR analysis, the effect of tCFA15 (10^{-6} M) on the mRNA level of several genes of the Notch pathway (*Notch1-4*, *Dll1*, *Jagged1*, *Hes1* and *Hes5*) in neurospheres grown for three days in suspension culture (Fig. 2A). All these genes were expressed in control neurospheres. After 24 hours of tCFA15 treatment, the expression of *Notch1* mRNA was downregulated. In contrast, the levels of *Notch2*, *Notch3* and *Notch4* mRNAs were not significantly affected. The decrease in *Notch1* mRNA level was accompanied by a decrease in the Notch1 products as shown by western analysis (Fig. 2C). The mRNA level of the Notch ligand *Dll1* was lower while *Jagged1* was not affected. The mRNA level of *Hes5*, a target gene of *Notch1* was diminished, however *Hes1* expression level was unaffected (Fig. 2A).

Time course experiments showed that tCFA15 treatment caused a significant decrease in *Notch1* mRNA as soon as 3 hours after the beginning of the treatment, whereas, in the same

experiment, the decrease in *Hes5* mRNA occurred only later (Fig. 2A), indicating that the effect of tCFA15 on *Hes5* mRNA was probably a consequence of *Notch1* functional decrease rather than a direct effect of tCFA15 on *Hes5* transcription.

We next tested whether the effect of tCFA15 could apply to each of the cell types comprising the neurospheres, by analysing its effect in primary cultures of neurons, astrocytes and oligodendrocytes (Fig. 2B). The same genes were analysed and found to be expressed in the cells analysed. Similar to the data from neurospheres, the results showed that *Notch1* and *Hes5* were significantly decreased in all the cell types tested. Other genes exhibited more contrasted responses depending on the cell type analyzed: *Dll1* mRNA level was strongly decreased in treated neurons while it was not modified in treated astrocytes or oligodendrocytes. *Notch4* showed a reproducible decrease in neurons and to a lesser extent, in oligodendrocytes. Although we noticed that the response of *Notch1* to tCFA15 treatment progressively decreased with the increasing differentiation of the cultures (data not shown), altogether, these data indicate that tCFA15 consistently decreases the level of *Notch1* mRNA and subsequently that of *Hes5*, in all the cell types analysed.

To determine whether the decrease in *Notch1* expression could account for the phenotypic effect of tCFA15 on neural stem cells, we examined the effect of *Notch1* antisense on cultures of neurospheres (Fig. 2D). The antisense oligonucleotide designed against the EGF coding region of the mouse *Notch1* gene has been reported to specifically reduce *Notch1* expression in retinal cells in vitro (Austin et al., 1995) and in neuroepithelial precursors (NEP) (Faux et al., 2001). The treatment of neurospheres with *Notch1* antisense oligonucleotides resulted in an increase in neurons and a decrease in astrocytes comparable (although slightly weaker) to that observed after tCFA15 treatment. Effects in the same way, but quantitatively different were observed when the treatment was applied during either proliferation and/or differentiation phases, indicating that *Notch1* was acting both on cell fate decision and on cell differentiation. These observations confirmed that *Notch1* controls the production of neurons versus glia from neural stem cells and further suggested that the tCFA15 effect was likely to be mediated by *Notch1*.

3. tCFA15 causes a decrease in tyrosine phosphorylation of STAT3

We next searched for the molecular mechanism of action of tCFA15. Because it is acting on *Notch1* mRNA level, tCFA15 is probably acting on an upstream regulator element of *Notch1*. So far, the mechanism of regulation of *Notch* genes remains largely unknown in vertebrates as well as in invertebrates, providing no hint for the identification of a putative target (Nickoloff

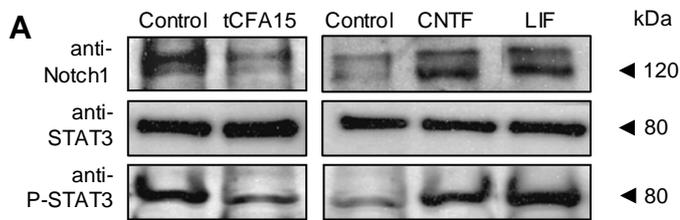
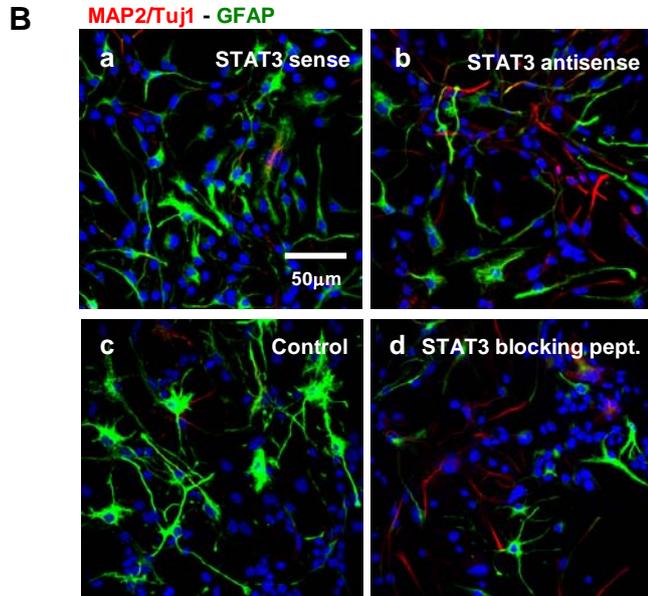
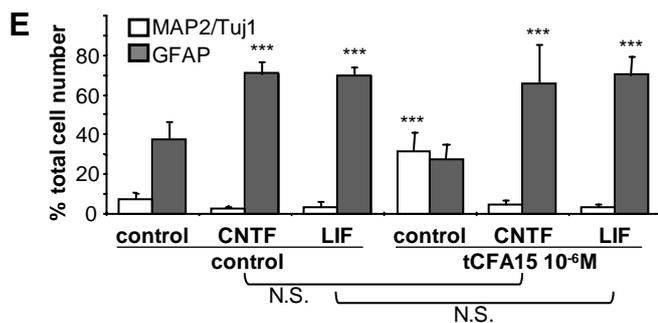
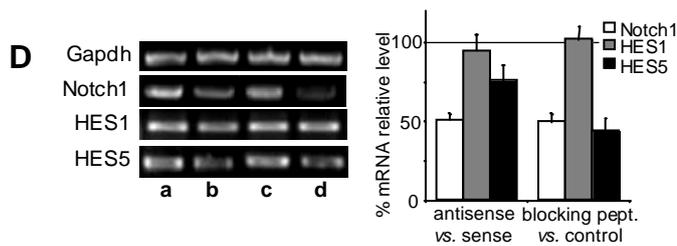
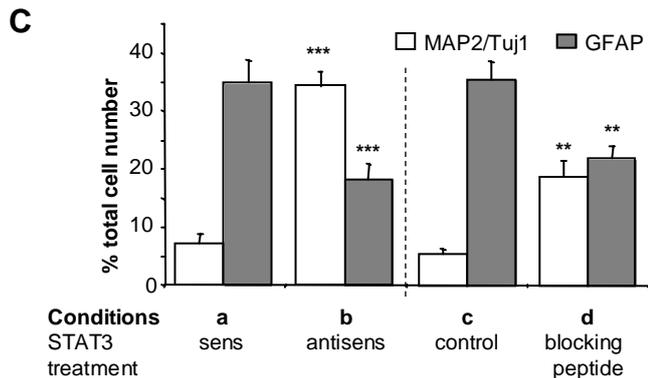


Figure 3. Notch1 is a STAT3 target gene in neurospheres. (A) tCFA15 causes a decrease in STAT3 phosphorylation. Neurospheres were grown in the absence or in the presence of either tCFA15 (10⁻⁶ M), CNTF (10 ng/ml) or LIF (10 ng/ml) for 1 day and then subjected to western analysis, with anti-Notch1, anti-STAT3 or anti-PY705-STAT3.



(B,C) STAT3 inhibition results in an increase in neurons at the expense of astrocytes. Neurospheres were treated with 10 mM of STAT3 sense (a), antisense (b) and 2 mM of STAT3 blocking peptide (d); the treatment was applied at the beginning of each of the proliferation and the differentiation phases, and spheres were then analysed by immunocytochemistry; the markers were the same as those used in Fig. 1. (C) Quantification of the results. (D) A sample of neurospheres corresponding to each of the above treatments was harvested at the end of the proliferation phase; the total mRNA was analysed by semi-quantitative RT-PCR. (E) Combined effects of tCFA15, CNTF and LIF on the generation of neurons and astrocytes in neurospheres. Neurospheres were treated during the proliferation and the differentiation phase with tCFA15 (10⁻⁶ M), CNTF (10 ng/ml) and LIF (10 ng/ml), alone or in combination. Neurons and astrocytes were identified by immunocytochemistry and quantified.



et al., 2003). One candidate was the JAK/STAT signaling which is involved in many of the same processes as Notch1, including the regulation of cell fate. The STAT proteins were identified as transcription factors critical in mediating cytokine driven signaling (Bonni et al., 1997; Bromberg and Darnell, 2000). These proteins are latent in the cytoplasm and become activated through tyrosine phosphorylation which typically occurs through JAK proteins, and which allows their dimerization and translocation to the nucleus. We therefore examined the possible effect of tCFA15 on the level of tyrosine phosphorylation of STAT3. We found that after tCFA15 treatment, although the relative levels of STAT3 remained unchanged (as shown by anti-STAT3 antibody), the level of STAT3 Y705 phosphorylation was strongly decreased (Fig. 3A, left). This observation suggested that tCFA15 acts on the STAT3 pathway and, together with the similarity of effects, led us to investigate the relationship between Notch1 and STAT3 signaling in neurospheres.

4. STAT3 controls neurogenesis versus gliogenesis in neural stem cell-derived neurospheres

Many in vitro studies have shown that both Notch and STAT3 pathways are implicated in astrocytic differentiation (Bonni et al., 1997; Ge et al., 2002; Tanigaki et al., 2001). Although this effect has sometimes been reported to be accompanied by a decrease in neurons, the role of STAT3 in the determinism of neuron vs glia has not been clearly established.

To test whether STAT3 controls the cell fate decisions from neural stem cells, we took a loss-of-function approach. STAT3 function in neurospheres was inhibited in one of two ways: (i) by blocking STAT3 by specific antisense oligonucleotides (Konnikova et al., 2003) and (ii) by blocking its activity, using a specific function blocking peptide that acts by specifically preventing the formation of STAT3 homodimers, thereby hampering the STAT3 DNA binding activity (Turkson et al., 2001). Both types of manipulations resulted in an increase in neurons at the expense of astrocytes (Fig. 3B,C). These results indicate that STAT3 inactivation mimics the phenotypic response of neurospheres to tCFA15 and to *Notch1* antisense oligonucleotides. Because they were qualitatively similar whether the treatment was applied during the growing phase or during the differentiation phase (data not shown), these results suggested that like *Notch1*, STAT3 was acting on cell fate decision and on differentiation.

We then examined the effects of STAT3 activation as it can be achieved by adding CNTF or LIF to cultures of neurospheres. Both factors increased the level of STAT3 Y705 phosphorylation in treated neurospheres (Fig. 3A, right). As expected, these treatments

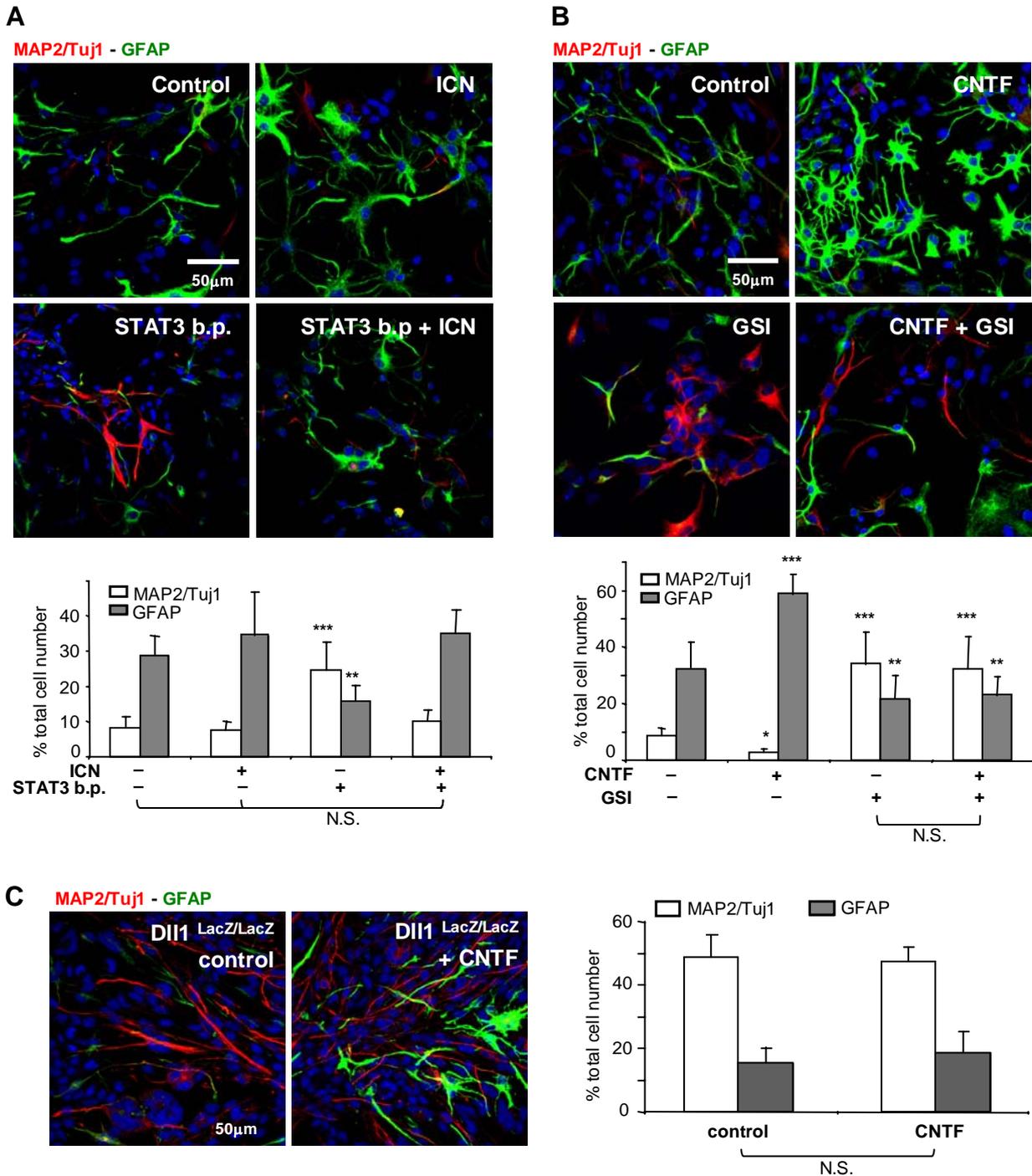


Figure 4. Combined loss-of-function and gain-of-function of *Notch1* and STAT3 defines a functional hierarchy between the two genes. (A) Immunocytochemistry of neurospheres treated with (or without) STAT3 blocking peptide (2 mM), and transfected with a plasmid containing an activated form of *Notch1* (ICN) or with an empty plasmid (control); the treatments were applied at the beginning of the proliferation phase; markers for immunocytochemistry and quantification of the results were the same as in Fig. 1. (B) Immunocytochemistry of neurospheres treated with CNTF (10 ng/ml) and GSI (2.5 mM) alone or in combination; markers and quantification of the results were the same as in Figure 1. (C) Effect of CNTF on *DII1^{LacZ/LacZ}* neurospheres. Neurospheres were prepared from embryos homozygous for *DII1* mutation as described in Grandbarbe et al., 2003; the neurospheres were treated (or not) with CNTF (20 ng/ml) at the beginning of the proliferation (3 days) and the differentiation (3 days) phases. The markers and the quantification of the results were the same as in Fig. 1.

resulted in a significant increase in the number of GFAP-positive cells and in a decrease in MAP2/TuJ1-positive cells (Fig. 3E). However, when neurospheres were treated with both tCFA15 and CNTF (or LIF), the effect of tCFA15 was abolished, probably due to the strong activation of STAT3 under these conditions. Altogether these data indicate that, in neural stem cell-derived neurospheres, STAT3 controls the generation of neurons versus glia in a manner closely resembling that of *Notch1*, supporting the notion of a link between the two pathways.

5. The effect of STAT3 on cell fate decision is mediated by Notch1

To establish a functional hierarchy between STAT3 and *Notch1*, we examined the effects of combining gain and loss-of-function for the two genes. Gain-of-function for Notch1 was achieved by transfecting the constitutively active intracellular domain of *Notch1* (ICN) into neurospheres; loss-of-function of Notch1 was achieved by treatment with a γ -secretase inhibitor (γ -secretase inhibitor, class XII) which blocks the cleavage of Notch1 necessary to release its active intracellular domain (Weijzen et al., 2002). The relevance of either treatment was assessed by checking the increase or decrease in *Hes5* mRNA expression as a result of *Notch1* activation or inhibition, respectively (Fig. 5B). Gain-of-function for STAT3 was achieved by CNTF which induces an increase in the level of STAT3 Y705 phosphorylation (Fig. 3A, right), while STAT3 loss-of-function was achieved by antisense oligonucleotides or blocking peptide as described above.

First, we combined gain-of-function for *Notch1* with loss-of-function of STAT3. Dissociated neurospheres were treated with STAT3 blocking peptide at the beginning of the proliferation phase, and immediately after, transfected with ICN; they were grown for 3 days and then plated to allow differentiation for an additional 3 days. Immunocytology showed that constitutively active *Notch1* (ICN) fragment was able to override the increased proportion of neurons and the decreased proportion of astrocytes induced by the inactivation of STAT3 (Fig. 4A). Similar results have been obtained with STAT3 antisense oligonucleotides and ICN transfection (data not shown). These data indicate that activated-*Notch1* effect on cell fate decision is not dependant on STAT3 and place *Notch1* downstream of STAT3 in this process. If, as inferred from the above experiments, *Notch1* is downstream of STAT3, then, the converse experiment whereby the *Notch1* loss-of-function is combined to STAT3 gain-of-function should recapitulate the *Notch1* phenotype, that is the effect of *Notch1* loss-of-function will not be rescued by activated STAT3. Indeed, we found that inactivation of Notch1 function by an inhibitor of γ -secretase (GSI) downregulated Hes5 protein (Fig. 5B)

and increased and decreased the number in neurons and astrocytes, respectively (Fig. 4B). However, when neurospheres were simultaneously treated with GSI and CNTF, the effect of GSI could not be reversed by CNTF even when GSI and CNTF concentrations were decreased and increased, respectively. Together, these data confirm that the effect of STAT3 on cell fate decision requires *Notch1* activity, and further supports the hypothesis that *Notch1* is downstream of STAT3.

6. *Notch1* and STAT3 act independently of each other to promote astrocytic differentiation

The differentiation of astrocytes as it can be followed by an increasing morphological complexity and an increase in immunolabelling with anti-GFAP, was stimulated by active *Notch1* (ICN) even in the presence of STAT3 blocking peptide (Fig. 4A), an effect which could be anticipated if *Notch1* is downstream of STAT3; surprisingly, in the presence of GSI, the astrocytic differentiation was still promoted by CNTF, and this despite the failure of CNTF to rescue the shift in neurons vs astrocytes induced by GSI (Fig. 4B). These observations suggest that *Notch1* and STAT3 stimulate astrocytic differentiation independently of each other. In order to test this further, we examined the effect of CNTF in neurospheres in which the inactivation of Notch signaling was due to the genetic impairment of the Notch ligand *Dll1* gene. Neurospheres prepared from *Dll1^{LacZ/LacZ}* mutant embryos differentiate mainly into neurons (Grandbarbe et al., 2003). In the presence of CNTF, although the ratio of astrocytes to neurons was unchanged with respect to the untreated *Dll1^{LacZ/LacZ}* neurospheres, astrocytes appeared significantly more differentiated than in the control (Fig. 4C), thus confirming the independence of STAT3 and Notch signalings in the process of astrocytic differentiation.

7. STAT3 controls the expression of *Notch1*

Although *Notch1* and STAT3 act independently for the differentiation of astrocytes, *Notch1* appears necessary for STAT3 to act on cell fate decision suggesting that *Notch1* is downstream of STAT3. To investigate directly the possible regulation of *Notch1* by STAT3 transcription factor, we examined the effect of STAT3 inhibition on *Notch1* mRNA level. Using either antisense oligonucleotides against STAT3 or the specific function blocking peptide described above, we observed a significant decrease in *Notch1* mRNA level, and a weaker but significant decrease in *Hes5* mRNA level (Fig. 3D). Next, we examined the effect of activating STAT3 by the addition of CNTF or LIF to growing neurospheres. Western blot

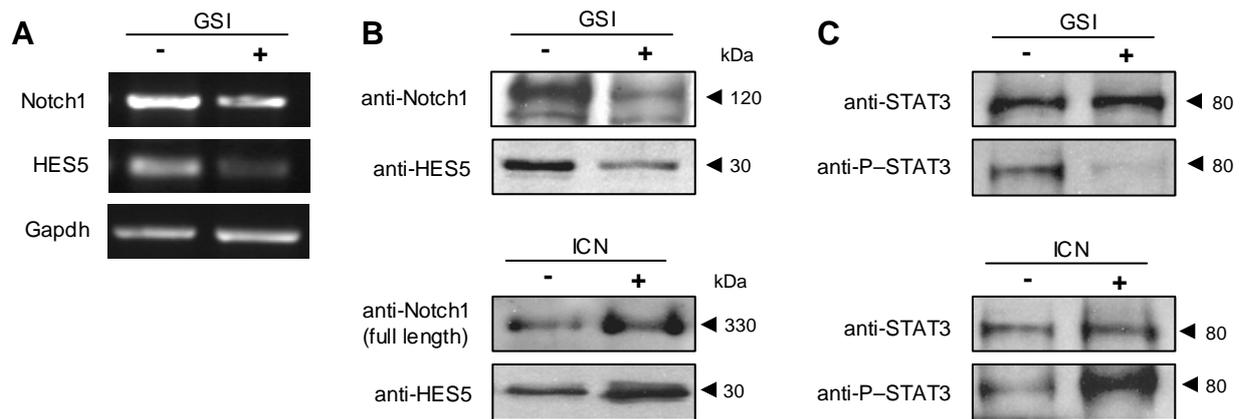


Figure 5. STAT3 and *Notch1* interaction results in a positive regulatory feedback of *Notch1* expression. (A) Dissociated neurospheres were treated with GSI (2.5 mM) for 24 hours and the expressions of *Notch1* and *Hes5* mRNA were analysed by semi-quantitative RT-PCR. Each PCF has been done in duplicate. (B, C) Dissociated neurospheres were treated with GSI (2.5 mM) or transfected with ICN. After 30 minutes (C) or 3 days (B) of treatment, total protein were analysed by western blot for the expression of Notch1, HES5 (B), and for PY705-STAT3 in comparison with STAT3 (C). For PY705-STAT3 analysis, orthovanadate was added to the lysis buffer.

analyses (Fig. 3A) showed that *Notch1* protein was significantly increased. Altogether, these data support the notion that STAT3 activity regulates the expression of *Notch1* gene although it cannot decide whether this effect is direct or not. The decrease in *Hes5* mRNA consecutive to STAT3 inhibition suggested that Notch1 function was altered; it also suggested that in neurospheres, *Notch1* is acting on *Hes5* but not on *Hes1*, since, like for tCFA15 treatment, no modification in the expression of this gene was ever observed in response to the modulation of STAT3 (Figs. 2A, 3D).

8. Auto-regulation of *Notch1* is mediated by STAT3

Recent data (Kamakura et al., 2004) have shown that HES proteins bind to JAK2 and STAT3, enhancing STAT3 phosphorylation and activation, suggesting that part of the action of Notch is to activate STAT3. Our data suggest that STAT3 operates upstream of Notch1. Although these results are apparently contradictory, they are not mutually exclusive. One explanation is that *Notch1* could be involved in a positive regulatory loop, mediated through STAT3 activation.

We verified that in neurospheres, *Notch1* was responsible for STAT3 phosphorylation; we inactivated Notch1 with GSI and we found a decrease in STAT3 Y705 phosphorylation (Fig. 5C); the converse gain-of-function experiment, in which we introduced the activated *Notch1* (ICN) resulted in an increase in STAT3 Y705 phosphorylation (Fig. 5C). Combining these data together with the data presented above, suggests a loop whereby *Notch1* positively regulates its own expression. If this is true, one prediction is that inhibiting Notch1 function would result in a decrease in *Notch1* expression. We examined the level of *Notch1* mRNA in GSI-treated neurospheres and found that it was indeed significantly decreased with respect to the control (Fig. 5A). We further examined the effect of GSI treatment in comparison with ICN treatment by western analysis. Consistent with the decrease in *Notch1* mRNA level, we observed a decrease in both the Notch1 transmembrane fragment, and the ICN fragment (Fig. 5B). Whereas the decrease in ICN (lower fragment, 120 kDa) could be anticipated from the inability for Notch1 protein to undergo γ -secretase mediated cleavage, the decrease in the transmembrane fragment logically reflects the decrease in *Notch1* expression, although it may also be due to an impairment of the degradation process. On the contrary, treatment of neurospheres with ICN resulted in an increase in Notch1 full length (330 kDa) which we assume, is a consequence of *Notch1* activation. Together these data suggest that *Notch1* expression is controlled by a positive regulatory loop, involving the activation of STAT3 and its own expression controlled by STAT3.

DISCUSSION

Initially selected for its action on neural stem cells, tCFA15 was found to regulate *Notch1* expression. In addition, it was found to decrease the tyrosine phosphorylation of STAT3, leading us to postulate a link between both signaling pathways. The use of gain and loss-of-function strategies, commonly used in genetics for establishing a hierarchy between genes likely involved in the same processes, combined to the possibility of distinguishing experimentally between the processes of cell fate decision (occurring during the proliferation phase) and of differentiation (occurring during the differentiation phase), make the neural stem cells-derived neurospheres, a system particularly relevant for the study of the functional relationship between *Notch1* and STAT3.

Notch signaling has long been reported to play a critical role in the production of neurons versus glia from multipotential progenitors. However, whether this role could be attributed to one specific *Notch* gene remained controversial (Hitoshi et al., 2002). Here, antisense experiments allowed us to assign this effect to *Notch1* and showed that in neurospheres, *Notch1* was implicated in both cell fate decision and differentiation. Moreover, the finding that tCFA15-induced *Notch1* downregulation was consistently accompanied by a decrease in *Hes5* mRNA level but not in *Hes1* mRNA level, suggested that the effect of *Notch1* on cell fate decision was mediated by *Hes5* and that *Hes1* could not compensate for the impairment of *Hes5*. This observation is consistent with the finding that *Dll1^{LacZ/LacZ}* homozygous mutant had a reduced level of *Hes5* mRNA while *Hes1* was not affected (M.P and J.B unpublished observations; (Yun et al., 2002)) and might give account for the similarity in the tCFA15-generated phenotype with that of *Dll1^{LacZ/LacZ}* mutant neurospheres. Together, these findings suggest that *Hes5* was the effector of *Notch1* function in the determinism of neurons vs glia from neural stem cells.

Like *Notch1*, STAT3 has been reported to be involved in seemingly opposite morphogenetic processes like maintaining embryonic stem cell in an undifferentiated state and promoting astrocytic differentiation; for STAT3, the latter function has been mostly inferred from the effect of cytokines, essentially CNTF and LIF (Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998); however, the role of STAT3 in cell fate decision has not clearly been established. Here we show that the inhibition of STAT3 at either the mRNA level (antisense oligonucleotides) or the functional level (STAT3 blocking peptide) resulted in a shift in the production of neurons vs. astrocytes, closely resembling that resulting from *Notch1* attenuation. The fact that this

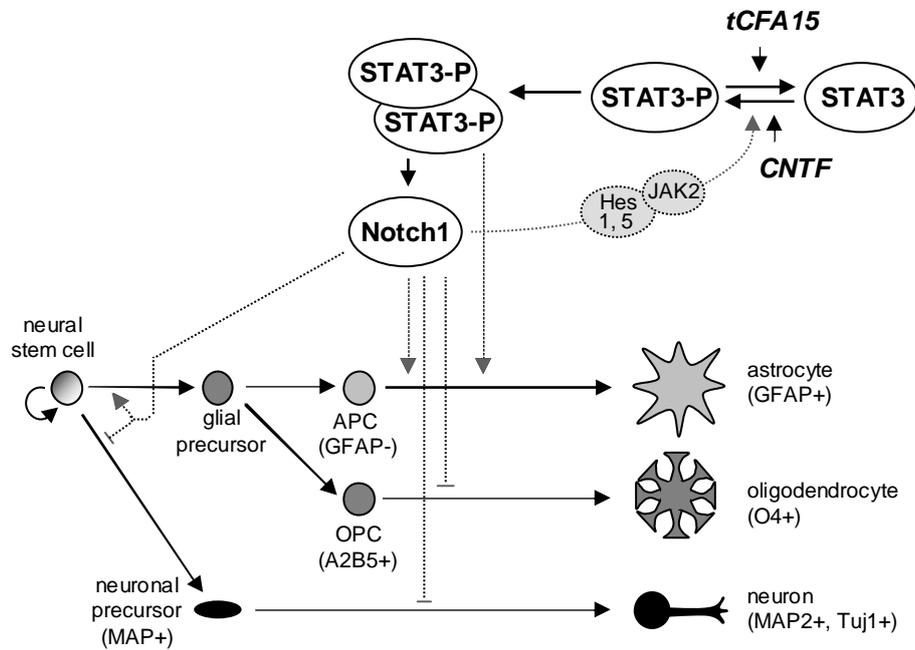


Figure 6. Recapitulative diagram of the cross-talk between *Notch1* and *STAT3* signalings in the generation of neurons and glia in neural stem cell-derived neurospheres. This diagram cumulates the data of the present study in addition to our earlier observations (Grandbarbe et al., 2003), together with the data of (Kamakura et al., 2004). In a first step, Notch signaling is acting as a switch that promotes glial fate while inhibiting neuronal fate. In a second step, Notch signaling inhibits the differentiation of neurons and oligodendrocytes, while it stimulates that of astrocytes. The *Notch1* antisense experiments reported in the present study allow assigning this role specifically to *Notch1*. From both the functional rescue experiments and the molecular data reported here, we assume that *STAT3* is upstream of *Notch1* and might be a direct or indirect positive regulator element for its expression. The inactivation of *STAT3* shows that it is acting on cell fate decision. Because it requires the activation of *Notch1*, we assume that this effect of *STAT3* is in fact mediated by *Notch1*. On the contrary, we show that *STAT3* can stimulate the differentiation of astrocytes independently of *Notch1* activity, consistent with the finding that the *GFAP* gene expression is directly regulated by *STAT3* (Bonni et al., 1997; Nakashima et al., 1999; Pitman et al., 2004). A similar effect on *GFAP* has been reported for *Notch1* (Ge et al., 2002; Tanigaki et al., 2001), showing that the differentiation of astrocytes can be achieved by either *STAT3* or *Notch1*, independently of each other. Recent data (Kamakura et al., 2004) have shown that HES proteins bind to JAK2 to promote phosphorylation of *STAT3*, thereby suggesting that *Notch1* is necessary for *STAT3* activity. We found that this was true also in the neurosphere system, thus suggesting a positive regulatory control between *Notch1* and *STAT3*.

effect took place when the treatment was transiently applied during the proliferation phase suggested that similarly to *Notch1*, STAT3 acts as a modulator of cell fate decision.

Gain-of-function and loss-of-function experiments have shown that the active form of *Notch1* could functionally rescue the phenotypic shift in neurons vs. astrocytes, in response to the impairment of STAT3, thus placing *Notch1* downstream of STAT3; reciprocally, the activation of STAT3 could not rescue the effect of *Notch1* inactivation, further confirming the hierarchical relationship between *Notch1* and STAT3. This finding was corroborated by molecular analysis showing that under the same conditions, the inactivation of STAT3 consistently resulted in a decrease in *Notch1* expression. Together, these data suggest that the effect of STAT3 on cell fate decision was likely mediated through *Notch1* (Fig. 6).

In the same set of experiments, we observed that activated *Notch1* (ICN) stimulated astrocytes differentiation even in the absence of STAT3, and conversely, that the CNTF-mediated activation of STAT3 stimulated the differentiation of astrocytes, in the absence of *Notch1* activity. This suggested that *Notch1* and STAT3 signalings were acting independently of each other in the differentiation of astrocytes. Although this is consistent with earlier data (Bonni et al., 1997; Ge et al., 2002; Rajan and McKay, 1998; Tanigaki et al., 2001) it is at odds with the recent finding (Kamakura et al., 2004) that activated *Notch1* (ICN) failed to stimulate the astrocytic differentiation from neuroepithelial cells from E12 mouse telencephalon previously infected with a dominant-negative of STAT3, thereby establishing that the effect of *Notch1* for promoting astrocyte differentiation was dependent on STAT3. Beside the trivial explanation that this discrepancy resulted from experimental differences such as the presence of 10% serum and the cellular material and preparation of neurospheres, we believe that this difference may actually reflect the intricacy of the relationship between *Notch1* and STAT3 signalings. Indeed, the effect of *Notch1* as well as STAT3 on the generation of astrocytes has long been reported to be highly cellular and context-dependent.

In the present study, we observed that tCFA15 was decreasing *Notch1* mRNA in cell primary cultures of neurons, oligodendrocytes and astrocytes, indicating that in all the neurosphere-comprising cell types, STAT3 was likely controlling the expression of *Notch1*. However, it would be presumptive to suppose that this is a general process, indeed we believe that this control might be limited to certain cell types depending intimately on their context. For example, the STAT3-dependent control of *Notch1* expression may provide a molecular support to the transition from LIF-dependent primitive neural stem cells to EGF-dependent definitive neural stem cells, a process which has been demonstrated to require Notch1 signaling in vitro and in vivo (Hitoshi et al., 2004). LIF-dependent primitive neural stem cells

possess some pluripotency in generating nonneural progeny, a feature which is lost with the transition to the definitive neural stem cells; the finding that this process is *Notch1* dependent, supports the notion that the induction of *Notch1* by STAT3 might then be considered as associated with the loss of pluripotency. It is interesting to note that primitive neural stem cells express *Hes1* while *Notch1* and *Dll1* are not expressed, showing that Notch signaling is not the sole regulator of *Hes1* expression. In contrast, *Hes5* expression occurs only later and is concomitant with that of *Notch1* and *Dll1*, suggesting that in this context, *Hes5* is a downstream target gene of *Notch1* closely mimicking the relationship between *Notch1* and *Hes5* we have observed in neurospheres.

Likewise, we assume that the relationship between *Notch1* and STAT3 may be stage-dependent. Indeed, we observed that cell cultures were all the more sensitive to tCFA15 treatment that they were young. In more differentiated cultures, the effect of tCFA15 on Notch1 expression was lessened and even abolished (data not shown). These observations could be related to the inability to identify *Notch1* as a putative target of STAT3 in microarray screenings of mature fibroblast cultures (David Frank, personal communication). A more precise investigation is needed on the state of differentiation-dependence of the relationship between *Notch1* and STAT3.

So far, very few synthetic small molecules have been described that can be used to selectively control stem cell proliferation and differentiation (Ding and Schultz, 2004). More work is needed to explore the mechanism of action of tCFA15 by defining some of its primary targets. Its negative effect on tyrosine phosphorylation is likely not restricted to STAT3. Despite its putative widespread effect, tCFA15 is quite specific to *Notch1*: other Notch receptors and ligands (with the exception of *Dll1*), although expressed in neurospheres, were not significantly altered by tCFA15. This suggests that different mechanisms of regulation are used by different Notch receptors and ligands, consistent with their distinct spatio-temporal patterns of expression during development.

It is interesting to note that the attenuation of Notch signaling resulting from tCFA15 treatment, creates conditions globally propitious for neural regeneration: it stimulates the production of neurons and the differentiation of oligodendrocytes thus potentially promoting myelinisation, while it diminishes astroglialogenesis, thereby which might reduce reactive gliosis, a major disadvantage to neural regenerative therapies. tCFA15 thus appears as providing a trail for developing molecules with a potential therapeutic use whether or not accompanied by neural stem cell transplantation.

ACKNOWLEDGEMENTS

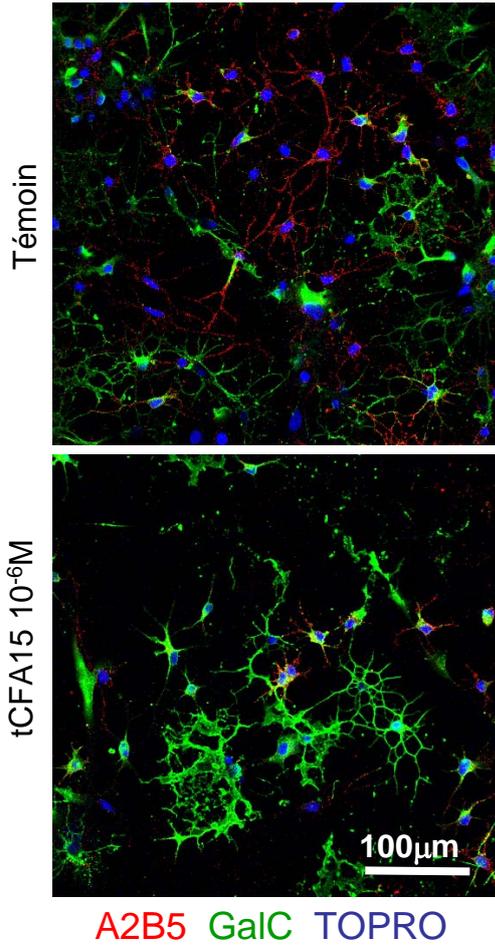
We are grateful to Drs F. Pfrieder and R. Ladher for fruitful discussions and for critical reading of the manuscript, to H. Beekenkamp, I. Leray and A. L'Hernault for skilful assistance. We thank Dr J. Aster for providing us with the ICN plasmid. This work was supported by grants from Meiji Dairies Corporation (Japan) to E.M. J.B was a recipient of a fellowship from l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and M.P. was a recipient of a fellowship from la Ligue Contre le Cancer / Région Alsace. We are grateful to Pr J.L. Mandel (IGBMC, Strasbourg) for supplying us with oligonucleotides facility. We acknowledge the confocal facility of IFR 37 (Strasbourg).

REFERENCES

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Aster, J. C., Robertson, E. S., Hasserjian, R. P., Turner, J. R., Kieff, E. and Sklar, J.** (1997). Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J Biol Chem* **272**, 11336-43.
- Austin, C. P., Feldman, D. E., Ida, J. A., Jr. and Cepko, C. L.** (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* **121**, 3637-50.
- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. and Greenberg, M. E. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**, 477-83.
- Borg, J., Toazara, J., Hietter, H., Henry, M., Schmitt, G. and Luu, B.** (1987). Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons. *FEBS Lett* **213**, 406-10.
- Bromberg, J. and Darnell, J. E., Jr.** (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468-73.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- Ding, S. and Schultz, P. G.** (2004). A role for chemistry in stem cell biology. *Nat Biotechnol* **22**, 833-40.
- Faux, C. H., Turnley, A. M., Epa, R., Cappai, R. and Bartlett, P. F.** (2001). Interactions between fibroblast growth factors and Notch regulate neuronal differentiation. *J Neurosci* **21**, 5587-96.
- Gaiano, N. and Fishell, G.** (2002). The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci* **25**, 471-90.
- Ge, W., Martinowich, K., Wu, X., He, F., Miyamoto, A., Fan, G., Weinmaster, G. and Sun, Y. E.** (2002). Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *J Neurosci Res* **69**, 848-60.
- Gensburger, C., Labourdette, G. and Sensenbrenner, M.** (1986). Influence of meningeal cells on the proliferation and maturation of rat neuroblasts in culture. *Exp Brain Res* **63**, 321-30.
- Girlanda-Junges, C., Keyling-Bilger, F., Schmitt, G. and Luu, B.** (1998). Effect of cyclohexenonic long chain fatty alcohols on neurite outgrowth. Study on structure-activity relationship. *Tetrahedron* **54**, 7735-7748.

- Gonzalez de Aguilar, J. L., Girlanda-Junges, C., Coowar, D., Duportail, G., Loeffler, J. P. and Luu, B.** (2001). Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res* **920**, 65-73.
- Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabe de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S. and Mohier, E.** (2003). Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* **130**, 1391-402.
- Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A. J., Nye, J. S., Conlon, R. A., Mak, T. W., Bernstein, A. and van der Kooy, D. (2002). Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* **16**, 846-58.
- Hitoshi, S., Seaberg, R. M., Kosciak, C., Alexson, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Tsuji, S. and van der Kooy, D.** (2004). Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* **18**, 1806-11.
- Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y.** (2004). Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* **6**, 547-54.
- Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M. M. and Cochran, B. H.** (2003). Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer* **3**, 23.
- Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M. and Taga, T. (1999). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* **19**, 5429-34.
- Nickoloff, B. J., Osborne, B. A. and Miele, L.** (2003). Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* **22**, 6598-608.
- Perraud, F., Besnard, F., Pettmann, B., Sensenbrenner, M. and Labourdette, G.** (1988). Effects of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF and bFGF) on the proliferation and the glutamine synthetase expression of rat astroblasts in culture. *Glia* **1**, 124-31.
- Pitman, M., Emery, B., Binder, M., Wang, S., Butzkueven, H. and Kilpatrick, T. J.** (2004). LIF receptor signaling modulates neural stem cell renewal. *Mol Cell Neurosci* **27**, 255-66.
- Rajan, P. and McKay, R. D.** (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**, 3620-9.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S.** (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**, 1-13.
- Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H. and Honjo, T.** (2001). Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**, 45-55.
- Tryoen-Toth, P., Gaveriaux-Ruff, C., Maderspach, K. and Labourdette, G.** (1998). Regulation of kappa-opioid receptor mRNA level by cyclic AMP and growth factors in cultured rat glial cells. *Brain Res Mol Brain Res* **55**, 141-50.
- Turkson, J., Ryan, D., Kim, J. S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sefti, S., Hamilton, A. D. and Jove, R.** (2001). Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* **276**, 45443-55.
- Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S. M., Zlobin, A., Osborne, B. A., Gottipati, S., Aster, J. C., Hahn, W. C. et al. (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* **8**, 979-86.
- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G. and Rubenstein, J. L.** (2002). Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* **129**, 5029-40

A. Précurseurs d'oligodendrocytes



B. Astrocytes

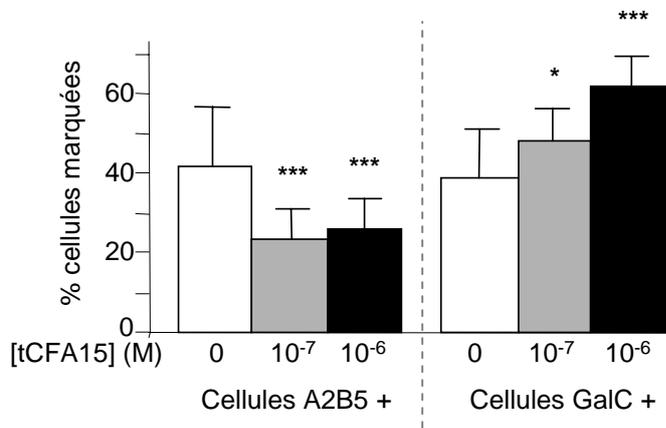
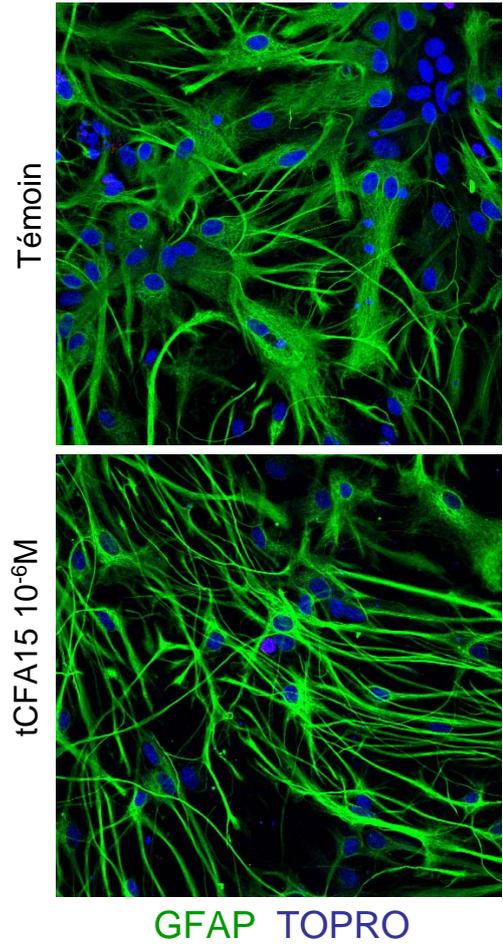


Figure 37. Le tCFA15 active la différenciation des oligodendrocytes et inhibe celle des astrocytes

2.4. Données complémentaires

2.4.1. Cytotoxicité du tCFA15

La toxicité du tCFA15 a été évaluée à l'aide de deux tests de mortalité cellulaire. Des neurosphères de trois jours ont été dissociées et les cellules ont été laissées à différencier dans du milieu « neurosphères » avec 0,2 ng d'EGF et 0,5% de FBS. Après 24 heures de différenciation, les cellules ont été traitées au tCFA15 24 heures avant de procéder aux tests MTT et « Live Dead Viability Cytotoxicity kit ». Les résultats obtenus ont montré que le tCFA15 n'est pas significativement cytotoxique à des concentrations inférieures ou égales à 10^{-6} M. Nous avons par ailleurs vérifié par des tests d'incorporation de BrdU et des analyses TUNEL que le phénotype observé en présence de tCFA15 n'est dû ni à une apoptose spécifique des astrocytes ni à une prolifération accrue des neurones.

2.4.2. Effet du tCFA15 sur la différenciation de cultures primaires de neurones, oligodendrocytes et astrocytes

Les travaux de Sestan (Sestan et al., 1999) ont montré qu'une activation de la voie Notch inhibe la différenciation des neurones in-vivo et en culture. Comme le tCFA15 inhibe la voie Notch dans les cultures primaires de neurones, il devrait promouvoir leur différenciation. Cela a été montré par des travaux effectués par le laboratoire de Bang Luu (Gonzalez de Aguilar et al., 2001; Hanbali et al., 2004) et nous avons observé le même phénomène dans nos cultures primaires de neurones.

Des travaux effectués par Wang (Wang et al., 1998), ont montré que l'activation de la voie Notch inhibe la différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes (OPC). Nous avons également montré au laboratoire que l'inactivation de la voie Notch favorisait la différenciation des OPC (Grandbarbe et al., 2003). Si le tCFA15 inhibe la voie Notch dans les cultures primaires d'oligodendrocytes, il devrait pouvoir favoriser la différenciation des cultures de précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) (figure 37A). Pour le savoir, nous avons utilisé une culture primaire contenant essentiellement des OPC. Ceux-ci sont mis à différencier pendant 2 jours en présence de tCFA15 à 10^{-6} M ou d'éthanol. Après de 2 jours de différenciation et dans la condition contrôle, les oligodendrocytes sont peu développés : il y a beaucoup de cellules A2B5 positives (précurseurs d'oligodendrocytes) et les cellules GalC positives ne semblent pas très étalées. La présence du tCFA15 induit donc une augmentation du nombre de cellules GalC positives et une diminution du nombre de cellules A2B5

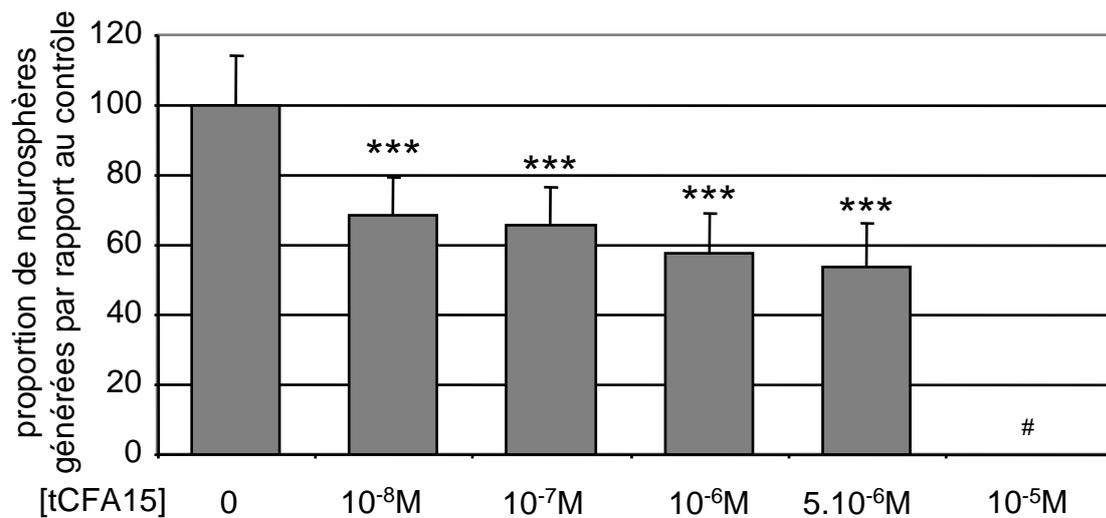


Figure 38. Le tCFA15 inhibe l'autorenouvellement des cellules souches neurales

Des neurosphères parfaitement dissociées ont été mises en culture en condition semi-clonale à la concentration de 4000 cellules/cm² en présence ou en absence de tCFA15. Après 5 jours de culture, les neurosphères obtenues dans chaque condition ont été dissociées. Les cellules ont été comptées et remises en culture à la concentration de 4000 cellules/cm² dans du milieu sans tCFA15. Après 5 jours de prolifération, le nombre de neurosphères générées a été compté. Le nombre de neurosphères formées reflète le nombre de cellules souches neurales présentes dans la population d'origine.

à la concentration de 10⁻⁵M, nous avons observé une cytotoxicité du tCFA15. Toutes les cellules étant mortes au cours de la première phase de prolifération, aucune neurosphère n'a été observée au cours de la deuxième phase de l'expérience.

positives. Ceci suggère que le tCFA15 favorise la différenciation des oligodendrocytes, ce qui est conforme avec l'effet de la voie Notch dans ce système.

Des résultats montrent que Notch1 et STAT3 servent directement de facteur de transcription pour le gène de la Gfap (Bonni et al., 1997; Ge et al., 2002; Song et Ghosh, 2004; Tanigaki et al., 2001). On pourrait donc s'attendre à ce que le tCFA15 inhibe l'expression de ce gène qui est utilisé comme un indicateur de la différenciation des astrocytes. Nous avons remarqué un changement morphologique des astrocytes présent dans les neurosphères sous l'effet du tCFA15 et nous avons voulu confirmer cette observation en testant le tCFA15 sur des cultures primaires d'astrocytes. Les astrocytes primaires ont été cultivés à faible densité et le milieu (avec ou sans tCFA15) a été changé chaque jour. Les astrocytes ont été fixés après 5 jours de traitement (figure 37B). En présence de tCFA15, les astrocytes expriment moins de GFAP, de plus ils sont moins étoilés et ont souvent une morphologie bipolaire, ce qui montre qu'ils sont en effet moins différenciés.

2.4.3. Le tCFA15 inhibe l'autorenouvellement des CSN

Des résultats décrits précédemment montrent que la voie Notch, plus précisément Notch1 est nécessaire à l'autorenouvellement des CSN (Hitoshi et al., 2002).

Le tCFA15 inhibant la voie Notch, nous nous sommes demandé s'il inhibait également l'autorenouvellement des CSN. Pour cela nous avons utilisé des neurosphères cultivées en condition semi clonale (Méthodes expérimentales §1.3.5) puisque le nombre de neurosphères générées dans la deuxième phase de prolifération reflète la proportion de cellules souches présentes dans la population d'origine.

Les résultats présentés dans le diagramme (figure 38) montrent que le traitement au tCFA15 diminue le nombre de CSN générées par les neurosphères. Le tCFA15 inhibe donc l'autorenouvellement des CSN dans notre système d'étude.

Il est néanmoins difficile de dire si cet effet est dû principalement à l'inhibition de la voie Notch ou à l'inhibition de l'activation de STAT3, ces deux mécanismes étant décrits comme jouant dans le maintien des cellules souches neurales (Hitoshi et al., 2002; Shimazaki et al., 2001). Cependant, cette question est peut-être sans objet si l'on considère que l'expression de Notch1 est liée à l'activation de STAT3 par une relation de dépendance.

Chapitre 4

Autres résultats

Autres résultats

Effets du tCFA15 sur des lignées tumorales
du système nerveux

1. Effets du tCFA15 sur des lignées tumorales du système nerveux

En parallèle aux travaux décrits dans ce manuscrit, j'ai collaboré avec Marie Paschaki, sur son sujet de doctorat. Nous avons étudié les effets du tCFA15 sur des lignées tumorales du SNC et j'ai dans ce cadre travaillé plus particulièrement sur la partie « culture cellulaire » (caractérisation des lignées et essais en agarose mou). Ce travail devrait aboutir à une publication, en cours de rédaction (Paschaki, Bouissac et al., en préparation).

1.1. Notch1 et lignées tumorales neurales

Nous avons montré dans les chapitres III.1 et III.2 que Notch inhibe la différenciation des neurones et des oligodendrocytes tandis qu'il favorise la différenciation des astrocytes. Ainsi, si Notch agit dans les cellules tumorales de la même façon que dans les cellules normales, on pourrait s'attendre à ce que le tCFA15 stimule la différenciation des neuroblastomes et oligodendrogliomes alors qu'il inhiberait celle des astrocytomes.

Nous nous sommes donc placés dans l'optique de la thérapie de différenciation des cancers, postulant que l'induction de la différenciation de lignées tumorales devrait être accompagnée d'une diminution de leur capacité proliférative et donc leur tumorigenicité. Nous avons voulu tester si le tCFA15 pouvait être utilisé comme un outil pharmacologique permettant de diminuer l'expression de Notch1 et en conséquence d'augmenter la différenciation de certaines lignées tumorales.

Pour tester cette hypothèse nous avons examiné les effets du tCFA15 sur des lignées tumorales correspondant aux trois types précités en évaluant leur degré de différenciation et leur capacité à proliférer *in vitro*, ainsi que leur capacité à générer des tumeurs *in vivo* avec ou sans traitement au tCFA15.

1.2. Lignées tumorales utilisées

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude détaillée des effets du tCFA15 sur deux lignées classiques de cellules tumorales de rat, le neuroblastome B104 et le glioblastome C6, pour voir s'il pouvait y moduler l'expression de certains gènes de la voie Notch et pour tester ses effets sur la différenciation de ces cellules et éventuellement sur le développement des tumeurs qui en seraient dérivées. Dans un deuxième temps, nous avons travaillé sur des lignées humaines de neuroblastome (SHSY-5Y), d'astrocytome (U373) et d'oligodendrogliome (TC620), pour tenter de généraliser le rôle de Notch dans ces lignées.

Les cellules C6 dérivent clonalement d'une tumeur de rat qui a été induite chimiquement par la méthyle nitrosourée (Benda et al., 1968). Ces cellules sont classées dans la catégorie des glioblastomes-astrocytomes d'après leur expression de glutamine synthétase, de protéine S100b et de GFAP. Au cours de cette étude, nous avons considéré cette lignée comme un astrocytome.

Les cellules B104 sont classées dans la catégorie des neuroblastomes d'après leur caractérisation phénotypique. L'aspect morphologique de ces cellules est proche de celui des neuroblastes (Schubert et al., 1974).

Les cellules U373 ont une morphologie proche des cellules épithéliales et sont classées dans la catégorie des glioblastomes-astrocytomes (Lachman et al., 1987; Ponten et Macintyre, 1968). Elles expriment très fortement la nestine, ce qui suggère un faible degré de différenciation.

Les SHSY-5Y sont classées dans la catégorie des neuroblastomes d'après leur caractérisation morphologique, proche de celle des neuroblastes (Biedler et al., 1973).

Les TC620 sont classées dans la catégorie des oligodendrogliomes d'après leurs caractéristiques phénotypiques (Manuelidis et al., 1977). Ils sont constitués de cellules gliales immatures engagées dans le lignage oligodendrocytaire (Kashima et al., 1993).

Nous avons optimisé les conditions de culture et de traitement au tCFA15 pour ces lignées. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM complété avec 5% de FBS. Nous avons déterminé, par deux tests de mortalité cellulaire (test MTT et Live Dead Viability Cytotoxicity kit), que dans ces conditions de culture le tCFA15 n'est significativement cytotoxique qu'à partir de 10^{-4} M.

1.3. Effets du tCFA15 sur des cellules d'astrocytome de rat (C6) et de neuroblastome de rat (B104)

1.3.1. Expression des gènes de la voie Notch : effets du tCFA15

Nous avons étudié les effets du tCFA15 sur l'expression des gènes de la voie Notch en réalisant une cinétique entre 30 mn et 24 h de traitement. Les cellules ont été traitées au tCFA15 avant extraction des ARN totaux et analysées par RT-PCR semi-quantitative. Nous avons observé que l'effet de tCFA15 sur l'expression de *Notch1* est rapide (il apparaît dès 30 mn), constant au moins jusqu'à 24 heures et semblable à celui observé dans les neurosphères. Le traitement au tCFA15 induit une chute du taux d'expression de *Notch1* à 15% dans les cellules C6 et à 28% dans les cellules B104, en comparaison avec les cellules non traitées.

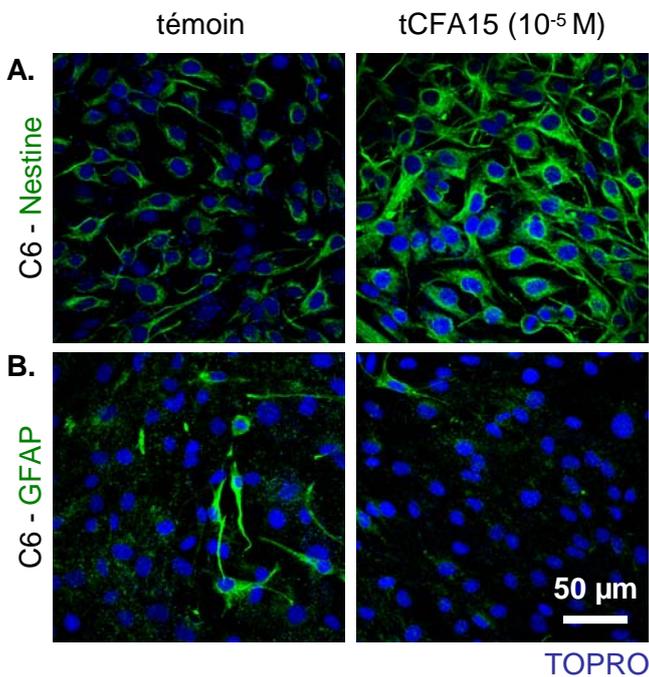


Figure 39. Effets du tCFA15 sur la différenciation des cellules C6

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre prétraitées à la poly-L-lysine, dans des boîtes 24 puits, à une concentration de 25 000 cellules par puits, dans du milieu DMEM complété avec 5% de FBS. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement. Les milieux ont été changés tous les jours et le traitement au tCFA15 (10^{-5} M) a été renouvelé à chaque changement de milieu. Après trois jours de traitement, les cellules ont été fixées au PFA à 4% et analysées par immunocytochimie. La nestine (vert) pour les cellules indifférenciées (A) et la GFAP (vert) pour les astrocytes (B) ont été utilisées comme marqueurs de différenciation. Les noyaux sont marqués au TOPRO (bleu).

Le tCFA15 induit une augmentation du nombre des cellules positives à la nestine et une augmentation de l'intensité de ce marquage, ainsi qu'une diminution du nombre des cellules positives à la GFAP.

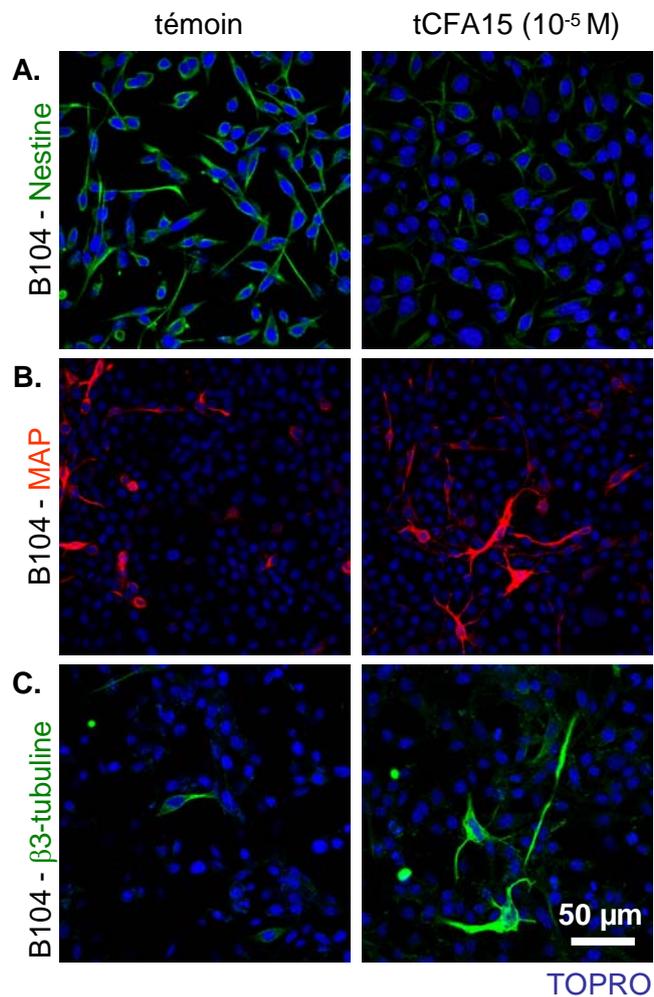


Figure 40. Effets du tCFA15 sur la différenciation des cellules B104

Les cellules ont été traitées comme décrit dans la Figure 25. La nestine pour les cellules indifférenciées (vert) (A), la MAP(2a+2b) pour les neurones (rouge) (B) et la β 3-tubuline pour les neurones (vert) (C) ont été utilisées comme marqueurs de différenciation. Les noyaux sont marqués au TOPRO (bleu).

Le tCFA15 induit une augmentation des cellules MAP(2a+2b)-positives, une plus forte augmentation des cellules β 3-tubuline-positives et une diminution des cellules positives pour la nestine.

Dans les mêmes conditions, l'expression de *Hes5* avait diminué à 36% dans les cellules C6, et à 13% dans les cellules B104 alors que l'expression des autres gènes de la voie Notch analysés, dont *Hes1*, reste constante. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus dans les neurosphères.

1.3.2. Effets du tCFA15 sur la phosphorylation de STAT3 dans les cellules C6 et B104

Nous avons montré que, dans les neurosphères (chapitre I.2), le tCFA15 inhibe l'expression de *Notch1* par l'intermédiaire d'une inactivation de STAT3. Nous avons testé si ce mécanisme d'action du tCFA15 s'appliquait également aux les cellules C6 et B104. Pour cela nous avons examiné par Western Blot si le traitement au tCFA15 un changement dans la phosphorylation de STAT3 (Tyr705). Nous observé, dans les minutes suivant le traitement au tCFA15 une diminution de la phosphorylation de STAT3 dans les deux types cellulaires étudiés. L'ensemble de ces résultats suggère que le mécanisme moléculaire du tCFA15 est indépendant de la lignée étudiée et passe par l'inactivation de STAT3, comme dans les neurosphères.

1.3.3. Effets phénotypiques du tCFA15 sur les cellules C6 et B104

1.3.3.1. Effet du tCFA15 sur la différenciation des cellules C6 et B104

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet du tCFA15 sur la différenciation des cellules C6 et des B104 par immunocytochimie. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps spécifiques dirigés contre la MAP(2a+2b) et la β 3-tubuline pour les neurones, la GFAP pour les astrocytes, et la nestine pour les cellules indifférenciées.

Dans les cellules C6, le tCFA15 induit une diminution faible mais significative du nombre des cellules GFAP-positives et inversement une augmentation de la proportion de cellules positives pour la nestine (figure 39). Cet effet correspond à une diminution de la différenciation et il est compatible avec l'effet d'une diminution de Notch puisque Notch1 induit la différenciation des astrocytes.

Dans les cellules B104, après traitement au tCFA15, nous avons observé une augmentation faible mais significative de la proportion de cellules MAP2-positives, ainsi qu'une plus forte augmentation des cellules β 3-tubuline-positives et une diminution de la proportion de cellules positives pour la nestine (figure 40). Cet effet correspond à une augmentation de la

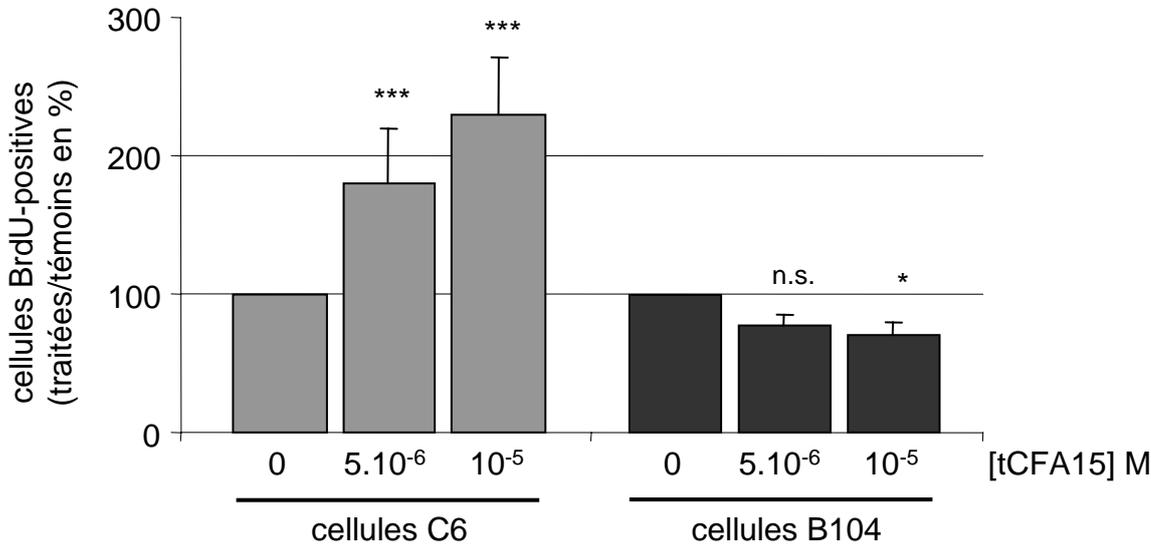


Figure 41. Effets du tCFA15 sur la prolifération des cellules C6 et B104

Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre traitées à la poly-L-lysine, dans des boîtes 24 puits, à la concentration de 25 000 cellules par puits. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement. Les milieux ont été changés tous les jours et le traitement au tCFA15 a été renouvelé à chaque changement de milieu. Après trois jours de traitement, les cellules ont été traitées à la BrdU pendant 12 h avant fixation et la proportion de cellules ayant incorporé la BrdU a été déterminée par immunocytochimie (n=3 expériences indépendantes). Le tCFA15 induit une augmentation de la prolifération des cellules C6 tandis qu'il provoque une diminution de la prolifération des cellules B104.

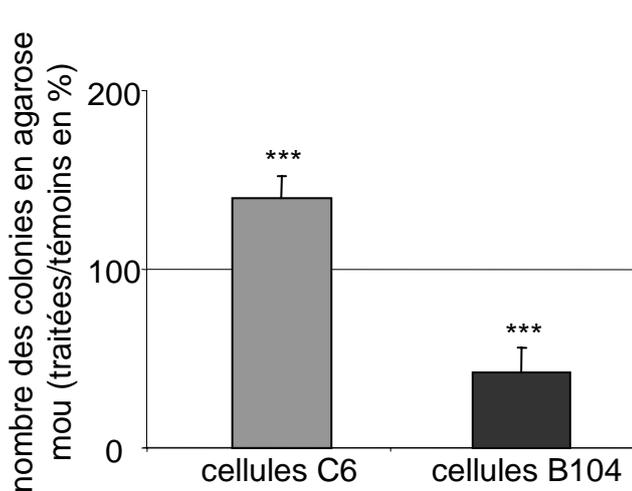


Figure 42. Effets du tCFA15 sur le nombre des colonies formées par les cellules C6 et B104 en agarose mou

Les cellules C6 et B104 ont été prétraitées au tCFA15 comme dans la figure 41. Après ce prétraitement, les cellules ont été dissociées et cultivées dans de l'agarose mou. Nous avons observé une augmentation du nombre des colonies formées par les cellules C6 traitées à 140% en comparaison avec les témoins, tandis que le nombre des colonies formées par les cellules B104 a chuté à 42%.

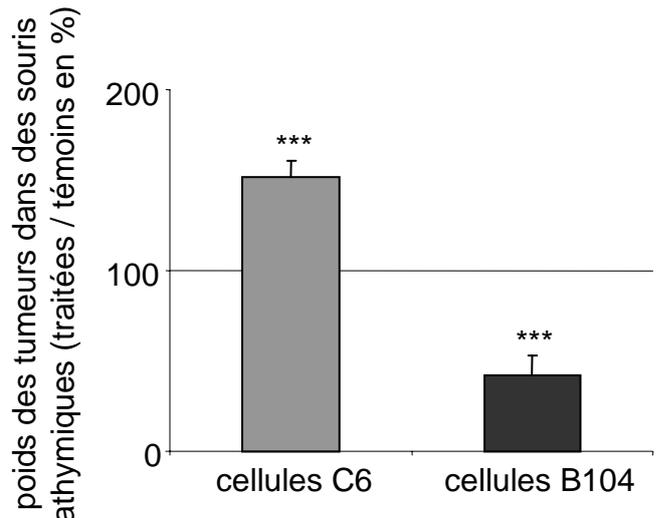


Figure 43. Effets du tCFA15 sur le développement des tumeurs de cellules C6 et B104 dans des souris athymiques

Les cellules C6 et B104 ont été prétraitées au tCFA15 comme dans la figure 41. Après ce prétraitement, les cellules ont été dissociées et injectées dans des souris athymiques, traitées ou non au tCFA15. Nous avons observé que le poids des tumeurs générées après injection des cellules C6 traitées a augmenté à 152%. Par contre, le poids des tumeurs générées par les cellules B104 a été réduit à 42% après traitement au tCFA15.

différenciation et il est compatible avec l'effet d'une diminution de Notch1 puisque Notch1 inhibe la différenciation des neurones.

Ainsi, pour ces deux types cellulaires, il apparaît que l'effet phénotypique du tCFA15 peut être expliqué par son seul effet d'inhibition de l'expression de Notch1. A la condition bien sûr que dans ces cellules tumorales, Notch1 exerce des effets phénotypiques semblables à ceux qu'il exerce dans les cellules normales.

1.3.3.2. Effet du tCFA15 sur la prolifération *in vitro* et *in-vivo* des cellules C6 et B104

Nous avons cherché à savoir si l'effet sur la différenciation que nous avons constaté en réponse au traitement au tCFA15 s'accompagnait d'un effet sur la prolifération de ces cellules. La prolifération a été mesurée par l'incorporation de BrDU. Nous avons observé que le tCFA15 induit une augmentation de la prolifération des cellules C6 (alors qu'il inhibait leur différenciation), tandis qu'il induit une faible diminution de la prolifération des cellules B104 (alors qu'il induisait leur différenciation) (figure 41). Une relation inverse, classique, entre la différenciation et la prolifération est donc observée dans les deux types cellulaires étudiés. On peut en conclure que les effets du tCFA15 sur la prolifération (comme sur leur différenciation) peuvent s'expliquer par la seule inhibition de Notch1.

La tumorigénicité des lignées tumorales peut être évaluée par leur capacité à former des colonies en agarose mou et par la taille de ces colonies. Nous avons trouvé que le nombre des colonies formées par les cellules C6 augmentait à 140% après traitement au tCFA15. En revanche, le nombre des colonies formées par les cellules B104 chutait à 42% comparé aux témoins, les colonies formées étant sensiblement plus petites (figure 42). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par incorporation de BrdU.

Les cellules C6 et B104 forment des tumeurs après injection sous-cutanée dans des souris athymiques. Nous avons testé l'effet du tCFA15 sur le développement de ces tumeurs. Les cellules C6 et B104 ont été traitées au tCFA15 (10^{-5} M) *in vitro*, pendant 3 jours avant d'être injectées dans les souris athymiques. Les souris ont ensuite été traitées au tCFA15 ($5 \cdot 10^{-6}$ M) localement et par injection intra-péritonéale pendant 15 jours, tous les 5 jours. Nous avons observé que le poids des tumeurs générées par les cellules C6 augmentait de 52% quand elles étaient traitées au tCFA15 (par rapport aux témoins non traités). Par contre, le poids des tumeurs générées par les B104 dans les souris avait diminué de 58% après traitement au tCFA15 (figure 43).

Ces résultats vont dans le sens des observations précédentes en montrant que le tCFA15 induit la différenciation des cellules B104 et au contraire inhibe leur prolifération et en conséquence leur tumorigénicité, in-vitro et in-vivo. Au contraire, l'inhibition de la voie Notch maintient plutôt les cellules C6 dans un état indifférencié, induit leur prolifération et accentue leur tumorigénicité.

Dans ces phénomènes, il semble que le tCFA15 agisse essentiellement, sinon exclusivement, par l'intermédiaire de son effet inhibiteur sur l'expression de Notch1. Mais cela reste à démontrer.

1.4. Effets du tCFA15 sur des lignées tumorales humaines du système nerveux

Nous avons examiné si les effets du tCFA15 sur les cellules C6 et B104 pouvaient être généralisés à d'autres lignées tumorales, en particulier à des lignées d'origine humaine. Pour cela, nous avons examiné les effets du tCFA15 sur un neuroblastome (SHSY-5Y), un astrocytome (U373) et un oligodendrogliome humains (TC620).

1.4.1. Expression des gènes de la voie Notch et phosphorylation de STAT3 dans les lignées SHSY-5Y, TC620 et U373, effets du tCFA15

Nous avons analysé par RT-PCR semi-quantitative le taux d'expression des gènes de la voie Notch dans ces trois lignées avec ou sans traitement au tCFA15. Nous avons observé une diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5* dans les cellules TC620, mais pas dans les lignées U373 et les SHSY-5Y.

Nous avons alors analysé par Western Blot le taux de STAT3 phosphorylé pour vérifier que le mécanisme d'action de tCFA15 est identique à celui observé dans les cellules C6 et B104. Nous avons trouvé que STAT3 et sa forme phosphorylée étaient très faiblement exprimés dans les cellules U373 et SHSY-5Y contrairement aux cellules TC620 qui, elles, expriment fortement STAT3 et P-STAT3. Nous avons observé une diminution de STAT3 phosphorylé après traitement au tCFA15 uniquement dans les cellules TC620. Ces résultats suggèrent que le tCFA15 n'a pas d'effet si sur la phosphorylation de STAT3, ni sur l'expression des gènes étudiés de la voie Notch dans les cellules SHSY-5Y et U373, du moins dans les conditions expérimentales que nous avons utilisés.

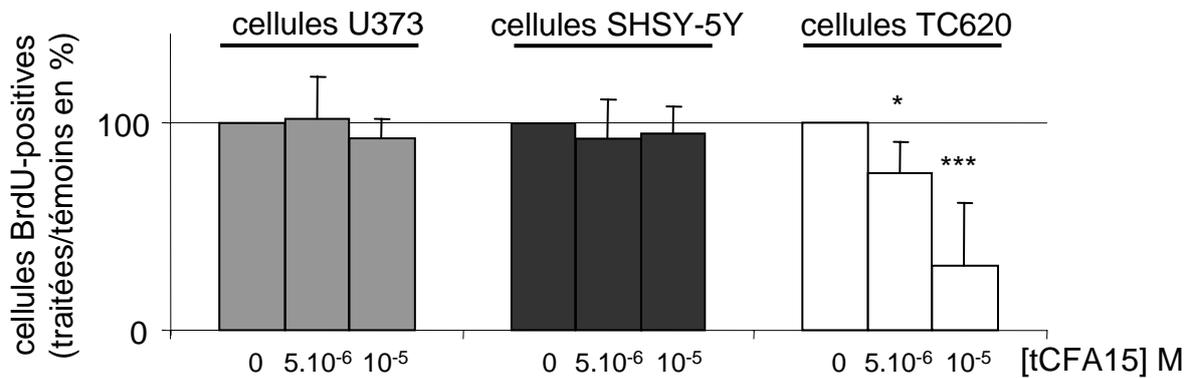


Figure 44. Effets du tCFA15 sur la prolifération des lignées U373, SHSY-5Y et TC620

Les cellules U373, SHSY-5Y et TC620 ont été traitées comme décrit dans la figure 41. Nous avons observé une diminution de la prolifération dans les cellules TC620. Aucun effet du tCFA15 sur la prolifération n'a été observé dans les cellules U373 et SHSY-5Y.

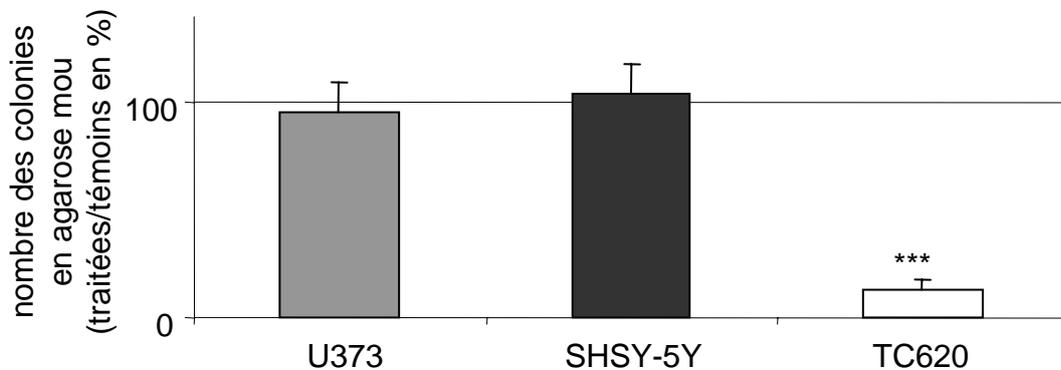


Figure 45. Effets du tCFA15 sur le nombre des colonies formées par les cellules U373, SHSY-5Y et TC620, en agarose mou.

Les cellules U373, SHSY-5Y et TC620 ont été traitées comme décrit dans la figure 42. Nous avons observé que le nombre des colonies formées par les U373 et les SHSY-5Y avec ou sans traitement au tCFA15 était inchangé. En revanche, le nombre de colonies formées par les cellules TC620 traitées a chuté à 13%, en comparaison avec les conditions témoins (fixées à 100%).

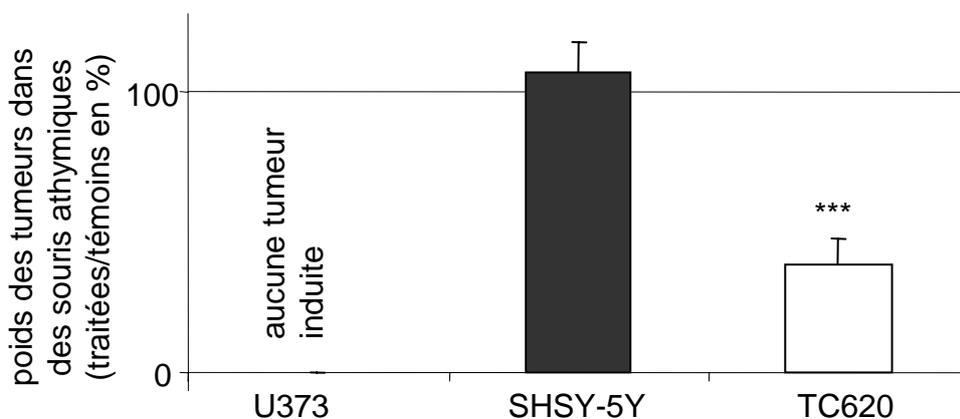


Figure 46. Effets du tCFA15 sur le développement des tumeurs issues de cellules U373, SHSY-5Y et TC620, dans des souris athymiques.

Les cellules U373, SHSY-5Y et TC620 ont été traitées comme décrit dans la figure 43. Les cellules U373 injectées n'ont formé aucune tumeur, même 45 jours après la transplantation. Le poids des tumeurs générées par les cellules SHSY-5Y est resté le même, avec ou sans traitement au tCFA15. En revanche, le poids des tumeurs générées par les cellules TC620 traitées a chuté à 39% de celui des tumeurs témoins.

1.4.2. Effet du tCFA15 sur la prolifération in vitro des cellules SHSY-5Y, TC620 et U373

Aucun effet du tCFA15 sur l'incorporation de la BrdU n'a été observé dans les cellules U373 et SHSY-5Y tandis que l'incorporation de la BrdU chutait dans les TC620 (figure 44).

Ensuite, nous avons étudié la capacité des cellules à proliférer et à former des colonies dans l'agarose mou. Nous avons trouvé que le nombre des colonies formées par les cellules U373 et SHSY-5Y était le même avec ou sans traitement au tCFA15. En revanche, le nombre des colonies formées par les cellules TC620 après traitement au tCFA15 chute à 13% en comparaison avec les conditions témoins fixées à 100% (figure 45).

1.4.3. Effets du tCFA15 sur le développement de tumeurs issues des cellules SHSY-5Y, TC620 et U373, dans des souris athymiques

Nous avons étudié la capacité des cellules U373, SHSY-5Y et TC620 à générer des tumeurs dans des souris athymiques. Les mêmes conditions que dans les cellules C6 et B104 ont été utilisées. Les cellules U373, avec ou sans traitement, n'ont pas formé de tumeurs, même 45 jours après leur injection. Nous avons observé que la taille des tumeurs générées après injection des cellules SHSY-5Y restait constante avec ou sans traitement au tCFA15. Par contre, le poids des tumeurs générées par les cellules TC620 dans les souris athymiques a été réduit de 61% après traitement au tCFA15 (figure 46).

La diminution du nombre des colonies formées dans l'agarose mou et la diminution du poids des tumeurs générées dans les souris par les cellules TC620 traitées au tCFA15, sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la voie Notch exerce des fonctions similaires dans les cellules normales et dans les cellules tumorales. En effet, la voie Notch inhibe la différenciation des oligodendrocytes (cellules normales) et favorise leur prolifération. Dans les oligodendrogliomes, le tCFA15, agissant par l'intermédiaire d'une inhibition de la voie Notch, active la différenciation et inhibe la prolifération, et donc la tumorigénicité de ces cellules.

1.5. Conclusions

Dans les lignées de cellules tumorales C6, B104 et TC620, le tCFA15 induit une diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5*. Un tel effet avait déjà été observé dans les divers types cellulaires normaux que nous avons analysés : astrocytes, neurones, et précurseurs d'oligodendrocytes. Cet effet pourrait donc être général et ne pas dépendre du type cellulaire

ou de son état de transformation. Dans ces trois lignées tumorales, nous avons également examiné la phosphorylation de STAT3, et nous avons trouvé de nouveau un effet similaire à celui observé dans les neurosphères. Le tCFA15 inhibe la phosphorylation de STAT3. Cet effet est d'une importance particulière du fait que STAT3 a été impliqué dans de nombreux types de cancers. Cette inhibition pourrait donc ouvrir un large potentiel thérapeutique au tCFA15. Les cellules tumorales, ne serait-ce que d'après leur activité proliférative, sont des cellules peu ou très peu différenciées, leur contrôle peut être obtenu soit en agissant directement sur leur prolifération, soit indirectement, sur leur degré de différenciation. Nous avons donc examiné l'effet du tCFA15 sur la différenciation de ces lignées. Le tCFA15 stimule la différenciation des cellules tumorales de type neuronale et oligodendrogliale alors qu'il inhibe celle des cellules de nature astrocytaire. Cet effet était attendu puisqu'il est similaire à celui observé avec les cellules normales correspondantes. L'effet du tCFA15 sur la prolifération des cellules est cohérent avec celui sur la différenciation puisqu'il est inverse. La prolifération des cellules C6 est stimulée alors que celle des cellules B104 et TC620 est inhibée.

Le fait que les cellules SHSY-5Y et U373 ne répondent pas au tCFA15 pourrait être expliqué par les caractéristiques biochimiques de ces cellules qui n'expriment que très peu STAT3, confortant ainsi le mécanisme d'action proposé pour le tCFA15 dans le système des neurosphères selon lequel cette molécule inhibe Notch1 via STAT3.

En conclusion le tCFA15 constitue un outil moléculaire permettant de réguler l'expression de *Notch1* dans la plupart des lignées tumorales étudiées. Si nous considérons seulement les lignées C6, B104 et TC620, qui répondent au tCFA15, nous observons que leur réponse est toujours la même et consiste en une diminution de l'expression de *Notch1* ; avec pour conséquence des effets phénotypiques parfois radicalement opposés selon le type de lignée examinée. Ainsi, le tCFA15 « reverse » le phénotype tumoral des neuroblastomes et des oligodendrogliomes tandis qu'il « aggrave » le phénotype tumoral des astrocytomes. Ces modifications phénotypiques ont été mesurées à deux niveaux : sur la prolifération des cellules in vitro et des tumeurs produites in vivo, avec parfois des effets spectaculaires, et sur la différenciation des cellules in vitro ; ces effets sont conformes à ceux que l'on attendait si la voie Notch exerce sur les cellules tumorales des effets semblables à ceux qu'elle exerce sur les cellules saines du même type.

Publication 3

Effets des alcools gras indoliques dans
la différenciation des neurosphères

2. Effets des alcools gras indoliques dans la différenciation des neurosphères

Comme nous l'avons vu dans le chapitre III.2, dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR 7123, nous avons testé les effets de petites molécules non peptidiques, sur la différenciation des cellules du SCN en utilisant le système modèle des neurosphères in vitro.

En parallèle à nos études sur les effets du tCFA15 sur la différenciation des neurosphères, j'ai réalisé le criblage d'une famille d'alcools gras indoliques (IFA), synthétisées par Djalil Coowar sur les neurosphères. Cette famille de molécules a été développée dans l'espoir de coupler l'effet neurotrophique de l'hexacosanol avec l'effet anti-oxydant de la mélatonine.

2.1. Résumé des travaux publiés

Nous avons montré que le 3-(18-hydroxyoctadécyl)-5-méthoxy-1/H/-indole (5mIFA18) à la concentration de 10 nM augmente de 90% le nombre des cellules positives à la MAP (2a+2b) (marqueur neuronal) dans les neurosphères, après 3 jours de différenciation. Contrairement au tCFA15, qui augmente la proportion des neurones aux dépens des astrocytes, le 5mIFA18 n'a aucun effet qualitatif ou quantitatif sur les cellules GFAP-positives (marqueur astrocytaire).

Nous avons également examiné si les effets du 5mIFA18 passaient par la voie Notch. Pour cela, nous avons analysé par RT-PCR l'expression des principaux gènes de la voie Notch dans les neurosphères traitées ou non au 5mIFA18 (10 nM) pendant leur phase de différenciation. Nous avons trouvé que le 5mIFA18 induit une diminution d'expression d'un seul des gènes testés, *Notch4*.

La question était de savoir si la régulation de la différenciation neuronale des neurosphères était effectivement liée à la diminution d'expression de *Notch4*. L'inhibition de Notch4 par l'utilisation d'anti-sens spécifiques sembla le confirmer.

Nous avons vu dans le chapitre III.2 qu'il paraît bien établi qu'une diminution d'expression de Notch1 agit sur le déterminisme cellulaire en induisant le lignage neuronal aux dépens du lignage glial et qu'en plus elle favorise la différenciation neuronale. Ici le 5mIFA18 n'agit pas sur le déterminisme, il agirait seulement pendant la phase de différenciation pour favoriser la différenciation neuronale. Le 5mIFA18 induit une diminution de *Notch4* seulement quand le traitement est effectué durant la phase de différenciation des neurosphères. Nous avons vu, également dans le chapitre III.3, que le tCFA15 agit sur les neuroblastes en culture en induisant leur différenciation, phénomène associé à des diminutions d'expression de Notch1 et de Notch4. On pourrait supposer que dans ces cultures, le tCFA15 exerce son effet par l'intermédiaire de Notch4 plutôt que Notch1. Des expériences complémentaires d'inhibition sélective des deux récepteurs,

dans le système des neurosphères et dans celui des cultures primaires de neuroblastes, pourraient apporter des indications sur leurs rôles respectifs.

2.2. Commentaires liés à la méthodologie utilisée pour le criblage

Lorsque nous avons commencé à cribler cette famille de petites molécules, nous avons décidé d'utiliser une technique de criblage basé sur le phénotype des neurosphères traitées pour déterminer quelles sont les molécules d'intérêt mais, nous ne pensions pas devoir tester une famille si vaste de molécules. Il s'est révélé que l'observation non-automatisée du phénotype des neurosphères n'est pas adaptée au criblage d'un grand nombre de molécules.

Nous sommes donc en train de mettre au point des méthodes de criblage plus rapides mettant en œuvre d'une part des tests ELISA sur ces cellules en culture pour détecter le taux d'expression de différents marqueurs de différenciation spécifiques des neurones, astrocytes et oligodendrocytes et d'autre part, l'utilisation des techniques de FACS pour caractériser le phénotype des neurosphères traitées.

A l'aide de ces techniques, Djalil Coowar projette de cribler l'ensemble de la chimiothèque des molécules synthétisées par l'équipe du Dr Bang Luu sur le système des neurosphères.

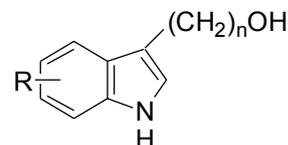
2.3. Article 3: Effects of Indole Fatty Alcohols on the differentiation of Neural Stem Cell–derived Neurospheres

Cet article a été publié en décembre 2004 dans *Journal of Medicinal Chemistry* (Volume 47, Issue 25, Pages 6270-6282)

Journal of Medicinal Chemistry

Volume 47, Issue 25, Pages 6270-6282, December 2, 2004

**Effects of Indole Fatty Alcohols on the differentiation
of Neural Stem Cell-derived Neurospheres**



Indole Fatty Alcohols
(R = H or OMe)

Djalil Coowar,^a Julien Bouissac,^b Mazen Hanbali,^a Marie Paschaki,^b
Eliane Mohier,^b and Bang Luu^{*.a}

Laboratoire de Chimie Organique des Substances naturelles, UMR 7123 CNRS,
Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine, UPR 2356 CNRS,
Université Louis Pasteur, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +333 88 41 16 72; Fax: +333 88 60 74 64; E-mail: luu@chimie.u-strasbg.fr.

^a Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles.

^b Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine.

ABSTRACT

In a search for inducers of neuronal differentiation to treat neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, a series of Indole Fatty Alcohols (**IFA**) were prepared. **13c (n=18)** was able to promote the differentiation of neural stem cell-derived neurospheres into neurons at a concentration of 10 nM. Analysis of the expression of the Notch pathway genes in neurospheres treated during the differentiation phase with **13c (n=18)** revealed a significant decrease in the transcription of the Notch 4 receptor.

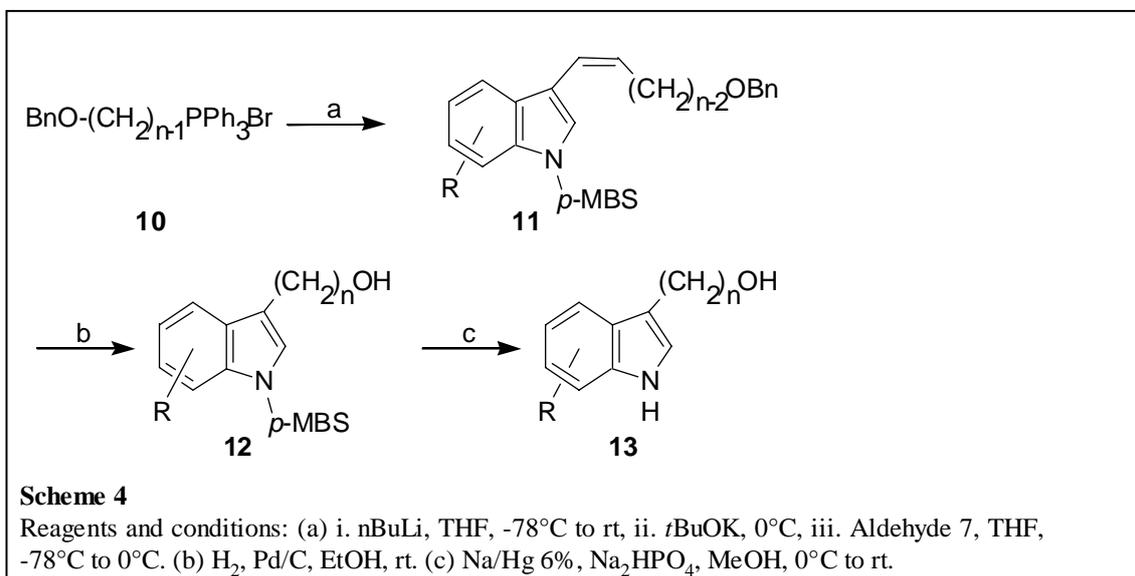
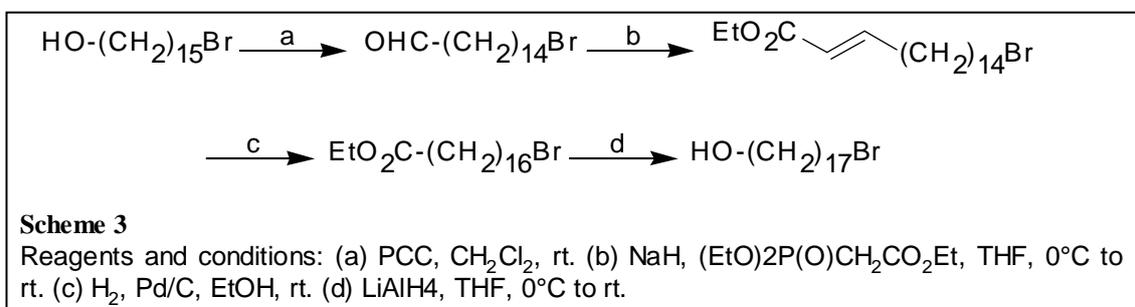
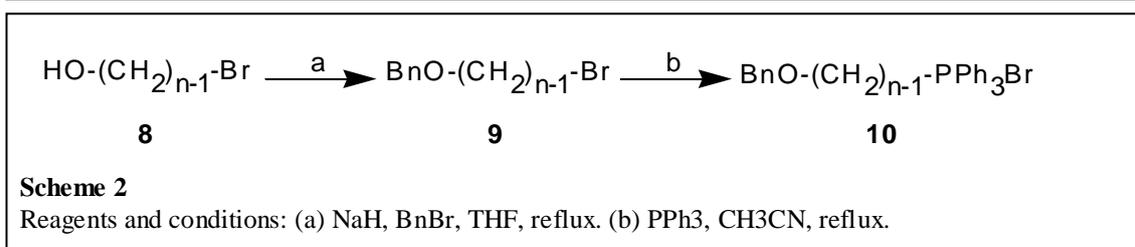
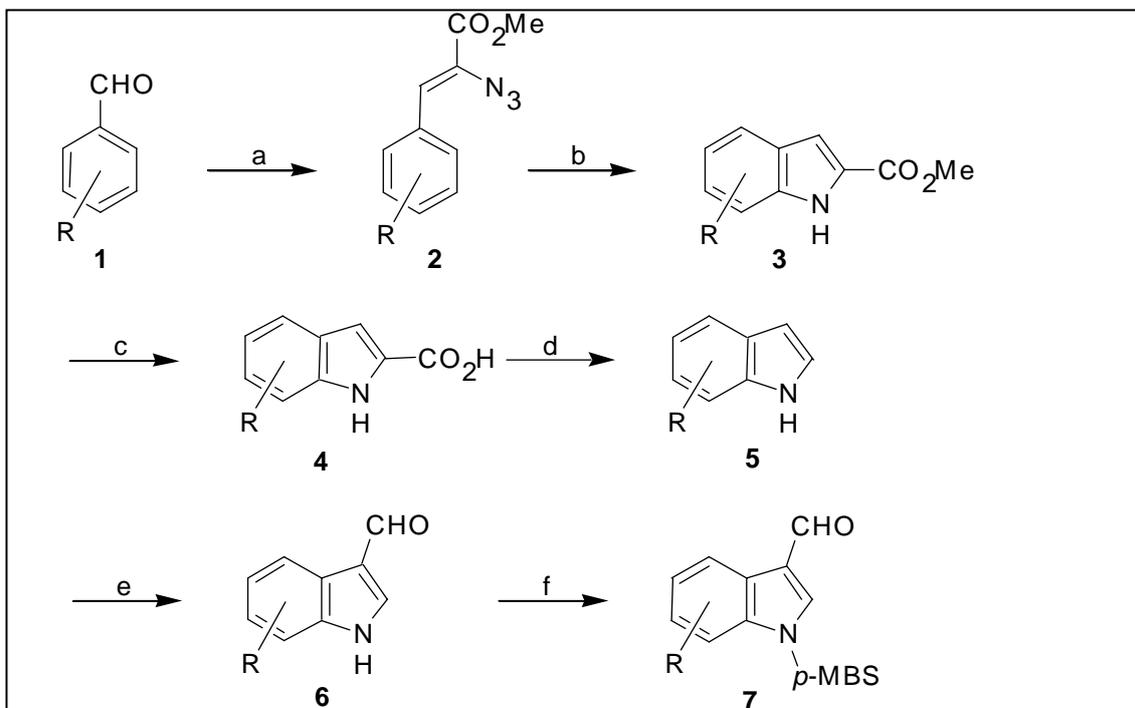
INTRODUCTION

Neuronal disorders have common pathological features that result in defects of nervous system functionality. Loss of neurons and/or glia contributes to this degeneration.

Over the past several years, protein neurotrophic factors (pNFs) have been investigated as a treatment for these disorders.¹ Endogenous molecules such as Nerve Growth Factor (NGF) or Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) are crucial for the regulation of the survival, differentiation and plasticity of neural cells during development.^{2,3} However, early attempts to develop clinical treatments with pNFs were unsuccessful.⁴ The main obstacle was the blood-brain barrier.⁵ The use of recombinant forms of pNFs by subcutaneous application avoided the direct injection of these proteins into the brain. Nevertheless this procedure did not prevent severe side effects.⁴

In parallel, efforts were made to develop functional mimics of pNFs. Synthetic lipophilic compounds were prepared to promote neuronal survival and differentiation. Drugs such as lactacystin⁶, epolactaene⁷, FK506⁸ and *N*-glyoxyl derivatives⁹ have trophic capacities *in vitro* and *in vivo*. In a previous study, we reported the neurotrophic activity of cyclohexenonic long-chain ω -alkanols.^{10,11} This class of molecules promotes neurite outgrowth and the survival of foetal neurons *in vitro*. The length of the side chain fatty alcohol appeared to be determinant for the neuritogenic activity. However until now, apart from the potential that these synthetic molecules offer, no clinical proof of efficacy on neurodegenerative disorders has ever been established.

A new approach to the repair of the nervous system could target the stimulation of endogenous neural stem cells¹² and seek to orientate them towards the production of neurons by promoting both neuronal cell fate decision¹³ and differentiation. Neural stem cells are multipotential progenitor cells, which can self-renew and generate both neurons and glia depending on the presence of growth factors, hormones and environmental cues.^{14,15} These neural stem cells are substantially present in the adult brain as a quiescent population of cells¹⁶ and recent data show that they may be able to proliferate and migrate to sites of damaged tissue where they may have potential therapeutic roles in the treatment of brain injuries. Nakatomi and colleagues have demonstrated that endogenous adult brain progenitors in the presence of exogenous growth factors were capable of replacing hippocampal pyramidal neurons that were lost due to ischemia.¹⁷ Compounds like retinoic acid¹⁸ and TWS119¹⁹ control the processes that regulate stem cell fate and were able to induce neuronal differentiation of embryonic stem cells. The aim of our research was to construct synthetic trophic drugs, capable of stimulating endogenous neural stem cells and of promoting their differentiation into neurons. These small lipophilic molecules must have systemic activity, oral bioavailability as well as the ability to cross the blood-brain barrier.



Neural stem cells can be isolated through the selective action of EGF. They can be grown *in vitro* as clones of undifferentiated cells floating in the medium, the so called neurospheres.²⁰ When provided with a solid support, neurospheres differentiate to give rise to neurons, oligodendrocytes and astrocytes in proportions that are genetically and epigenetically defined.²¹ Neurospheres represent an interesting *in vitro* model system for investigating the influence of factors on the differentiation potential of neural stem cells.

In a parallel work, we have shown that **tCFA15** (Figure 2) was able to promote neuronal cell fate decision and differentiation of neural stem cells-derived neurospheres at 10^{-6} M.²² The putative structure-activity relationship was further investigated with the aim of combining the trophic activity of the long chain ω -alkanols and a neuroprotective moiety. Oxidative stress has been linked to neuronal cell death resulting in either acute insults due to ischemia, trauma, or in chronic neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.²³ Synergistic effects have been observed in drug combination studies of trophic factors with antioxidants.²⁴ For this reason, molecules were synthesized which combine a long chain ω -alkanol with an antioxidant core. Since melatonin is a well-known antioxidant,²⁵ the indole ring bearing methoxy groups was chosen. In this study, we analysed the effects of Indole Fatty Alcohols (**IFA**) as free radical scavengers and as stimulants of neural stem cells-derived neurospheres.

RESULTS

Chemistry

Indole carboxaldehydes **7** were the first intermediates needed to prepare the desired indole fatty alcohols by means of a Wittig reaction. The protocol chosen to prepare gram scale quantities of methoxyindoles utilizes Moody azide pyrolysis.²⁶ Our procedure started with commercial methoxybenzaldehydes **1**. They were transformed to azidocinnamates **2** which were then cyclised in hot xylene (Scheme 1). Cyclisation of unsymmetrical azidocinnamates provided two regioisomers in proportions depending upon the substitution position. The 5-methoxy- and 7-methoxyindole carboxylates were obtained from the 3-methoxy-azidocinnamate in a 1:1 ratio, whereas the reaction with the 3,4-dimethoxy derivative gave preferentially the 5,6-dimethoxyindole carboxylate with a yield of 86 %. Base hydrolysis of **3** followed by Cu / quinoline mediated decarboxylation of the acid **4** afforded the methoxyindoles **5**. Vilsmeier formylation²⁷ followed by indole protection produced the indole carboxaldehydes **7**.

The phosphonium salts **10** were prepared from O-protected bromoalcohols **9** (Scheme 2). 11-Bromoundecan-1-ol is commercially available whereas 9-bromononan-1-ol was obtained by

monobromination of nonanediol in a mixture of HBr-cyclohexane. The C-13 and C-15 bromoalcohols were prepared by reduction of the corresponding diacid and lactone with lithium aluminium hydride followed by monobromination of the diols.²⁸ The C-17 bromoalcohol was obtained in four steps from 15-bromopentadecan-1-ol by homologation (Scheme 3).

The next step in the synthesis involved the Wittig reaction between the phosphonium salts **10** and the indole carboxaldehydes **7** using Schlosser's base²⁹ (Scheme 4). Catalytic hydrogenation of **11** with palladium on charcoal followed by indole deprotection led to the Indole Fatty Alcohols **13**. Compound **14** was obtained according to the same procedure with the tetradecylphosphonium salt as reagent. Table 2 presents the structures evaluated in this study.

Free-Radical Scavenging Activity

The free-radical scavenging activity of IFA's was confirmed in the 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) competition assay.³⁰ In the presence of hydroxyl radicals, ABTS is oxidized to the stable ABTS cation radical (ABTS^{•+}) observed by its absorbance at 405 nm. This method measures the relative ability of IFA's to scavenge ·OH and thus inhibit the formation of ABTS^{•+} as measured by a decrease of its absorbance at 405 nm. The results are presented in Table 1.

Surprisingly these IFA's caused stronger suppression of ABTS^{•+} than melatonin and than Trolox[®], a water soluble antioxidant derivative of α -tocopherol. **tCFA15** was unable to scavenge the hydroxyl radicals. Compound **13f**, bearing two methoxy groups on the C-4 and C-5 position of the benzene moiety, was the most potent. The relative efficacy of these compounds was independent of the length of the side chain (n=10-18, data not shown). However, the presence of the hydroxyl group was essential for the high potency of these IFA's. The activity of compound **14**, an analogue of compound **13c** with the terminal –CH₂OH of the side chain removed, was reduced to that of melatonin.

Effect of IFAs on the Differentiation of Neural Stem Cells-derived Neurospheres

In an attempt to establish a structure-function relationship between our compounds, we analysed each of the synthetic products described above for its ability to influence the cell fate decision and differentiation of neural stem cells-derived neurospheres into neurons and astrocytes.

The experimental protocol was that described by Grandbarbe et al.²¹ (Figure 3). Briefly, dissociated neurospheres, floating in the culture medium, were grown for three days (proliferation phase) and allowed to differentiate on polyornithine support (differentiation phase). The IFAs were added just

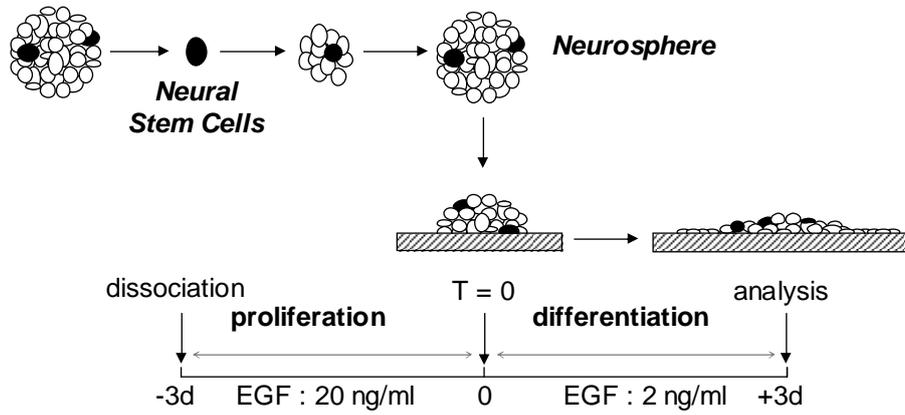


Figure 3. Experimental protocol

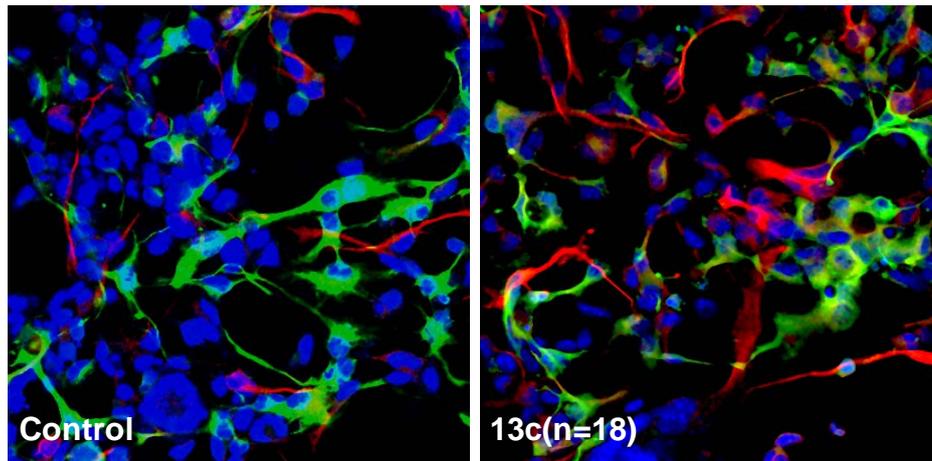


Figure 4. Neurospheres were allowed to differentiate for three days without (control) or with **13c(n=18)** at 10 nM. Triple immunostaining involved anti-MAP2ab and Tuj1 coupled to Cy3 for neurons (red), anti-GFAP coupled to Alexa 488 for astrocytes (green) and TO-PRO, a marker specific for nuclei (blue). Colocalized markers are rarely observed, and are likely to result from overlapping cells.

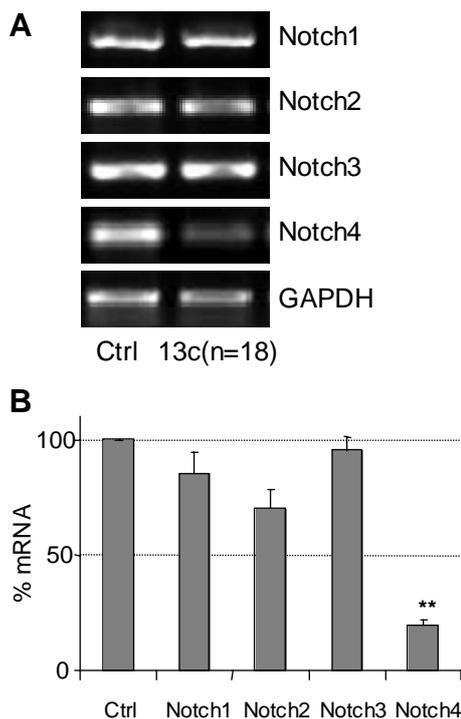


Figure 5. Expression of Notch1 to Notch4 mRNAs by semi-quantitative RT-PCR in neurospheres. Cells were treated without (Ctrl) or with **13c(n=18)** at 10nM during the differentiation phase. Total RNA was isolated and RT-PCR was performed using gene specific primers for Notch genes or GAPDH as an internal control. The products were analyzed by electrophoresis on agarose gels containing ethidium bromide as pictured above (A). The relative level of mRNA expressed was quantified by densitometry analysis software NIHImage1.36 (B). Any variation between 0% and 50% was not considered to be significant ; ** $p \leq 0.01$ by multiple pair-wise comparisons using Turkey-Kramer method.

after plating onto polyornithine cover slips ($T = 0$), the IFA in the control being replaced by the same volume of ethanol. Neurospheres were then analysed by immunocytochemistry, using the antibodies specific for mitotic neurons (Microtubule Associated Protein 2, MAP2ab), for post-mitotic neurons (monoclonal antibody against neuronal class III-tubulin, TuJ1) and an astrocyte-specific intermediate filament protein (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP). The present study does not take into account oligodendrocytes which are difficult to visualize in neurospheres. A nuclear marker, TO-PRO-3-iodide, was used to quantify the total number of cells. First of all, we determined quantitatively that the strongest effect on neuronal population was observed at 10 nM. Higher concentrations (1000 nM, 100 nM) were cytotoxic and lower concentrations (1 nM) were inefficient. The efficiency of each product on neuron differentiation was estimated from qualitative morphological criteria (aspect) including the size of the neurons and the length of their processes (Table 2).

To investigate the structural requirement of IFAs, we examined whether the length of the hydrocarbon chain was a determining factor for the biological activity as well as the position of the methoxy group on the benzene moiety. Indole fatty alcohols bearing a side chain containing at least 16 carbon atoms enhanced the neuronal production. Compounds **13c(n=16)** and **13c(n=18)**, bearing a methoxy group at the C-5 position of the indole ring, led to a substantial increase of 70 % in the production of neurons from the neurospheres as compared to the untreated cells. This activity was comparable to that observed with retinoic acid at the same dose (98%) which remains the highest value obtained in our experiments. The neuronal morphology was similar in both cases; neurons were larger with longer processes indicating a more mature state of differentiation. The presence of the long chain ω -alkanol is essential for the neurotrophic activity as confirmed by the low increase in neuronal production observed with melatonin (19%). Also, the poor result (5%) obtained with compound 14 confirmed the necessity of the hydroxyl group on the side chain. We also analysed the dimethoxy series **13f** and **13g** for their effect on neuronal fate and differentiation which proved to be ineffective (<20%) despite their good antioxidant capacity. We therefore concluded that there was no correlation between the antioxidant property of the indole fatty alcohols and their capacity to promote the production of neurons. In contrast, neither qualitative nor quantitative effects were observed on astrocytes, suggesting that IFAs might be acting specifically on neuronal progenitors, by promoting their proliferation and differentiation.

In order to further characterize the effects of IFAs, we focused on **13c(n=18)**, since the compound **13c(n=16)** was slightly more toxic at higher concentrations. We examined the dependence of its effect on the differentiation of neurospheres on the time of administration. This procedure allowed us to define whether a factor is acting either on the cell fate decision and/or on cell differentiation.²¹

When the product is administered during the proliferation phase, an increase in the number of neurons accompanied by a decrease of GFAP-positive cells would suggest that the test compound acts on a cell fate decision. **13c(n=18)** was added everyday at a concentration of 10 nM to the neurospheres during either the proliferation phase, and/or the differentiation phase. In all cases, the results were similar and showed an increase in the number of MAP2 positive cells up to 90%, the neurons being larger with longer processes. In contrast, neither qualitative nor quantitative effects were observed on astrocytes (Figure 4). Together these results suggest that the increase in neurons was not taking place at the expense of astrocytes and therefore that **13c(n=18)** was specifically acting on neuronal progenitors by increasing their proliferation and differentiation. We analysed DNA synthesis by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation to investigate the possible effect of **13c(n=18)** on the proliferation potential of neurospheres. Although there was a slight increase in the number of BrdU incorporating cells (data not shown), there was no increase in the number of cells colocalizing MAP2ab and BrdU. This result suggests that compound **13c(n=18)** has no mitotic effect on neuronal precursors. However we cannot exclude the possibility that it may act on early neuronal progenitors which do not yet express MAP2ab. Overall, these data are consistent with the notion that **13c(n=18)** has a promoting effect on the differentiation of neurons and is not acting on cell fate decision.

In a first attempt to elucidate the mechanism of action of IFAs and to identify their targets, we investigated the possibility that the action of **13c(n=18)** might be mediated through Notch signaling. Notch signaling controls a wide variety of cell fate decisions, including the differentiation of neural stem cells during neurogenesis.^{21,31} In molecular terms it depends on transmembrane receptors encoded by the Notch genes (from Notch1 to Notch4 in vertebrates) activated by transmembrane ligands of the Delta and Jagged families. We thus compared the level of expression of the four Notch genes and of other genes of the Notch pathway by semi-quantitative RT-PCR in neurospheres treated with **13c(n=18)** at 10 nM during the differentiation phase. The Notch1-3 messengers (> 70%) showed a slight decrease which was insignificant ; in contrast the levels of the Notch4 messengers (19%) are consistently and significantly diminished suggesting that it might be a biological specific target for **13c(n=18)** (Figure 5). Unfortunately, contrary to other Notch genes, the function of Notch4 in the nervous system remains largely unknown, thereby precluding further correlation between the biological effect of **13c(n=18)** and its mechanism of action.

In order to study the putative role of Notch4 on the production of neurons versus glia in neurospheres, we resorted to the antisense oligonucleotides technique which allows the repression of the Notch4 mRNA translation to the protein. The addition of antisense to Notch4 to neurospheres during the proliferation and the differentiation phase, relative to neurospheres treated with the sense

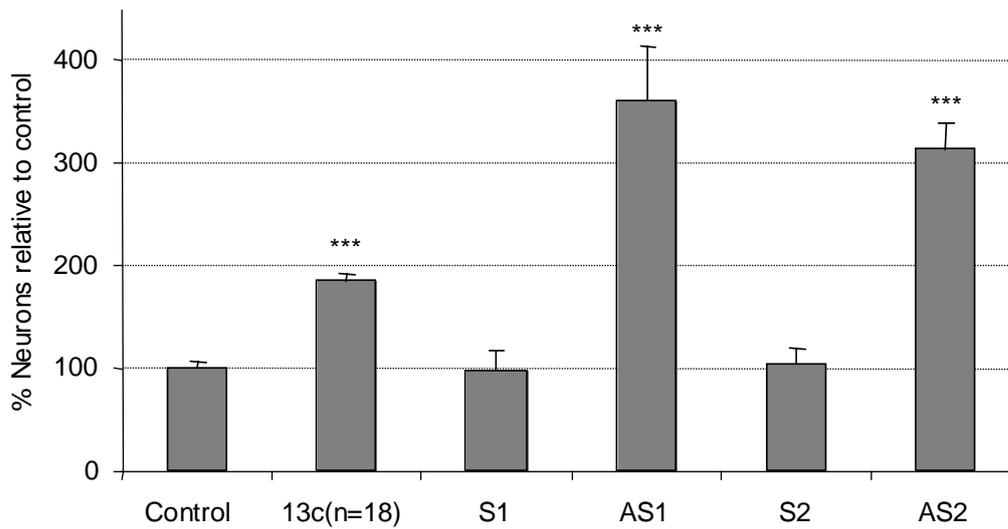


Figure 6. Effect of Notch4 antisense oligonucleotides on the production of neurons in neurospheres. **13c(n=18)**, antisense oligonucleotides (**AS1** and **AS2**) or sense oligonucleotides (**S1** and **S2**, control to AS1 and AS2) were added to neurospheres during the proliferation and the differentiation phase. Results were quantified as percentages of the total number of cells as described in the experimental section. Data are representative of three independent experiments. *** $p \leq 0.001$ by multiple pairwise comparisons using Turkey-Kramer method.

oligonucleotides as control, resulted in a increase of the neuronal population (>300%) with no effect on astrocytes (Figure 6). The phenotypic response was similar to that obtained when the neurospheres were treated with **13c(n=18)** at 10 nM. These results indicate that the **13c(n=18)** promoting effect on the differentiation of neurons might strongly be due to the decrease in Notch4 level expression.

CONCLUSION

In conclusion, the indole fatty alcohol **13c(n=18)** promotes the differentiation of neural stem cell-derived neurospheres into neurons. Our results suggest that this effect is probably exerted on neuronal progenitors rather than on bipotential neuronal / glial precursors, with **13c(n=18)** promoting their differentiation. This finding supports the notion that this molecule acts as a neurotrophic factor. More work is needed for elucidating its mechanism of action. However, our results support largely the hypothesis that the compound **13c(n=18)** may act through the Notch signaling so as to increase the production of neurons from neural stem cells. These results suggest that this compound may have interesting implications in the treatment of neuronal disorders.

EXPERIMENTAL SECTION

Biology

Drug was dissolved in ethanol at the concentration of 10^{-2} M and diluted in culture medium to render a final concentration of 0.1% ethanol. Control cells were incubated in the same conditions. Neurospheres have been prepared as described by Grandbarbe et al.²⁰

Differentiation and analysis of neurospheres

After three days of proliferation, 50-100 neurospheres were plated onto polyornithine (poly-L-ornithine Sigma)-coated (14 mm) cover slips, in a 24 wells plate (Nunc) to differentiate. Differentiation of neurospheres is often described as requiring the withdrawal of EGF, which is replaced by fetal bovine serum (FBS). In order to avoid the hazardous effect of FBS, while preserving cell survival, we reduced EGF concentration to 2 ng/ml during the differentiation phase, which is sufficient to allow cell survival but minimizes proliferation. Under these conditions, the differentiating sphere remains a dynamic structure where generation of new cells (stem cells and progenitors) is diminished but not totally abolished.

Immunostaining and quantification

Neurospheres were fixed for 20 minutes in 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4), washed in PBS and permeabilized 5 minutes with PBS/0.5% Triton X-100 (Sigma). The neurospheres were incubated for 30 minutes in PBS containing 3% BSA and then for two hours with the appropriate mixture of antibodies. Primary antibodies used were mouse monoclonal anti-MAP2 (2a+2b) (1/600, Sigma) and mouse monoclonal TUJ1 (1/400, Convance) specific for immature and post-mitotic neurons respectively, rabbit polyclonal anti-GFAP (1/1000, Dako) for astrocytes. After washing in PBS, differentiating spheres were incubated for 1 hour with anti-mouse Cy3-conjugated secondary antibodies (1/1000, Jackson ImmunoResearch) and anti-rabbit Alexa 488-conjugated antibodies (1/600, Molecular Probes). Preparations were counterstained with TO-PRO-3-iodide (1/15000, Molecular Probes), mounted in Aquamount (Polyscience) and viewed for triple immunofluorescence using a Zeiss LSM 510 confocal microscope. Data are based on three or four independent experiments in which averages of more than 10 spheres were analyzed per condition, per experiment. Under the conditions used for cell concentration after full dissociation (3.10^4 cells/ml) and plating (50-100 spheres/cover slip), each neurosphere may be considered as the clonal progeny of a single neural stem cell. For cell type quantitative estimation, neurospheres were chosen of approximately the same size. The confocal plane was at the basis of the neurosphere, i.e. where the cells differentiate. The optical slice was ≤ 2 μ m. The results are expressed in percentage of total cell number assessed from TO-PRO-3-iodide staining.

Treatment with Notch4 antisense oligonucleotides

Notch4 antisense (**AS1** and **AS2**) and control sense (**S1** and **S2**) oligonucleotides have been designed with OLIGO 6.1 software (Molecular Biology Insights) and sequences are as follows: **AS1** - CCA TGA GCT TTC GGG TTC, **S1** - GAA CCC GAA AGC TCA TGG, **AS2** - AAG GCG TTG GCT AAA and **S2** - TTT AGC CAA CGC CTT. Neurospheres have been treated with 10 μ M of sense (control conditions), antisense oligonucleotides or with **13c(n=18)** at 10 nM during differentiation and proliferation phases. The graphed results are shown as means \pm s.e.m. When statistical differences were obtained between groups at $P \leq 0.001$ for ***, group changes were assessed by multiple pair-wise comparisons using the Turkey-Kramer method.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Analysis

The cDNA was synthesised from 3 μ g of total RNA for neurospheres at 37°C for 1hr, in a 20 μ l reaction mixture, containing 200 U of M-MLV Reverse Transcriptase(Invitrogen), 0.5 mM dNTPs (QBiogen), 5mM DTT (Invitrogen), 0.01 μ g/ μ l Random hexamer (Invitrogen), 20 U RNaseOUT™

(Invitrogen). One-tenth of total cDNA was amplified in a 20 µl reaction mixture containing 1,25 U of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, 0.5 mM dNTPs (QBiogen), 0.5 µl of each primer (IGBMC, Strasbourg). PCR conditions have been adjusted for each primer. Typical cycle conditions were 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, and 30 sec at 72°C for all the primers studied. 10 µl of the reaction were then separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The graphed results are shown as means ± s.e.m. Group changes were assessed by multiple pair-wise comparisons using the Turkey-Kramer method. Statistical differences were obtained between groups at $P \leq 0.01$ for **.

Genes	Sequence of primers
Notch1 F	5'-TGCCAAATGCCTGCCAGAAT-3'
Notch1 R	5'-CATGGATCTTGTCCATGCAG-3'
Notch2 F	5'-GAGGCGACTCTTCTGCTGTTGAAGA-3'
Notch2 R	5'-ATAGAGTCACTGAGCTCTCGGACAG-3'
Notch3 F	5'-ACACTGGGAGTTCTCTGTGAG-3'
Notch3 R	5'-GCTGTCTGCTGGCATGGGATA-3'
Notch4 F	5'-CTTCTCGTCTCCAGTCCAT-3'
Notch4 R	5'-GCTGACATCAGGGGTGTCAC-3'

Chemistry

General Procedures. Tetrahydrofuran was distilled from sodium/benzophenone under argon prior to use. Dichloromethane, methanol and xylene were distilled from calcium hydride. DMF was distilled from P_2O_5 . All reactions involving moisture sensitive reactants were executed under argon atmosphere using oven dried and/or flame dried glassware. 1H NMR spectra were recorded on Bruker AC 200 (200 MHz) and Bruker Advance 300 (300 MHz) spectrometers as solutions in $CDCl_3$ or DMSO- d_6 . Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm, δ) downfield from tetramethylsilane (TMS) and are referenced to $CHCl_3$ (7.26 ppm) or DMSO (2.54 ppm) as internal standard. J values are expressed in hertz (Hz). ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker AC 200 (50 MHz) and Bruker Advance 300 (75 MHz) spectrometers as solutions in $CDCl_3$ or DMSO- d_6 . Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm, δ) downfield from

TMS and are referenced to $CDCl_3$ (77.4 ppm) or DMSO- d_6 (40.5 ppm) as internal standard. The attribution of the different carbons (C, CH, CH_2 , CH_3) was determined by ^{13}C to 1H polarisation transfer (DEPT). Infrared spectra (IR, cm^{-1}) were measured on a Perkin-Elmer 881 FT-IR spectrometer. UV spectra were obtained in acetonitrile solution using Kontron-Uvikon 810 UV-Vis spectrometer. Mass spectra (MS) were measured on a Trio 2000 Fisons apparatus by direct introduction (an ionisation potential of 70 eV was used, m/z relative intensities (in %) are noted in brackets). Analysis were performed by the "Service Central de Microanalyse du CNRS" and all new synthesized compounds agreed within $\pm 0.4\%$ of calculated values. Routine monitoring of reactions were performed using 60 F_{254} silica gel TLC plates (Merck), which were dipped in a solution of vanillin (1g) in EtOH/ H_2SO_4 (95/5) and heated on a hot plate. Flash chromatography was conducted using 60 F_{254} silica gel (Merck) with the indicated solvent.

2-Azido-3-(2'-methoxy-phenyl)-acrylic acid methyl ester (2b). A solution of sodium methoxide (30% w/w, 22 ml, 0.12 mol, 4 eq) in methanol (40 ml) was cooled at $-10^\circ C$. A mixture of 2-methoxybenzaldehyde **1b** (4 g, 29.38 mmol, 1 eq) and methyl azidoacetate (13.5 g, 0.12 mol, 4 eq) in methanol (10 ml) was added dropwise to it over 1.5 h. The mixture was stirred at $-10^\circ C$ for an additional 1.5 h, poured into ice-water (100 ml) and extracted with ethyl ether (3x100 ml). The combined extracts were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated. Flash chromatography on silica gel using hexane-AcOEt (90-10) gave a yellow solid (4.7 g, 68%). 1H NMR (300MHz), δ : 3.87 (s, 3H, $-CO_2CH_3$), 3.91 (s, 3H, $-OCH_3$), 6.89 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-2'), 6.99 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-5'), 7.32 (dt, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-4'), 7.40 (s, 1H, H-3), 8.19 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-6'). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 52.8 ($-OCH_3$), 55.6 ($-CO_2CH_3$), 110.4 (C-3'), 119.6, 120.4 (C-3,5'), 122.0 (C-1'), 125.1 (C-2), 130.6, 130.9 (C-4',6'), 157.6 (C-2'), 164.2 (C-1).

2-Azido-3-(3'-methoxy-phenyl)-acrylic acid methyl ester (2c). Yield: 45% 1H NMR (300MHz), δ : 3.84 (s, 3H, $-CO_2CH_3$), 3.91 (s, 3H, $-OCH_3$), 6.89 (s, 1H, H-3), 6.92 (m, 1H, H-4'), 7.30 (s, 1H, H-2'), 7.33 (m, 1H, H-6'), 7.43 (m, 1H, H-5'). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 52.9 ($-OCH_3$), 55.3 ($-CO_2CH_3$), 115.3, 115.5 (C-2',4'), 123.4 (C-6'), 125.4 (C-3), 125.5 (C-2), 129.4 (C-5'), 134.3 (C-1'), 159.4 (C-3'), 163.9 (C-1).

2-Azido-3-(4'-methoxy-phenyl)-acrylic acid methyl ester (2d). Yield: 72% 1H NMR (300MHz), δ : 3.84 (s, 3H, $-CO_2CH_3$), 3.89 (s, 3H, $-OCH_3$), 6.89 (s, 1H, H-3), 6.91 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-2',6'), 7.79 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H-3',5'). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 52.7 ($-OCH_3$), 55.3 ($-CO_2CH_3$), 113.9 (C-3',5'), 123.1 (C-1'), 125.7 (C-3), 125.9 (C-2), 132.4 (C-2',6'), 160.5 (C-4'), 164.3 (C-1).

2-Azido-3-(2',3'-dimethoxy-phenyl)-acrylic acid methyl ester (2e). Yield: 57% 1H NMR (300MHz), δ : 3.84 (s, 3H, $-CO_2CH_3$), 3.87 (s, 3H, $-OCH_3$), 3.92 (s, 3H, $-OCH_3$), 6.93 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4'), 7.09 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5'), 7.33 (s, 1H, H-3), 7.81 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-

6'). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 52.9 (-CO₂CH₃), 55.8 (-OCH₃), 61.4 (-OCH₃), 113.6 (C-4'), 119.5 (C-6'), 122.2 (C-3), 123.7 (C-5'), 126.1 (C-1'), 127.3 (C-2), 148.1 (C-2'), 152.5 (C-3'), 164.1 (C-1).

2-Azido-3-(3',4'-dimethoxy-phenyl)-acrylic acid methyl ester (2f). Yield: 76% ^1H NMR (300MHz), δ : 3.90 (s, 3H, -CO₂CH₃), 3.91, 3.92 (2s, 6H, -OCH₃), 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 6.88 (s, 1H, H-3), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.51 (s, 1H, H-2'). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 52.8 (-CO₂CH₃), 55.9 (-OCH₃), 110.7 (C-2'), 112.9 (C-5'), 123.2 (C-1'), 124.9 (C-3), 125.9 (C-6'), 126.2 (C-2), 148.6 (C-4'), 150.2 (C-3'), 164.2 (C-1).

4-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid methyl ester (3b). Azido ester **2b** (3.7 g, 15.86 mmol, 1 eq) dissolved in xylene (100 ml) was added dropwise to refluxing xylene (150 ml) under argon. The solution was refluxed for 1 h, after which it was evaporated under reduced pressure. The resulting solid was flash chromatographed on silica gel using hexane-AcOEt (80-20) to give a white solid (2.9 g, 88%). mp 143-144°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 3.96 (s, 3H, -CO₂CH₃), 6.51 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5), 7.03 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-7), 7.24 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.36 (s, 1H, H-3), 9.17 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 51.9 (-OCH₃), 55.3 (-CO₂CH₃), 99.7 (C-5), 104.8 (C-7), 106.5 (C-3), 118.9 (C-3'), 125.8 (C-2), 126.5 (C-6), 138.3 (C-7'), 154.6 (C-4), 162.5 (-CO₂CH₃). Anal. Calcd C : 64.38 H : 5.40 N : 6.83. Found C : 64.35 H : 5.36 N : 6.65. IR (CsI) : 3320 (s br, N-H), 2992 (w, =C-H), 2933, 2841 (w, C-H), 1699 (s, C=O), 1522 (m, C-N), 1254 (m, C-O), 755 (s, C-H arom).

5-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid methyl ester (3c). Yield: 37% mp 177-178°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.85 (s, 3H, -CO₂CH₃), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 7.00 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 7.08 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.14 (s, 1H, H-3), 7.32 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-7), 8.91 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 51.9 (-OCH₃), 55.7 (-CO₂CH₃), 102.5 (C-4), 108.3 (C-3), 112.8 (C-6), 117.1 (C-7), 127.5 (C-2), 127.8 (C-3'), 132.2 (C-7'), 154.7 (C-5), 162.4 (-CO₂CH₃). Anal. Calcd C : 64.38 H : 5.40 N : 6.83. Found C : 64.44 H : 5.44 N : 6.88. IR (CsI) : 3314 (s, N-H), 2997 (w, =C-H), 2938, 2836 (w, C-H), 1688 (s, C=O), 1527 (m, C-N), 1250 (m, C-O), 1027 (m, C-O), 766 (s, C-H arom).

6-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid methyl ester (3d). Yield: 94% mp 118-119°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 3.94 (s, 3H, -CO₂CH₃), 6.83 (dd, J = 9.5 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), 6.84 (s, 1H, H-3), 7.17 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 7.55 (d, J = 9.5 Hz, 1H, H-4), 9.02 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 51.8 (-OCH₃), 55.5 (-CO₂CH₃), 93.7 (C-7), 109.2 (C-3), 112.3 (C-5), 121.8 (C-3'), 123.4 (C-4), 126.0 (C-2), 138.0 (C-7'), 158.9 (C-6), 162.5 (-CO₂CH₃). IR (CsI) : 3321 (s, N-H), 2998 (w, =C-H), 2935, 2832 (w, C-H), 1695 (s, C=O), 1525 (m, C-N), 1253 (m, C-O), 1091 (m, C-O), 773 (s, C-H arom).

7-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid methyl ester (3e). Yield: 28% mp 115-116°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 3.98 (s, 3H, -CO₂CH₃), 6.74 (d, J =

7.9 Hz, 1H, H-6), 7.08 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.21 (s, 1H, H-3), 7.29 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-4), 9.09 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 52.1 (-OCH₃), 55.5 (-CO₂CH₃), 104.2 (C-6), 109.1 (C-3), 114.9 (C-5), 121.3 (C-4), 126.9 (C-7'), 128.2 (C-3'), 128.7 (C-2), 146.6 (C-7), 162.3 (-CO₂CH₃). Anal. Calcd C : 64.38 H : 5.40 N : 6.83. Found C : 65.14 H : 5.46 N : 7.25. IR (CsI) : 3340 (s, N-H), 2997 (w, =C-H), 2933, 2836 (w, C-H), 1709 (s, C=O), 1579 (m, C-N), 1263 (m, C-O), 1090 (m, C-O), 782 (s, C-H arom).

4,5-Dimethoxy-1H-indole-2-carboxylic acid methyl ester (3f). Yield: 63% mp 120-121°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.90 (s, 3H, -CO₂CH₃), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 4.08 (s, 3H, -OCH₃), 7.07 (s br, 2H, H-6,7), 7.32 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-3), 8.95 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 50.1 (-CO₂CH₃), 56.5 (-OCH₃), 58.9 (-OCH₃), 104.3, 104.7 (C-6,7), 114.2 (C-3), 120.4 (C-3'), 125.5 (C-2), 132.3 (C-7'), 141.0 (C-4), 142.8 (C-5), 160.4 (-CO₂CH₃). Anal. Calcd C : 61.27 H : 5.57 N : 5.95. Found C : 61.43 H : 5.60 N : 5.95. IR (CsI) : 3328 (s, N-H), 2997 (w, =C-H), 2938, 2836 (w, C-H), 1695 (s, C=O), 1530 (m, C-N), 1256 (m, C-O), 1061 (w, C-O), 753 (s, C-H arom).

5,6-Dimethoxy-1H-indole-2-carboxylic acid methyl ester (3g). Yield: 86% mp 167-168°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.92 (s, 9H, -OCH₃, -CO₂CH₃), 6.85 (s, 1H, H-4), 7.04 (s, 1H, H-7), 7.11 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-3), 8.89 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 51.8 (-CO₂CH₃), 56.1 (-OCH₃), 93.7 (C-4), 102.5 (C-3), 108.8 (C-7), 120.4 (C-3'), 125.6 (C-2), 132.1 (C-7'), 146.2 (C-5), 150.1 (C-6), 162.3 (-CO₂CH₃). IR (CsI) : 3334 (s, N-H), 2943, 2836 (w, C-H), 1686 (s, C=O), 1531 (m, C-N), 1255 (m, C-O), 766 (s, C-H arom).

4-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid (4b). Carboxylate **3b** (4 g, 19.49 mmol, 1 eq) was added to a solution of aqueous sodium hydroxide (2M, 98 ml, 0.20 mol, 10 eq). The suspension was stirred and heated until the reaction mixture became homogeneous, after which the solution was heated at reflux for 30 min. The mixture was acidified and the precipitate formed was extracted with ethyl acetate (3x100 ml). The combined extracts were washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated to give a white solid (3.7 g, 99%). mp 240-241°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.91 (s, 3H, -OCH₃), 6.55 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.06 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.09 (s, 1H, H-3), 7.19 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 11.79 (s, 1H, H-1), 12.87 (s, 1H, -CO₂H). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 55.4 (-OCH₃), 99.7 (C-5), 104.9, 105.8 (C-3,7), 118.4 (C-3'), 125.8 (C-6), 127.4 (C-2), 138.9 (C-7'), 154.1 (C-4), 163.0 (-CO₂H). IR (CsI) : 3325 (s br, N-H, O-H), 2997 (w, =C-H), 1703 (s, C=O), 1519 (m, C-N), 1205 (m, C-O), 1019 (m, C-O), 731 (s, C-H arom).

5-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid (4c). Yield: 99% mp 199-201°C. ^1H NMR (300MHz), δ : 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 6.93 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 7.03 (s, 1H, H-3), 7.13 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.36 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-7), 11.64 (s, 1H, -CO₂H), 12.86 (s, 1H, H-1). ^{13}C NMR (75MHz), δ : 55.1 (-OCH₃), 101.9 (C-4), 106.8 (C-3), 113.3 (C-6), 115.7 (C-7), 127.1 (C-2), 128.5 (C-3'),

132.5 (C-7'), 153.7 (C-4), 162.7 (-CO₂H). Anal. Calcd C : 62.82 H : 4.74 N : 7.33. Found C : 62.79 H : 4.73 N : 7.08. IR (CsI) : 3335 (s br, N-H, O-H), 2998 (w, =C-H), 1715 (s, C=O), 1523 (m, C-N), 1213 (m, C-O), 1028 (m, C-O), 736 (s, C-H arom).

6-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid (4d). Yield: 99% mp 204-205°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 6.75 (dd, J = 8.8 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, H-5), 6.90 (s, 1H, H-3), 7.05 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.55 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-4), 11.58 (s, 1H, H-1), 12.73 (s, 1H, -CO₂H). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.0 (-OCH₃), 93.9 (C-7), 107.7 (C-3), 111.5 (C-5), 121.1 (C-3'), 122.7 (C-4), 127.1 (C-2), 138.2 (C-7'), 157.6 (C-6), 162.6 (-CO₂H). IR (CsI) : 3345 (s large, N-H, O-H), 2996 (w, =C-H), 1693 (s, C=O), 1526 (m, C-N), 1211 (m, C-O), 1031 (m, C-O), 745 (s, C-H arom).

7-Methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid (4e). Yield: 96% ¹H NMR (300MHz), δ : 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 6.80 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-6), 7.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 7.11 (s, 1H, H-3), 7.25 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-4), 11.65 (s, 1H, -CO₂H), 12.82 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 56.2 (-OCH₃), 105.0 (C-6), 109.1 (C-3), 115.1 (C-5), 121.6 (C-4), 129.1, 129.2, 129.5 (C-2, 3', 7'), 147.7 (C-7), 163.5 (-CO₂H). Anal. Calcd C : 62.82 H : 4.74 N : 7.33. Found C : 62.68 H : 4.80 N : 7.31. IR (CsI) : 3312 (s br, N-H, O-H), 2998 (w, =C-H), 1674 (s, C=O), 1549 (m, C-N), 1249 (m, C-O), 1087 (m, C-O), 730 (s, C-H arom).

4,5-Dimethoxy-1H-indole-2-carboxylic acid (4f). Yield: 93% ¹H NMR (300MHz), δ : 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 7.09-7.14 (m, 2H, H-6,7), 7.12 (s, 1H, H-3); 11.70 (s, 1H, -CO₂H), 12.95 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 58.5 (-OCH₃), 60.6 (-OCH₃), 104.7 (C-7), 107.8 (C-6), 116.0 (C-3), 121.9 (C-3'), 129.0 (C-2), 135.0 (C-7'), 142.3 (C-4), 144.2 (C-5), 163.0 (-CO₂H). Anal. Calcd C : 59.73 H : 5.01 N : 6.33. Found C : 59.73 H : 5.18 N : 5.88. IR (CsI) : 3394 (s br, N-H, O-H), 2998 (w, =C-H), 1647 (s, C=O), 1523 (m, C-N), 1215 (m, C-O), 1064 (m, C-O), 741 (s, C-H arom).

5,6-Dimethoxy-1H-indole-2-carboxylic acid (4g). Yield: 85% ¹H NMR (300MHz), δ : 3.71, 3.74 (s, 6H, -OCH₃), 6.83 (s, 1H, H-3), 6.91 (s, 1H, H-4), 7.03 (s, 1H, H-7), 11.40 (s, 1H, -CO₂H), 12.53 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.8, 56.0 (-OCH₃), 94.8 (C-4), 103.0 (C-3), 107.9 (C-7), 120.2 (C-3'), 126.9 (C-2), 132.8 (C-7'), 145.9 (C-5), 149.6 (C-6), 163.1 (-CO₂H). IR (CsI) : 3391 (s br, N-H, O-H), 2997 (w, =C-H), 1652 (s, C=O), 1539 (m, C-N), 1227 (m, C-O), 1015 (m, C-O), 724 (s, C-H arom).

4-Methoxy-1H-indole (5b). The carboxylic acid **4b** (3.7 g, 19.09 mmol, 1 eq), copper powder (850 mg, 13.36 mmol, 0.7 eq) and freshly distilled quinoline (50 ml) were brought to reflux for 2 h. The mixture was then cooled and filtered on celite. The filtrate was poured on ice and the solution was brought to pH 4 with conc. HCl and extracted with ethyl acetate (3x100 ml). The combined extracts were washed with HCl 2M (3x100 ml), saturated NaHCO₃ and brine. The organic solution was dried over

MgSO₄ and concentrated. The residue was flash chromatographed on silica gel using hexane-AcOEt (85-15) to give a white solid (2.6 g, 94%). mp 69-70°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.99 (s, 3H, -OCH₃), 6.57 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-5), 6.70 (t, J = 2.5 Hz, 1H, H-3), 7.03 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.10 (t, J = 2.5 Hz, 1H, H-2), 7.16 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 8.13 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 53.3 (-OCH₃), 99.6, 99.8 (C-3,5), 104.5 (C-7), 118.6 (C-3'), 122.7, 122.8 (C-2,6), 137.3 (C-7'), 153.4 (C-4). IR (CsI) : 3415 (s, N-H), 2993 (w, =C-H), 2941, 2835 (w, C-H), 1599 (s, C-N), 1486 (m, C-H), 1239 (s, C-O), 1053 (m, C-O), 725 (s, C-H arom).

5-Methoxy-1H-indole (5c). Yield: 77% mp 52-53°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 6.50 (t, J = 2.8 Hz, 1H, H-3), 6.89 (dd, J = 8.8 Hz, J = 2.4 Hz, 1H, H-6), 7.13 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-4), 7.19 (t, J = 2.8 Hz, 1H, H-2), 7.28 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-6), 8.06 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 53.9 (-OCH₃), 102.3, 102.4 (C-3,6), 111.7 (C-4), 112.4 (C-7), 124.9 (C-2); 130.1 (C-3'), 131.0 (C-7'), 154.2 (C-5). IR (CsI) : 3411 (s, N-H), 2997 (w, =C-H), 2943, 2832 (w, C-H), 1625 (s, C-N), 1480 (m, C-H), 1224 (s, C-O), 1028 (m, C-O), 725 (s, C-H arom).

6-Methoxy-1H-indole (5d). Yield: 87% mp 92-94°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 6.52 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H-3), 6.85 (m, 2H, H-5,7), 7.08 (t, J = 2.6 Hz, 1H, H-2), 7.55 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H-4), 7.99 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.7 (-OCH₃), 94.6 (C-7), 102.4 (C-3), 109.9 (C-5), 121.3 (C-4), 122.2 (C-3'), 123.1 (C-2), 136.6 (C-7'), 156.4 (C-6). IR (CsI) : 3395 (s, N-H), 3009 (w, =C-H), 2955, 2841 (w, C-H), 1631 (s, C-N), 1509 (m, C-H), 1249 (s, C-O), 1041 (m, C-O), 815 (s, C-H arom).

7-Methoxy-1H-indole (5e). Yield: 71% ¹H NMR (300MHz), δ : 3.98 (s, 3H, -OCH₃), 6.56 (t, J = 2.7 Hz, 1H, H-3), 6.67 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-6), 7.06 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.19 (t, J = 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.29 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-4), 8.39 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 57.6 (-OCH₃), 104.0 (C-6), 105.2 (C-3), 115.8 (C-5), 122.5 (C-4), 126.0 (C-2), 128.8 (C-3'), 131.5 (C-7'), 148.5 (C-7). Anal. Calcd C : 73.45 H : 6.16 N : 9.52. Found C : 73.53 H : 6.16 N : 9.54. IR (CsI) : 3418 (s, N-H), 3046 (w, =C-H), 2937, 2836 (w, C-H), 1580 (s, C-N), 1490 (m, C-H), 1255 (s, C-O), 1081 (m, C-O), 725 (s, C-H arom).

4,5-Dimethoxy-1H-indole (5f). Yield: 83% mp 160-161°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.91 (s, 3H, -OCH₃), 4.08 (-OCH₃), 6.64 (t, J = 2.6 Hz, 1H, H-3), 6.94 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-6), 7.07 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-7), 7.14 (t, J = 2.6 Hz, 1H, H-2), 8.18 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 58.4 (-OCH₃), 60.7 (-OCH₃), 99.8 (C-3), 105.8 (C-6), 111.8 (C-7), 122.2 (C-3'), 124.6 (C-2), 133.3 (C-7'), 141.9 (C-5), 144.5 (C-4). Anal. Calculated C : 67.78 H : 6.26 N : 7.90. Found C : 67.57 H : 6.28 N : 7.82. IR (CsI) : 3339 (s, N-H), 2995 (w, =C-H), 2932, 2836 (w, C-H), 1638 (s, C-N), 1490 (m, C-H), 1224 (s, C-O), 1039 (m, C-O), 742 (s, C-H arom).

5,6-Dimethoxy-1H-indole (5g). Yield: 61% mp 155-157°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.90, 3.93 (s, 6H, -OCH₃), 6.45 (t, J = 2.8 Hz, 1H, H-3), 6.89 (s, 1H, H-7), 7.08 (t, J

= 2.8 Hz, 1H, H-2), 7.10 (s, 1H, H-4), 8.05 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 56.2, 56.3 (-OCH₃), 94.4 (C-3), 102.3, 102.3 (C-4,7), 120.5 (C-3'), 122.7 (C-2), 130.1 (C-7'), 145.1 (C-5), 147.0 (C-6). IR (CsI) : 3353 (s, N-H), 2997 (w, =C-H), 2961, 2830 (w, C-H), 1629 (s, C-N), 1478 (s, C-H), 1221 (s, C-O), 997 (m, C-O), 757 (s, C-H arom).

4-Methoxy-1H-indole-3-carbaldehyde (6b).

Pyrophosphoryl chloride (1.9 ml, 13.86 mmol, 1.2 eq) was added dropwise to a stirred mixture of *N,N*-dimethylformamide (4.5 ml, 57.76 mmol, 5 eq) and indole **5b** (1.7 g, 11.55 mmol, 1 eq) at 0°C. The resulting syrup was stirred at 0°C for 0.5 h then at 40°C for 1 h. Ice was added, followed by a solution of sodium hydroxide (2M), and the mixture was heated under reflux. On cooling, the solution was extracted with ethyl acetate (3x50 ml). The combined organic extracts were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. Flash chromatography with hexane-AcOEt (60-40) gave a white solid (1.7 g, 85%). mp 162-163°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 4.00 (s, 3H, -OCH₃), 6.72 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5), 7.09 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-7), 7.21 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 7.92 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-2), 9.36 (s, 1H, H-1), 10.50 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.2 (-OCH₃), 102.2 (C-5), 105.7 (C-7), 115.5 (C-3), 118.0 (C-3'), 123.5 (C-6), 129.5 (C-2), 137.8 (C-7'), 153.8 (C-4), 186.2 (-CHO).

1H-indole-3-carbaldehyde (6a). Yield: 91% mp 188-189°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 7.19-7.28 (m, 2H, H-5,6), 7.53 (dd, J = 7.2 Hz, J = 1.6 Hz, 1H, H-7), 8.04 (dd, J = 6.6 Hz, J = 1.5 Hz, 1H, H-4), 8.29 (s, 1H, H-2), 9.94 (s, 1H, -CHO), 12.13 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 112.9 (C-7), 118.6 (C-3), 121.3 (C-5), 122.6 (C-4), 123.9 (C-6), 124.5 (C-3'), 137.5 (C-7'), 138.9 (C-2), 185.4 (-CHO). IR (CsI) : 3391 (s br, N-H), 2927, 2819 (w, C-H), 1634 (s, C=O), 1447 (m, C-H), 1244 (m, C-H), 761 (s, C-H arom).

5-Methoxy-1H-indole-3-carbaldehyde (6c). Yield: 90% mp 182-183°C. ¹H NMR (200MHz), δ : 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 6.92 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, H-6), 7.44 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-7), 7.63 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-4), 8.25 (s, 1H, H-2), 9.93 (s, 1H, -CHO), 12.06 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (50MHz), δ : 55.2 (-OCH₃), 102.5 (C-4), 113.1, 113.2 (C-6,7), 118.0 (C-3), 124.8 (C-3'), 131.7 (C-7'), 138.3 (C-2), 155.6 (C-5), 184.7 (-CHO). IR (CsI) : 3339 (s br, N-H), 2926, 2839 (w, C-H), 1635 (s, C=O), 1489 (m, C-H), 1263 (s, C-O), 1052 (m, C-O), 776 (s, C-H arom).

6-Methoxy-1H-indole-3-carbaldehyde (6d). Yield: 89% mp 195-196°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 6.85 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), 6.99 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 7.98 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-4), 8.05 (s, 1H, H-2), 9.89 (s, 1H, -CHO), 12.08 (s, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.0 (-OCH₃), 95.2 (C-7), 111.6 (C-5), 117.9, 118.2 (C-3,3'), 121.3 (C-4), 137.0 (C-2), 137.9 (C-7'), 156.7 (C-6), 184.3 (-CHO). IR (CsI) : 3187 (s br, N-H), 2824 (w, C-H), 1638 (s, C=O), 1423 (m, C-H), 1228 (s, C-O), 1036 (m, C-O), 769 (s, C-H arom).

7-Methoxy-1H-indole-3-carbaldehyde (6e). Yield: 78% mp 162-163°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 6.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.23 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.81 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-2), 7.88 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-4), 9.23 (s, 1H, H-1), 10.06 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.4 (-OCH₃), 104.2 (C-6), 114.2 (C-4), 120.0 (C-3), 123.7 (C-5), 125.8 (C-7'), 127.2 (C-3'), 134.6 (C-2), 146.0 (C-7), 185.4 (-CHO). Anal. Calcd C : 68.56 H : 5.18 N : 8.00. Found C : 68.41 H : 5.18 N : 7.90. IR (CsI) : 3401 (s br, N-H), 2889 (w, C-H), 1615 (s, C=O), 1467 (m, C-H), 1239 (s, C-O), 1059 (m, C-O), 750 (s, C-H arom).

4,5-Dimethoxy-1H-indole-3-carbaldehyde (6f). Yield: 57% mp 116-117°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.93 (s, 3H, -OCH₃), 4.01 (s, 3H, -OCH₃), 6.98 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-6), 7.18 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-7), 7.93 (d, J = 3.1 Hz, 1H, H-2), 9.82 (s, 1H, H-1), 10.38 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 57.6 (-OCH₃), 60.8 (-OCH₃), 107.9 (C-6), 112.1 (C-7), 118.5 (C-3), 120.6 (C-3'), 131.7 (C-2), 133.2 (C-7'), 142.5 (C-4), 147.8 (C-5), 187.3 (-CHO). Anal. Calcd C : 64.38 H : 5.40 N : 6.83. Found C : 64.02 H : 5.40 N : 6.73. IR (CsI) : 3268 (s br, N-H), 2938, 2836 (w, C-H), 1644 (s, C=O), 1505 (m, C-H), 1296 (s, C-O), 1062 (m, C-O), 793 (s, C-H arom).

5,6-Dimethoxy-1H-indole-3-carbaldehyde (6g). Yield: 86% mp 167-168°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.75 (s, 6H, -OCH₃), 6.98 (s, 1H, H-4), 7.51 (s, 1H, H-7), 8.03 (s, 1H, H-2), 9.83 (s, 1H, H-1), 10.45 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 56.1 (-OCH₃), 96.1 (C-4), 103.0 (C-7), 117.3 (C-3), 118.8 (C-3'), 131.6 (C-7'), 137.0 (C-2), 146.9 (C-5), 147.9 (C-6), 185.1 (-CHO). IR (CsI) : 3401 (s br, N-H), 2965, 2841 (w, C-H), 1635 (s, C=O), 1487 (m, C-H), 1296 (s, C-O), 1074 (m, C-O), 723 (s, C-H arom).

4-Methoxy-1-(4'-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole-3-carbaldehyde (7b). To a solution of **6b** (1.7 g, 9.59 mmol, 1 eq) in dichloromethane (20 ml), were added sodium hydroxide pellets (574 mg, 14.34 mmol, 1.5 eq) and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. 4-Methoxybenzenesulfonyl chloride (3.0 g, 14.34 mmol, 1.5 eq) was then added and the mixture was stirred for 12 h at room temperature. A saturated solution of NH₄Cl (100 ml) was then added and the mixture was extracted with ethyl acetate (3x100 ml). The combined extracts were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by flash chromatography using hexane-AcOEt (70-30) to give a white solid (3.2 g, 97%). mp 137-138°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 6.99 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5), 7.15 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3'',5''), 7.41 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-6), 7.61 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7), 8.12 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2'',6''), 8.40 (s, 1H, H-2), 10.40 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.7, 55.9 (-OCH₃), 105.5, 106.0 (C-5,7), 115.2 (C-3'',5''), 116.4 (C-3'), 121.4 (C-3), 126.8 (C-6), 127.2 (C-7'), 129.1 (C-2), 129.9 (C-2'',6''), 135.3 (C-1''), 153.9 (C-4), 164.3 (C-4''), 187.0 (-CHO). IR (KBr) : 3008 (w, =C-H), 2956, 2835 (w, C-H), 1677 (s, C=O), 1475 (m, C-H), 1254 (s, C-O), 1058 (m, C-O).

1-(4-Methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole-3-

carbaldehyde (7a). Yield: 87% mp 138-139°C. ¹H NMR (200MHz), δ : 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 6.94 (d, J = 9.1 Hz, 2H, H-3'',5''), 7.32-7.45 (m, 2H, H-5,6), 7.91 (d, J = 9.1 Hz, 2H, H-2'',6''), 7.87-7.96 (m, 1H, H-4), 8.23 (s, 1H, H-2), 8.25 (dd, J = 6.9 Hz, J = 2.7 Hz, 1H, H-7), 10.09 (s br, 1H, -CHO). ¹³C NMR (50MHz), δ : 55.8 (-OCH₃), 113.3 (C-7), 114.9 (C-3'',5''), 122.3 (C-3), 122.6 (C-4,6), 125.0 (C-5), 126.3 (C-2'',6''), 128.6 (C-3'), 129.6 (C-7'), 135.2 (C-1''), 136.2 (C-2), 164.5 (C-4''), 185.3 (-CHO). IR (KBr) : 3015 (w, =C-H), 2948, 2831 (w, C-H), 1676 (s, C=O), 1491 (m, C-H)

5-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole-3-carbaldehyde (7c). Yield: 95% mp 125-126°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 6.93 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3'',5''), 6.99 (dd, J = 9.1 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, H-6), 7.71 (d, J = 2.5 Hz, 1H, H-4), 7.81 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H-7), 7.88 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2'',6''), 8.17 (s, 1H, H-2), 10.05 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.8 (-OCH₃), 104.1 (C-4), 114.1 (C-6), 114.9 (C-3'',5''), 116.2 (C-7), 122.2 (C-3), 127.4 (C-3'), 128.7 (C-7'), 129.6 (C-2'',6''), 135.2 (C-1''), 136.7 (C-2), 157.8 (C-5), 164.5 (C-4''), 185.5 (-CHO). Anal. Calcd C : 59.12 H : 4.38 N : 4.06 O : 23.16. Found C : 59.07 H : 4.40 N : 4.14 O : 23.90. IR (KBr) : 3010 (w, =C-H), 2965, 2843 (w, C-H), 1683 (s, C=O), 1480 (m, C-H), 1262 (s, C-O), 1035 (m, C-O).

6-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole-3-carbaldehyde (7d). Yield: 97% mp 118-119°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 3.99 (s, 3H, -OCH₃), 7.07 (dd, J = 8.8 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), 7.18 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3'',5''), 7.44 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.01 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-4), 8.10 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2'',6''), 8.77 (s, 1H, H-2), 10.05 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.6, 55.9 (-OCH₃), 97.2 (C-7), 113.5 (C-5), 115.3 (C-3'',5''), 119.1 (C-3'), 121.5 (C-3), 122.4 (C-4), 127.2 (C-7'), 129.7 (C-2'',6''), 135.4 (C-1''), 137.3 (C-2), 158.2 (C-6), 164.3 (C-4''), 186.5 (-CHO). IR (KBr) : 2995 (w, =C-H), 2946, 2829 (w, C-H), 1674 (s, C=O), 1475 (m, C-H), 1249 (s, C-O), 1067 (m, C-O).

7-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole-3-carbaldehyde (7e). Yield: 30% mp 118-119°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 6.98 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.20 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3'',5''), 7.33 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.77 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-4), 7.97 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2'',6''), 8.92 (s, 1H, H-2), 10.15 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.8, 56.4 (-OCH₃), 108.8 (C-6), 114.1 (C-4), 115.1 (C-3'',5''), 121.0 (C-3), 126.7 (C-5), 128.6 (C-3'), 129.1 (C-7'), 130.8 (C-2'',6''), 141.0 (C-2), 147.1 (C-1''), 155.2 (C-7), 164.6 (C-4''), 187.4 (-CHO). IR (KBr) : 3017 (w, =C-H), 2955, 2836 (w, C-H), 1659 (s, C=O), 1493 (s, C-H), 1244 (s, C-O), 1059 (m, C-O).

4,5-Dimethoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole-3-carbaldehyde (7f). Yield: 96% mp 132-133°C. ¹H NMR (300MHz), δ : 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 3.91 (s, 3H, -OCH₃), 3.96 (s, 3H, -OCH₃), 6.93 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3'',5''), 7.03 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-6), 7.65 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-7), 7.87 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2'',6''), 8.22 (s, 1H,

H-2); 10.43 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.8 (-OCH₃), 57.1 (-OCH₃), 60.8 (-OCH₃), 109.1 (C-6), 112.8 (C-7), 114.8 (C-3'',5''), 121.5 (C-3), 122.2 (C-3'), 128.6 (C-7'), 129.6 (C-2'',6''), 130.7 (C-1''), 130.8 (C-2), 142.5 (C-4), 149.0 (C-5), 164.4 (C-4''), 187.4 (-CHO). Anal. Calcd C : 57.59 H : 4.56 N : 3.73 S : 8.54. Found C : 57.27 H : 4.59 N : 3.92 S : 8.35. IR (KBr) : 3021 (w, =C-H), 2940, 2838 (w, C-H), 1674 (s, C=O), 1495 (m, C-H), 1263 (s, C-O), 1056 (m, C-O).

5,6-Dimethoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole-3-carbaldehyde (7g). Yield: 26% mp 198-199°C.

¹H NMR (300MHz), δ : 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.84 (s, 3H, -OCH₃), 7.10 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3'',5''), 7.38 (s, 1H, H-4), 7.49 (s, 1H, H-7), 8.01 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2'',6''), 8.62 (s, 1H, H-2); 9.96 (s, 1H, -CHO). ¹³C NMR (75MHz), δ : 55.3 (-OCH₃), 56.1, 56.4 (-OCH₃), 96.9 (C-4), 103.3 (C-7), 115.8 (C-3'',5''), 122.1 (C-3'), 127.8 (C-3), 129.0 (C-7'), 130.1 (C-2'',6''), 130.8 (C-1''), 137.0 (C-2), 148.4 (C-6), 149.1 (C-5), 164.8 (C-4''), 187.2 (-CHO). IR (KBr) : 2998 (w, =C-H), 2945, 2829 (w, C-H), 1676 (s, C=O), 1492 (m, C-H), 1260 (s, C-O), 1087 (m, C-O).

3-(10-Benzyloxy-dec-1-enyl)-4-methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole (11b n=10). To a solution of 9-benzyloxynonyltriphenylphosphonium bromide (600 mg, 1.04 mmol, 1.2 eq) in THF (12 ml), was added dropwise a solution of n-BuLi (1.5 M in hexane, 0.7 ml, 1.04 mmol, 1.2 eq) under argon at -78°C. After 15 min stirring at room temperature, potassium *tert*butoxide (117 mg, 1.04 mmol, 1.2 eq) was added at 0°C. The solution was stirred for 15 min at 0°C. It was then cooled to -78°C and a solution of aldehyde **7b** (300 mg, 0.87 mmol, 1eq) in THF (7 ml) was added slowly. The solution was stirred for 1 h at -78°C, then for 1h30 at 0°C. The mixture was poured on a saturated solution of NH₄Cl (50 ml) and extracted with ethyl ether (3x50 ml). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was purified on silica gel (eluting with hexane-AcOEt 90-10 to 85-15) to give a white solid (362 mg, 74%). ¹H NMR (300MHz), δ : 1.33 (s br, 8H, H-12 to 15), 1.47 (m, 2H, H-16), 1.62 (m, 2H, H-11), 2.32 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H-10), 3.47 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H-17), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.86 (s, 3H, -OCH₃), 4.51 (s, 2H, H-18), 5.70 (dt, J = 10.6 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 6.63 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.80 (d, J = 10.6 Hz, 1H, H-8), 6.86 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3'',5''), 7.16-7.37 (m, 6H, H-7, H-2'' to 6''), 7.38 (s, 1H, H-2), 7.58 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2'',6''). ¹³C NMR (75MHz), δ : 26.2 (C-10), 29.2-29.8 (C-11 to 16), 55.4, 55.6 (-OCH₃), 70.5 (C-17), 72.9 (C-18), 103.9, 104.1 (C-3,5), 106.6 (C-7), 114.4 (C-3'',5''), 119.5 (C-3'), 120.5 (C-2), 122.5 (C-6), 125.6 (C-8), 127.4 (C-4''), 127.6 (C-2'',6''), 128.3 (C-2'',6''), 129.0 (C-3'',5''), 131.7 (C-1''), 132.7 (C-9), 136.6 (C-7'), 138.7 (C-1''), 154.9 (C-4), 163.7 (C-4'').

n	Yield					
	11a	11b	11c	11d	11f	11g
10	70%	74%	65%	91%		
12	87%	71%	62%	78%		
14	88%	45%	84%	77%		
16	90%	69%	94%	85%	81%	49%
18	69%	68%	71%	66%	73%	71%

3-(10-Benzyloxy-dec-1-enyl)-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole (11a n=10). Yield: 70% ¹H NMR (200MHz), δ : 1.31 (s br, 8H, H-12 to 15), 1.42-1.61 (m, 4H, H-11,16), 2.31 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H-10), 3.46 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-17), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 4.50 (s, 2H, H-18), 5.81 (dt, J = 11.2 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 6.40 (d, J = 11.2 Hz, 1H, H-8), 6.86 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 7.24-7.35 (m, 7H, H-5,6, H-2^{'''}-6^{'''}); 7.50 (s, 1H, H-2), 7.53 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H-4), 7.82 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}), 7.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-7). ¹³C NMR (50MHz), δ : 26.3 (C-10), 29.9 (C-11 to 16), 55.7 (-OCH₃), 70.7 (C-17), 73.0 (C-18), 113.7 (C-7), 114.5 (C-9), 117.6 (C-3^{''},5^{''}), 119.4 (C-3), 119.8 (C-5), 123.3 (C-4), 123.6 (C-6), 124.9 (C-2^{''},6^{''}), 127.6 (C-4^{'''}), 127.7 (C-3^{'''},5^{'''}), 128.5 (C-2^{''},6^{''}), 129.2 (C-8), 129.9 (C-3[']), 131.2 (C-7[']), 134.8 (C-1[']), 135.0 (C-2), 139.0 (C-1^{''}), 163.9 (C-4^{''}).

3-(10-Benzyloxy-dec-1-enyl)-5-methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole (11c n=10). Yield: 65% ¹H NMR (200MHz), δ : 1.31 (s br, 8H, H-12 to 15), 1.48 (m, 2H, H-16), 1.61 (m, 2H, H-11), 2.30 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H-10), 3.46 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-17), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 4.50 (s, 2H, H-18), 5.80 (dt, J = 11.3 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 6.34 (d, J = 11.3 Hz, 1H, H-8), 6.85 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.89-6.94 (m, 2H, H-4,6), 7.33 (m, 5H, H-2^{''} to 6^{''}), 7.45 (s, 1H, H-2), 7.78 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}), 7.87 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-7). ¹³C NMR (50MHz), δ : 26.2 (C-10), 29.5-29.8 (C-11 to 16), 55.7 (-OCH₃), 70.6 (C-17), 72.9 (C-18), 102.0 (C-4), 113.9 (C-6), 114.4 (C-3^{''},5^{''}), 114.6 (C-3), 117.6 (C-7), 119.4 (C-3[']), 124.3 (C-2), 127.5 (C-8), 127.7 (C-2^{''},6^{''}), 128.4 (C-3^{''},5^{''}), 129.0 (C-2^{''},6^{''}), 129.2 (C-4^{''}), 129.6 (C-7[']), 131.9 (C-1^{''}), 134.9 (C-9), 138.5 (C-1^{''}), 156.4 (C-5), 163.7 (C-4^{''}).

3-(10-Benzyloxy-dec-1-enyl)-6-methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole (11d n=10). Yield: 91% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.31 (s br, 8H, H-12 to 15), 1.48 (m, 2H, H-16), 1.61 (m, 2H, H-11), 2.30 (q, J = 6.7 Hz, 2H, H-10), 3.46 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-17), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 4.50 (s, 2H, H-18), 5.79 (dt, J = 11.5 Hz, J = 6.7 Hz, 1H, H-9), 6.35 (d, J = 11.5 Hz, 1H, H-8), 6.87 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.88 (m, 1H, H-5), 7.33 (m, 6H, H-4, H-2^{''} to 6^{''}), 7.39 (s, 1H, H-2), 7.52 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-7), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 26.2 (C-10), 29.3-29.8 (C-11 to 16), 55.6, 55.8 (-OCH₃), 70.5 (C-17), 72.8 (C-18), 97.9 (C-7), 112.3 (C-5), 114.4 (C-3^{''},5^{''}), 117.5 (C-4), 119.2 (C-3), 120.0 (C-2), 122.2 (C-8), 124.7 (C-3[']), 127.4-128.9 (C-2^{''},6^{''}, C-2^{''} to 6^{''}), 129.6 (C-1^{''}), 134.7 (C-9), 135.6 (C-7[']), 138.7 (C-1^{''}), 158.1 (C-6), 163.7 (C-

4^{''}). IR (CsI): 2925, 2853 (s, C-H), 1642, 1595 (m, C=C), 1497 (m, C-H), 1264 (m, C-O), 1095 (m, C-O), 676 (m, C-H).

3-(16-Benzyloxy-hexadec-1-enyl)-7-methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole (11e n=16). Yield: 77% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.25 (s br, 20H, H-12 to 21), 1.51 (m, 2H, H-22), 1.60 (m, 2H, H-11), 2.37 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H-10), 3.46 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.73 (s, 3H, -OCH₃), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 4.50 (s, 2H, H-24), 5.82 (dt, J = 11.3 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 6.41 (d, J = 11.3 Hz, 1H, H-8), 6.70 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-6), 6.92 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 7.15 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-4), 7.28-7.33 (m, 5H, H-2^{'''} to 6^{'''}), 7.35 (s, 1H, H-2), 7.79 (m, 1H, H-5), 7.80 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 26.2 (C-10), 29.4-29.8 (C-11 to 22), 55.6 (-OCH₃), 70.5 (C-23), 72.8 (C-24), 107.1 (C-6), 112.1 (C-4), 113.9 (C-3^{''},5^{''}), 117.5 (C-5), 123.8 (C-8), 126.0 (C-3), 127.4 (C-4^{'''}), 127.6 (C-2^{'''},6^{'''}), 128.3 (C-2^{''},6^{''}), 129.6 (C-3^{'''},5^{'''}), 131.7 (C-1^{''}), 132.6 (C-7[']), 133.7 (C-3[']), 134.4 (C-9), 138.7 (C-1^{''}), 147.4 (C-7), 163.2 (C-4^{''}). Anal. Calcd C : 72.52 H : 7.96 N : 2.17. Found C : 72.13 H : 7.81 N : 2.06.

3-(16-Benzyloxy-hexadec-1-enyl)-4,5-dimethoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole (11f n=16). Yield: 81% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.25 (s br, 20H, H-12 to 21), 1.47 (m, 2H, H-22), 1.58 (m, 2H, H-11), 2.30 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H-10), 3.46 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 4.50 (s, 2H, H-24), 5.73 (dt, J = 11.6 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 6.74 (d, J = 11.6 Hz, 1H, H-8), 6.86 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-6), 7.28-7.36 (m, 6H, H-2, 2^{''} to 6^{''}), 7.65 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-7), 7.78 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 26.2 (C-10), 29.5-29.7 (C-11 to 22), 55.6 (-OCH₃), 57.1 (-OCH₃), 61.3 (-OCH₃), 70.5 (C-23), 72.8 (C-24), 109.0 (C-3,6), 111.9 (C-7), 114.4 (C-3^{''},5^{''}), 119.7 (C-2), 124.3 (C-3[']), 127.4-129.3 (C-7['],8,2^{''},6^{''},2^{'''} to 6^{'''}), 130.8 (C-1[']), 133.3 (C-9), 138.7 (C-1^{''}), 143.0 (C-4), 148.6 (C-5), 163.7 (C-4^{''}).

3-(16-Benzyloxy-hexadec-1-enyl)-5,6-dimethoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indole (11g n=16). Yield: 49% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.26 (s br, 20H, H-12 to 21), 1.48 (m, 2H, H-22), 1.61 (m, 2H, H-11), 2.29 (q, J = 6.9 Hz, 2H, H-10), 3.46 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 3.97 (s, 3H, -OCH₃), 4.50 (s, 2H, H-24), 5.79 (dt, J = 11.3 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 6.32 (d, J = 11.3 Hz, 1H, H-8), 6.85 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.90 (s, 1H, H-7), 7.25-7.35 (m, 6H, H-2, H-2^{''} to 6^{''}), 7.55 (s, 1H, H-4), 7.77 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 26.2 (C-10), 29.4-29.7 (C-11 to 22), 55.6 (-OCH₃), 56.1, 56.4 (-OCH₃), 70.5 (C-23), 72.8 (C-24), 97.4 (C-7), 100.9 (C-4), 114.3 (C-3^{''},5^{''}), 117.6 (C-2), 119.6 (C-3), 122.2 (C-8), 123.8 (C-3[']), 127.6-128.8 (C-2^{''},6^{''},2^{'''} to 6^{'''}), 29.0 (C-7[']), 129.6 (C-1^{''}), 134.8 (C-9), 138.7 (C-1^{''}), 147.1 (C-6); 148.2 (C-5), 163.7 (C-4^{''}). Anal. Calcd C : 71.08 H : 7.90 N : 2.07. Found C : 71.20 H : 8.07 N : 2.16. IR (CsI) : 2925, 2853 (s, C-H), 1648, 1596 (m, C=C), 1486 (m, C-H), 1263 (m, C-O), 1094 (m, C-O), 675 (m, C-H).

5-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-3-pentadec-1-enyl-1H-indole 11h. Yield: 76% ¹H NMR (300MHz), δ : 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 3H, H-22), 1.25 (s br, 20H, H-12 to 21), 1.47 (m, 2H, H-11), 2.30 (q, J = 4.4 Hz, 2H, H-10), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 5.80 (dt, J = 11.4 Hz, J = 6.9 Hz, 1H, H-9), 6.35 (d, J = 11.4 Hz, 1H, H-8), 6.86 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.89-6.94 (m, 2H, H-4,6), 7.45 (s, 1H, H-2), 7.77 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}), 7.87 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-7). ¹³C NMR (50MHz), δ : 14.6 (C-22), 26.2 (C-10), 29.3-29.8 (C-11 to 21), 55.6 (-OCH₃), 56.2 (-OCH₃), 102.1 (C-4), 113.9 (C-6), 114.4 (C-3^{''},5^{''}), 114.6 (C-3), 117.5 (C-7), 119.4 (C-3[']), 124.2 (C-2), 127.5 (C-8), 128.9 (C-2^{''},6^{''}), 129.8 (C-7[']), 131.9 (C-1^{''}), 134.7 (C-9), 156.4 (C-5), 163.6 (C-4^{''}). Anal. Calcd C : 70.82 H : 8.24 N : 2.66. Found C : 70.93 H : 8.31 N : 2.70.

10-[4-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indol-3-yl]-decan-1-ol (12b n=10). To a solution of alkene **11b** (n=10) (350 mg, 0.62 mmol, 1eq) in ethanol (6 ml), was added palladium on charcoal (5%, 35 mg, 10% w/w). The mixture was stirred under 1 atmosphere of hydrogen for 4 h at room temperature. The mixture was then filtered on celite and then concentrated. The residue was purified by flash chromatography using hexane-AcOEt (70-30) to give a white solid (277 mg, 93%). ¹H NMR (300MHz), δ : 1.27 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.59 (m, 4H, H-9,16), 2.76 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.2 Hz, 2H, H-17), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 6.61 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5), 6.85 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 7.15 (s, 1H, H-2), 7.18 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-6), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7), 7.77 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 25.7 (C-15), 26.9 (C-9), 29.3-29.8 (C-8,10 to 14), 32.8 (C-16), 55.2, 55.6 (-OCH₃), 63.1 (C-17), 103.6 (C-5), 106.6 (C-7), 114.3 (C-3^{''},5^{''}), 120.6 (C-3), 121.2 (C-6), 124.1 (C-3[']), 125.3 (C-2), 128.9 (C-2^{''},6^{''}), 129.8 (C-1^{''}), 137.0 (C-7[']), 154.6 (C-4), 163.5 (C-4^{''}).

n	Yield					
	12a	12b	12c	12d	12f	12g
10	92%	93%	91%	80%		
12	92%	94%	83%	85%		
14	93%	57%	91%	92%		
16	92%	47%	91%	47%	89%	94%
18	46%	50%	94%	85%	93%	90%

10-[1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indol-3-yl]-decan-1-ol (12a n=10). Yield: 92% ¹H NMR (200MHz), δ : 1.29 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.62 (m, 4H, H-9,16), 2.63 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-17), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 6.85 (d, J = 9.1 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 7.21-7.33 (m, 3H, H-2,5,6), 7.47 (d, J = 6.9 Hz, 1H, H-4), 7.78 (d, J = 9.1 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}), 7.97 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-7). ¹³C NMR (50MHz), δ : 24.9 (C-15), 25.8 (C-9), 28.9 (C-8), 29.7 (C-10 to 14), 32.8 (C-16), 55.6 (-OCH₃), 63.1 (C-17), 113.8 (C-7), 114.4 (C-9), 119.6 (C-3^{''},5^{''}), 122.7 (C-4), 122.9 (C-6), 123.7 (C-3), 124.5 (C-5), 129.0 (C-2^{''},6^{''}), 131.3 (C-7[']), 134.9 (C-1^{''}), 135.4 (C-2), 163.6 (C-4^{''}).

10-[5-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indol-3-yl]-decan-1-ol (12c n=10). Yield: 91% ¹H NMR (200MHz), δ : 1.29 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.60 (m, 4H, H-9,16), 2.58 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-17), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 6.83 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.88-6.93 (m, 2H, H-4,6), 7.24 (s, 1H, H-2), 7.75 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}), 7.86 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-7). ¹³C NMR (50MHz), δ : 24.9 (C-15), 25.8 (C-9), 28.7 (C-8), 29.4-29.6 (C-10 to 14), 32.9 (C-16), 55.6, 55.8 (-OCH₃), 63.1 (C-17), 102.3 (C-4), 113.2 (C-6), 114.3 (C-3^{''},5^{''}), 114.7 (C-7), 123.6 (C-2), 124.0 (C-3), 128.9 (C-2^{''},6^{''}), 129.9 (C-7[']), 130.2 (C-3[']), 132.4 (C-1^{''}), 156.3 (C-5), 163.6 (C-4^{''}).

10-[6-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indol-3-yl]-decan-1-ol (12d n=10). Yield: 80% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.28 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.58 (m, 4H, H-9,16), 2.58 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-8), 3.63 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-17), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 6.85 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.86 (m, 1H, H-5), 7.17 (s, 1H, H-2), 7.32 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-4), 7.52 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 7.77 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 24.9 (C-15), 25.7 (C-9), 28.8 (C-8), 29.3-29.5 (C-10 to 14), 32.8 (C-16), 55.6, 55.8 (-OCH₃), 63.0 (C-17), 98.2 (C-7), 111.9 (C-5), 114.3 (C-3^{''},5^{''}), 119.9 (C-4), 121.3 (C-2), 123.6 (C-3), 125.1 (C-3[']), 128.9 (C-2^{''},6^{''}), 129.8 (C-1^{''}), 136.4 (C-7[']), 157.9 (C-6), 163.5 (C-4^{''}). IR (CsI) : 3368 (w br, O-H), 2919, 2850 (s, C-H), 1595 (m, C=C), 1497 (m, C-H), 1264 (m, C-O), 1113 (m, C-O), 676 (m, C-H).

16-[7-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indol-3-yl]-hexadecan-1-ol (12e n=16). Yield: 52% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.27 (s br, 24H, H-10 to 21), 1.56 (m, 2H, H-22), 1.71 (m, 2H, H-9), 2.66 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.71 (s, 3H, -OCH₃), 3.83 (s, 3H, -OCH₃), 6.67 (m, 1H, H-6), 6.90 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 7.10 (m, 2H, H-4,5), 7.57 (s, 1H, H-2), 7.78 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 24.9 (C-21), 25.7 (C-9), 29.0 (C-8), 29.4-29.7 (C-10 to 20), 32.8 (C-22), 55.6 (-OCH₃), 63.1 (C-23), 106.9 (C-6), 112.1 (C-4), 113.8 (C-3^{''},5^{''}), 121.0 (C-3), 123.5 (C-5), 124.9 (C-7[']), 125.1 (C-2), 129.5 (C-2^{''},6^{''}), 132.1 (C-3[']), 134.1 (C-1^{''}), 153.3 (C-7), 163.1 (C-4^{''}).

16-[4,5-Dimethoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indol-3-yl]-hexadecan-1-ol (12f n=16). Yield: 89% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.26 (s br, 24H, H-10 to 21), 1.59 (m, 4H, H-9,22), 2.73 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.86 (s, 3H, -OCH₃), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 6.85 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.92 (d, 1H, H-6), 7.15 (s, 1H, H-2), 7.64 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 7.75 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 25.7 (C-21), 26.4 (C-9), 29.4-29.7 (C-8,10 to 20), 32.8 (C-22), 55.6 (-OCH₃); 57.0 (-OCH₃), 61.3 (-OCH₃), 63.1 (C-23), 109.0 (C-6), 111.6 (C-7), 114.2 (C-3^{''},5^{''}), 123.2 (C-2), 123.7 (C-3), 128.9 (C-2^{''},6^{''}), 129.7 (C-3[']), 131.6 (C-7[']), 142.7 (C-1^{''}), 148.3 (C-4), 155.8 (C-5), 163.5 (C-4^{''}). IR (CsI) : 3401 (w br, O-H), 2925, 2853 (s, C-H), 1595 (m, C=C), 1495 (s, C-H), 1263 (s, C-O), 1095 (m, C-O), 675 (m, C-H).

16-[5,6-Dimethoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-1H-indol-3-yl]-hexadecan-1-ol (12g n=16). Yield: 94% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.26 (s br, 24H, H-10 to 21), 1.58 (m, 4H, H-9,22), 2.57 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.89 (s, 3H, -OCH₃), 3.96 (s, 3H, -OCH₃), 6.84 (s, 1H, H-4), 6.85 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 7.14 (s, 1H, H-7), 7.55 (s, 1H, H-2), 7.73 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}). ¹³C NMR (75MHz), δ : 24.9 (C-21), 25.7 (C-9), 28.7 (C-8), 29.4-29.7 (C-10 to 20), 32.8 (C-22), 55.6, 56.2, 56.4 (-OCH₃), 63.1 (C-23), 97.7 (C-7), 109.0 (C-4), 114.2 (C-3^{''},5^{''}), 121.3 (C-2), 124.0, 124.1 (C-3,3'), 128.7 (C-2^{''},6^{''}), 129.4 (C-7'), 129.8 (C-1''), 146.9 (C-6), 148.0 (C-5), 163.5 (C-4''). IR (CsI) : 3400 (w br, O-H), 2924, 2852 (s, C-H), 1596 (m, C=C), 1486 (m, C-H), 1263 (m, C-O), 1094 (m, C-O), 676 (m, C-H).

5-Methoxy-1-(4-methoxy-benzenesulfonyl)-3-pentadecyl-1H-indole 12h. Yield: 91% ¹H NMR (300MHz), δ : 0.87 (t, J = 6.7 Hz, 3H, H-22), 1.26 (s br, 24H, H-10 to 21), 1.59 (m, 2H, H-9), 2.59 (q, J = 7.4 Hz, 2H, H-8), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 3.82 (s, 3H, -OCH₃), 6.83 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-3^{''},5^{''}), 6.89-6.96 (m, 2H, H-4,6), 7.25 (s, 1H, H-2), 7.76 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-2^{''},6^{''}), 7.86 (d, J = 9.6 Hz, 1H, H-7). ¹³C NMR (50MHz), δ : 14.6 (C-22), 25.9 (C-9), 28.7 (C-8), 29.5-29.8 (C-10 to 21), 55.6 (-OCH₃), 55.9 (-OCH₃), 102.3 (C-4), 113.6 (C-6), 114.4 (C-3^{''},5^{''}), 114.6 (C-7), 123.6 (C-2), 124.1 (C-3), 128.9 (C-2^{''},6^{''}), 129.8 (C-7'), 130.2 (C-3'), 132.4 (C-1''), 156.4 (C-5), 163.6 (C-4'').

10-(4-Methoxy-1H-indol-3-yl)-decan-1-ol (13b n=10). To a solution of indole **12b** (n=10) (260 mg, 0.55 mmol, 1eq) in dry methanol (18 ml), was added disodium hydrogenphosphate (156 mg, 1.10 mmol, 2 eq) and sodium amalgam (6%, 4 g) at 0°C under argon. The mixture was stirred at room temperature for 12 h, then quenched with a saturated solution of NH₄Cl (50 ml) and extracted with ethyl ether (3x50 ml). The combined extracts were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was purified on silica gel (eluting with hexane-AcOEt from 80-20 to 75-25) to give white crystals (142 mg, 85%). ¹H NMR (300MHz), δ : 1.31 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.57 (m, 2H, H-16), 1.68 (m, 2H, H-9), 2.87 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.2 Hz, 2H, H-17), 3.92 (s, 3H, -OCH₃), 6.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.82 (s, 1H, H-2), 6.94 (d, J = 7.8 Hz, 1H, H-7), 7.07 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6), 7.88 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 25.7 (C-15), 26.9 (C-9), 29.4-29.6 (C-10 to 14), 31.2 (C-8), 32.8 (C-16), 55.1 (-OCH₃), 63.1 (C-17), 99.3 (C-7), 104.3 (C-5), 117.5 (C-3), 117.8 (C-3'), 119.7 (C-6), 122.5 (C-2), 138.1 (C-7'), 155.0 (C-4). UV (acetonitrile) : λ_{\max} : 225 nm (ϵ 301465), 270 nm (ϵ 71091), 283 nm (ϵ 67263), 293 nm (ϵ 68010). IR (KBr) : 3377 (s, O-H, N-H), 3038 (w, =C-H), 2925, 2850 (s, C-H), 1615, 1585 (m, C=C), 1467 (m, C-H), 1094 (m, C-O), 724 (w, C-H).

13b	n	Analysis
4-MeO	10	mp 44-45°C. MS (EI) : 303 (M ⁺ , 25), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 130 (C ₉ H ₈ N, 17). Anal. Calcd C: 75.21, H: 9.63, N: 4.62. Found C: 75.45, H: 9.71, N: 4.54.
	12	mp 45-46°C. MS (EI) : 331 (M ⁺ , 32), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 130 (C ₉ H ₈ N, 16). Anal. Calcd C: 76.09, H: 10.03, N: 4.23. Found C: 76.02, H: 10.10, N: 4.23.
	14	mp 48-49°C. MS (EI) : 360 (M ⁺ , 35), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 130 (C ₉ H ₈ N, 16). Anal. Calcd C: 76.83, H: 10.37, N: 3.90. Found C: 77.15, H: 10.52, N: 3.90.
	16	mp 53-54°C. MS (EI) : 388 (M ⁺ , 43), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 130 (C ₉ H ₈ N, 15). Anal. Calcd C: 77.47, H: 10.66, N: 3.61. Found C: 77.62, H: 10.76, N: 3.61.
	18	mp 65-66°C. MS (EI) : 416 (M ⁺ , 41), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 130 (C ₉ H ₈ N, 15). Anal. Calcd C: 78.02, H: 10.91, N: 3.37. Found C: 78.01, H: 10.98, N: 3.37.

n	Yield					
	13a	13b	13c	13d	13f	13g
10	90%	85%	84%	84%		
12	83%	82%	95%	80%		
14	70%	99%	87%	85%		
16	75%	92%	72%	89%	98%	97%
18	91%	96%	85%	95%	89%	98%

10-(1H-indol-3-yl)-decan-1-ol (13a n=10). Yield: 90% ¹H NMR (200MHz), δ : 1.28 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.57 (m, 2H, H-16), 1.71 (m, 2H, H-9), 2.75 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-17), 6.97 (s, 1H, H-2), 7.16 (m, 2H, H-5,6), 7.35 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-4), 7.61 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.95 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (50MHz), δ : 25.3 (C-15), 25.9 (C-9), 29.8 (C-10 to 14), 30.3 (C-8), 32.9 (C-16), 63.3 (C-17), 111.2 (C-7), 117.4 (C-3), 119.2 (C-4,6), 121.1 (C-5), 121.9 (C-2), 127.8 (C-3'), 136.5 (C-7'). UV (acetonitrile) : λ_{\max} : 204 nm (ϵ 19629), 222 nm (ϵ 28322), 281 nm (ϵ 6314). IR (KBr) : 3416 (s, O-H, N-H), 3049 (w, =C-H), 2916, 2849 (w, C-H), 1638, 1618 (m, C=C), 1456 (m, C-H), 1059 (w, C-O), 741 (m, C-H).

13a	n	Analysis
H	10	mp 55-56°C. MS (EI) : 273 (M ⁺ , 22), 144 (C ₁₀ H ₁₀ N, 3), 130 (C ₉ H ₈ N, 100). Anal. Calcd C: 79.07, H: 9.95, N: 5.12. Found C: 79.08, H: 10.05, N: 5.05.
	12	mp 66-67°C. MS (EI) : 301 (M ⁺ , 27), 144 (C ₁₀ H ₁₀ N, 4), 130 (C ₉ H ₈ N, 100). Anal. Calcd C: 79.68, H: 10.36, N: 4.65. Found C: 79.77, H: 10.47, N: 4.62.
	14	mp 72-73°C. MS (EI) : 329 (M ⁺ , 32), 144 (C ₁₀ H ₁₀ N, 4), 130 (C ₉ H ₈ N, 100). Anal. Calcd C: 80.19, H: 10.71, N: 4.25. Found C: 80.41, H: 10.80, N: 4.21.
	16	mp 79-80°C. MS (EI) : 357 (M ⁺ , 37), 144 (C ₁₀ H ₁₀ N, 4), 130 (C ₉ H ₈ N, 100). Anal. Calcd C: 80.62, H: 10.99, N: 3.92. Found C: 80.61, H: 11.10, N: 3.85.
	18	mp 83-84°C. MS (EI) : 385 (M ⁺ , 33), 144 (C ₁₀ H ₁₀ N, 3), 130 (C ₉ H ₈ N, 100). Anal. Calcd C: 80.98, H: 11.24, N: 3.63. Found C: 81.34, H: 11.46, N: 3.54.

10-(5-Methoxy-1H-indol-3-yl)-decan-1-ol (13c n=10).

Yield: 84% ¹H NMR (200MHz), δ : 1.30 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.57 (m, 2H, H-16), 1.71 (m, 2H, H-9), 2.71 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-17), 3.88 (s, 3H, -OCH₃), 6.85 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, H-6), 6.94 (s, 1H, H-2), 7.05 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-4), 7.24 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-7), 7.86 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (50MHz), δ : 25.2 (C-15), 25.8 (C-9), 29.5-29.6 (C-10 to 14), 30.0 (C-8), 32.9 (C-16), 56.1 (-OCH₃), 63.2 (C-17), 101.2 (C-4), 111.8, 111.9 (C-6,7), 117.0 (C-3), 122.0 (C-2), 128.1 (C-3'), 131.7 (C-7'), 153.8 (C-5). UV (acetonitrile) : λ_{max} : 206 nm (ε 208300), 225 nm (ε 218030), 278 nm (ε 57697), 297 nm (ε 45465). IR (KBr) : 3424; 3277 (w, O-H, N-H), 3001 (w, =C-H), 2920, 2846 (w, C-H), 1630, 1578 (w, C=C), 1466 (m, C-H), 1070 (m, C-O), 708 (w, C-H).

13c	n	Analysis
5-MeO	10	mp 75-76°C. MS (EI) : 304 (M ⁺ , 25), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 7). Anal. Calcd C: 75.21, H: 9.63, N: 4.62. Found C: 75.10, H: 9.73, N: 4.53.
	12	mp 82-83°C. MS (EI) : 331 (M ⁺ , 28), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 7). Anal. Calcd C: 76.09, H: 10.03, N: 4.23. Found C: 76.09, H: 10.10, N: 4.01.
	14	mp 87-88°C. MS (EI) : 360 (M ⁺ , 35), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 6). Anal. Calcd C: 76.83, H: 10.37, N: 3.90. Found C: 76.86, H: 10.49, N: 3.81.
	16	mp 92-93°C. MS (EI) : 388 (M ⁺ , 35), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 5). Anal. Calcd C: 77.47, H: 10.66, N: 3.61. Found C: 77.76, H: 10.78, N: 3.57.

	18	mp 94-95°C. MS (EI) : 416 (M ⁺ , 38), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 5). Anal. Calcd C: 78.02, H: 10.91, N: 3.37. Found C: 77.88, H: 10.99, N: 3.29.
--	----	--

10-(6-Methoxy-1H-indol-3-yl)-decan-1-ol (13d n=10).

Yield: 84% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.30 (s br, 12H, H-10 to 15), 1.56 (m, 2H, H-16), 1.69 (m, 2H, H-9), 2.71 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-8), 3.64 (m, 2H, H-17), 3.85 (s, 3H, -OCH₃), 6.79 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), 6.85 (s, 1H, H-2), 6.87 (m, 1H, H-7), 7.47 (d, J = 8.6 Hz, 1H, H-4), 7.81 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 25.2 (C-15), 25.7 (C-9), 29.4-29.6 (C-10 to 14), 30.1 (C-8), 32.8 (C-16), 55.7 (-OCH₃), 63.1 (C-17), 94.6 (C-7), 109.0 (C-5), 117.1 (C-3), 119.6, 119.7 (C-2,4), 122.1 (C-3'), 137.0 (C-7'), 156.4 (C-6). UV (acetonitrile) : λ_{max} : 206 nm (ε 189323), 228 nm (ε 279970), 275 nm (ε 56545), 292 nm (ε 57990). IR (KBr) : 3424 (s, N-H, O-H), 3012 (w, =C-H), 2918, 2848 (s, C-H), 1631, 1581 (m, C=C), 1463 (m, C-H), 1083 (m, C-O), 725 (w, C-H).

13d	n	Analysis
6-MeO	10	mp 88-89°C. MS (EI) : 303 (M ⁺ , 31), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 8). Anal. Calcd C: 75.21, H: 9.63, N: 4.62. Found C: 75.51, H: 9.80, N: 4.48.
	12	mp 95-96°C. MS (EI) : 331 (M ⁺ , 32), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 7). Anal. Calcd C: 76.09, H: 10.03, N: 4.23. Found C: 76.31, H: 10.16, N: 4.17.
	14	mp 97-98°C. MS (EI) : 359 (M ⁺ , 59), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 9). Anal. Calcd C: 76.83, H: 10.37, N: 3.90. Found C: 76.51, H: 10.44, N: 3.81.
	16	mp 102-103°C. MS (EI) : 387 (M ⁺ , 33), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 8). Anal. Calcd C: 77.47, H: 10.66, N: 3.61. Found C: 77.18, H: 10.81, N: 3.55.
	18	mp 105-106°C. MS (EI) : 416 (M ⁺ , 35), 160 (C ₁₀ H ₁₀ NO, 100), 145 (C ₉ H ₇ NO, 8). Anal. Calcd C: 78.02, H: 10.91, N: 3.37. Found C: 77.26, H: 10.91, N: 3.28.

16-(7-Methoxy-1H-indol-3-yl)-hexadecan-1-ol (13e n=16).

Yield: 54% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.26 (s br, 24H, H-10 to 21), 1.57 (m, 2H, H-22), 1.70 (m, 2H, H-9), 2.73 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 6.64 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-6), 6.94 (s, 1H, H-2), 7.02 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.22 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-4), 8.13 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 25.3 (C-21), 25.7 (C-9), 29.6 (C-10 to 20), 30.2 (C-8), 32.8 (C-22), 55.3 (-OCH₃), 63.1 (C-23), 101.7 (C-6), 111.8 (C-4), 117.6 (C-3), 119.3 (C-5), 120.6 (C-2), 129.0 (C-7'), 146.1 (C-3'), 152.4 (C-7). UV (acetonitrile) : λ_{max} : 223 nm (ε 30060), 269 nm (ε 4350), 291 nm (ε 2930). IR (KBr) : 3447, 3340 (w, O-H, N-H), 3049 (w, =C-H), 2914, 2846 (w, C-H), 1581 (m, C=C), 1463 (m, C-H), 1060 (w, C-O). MS (EI) : 387 (M⁺, 40), 160

2. Effets des alcools gras indoliques dans la différenciation des neurosphères

(C₁₀H₁₀NO, 100), 145 (C₉H₈NO, 11). Anal. Calcd C: 77.47, H: 10.66, N: 3.61. Found C: 77.25, H: 10.73, N: 3.86.

16-(4,5-Dimethoxy-1H-indol-3-yl)-hexadecan-1-ol (13f n=16). Yield: 98% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.26 (s br, 24H, H-10 to 21), 1.57 (m, 2H, H-22), 1.70 (m, 2H, H-9), 2.84 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-23), 3.90 (s, 3H, -OCH₃), 3.96 (s, 3H, -OCH₃), 6.87 (s, 1H, H-2), 6.89 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-6), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 7.80 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 25.7 (C-21), 26.5 (C-9), 29.4-29.7 (C-10 to 20), 31.0 (C-8), 32.8 (C-22), 58.2 (-OCH₃), 61.3 (-OCH₃), 63.1 (C-23), 106.1 (C-6), 111.7 (C-7), 117.0 (C-3), 121.7 (C-3'), 121.9 (C-2), 133.9 (C-7'), 143.3 (C-4), 145.3 (C-5). UV (acetonitrile) : λ_{max} : 194 nm (ε 24361), 226 nm (ε 27481), 274 nm (ε 7505), 296 nm (ε 5372). IR (KBr) : 3452, 3228 (w, O-H, N-H), 3051 (w, =C-H), 2917, 2845 (w, C-H), 1582 (m, C=C), 1464 (m, C-H), 1066 (w, C-O).

(s br, 24H, H-10 to 21), 1.60 (m, 2H, H-9), 2.71 (q, J = 7.6 Hz, 2H, H-8), 3.87 (s, 3H, -OCH₃), 6.85 (dd, J = 8.8 Hz, J = 2.5 Hz, 1H, H-6), 6.94 (s, 1H, H-4), 7.04 (s, 1H, H-2), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-7), 7.80 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (50MHz), δ : 14.6 (C-22), 25.8 (C-9), 29.5-29.6 (C-10 to 21), 30.1 (C-8), 56.1 (-OCH₃), 101.3 (C-4), 111.6, 111.8 (C-6,7) 117.0 (C-3), 122.1 (C-2), 128.1 (C-3'), 131.6 (C-7'), 153.8 (C-5). IR (KBr) : 3424 (w, N-H), 3001 (w, =C-H), 2920, 2846 (w, C-H), 1630, 1578 (w, C=C), 1466 (m, C-H), 1070 (m, C-O), 708 (w, C-H). MS (EI) : 358 (M⁺). Anal. Calcd C: 80.61, H: 10.99, N: 3.92. Found C: 80.63, H: 11.02, N: 3.97.

13f	n	Analysis
4,5-MeO	16	mp 79-80°C. MS (EI) : 418 (M ⁺ , 71), 190 (C ₁₁ H ₁₂ NO ₂ , 100), 175 (C ₁₀ H ₁₀ NO ₂ , 50). Anal. Calcd C: 74.77, H: 10.38, N: 3.35. Found C: 74.51, H: 10.50, N: 3.33.
	18	mp 82-83°C. MS (EI) : 446 (M ⁺ , 50), 190 (C ₁₁ H ₁₂ NO ₂ , 100), 175 (C ₁₀ H ₁₀ NO ₂ , 53). Anal. Calcd C: 75.46, H: 10.63, N: 3.14. Found C: 75.09, H: 10.69, N: 3.20

16-(5,6-Dimethoxy-1H-indol-3-yl)-hexadecan-1-ol (13g n=16). Yield: 97% ¹H NMR (300MHz), δ : 1.25 (s br, 24H, H-10 to 21), 1.56 (m, 2H, H-22), 1.69 (m, 2H, H-9), 2.69 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H-8), 3.64 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H-23), 3.90 (s, 3H, -OCH₃), 3.94 (s, 3H, -OCH₃), 6.84, 6.86 (2s, 2H, H-4,7), 7.01 (s, 1H, H-2), 7.76 (s br, 1H, H-1). ¹³C NMR (75MHz), δ : 25.2 (C-21), 25.7 (C-9), 29.4-29.7 (C-10 to 20), 30.0 (C-8), 32.8 (C-22), 56.2, 56.4 (-OCH₃), 63.1 (C-23), 94.6 (C-7), 100.8 (C-4), 117.0 (C-3), 119.5 (C-2), 120.3 (C-3'), 130.5 (C-7'), 144.7 (C-5), 147.0 (C-6). UV (acetonitrile) : λ_{max} : 205 nm (ε 24468), 226 nm (ε 25619), 280 nm (ε 7979), 297 nm (ε 9190). IR (KBr) : 3394, 3260 (w, O-H, N-H), 3035 (w, =C-H), 2916, 2846 (w, C-H), 1579 (m, C=C), 1468 (m, C-H), 1070 (w, C-O).

13g	n	Analysis
5,6-MeO	16	mp 72-83°C. MS (EI) : 418 (M ⁺ , 71), 190 (C ₁₁ H ₁₂ NO ₂ , 100), 176 (C ₁₀ H ₁₀ NO ₂ , 15). Anal. Calcd C: 74.77, H: 10.38, N: 3.35. Found C: 75.02, H: 9.69, N: 3.00.
	18	mp 85-86°C. MS (EI) : 446 (M ⁺ , 54), 190 (C ₁₁ H ₁₂ NO ₂ , 100), 176 (C ₁₀ H ₁₀ NO ₂ , 17). Anal. Calcd C: 75.46, H: 10.63, N: 3.14. Found C: 75.01, H: 10.59, N: 3.16.

5-Methoxy-3-pentadecyl-1H-indole 14. Yield: 71% ¹H NMR (300MHz), δ : 0.88 (t, J = 6.7 Hz, 3H, H-22), 1.25

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported in part by 'Ministère de la Recherche et des nouvelles Technologies' (D.C) and by Meiji Dairies Corporation (B.L and J.B). We are grateful to Pr J.L. Mandel (IGBMC, Strasbourg) for supplying us with oligonucleotides facility. We acknowledge the confocal service of IFR 37 (Strasbourg).

REFERENCES

1. Hurko, O.; Walsh, F. S. J. Novel drug development for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 2000, 180, 21-28.
2. Lindsay, R. M.; Wiegand, S. J.; Altar, C. A.; DiStefano, P. S. Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.*, 1994, 17, 182-190.
3. Connor, B.; Dragunow, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Rev.*, 1998, 27, 1-39.
4. Thoenen, H.; Sendtner, M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci.*, 2002, 5 suppl, 1046-1050.
5. Skaper, S. D.; Walsh, F. S. Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. *Mol. Cell. Neurosci.*, 1998, 12, 179-193.
6. Omura, S.; Fujimoto, T.; Otaguro, K.; Matsuzaki, K.; Moriguchi, R.; Tanaka, H.; Sasaki, Y. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J. of Antibiotics*, 1991, 44, 113-116.
7. Kakeya, H.; Onosawa, C.; Sato, M.; Arai, K.; Osada, H. Neuritogenic effect of epolactaene derivatives on human neuroblastoma cells which lack high-affinity nerve growth factor receptors. *J. Med. Chem.*, 1997, 40, 391-394.
8. Avramut, M.; Zeevi, A.; Achim, C. L. The immunosuppressant drug FK506 is a potent trophic agent for human foetal neurons. *Dev. Brain Res.*, 2001, 132, 151-157.
9. Hamilton, G. S.; Wu, Y.-Q.; Limburg, D. C.; Wilkinson, D. E.; Vaal, M. J.; Li, J.-H.; Thomas, C.; Huang, W.; Sauer, H.; Ross, D. T.; Soni, R.; Chen, Y.; Guo, H.; Howorth, P.; Valentine, H.; Liang, S.; Spicer, D.; Fuller, M.; Steiner, J. P. Synthesis of *N*-Glyoxyl prolyl and pipercolyl amides and thioesters and evaluation of their in vitro and in vivo nerve regenerative effects. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 3549-3557.
10. Luu, B.; Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Girlanda-Junges, C. Cyclohexenonic long-chain fatty alcohols as neuronal growth stimulators. *Molecules*, 2000, 5, 1439-1460.
11. Gonzalez de Aguilar, J.-L.; Girlanda-Junges, C.; Coowar, D.; Duportail, G.; Loeffler, J.-P.; Luu, B. Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res.*, 2001, 920, 65-73.
12. Kruger, G. M.; Morrison, S. J. Brain repair by endogenous progenitors. *Cell*, 2002, 110, 399-402.
13. Ding, S.; Schultz, P. G. A role for chemistry in stem cell biology. *Nat. Biotechnol.*, 2004, 22, 833-840.
14. Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287, 1433-1438.
15. Anderson, D. J. Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron*, 2001, 30, 19-35.
16. Morshead, C. M.; Reynolds, B. A.; Craig, C. G.; McBurney, M. W.; Staines, W. A.; Morassutti, D.; Weiss, S.; van der Kooy, D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron*, 1994, 13, 1071-1082.

2. Effets des alcools gras indoliques dans la différenciation des neurosphères

17. Nakatomi, H.; Kuriu, T.; Okabe, S.; Yamamoto, S.-I.; Hatano, O.; Kawahara, N.; Tamura, A.; Kirino, T.; Nakafuku, M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, 2002, 110, 429-441.
18. Wichterle, H.; Lieberam, I.; Porter, J. A.; Jessell, T. M. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 2002, 110, 385-397.
19. Ding, S.; Wu, T. Y. H.; Brinker, A.; Peters, E. C.; Hur, W.; Gray, N. S.; Schultz, P. G. Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 110, 7632-7637.
20. Reynolds, B. A.; Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255, 1707-1710.
21. Grandbarbe, L.; Bouissac, J.; Rand, M. D.; Hrabe de Angelis, M.; Artavanis-Tsakonas, S.; Mohier, E. Delta-Notch signalling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development*, 2003, 130, 1391-1402.
22. Results unpublished.
23. Yankner, B. A. Mechanism of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*, 1996, 16, 921-932.
24. Ko, M. L.; Hu, D. N.; Ritch, R.; Sharma, S. C. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000, 41, 2967-2971.
25. Vijayalaxmi; Thomas, Jr C. R.; Reiter, R. J.; Herman, T. S. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J. Clin. Oncol.*, 2002, 20, 2575-2601.
26. Moody, C. J. Regioselective Claisen Rearrangements in Indoles. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1984, 1333-1337.
27. Downie, I. M.; Earle, M. J.; Heaney, H.; Shuhaibar, K. F. Vilsmeier formylation and glyoxylation reactions of nucleophilic aromatic compounds using pyrophosphoryl chloride. *Tetrahedron*, 1993, 41, 4015-4034.
28. Girlanda-Junges, C.; Keyling-Bilger, F.; Schmitt, G.; Luu, B. Effect of cyclohexenonic long chain fatty alcohols on neurite outgrowth. Study on structure-activity relationship. *Tetrahedron*, 1998, 54, 7735-7748.
29. Schlosser, M. Zur aktivierung lithiumorganischer reagenzien: The activation of organolithium reagents. *J. Organomet. Chem.*, 1967, 8, 9-16.
30. Poeggeler, B.; Thuermann, S.; Dose, A.; Schoenke, M.; Burkhardt, S.; Hardeland, R. Melatonin's unique radical scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.*, 2002, 33, 20-30.
31. Artavanis-Tsakonas, S.; Rand, M. D.; Lake, R. J. Notch signalling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999, 284, 770-776.

Publication 4

Effets du Ginsenoside-Rd sur
la différenciation des neurosphères

3. Effets du Ginsenoside-Rd sur la différenciation des neurosphères

3.1. Contexte de ces travaux

Au cours de mon doctorat, j'ai travaillé avec deux post-doctorants rattachés à l'équipe de Bang Luu avec qui nous collaborions, sur les potentialités d'une plante, le *Panax notoginseng*, également connue sous le nom de *Tienchi-* ou *Sanchi-ginseng*.

Cette plante, issue de la médecine traditionnelle chinoise, est encore très utilisée de nos jours en phytothérapie. Le *Panax notoginseng* est principalement utilisé dans le traitement symptomatique des hémorragies externes et digestives. Ses propriétés coagulantes ont également été mises à profit dans la médecine de guerre par les soldats occidentaux au cours de la 2^{ème} guerre mondiale et de la guerre du Viet Nam. On lui prête également d'autres propriétés (non démontrées par des études clinique) : elle stimulerait les systèmes circulatoire et immunitaire, aurait des propriétés anti cancéreuses et, de par ses propriétés anti-oxydantes, le *Panax Notoginseng* pourrait ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer.

Qin Shi, chimiste de formation, a isolé à partir des racines de cette plante différentes fractions et molécules. Qi Hao a, quant à elle, testé leurs éventuelles propriétés neurotrophiques dans le système des neurosphères.

Mon rôle a été de former Qin Shi et Qi Hao aux différentes techniques de biologie cellulaire relatives au système des neurosphères et à les conseiller dans l'analyse des résultats.

3.2. Résumé des travaux publiés

Nous avons recherché les éventuelles propriétés neurotrophiques de plusieurs produits extraits du *Panax notiginseng* mais la plupart des fractions analysées se sont révélés sans effets sur la spécification des CSN et sur la différenciation des précurseurs de neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Une seule des fractions, la saponine PNS (*Panax notoginseng* saponine) a eu un effet (faible mais significatif) sur la différenciation des neurosphères en favorisant la différenciation des astrocytes.

La purification et l'analyse des molécules présentes dans cette fraction ont montré que le Ginsenoside-Rd est le principe actif du PNS, responsable de la différenciation des astrocytes dans le système des neurosphères. De plus, l'analyse de l'effet de Ginsenoside Rd sur des neurosphères mutantes pour Dll1 (décrites au chapitre III.1) ont d'une part confirmé son effet dans la différenciation des astrocytes et ont montré d'autre part que cette molécule semble

sauver partiellement le phénotype de différenciation des neurosphères Dll1 en favorisant les cellules gliales au dépend des neurones, laissant envisager que cette molécule pourrait éventuellement activer la voie Notch.

Mais l'analyse des effets du Ginsenoside-Rd sur des cultures primaires d'astrocytes a indiqué que cette molécule semble plutôt favoriser la prolifération des astrocytes plutôt que de jouer sur le choix neurones / cellules gliales à partir des CSN.

3.3. Article 4: Ginsenoside-Rd from Panax notoginseng enhances astrocyte differentiation from neural stem cells.

Cet article a été publié en Janvier 2005 dans Life Science ; 76(9):983-95.

Nous discuterons des résultats de cet article dans le §2.4.

Life Sciences

Volume 76, Issue 9, Pages 983-995, 14 January 2005

Ginsenoside-Rd from *Panax notoginseng* enhances astrocyte differentiation from neural stem cells.

Qin SHI¹, Qi HAO^{1,2}, Julien BOUISSAC², Yang LU³, Songjiu TIAN⁴, and Bang LUU^{1,#}

¹ Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles, UMR CNRS-ULP 7123, 5 rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg, France.

² Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine, UPR 2356, CNRS, 5 rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg, France.

³ Department of Chemistry, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China.

⁴ National Research Center for the Standardization of Pharmaceutical and Biological Products, Temple of Heaven, Beijing 100050, China.

Corresponding author: tel. 33 3 88411672; fax. 33 3 88607464; luu@chimie.u-strasbg.fr

KEYWORDS: *Panax notoginseng*, neural stem cells, neurospheres, differentiation.

ABSTRACT

Neural stem cells cultured as neurospheres were used to assess the effects of *P. notoginseng* on the production of neurons and glia. The crude saponins (PNS) and ginsenoside-Rd promote the differentiation of neurospheres into astrocytes. Ginsenoside-Rd increases the production of astrocytes in a dose-dependent manner. On the other hand, both PNS and ginsenoside-Rd induce a weak but significant effect by decreasing the number of neurons. The other ginsenosides do not induce any differentiation on both neurons and astrocytes.

INTRODUCTION

Stem cells are capable of proliferation, self-renewal and production of differentiated functional progeny that are characteristic of the organ from which they were derived (Hall and Watt 1989 ; Weissman 2000). The discovery of neural stem cells (NSCs) in mammalian brain (Reynolds and Weiss 1996), including humans (Johansson et al. 1999; Gage 2000), has opened up new promises for the treatment of several brain disorders. In the central nervous system, several diseases cause the loss of neurons and glia. Neural stem cells with their potential to generate new neurons and glia have become an attractive target for the treatment of neurodegenerative diseases (Price, 2001). The major difficulty one has to overcome is to induce the neural stem cells to differentiate into the desired mature and functional cells types.

The proliferation and the differentiation of neural stem cells are under the control of various intracellular and extracellular signaling molecules (Dai and Holland, 2003), growth factors such as the well-known neurotrophic factors (NTFs) (Connor and Dragunow, 1998). The practical manipulations and the clinical use of these naturally-occurring proteins are rendered hazardous by their poor nervous system penetration. The exogeneous small molecules that can mimic the activity of these growth factors could, in principle, induce neurogenesis or gliogenesis *in situ*, in the brain, on the endogenous neural stem cells. Thus they could be used as therapeutic agents for regenerative medicine (Kruger and Morrison, 2002; Cao, 2002).

From the view point of developmental biology; the nervous system and the skin both originate from the ectoderm. Some NTFs are powerful mitogens of non-neuronal cells while the fibroblast growth factors (FGF) are active on the central nervous system. For these reasons, we focused our attention on the traditional medicinal plants which are used to cure wounds. Additionnally, secondary metabolites of plants are frequently small molecules.

Panax notoginseng (Burk.) F.H. Chen is a well-known traditional Chinese medicine for healing wounds. It is used in many medicinal preparations in China. Extensive chemical and biological studies on *P. notoginseng* proved dammarane-type saponins to be the major constituents (Yang et al., 1983; Zhao et al., 1996; Ma et al., 1999; Jiang and Qian, 1995). In the present study, we use NSCs derived neurospheres (Reynolds and Weiss, 1992) as a bioassay system to assess the effects of components isolated from the roots of *P. notoginseng*. Because they are multipotential and can generate neurons, oligodendrocytes and astrocytes, neurospheres provide a good model system to investigate the proliferation and the differentiation of NSCs *in vitro*. Indeed they are clonally derived from the NSCs. The

production of neurospheres relies on the selection of NSCs from embryonic or adult brain through the action of epidermal growth factor (EGF). In the presence of EGF, NSCs proliferate and form clusters of cells floating in the medium, the so-called neurospheres (or spheres). Each sphere represents the clonal progeny of a neural stem cell. When these neurospheres are transferred on a solid support, they attach and begin to differentiate to give rise to the major cell types that comprise the adult brain ie: neurons, astrocytes and oligodendrocytes in proportions that are reproducible under given culture conditions.

MATERIALS AND METHODS

General. FAB-MS were obtained on a VG analytical ZAB-HF double-focussing mass spectrometer using triethanolamine (TEA), 1-thioglycerol, or *m*-nitrobenzyl alcohol as matrix. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance-500 or on a Bruker Avance-300 spectrometer (C_5D_5N used as solvent and reference). Ordinary or reversed-phase column chromatography (CC) was run on Merck silica gel or Waters C-18 respectively. TLC was performed on Merck silica gel F₂₅₄ and RP-18 F₂₅₄ plates with a treatment by a solution of 1% vanillin (in 4%/5 H₂SO₄-EtOH) followed by heating.

Preparation of crude material. Roots of *Panax notoginseng*, cultivated in the Yunnan province, China, were purchased in a drug store in Shanghai, China and were authenticated by investigators at the Shanghai Second Medical University.

Dried powdered roots of *P. notoginseng* (2 kg) were extracted with EtOH. The combined extracts were dissolved in water and extracted successively with petroleum ether, dichloromethane, and n-BuOH. The combined BuOH layers were concentrated to dryness, affording a crude fraction of *Panax notoginseng* saponins (PNS) (224g, yield: 11.4%).

Culture of neurospheres. Neurospheres (spheres) were prepared and used as described by Grandbarbe et al., 2003. The telencephalon of embryos (E10.5) of wild-type or of mutant Delta like 1^{LacZ/LacZ} (Dll1) mice were dissected and mechanically dissociated in a serum-free neurosphere culture medium (DMEM:F12(1:1), supplemented with 25μg/ml insulin; 100μg/ml transferrin; 20nM progesterone; 60μM putrescine; 30nM selenium and 20ng/ml EGF as described by Reynolds et al., 1992. After 7 DIV(days in vitro), most of the cells died, but a small proportion of cells proliferated by forming clusters of undifferentiated cells floating in the medium, referred to as “spheres”. To expand the population, these primary

spheres were dissociated mechanically by gentle trituration and chemically by making use of a “dissociation solution” (Sigma), and were transferred into fresh standard medium in 75 ml flasks in which the secondary spheres were generated. Spheres could be maintained for long periods of times by successive passages including dissociation and proliferation. Practically, spheres were dissociated every 3 or 4 days. Cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere.

After 3 days of proliferation, floating spheres were collected by centrifugation and washed once with fresh standard medium (DMEM:F12 (1:1), supplemented as above but with EGF 2ng/ml). Neurospheres were transferred on poly-L-ornithine (Sigma) coated cover slips in 24-well plate at a density of 50-100 spheres / cover slip in the standard medium supplemented with 0.5% fetal bovine serum (FBS, GIBCO). We reduced EGF concentration to 2ng/ml during the differentiation phase, to ensure cell survival but minimize cell proliferation. Neuronal and glial differentiation was assessed by immunocytochemistry after a defined period in culture.

Test substances were added at the beginning of the proliferation phase (just after dissociation) and/or at the beginning of the differentiation phase (just after the transfer to poly-L-ornithine-coated cover slips). The products were dissolved in absolute ethanol at an appropriate concentration and diluted in culture medium to adjust the final concentration of ethanol to 0.1%. The control group was incubated under the same conditions.

Immunostaining. Neurospheres were fixed for 20 min in PBS / 4% paraformaldehyde, permeabilized for 10 min with 0.5% Triton X100 (Sigma) in PBS, and saturated for 30 min with PBS / 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma). The neurospheres were incubated for 2 hr at room temperature in PBS containing 1% BSA and the appropriate mixture of primary antibodies. The primary antibodies used were mouse monoclonal anti-MAP2 (2a+2b) (1/600, Sigma) specific for mitotic neurons; rabbit polyclonal anti-GFAP (1/1000, Dako) for astrocytes. Secondary antibodies were Cy3 conjugated donkey anti-mouse IgG (1/1000, Jackson Immuno Research) and Alexa 488 conjugated goat anti-rabbit IgG (1/1000, Molecular Probes). The nuclei of all cells were stained by TO-PRO3 (1/15000, Molecular Probes). The prepared cover slips were mounted in Aquamount (Polyscience) and viewed for triple immunofluorescence under a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

Primary culture of astrocytes. Homogeneous cultures of astrocytes were established from newborn Wistar rat brain following the method of Perraud et al., 1988. Briefly, cerebral

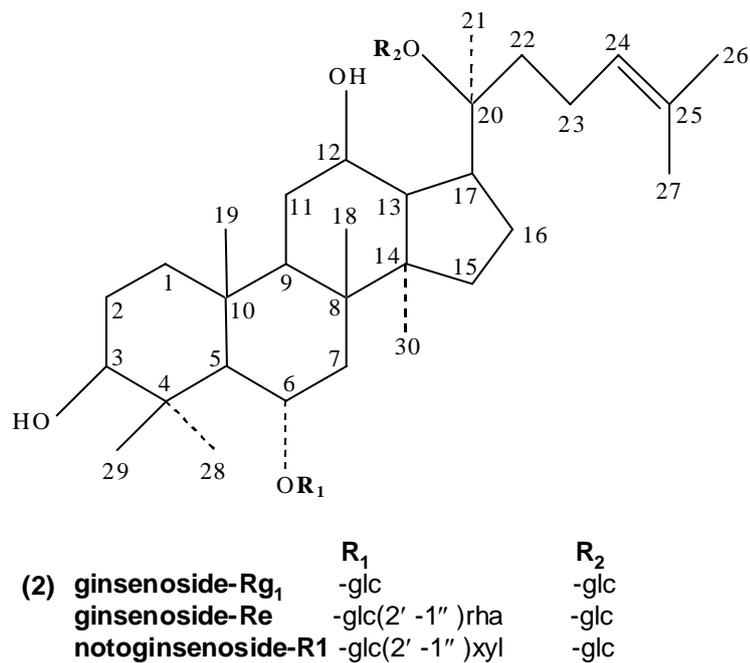
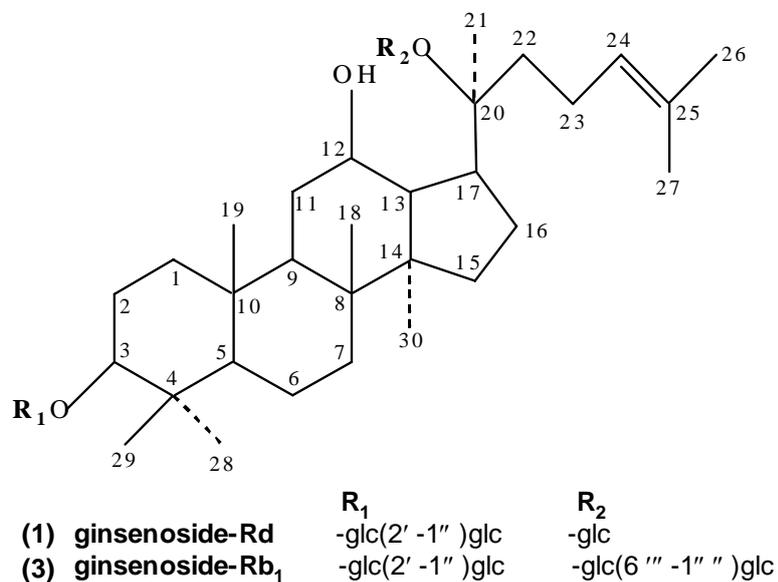


Figure 1. Structures of the saponins isolated from the roots of *P. notoginseng*.

hemispheres of newborn rats were dissected, their meningeal membranes were removed and mechanically dissociated in a small volume of DMEM basal medium containing sodium pyruvate (110mg/l), 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), penicillin (50 units/ml), and streptomycin (50 µg/ml). Cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Growth medium was changed on day 5 and then twice a week. Oligodendrocytes precursor cells were mechanically removed every 5 days.

Quantification of proliferation in primary culture of astrocytes by BrdU incorporation.

One month old primary astrocytes were dissociated with 1x trypsin (GIBCO/BRL) into single cells and transferred for two days to 24 well plates, the coverslips of which have been coated with poly-L-ornithine. Compounds were then added once a day for 3 days. Ethanol was added in the case of the control. BrdU (50 µl/ml, 1mM BrdU) was added when compounds or ethanol was added. 24 hours later, cells were fixed in 4% PFA for 20 min at room temperature and processed for immunocytochemistry as described above.

Quantitative analysis. Data were based on three to four independent experiments in which an average of more than 10 spheres, or astrocytes fields were analysed for each treatment and for each experiment. Spheres were chosen approximately of the same size for cell types quantitative analysis. For spheres, the confocal plane for observation was at the basis of the sphere, where the cells differentiated. The results were expressed in increase of proportion of each cell type in the total cell number assessed from TO-PRO3 staining and were shown as means ± S.E.M. (control condition is at 100%). Group changes were assessed using one-way ANOVA. When the statistical differences were at the $p \leq 0.05$ level between groups, parametric multiple comparisons were made using the Tukey-Kramer method. In the text, p values indicate statistically significant differences. When the statistical test is not significant, N.S. means “non-significant”. In figures, * indicates $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

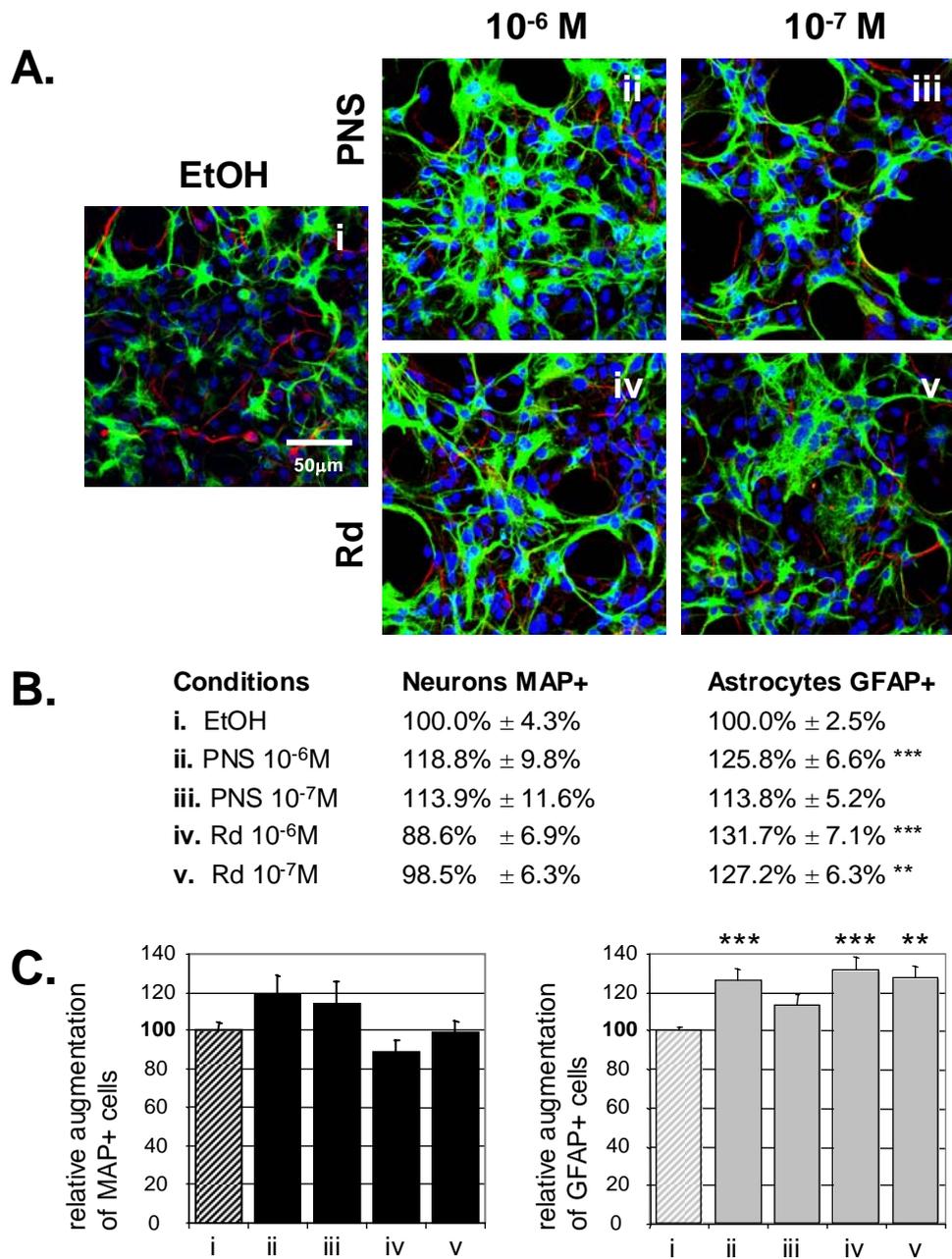


Figure 2. PNS and Ginsenoside-Rd increase the production of astrocytes in wild-type (WT) neurospheres.

(A) Triple immunostaining by making use of anti-MAP2 coupled to Cy3 for neurons (red), anti-GFAP coupled to Alexa 488 for astrocytes (green) and TO-PRO, specific for nuclei (blue). Wild-type neurospheres were treated by EtOH (control, i). PNS at 10-6M and 10-7 M (ii, iii) and Ginsenoside-Rd at 10-6M and 10-7M (iv,v) during both proliferation and differentiation phases. **(B)** The results were quantified and expressed as percentages of variation in comparison with the control (100%), as described in experimental procedures. **(C)** Quantified data presented in (B). Data were representative of four independent experiments. Bar scale 50μm.

RESULTS

Crude saponins (PNS) promote the differentiation of astrocytes using wild type neurospheres (WT). The optimal time in culture for a differentiation of spheres was 3 days. At this moment, the expression of MAP2 and GFAP was at a highest level.

To assess any potential action of PNS on the differentiation of EGF-dependent neural stem cells, 3 days proliferating spheres were treated immediately after plating on poly-L-ornithine coated cover slips with concentrations of PNS ranging from 10^{-5} M to 10^{-9} M (calculated with an estimated average molecular weight) and allowed to differentiate for 3 days.

The first experiments showed that PNS is toxic at 10^{-5} M (spheres do not adhere to coverslips, data not shown). PNS increases the number of astrocytes at 10^{-6} M in a range of 126% ($p \leq 0.001$) but has no activity at 10^{-7} and 10^{-8} M. PNS did not promote the differentiation into neurons. (Figure 2)

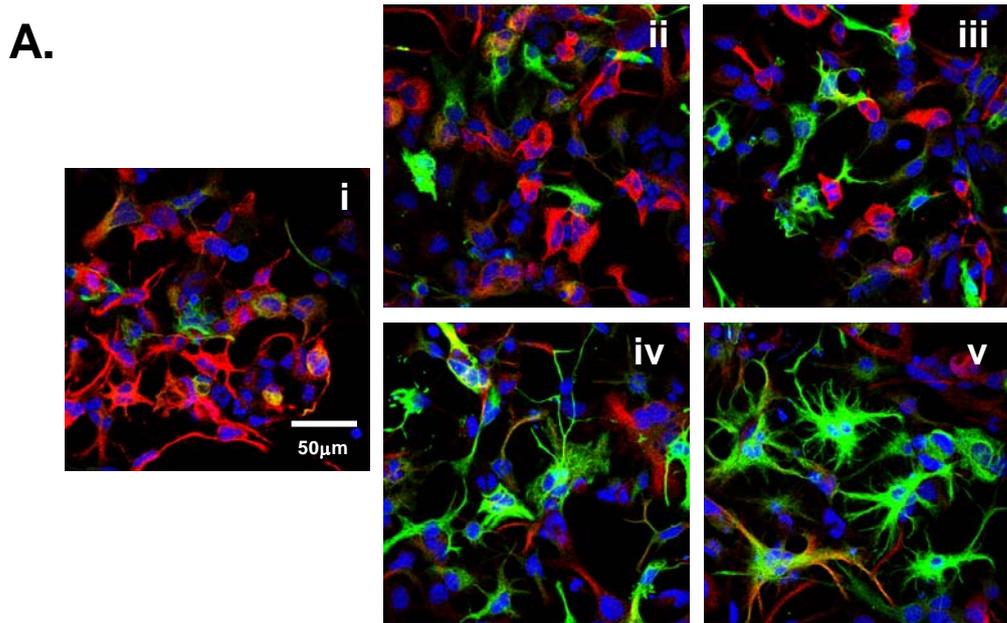
Purification of active compound.

The crude saponin PNS fraction was submitted to flash column chromatography (CC) and gave 6 fractions. The fractions 2, 3, and 5 containing glycosides were subjected to repeated CC affording three pure saponins, 1-3 and a mixture of two minor saponins

Saponin 1 displayed two quasimolecular ion peaks at m/z 969[M+Na]⁺ and 947[M+H]⁺; fragment ions at 789 [969–Glc]⁺ and 767 [947–Glc]⁺ in the positive-mode FAB-MS. This information together with the data from the ¹³C NMR spectrum (data not shown) allowed its molecular formula to be assigned as C₄₈H₈₂O₁₈. The ¹H NMR (pyridine-d₅) showed the presence of three anomeric protons [δ 4.55 (d, $J=7.4$ Hz, 1'-H), 4.79 (d, $J=7.8$ Hz, 1'''-H), 4.93 (d, $J=7.8$ Hz, 1''-H)] and one olefinic proton [δ 5.09 (t, $J=7.5$ Hz, 24-H)]. The carbon signals in the ¹³C-NMR spectra of saponin 1 were found to be superimposable on those of an authentic sample of ginsenoside-Rd (0.87% from powdered roots), (Figure1) (Ma et al., 1999).

Similarly, saponin 2 and saponin 3 were identified as ginsenoside-Rg₁ (2.5% from powdered roots) and ginsenoside-Rb₁ (3.00% from powdered roots) respectively (Matsuura et al., 1983) (Figure 1).

The mixtures of these two minor saponins were further identified as ginsenoside-Re (1.4% from powdered roots) and notoginsenoside-R1 (0.6% from powdered roots) by comparing their spectral data with those of authentic samples (Zhou et al. 1981).



B.

Conditions	Neurons MAP+	Astrocytes GFAP+
i. EtOH	100% ± 18.3%	100% ± 44.4%
ii. Rd 10 ⁻⁸ M	90.1% ± 22.8%	149% ± 41.0%
iii. Rd 10 ⁻⁷ M	75.9% ± 18.6%	195% ± 36.6% ***
iv. Rd 10 ⁻⁶ M	65.6% ± 21.2% **	259% ± 41.0% ***
v. Rd 10 ⁻⁵ M	58.4% ± 21.0% ***	323% ± 46.8% ***

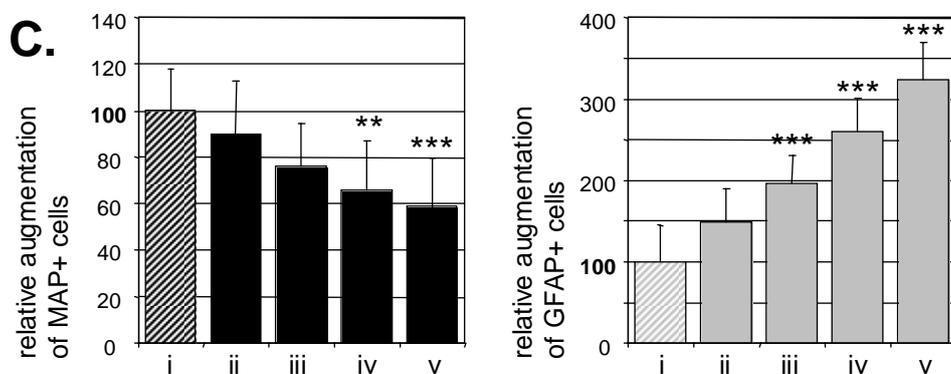


Figure 3. Ginsenoside-Rd increases the production of astrocytes and decreases the production of neurons in Dll1Lac Z/LacZ neurospheres in a dose-dependant manner.

(A) Triple immunostaining by making use of anti-MAP2 coupled to Cy-3 for neurons (red), antiGFAP coupled to Alexa 488 for astrocytes (green) and TO-PRO, specific for nuclei (blue). Delta^{LacZ/LacZ} neurospheres were treated by EtOH (control, i) and by Ginsenoside-Rd at 10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M and 10⁻⁵ M (ii, iii, iv, v) during both proliferation and differentiation phases. **(B)** The results were quantified and expressed as percentages of variation in comparison with the control (100%). **(C)** Quantified data presented in (B). Data were representative of three independent experiments. Bar scale 50µm.

Ginsenoside-Rd is an active component of *P. notoginseng* for promoting astrocytes differentiation using wild type (WT) neurospheres.

After determining the activity of PNS, we added purified ginsenosides-Rd, -Rg₁, and Rb₁ to the WT neurospheres culture at concentrations ranging from 10⁻⁵M to 10⁻⁹M after 3 days proliferation. The mixture of ginsenoside-Re and notoginsenoside-R1 were analysed at concentrations of 10⁻⁶M and 10⁻⁷M, which were the active concentrations according to our experiments.

Ginsenoside-Rd promoted a production of astrocytes in WT neurospheres at the concentrations of 10⁻⁶M and 10⁻⁷M in a range of 132% (p≤0.001) and 127% (p≤0.01) respectively with regard to control. But it did not influence the differentiation of neurons (Figure 2).

Ginsenoside-Rg₁, -Rb₁, and the mixture of ginsenoside-Re and notoginsenoside-R1 did not exert any promoting effects on the differentiation of both neurons and astrocytes (data not shown).

Use of mutant Delta like 1^{LacZ/LacZ} (Dll1) neurospheres to confirm the activity of ginsenoside-Rd.

The differentiating phenotype of WT neurosphere consists of neurons representing 5-10% of the total cell number, whereas astrocytes are the major cell type and represent more than 50% of total cells. Oligodendrocytes are below 10%. Contrasting with WT neurospheres, the transgenic Delta like 1^{LacZ/LacZ} (Dll1) spheres contain neurons as the major cell type, (40-50% of total cell) and astrocytes about 10% of total cells (Grandbarbe et al., 2003). The Dll1^{LacZ/LacZ} transgenic mouse line resulted from the insertion of LacZ in the exon1 of the Delta like 1 gene, a gene encoding the ligand of the Notch receptor as described by Hrabe de Angelis et al. 1997. As Dll1^{LacZ/LacZ} produce less astrocytes than WT spheres, we should see more easily the effect of ginsenoside-Rd on the production of astrocytes in this system.

In an attempt to optimize the efficacy of Rd, it was added daily during both proliferation and differentiation phase at concentrations ranging from 10⁻⁸ to 10⁻⁵M (Figure 3). We observed that treatment with increasing concentrations of Rd resulted in an increase of the production of astrocytes and a decrease of neurons. The relative proportion of astrocytes increased from 195% (Rd at 10⁻⁷M, p≤0.001) to 323% (Rd at 10⁻⁵M, p≤0.001) in comparison with the control group (100%) although this effect was accompanied with an increase in Rd toxicity at 10⁻⁵M. On the other hand, the relative proportion of neurons decreased from 100% in the control to

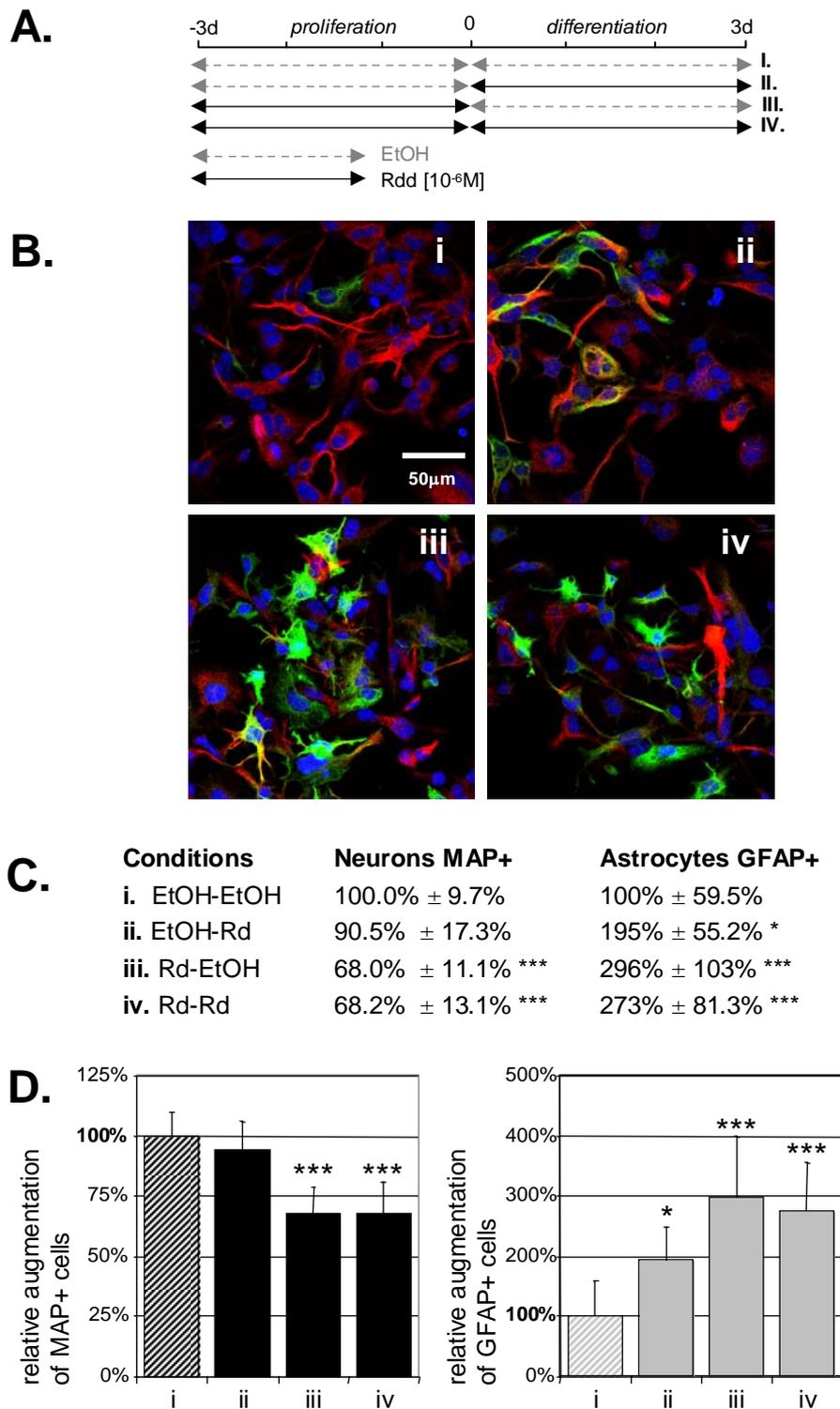


Figure 4. Effect of Ginsenoside-Rd on the differentiation of $DII1^{LacZ/LacZ}$ neurospheres treated during proliferation and/or differentiation phases.

(A) Schematized representation of the experimental protocol. After three days of proliferation in the presence of EtOH (i, ii) or Ginsenoside-Rd at $10^{-6}M$ (ii, iv), spheres were allowed to differentiate on polyornithine in the presence of EtOH (i, iii) or Ginsenoside-Rd at $10^{-6}M$ (ii, iv). Control were EtOH treated neurospheres during both proliferation and differentiation phases (i). **(B)** The spheres were fixed after 3 days of differentiation and were analyzed by immunostaining by making use of anti-MAP2 coupled to Cy3 for neurons (red), anti-GFAP coupled to Alexa488 for astrocytes (green) and TO-PRO, specific for nuclei (blue). **(C)** The results were quantified and expressed as percentages of variation in comparison with the control (100%). **(D)** Quantified data presented in (C). Data were representative of two independent experiments. Bar scale: $50\mu m$.

90% (N.S.), 76% (N.S.), 66% ($p \leq 0.01$) and 58% ($p \leq 0.001$) in the presence of Rd at concentrations of 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M and 10^{-5} M respectively.

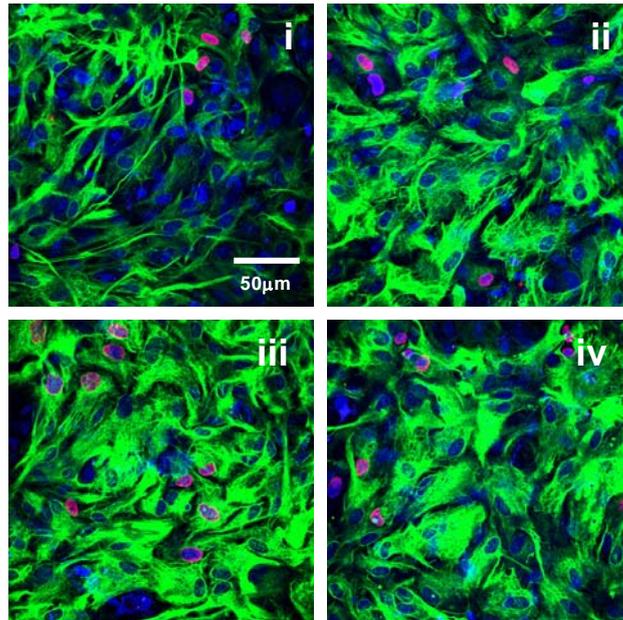
Furthermore, we observed a change in the morphology of each cell type: the astrocytes in the treated groups were much larger than in the control group, with a star-like morphology. This is an indication of a more mature state of differentiation. Neurons in the control groups show longer processes and more filament than the treated group.

In order to test whether the transient exposure of spheres to Rd (10^{-6} M) during proliferation and/or differentiation phases was sufficient to influence the differentiation of neurospheres, 10^{-6} M Rd was added to spheres cultures daily (figure 4) during proliferation and/or differentiation phase (experimental protocol in fig. 4.A). The treatment of spheres with Rd resulted in all cases in an increase of the number of GFAP-positive cells in comparison with untreated spheres (figure 4). This increase was stronger when Rd was added during the proliferation phase (figure 4, condition iii and iv, relative increase of 296% ($p \leq 0.001$) and 273% ($p \leq 0.001$) respectively) than during the differentiation phase (figure 4, condition ii relative increase of 195% ($p \leq 0.05$)). The production of neurons decreased when Rd was added during the proliferation phase (condition iii and iv, proportion of neurons over the control: 68 and 68% $p \leq 0.001$).

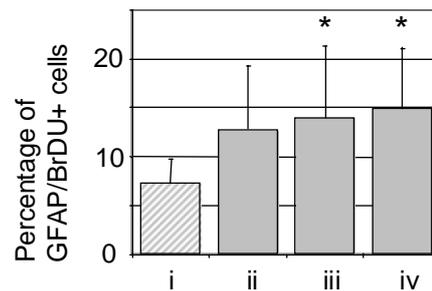
Ginsenoside-Rd promotes both proliferation and differentiation of astrocytes in primary cultures conditions.

In order to check whether Rd increases the number of astrocytes by stimulating their ability to proliferate, primary astrocytes were allowed to grow in the presence of Rd and BrdU, a thymidine analogue that labels the DNA of proliferating cells in the S-phase of the cell cycle. A stimulating effect of Rd on the proliferation of astrocyte precursors would result in an increase of cells with co-localisation of BrdU and GFAP. Figure 5 shows a nuclear localization of BrdU, and a cytoplasmic distribution of GFAP in differentiated astrocytes. In the control, 7% of astrocytes showed BrdU incorporation. This proportion increases to 14% and 15% ($p \leq 0.05$) in the presence of Rd (at 10^{-5} M or 10^{-6} M). But this increase is not significant with PNS at 10^{-6} M (12.5%, N.S.). Here again, astrocytes treated with Rd displayed larger star-like morphology which is characteristic of mature astrocytes.

DISCUSSION

A.**B.**

Conditions	GFAP/BrDU+
i. EtOH	7.23% ± 2.51%
ii. PNS 10 ⁻⁶ M	12.5% ± 6.48%
iii. Rd 10 ⁻⁶ M	13.9% ± 7.46% *
iv. Rd 10 ⁻⁵ M	14.8% ± 6.25% *

C.**Figure 5. Ginsenoside-Rd increases the proliferation in primary cultures of astrocytes.**

(A). Eight weeks-old primary culture of astrocytes was dissociated and let for 5 days to proliferate on polyornithine-coated coverslips in presence of EtOH (i), PNS at 10⁻⁶ M (ii) or Ginsenoside-Rd at 10⁻⁶ M or 10⁻⁵M (iii, iv). Brd U was added last 24 hours (50 μ M) of proliferation. Astrocytes were fixed and were analysed by immunostaining by making use of anti-BrdU coupled to Cy3 for mitotic nuclei (red), anti-GFAP coupled to Alexa488 for astrocytes (green) and TO-PRO3 specific for nuclei (blue). (B) The results were quantified and expressed as percentage of Brd U/GFAP positive cells. (C) Quantified data presented in (B). Data were representative of two independent experiments. Bar scale: 50 μ m.

In most cases of CNS degenerative diseases or trauma, both neurons and glia are lost. Neural stem cells with their potential to generate neurons, astrocytes and oligodendrocytes have become promising therapeutic agents. The proliferation and the differentiation of neural stem cells are under the control of neuronal growth factors (Okano, 2002). Small molecules which are able to mimic the biological effect of these proteic growth factors (Gonzalez de Aguilar et al. 2001, Ding et al. 2003), could be useful for basic research as well as for potential clinical applications.

We have first analysed the effect of the crude extract of *P. notoginseng* (PNS) on the WT spheres. Interestingly, PNS induced the differentiation of spheres into astrocytes but not into neurons.

By chemical fractionation using neurospheres a screening system, we showed that only ginsenoside-Rd induced the differentiation of neurospheres into astrocytes.

Although reproducible, the observed effect was rather weak. We have thus undertaken the investigation with another bioassay system. The mutant Dll1 neurospheres which produced a very low proportion of astrocytes in comparison to that of WT spheres could show a more pronounced effect on the production of astrocytes.

Interestingly, in the presence of Rd, the relative proportion of astrocytes increased from 195% at 10^{-7} M to 320% at 10^{-5} M in comparison with the control group (100%). Additionally, in the treated group, astrocytes are much larger; with a star-like morphology. This indicated a more differentiated state. We did not observe any differentiative effect with other ginsenosides. The effect was reproducible and significant. The finding that a transient treatment with Rd during proliferation was sufficient to invert the proportion of astrocytes versus neurons suggested that the product was acting on multipotential progenitors which influenced cell fate decisions. So, we assume that Rd could play a role on Notch pathway which has been described to influence the neuron/glia determinism. An inhibition of Notch pathway is known to promote neurons at the expense of glia (Grandbarbe et al., 2003) and a hyperactivation of Notch is known to promote astrocytes differentiation (Ge et al., 2002). Furthermore, in Dll1 neurospheres where we assume that Notch pathway is inactivated because of the mutation of the ligand Dll1 of Notch, Rd could save the phenotype by increasing the proportion of astrocytes at the expense of neurons. Confirming the link between Rd and Notch pathway will be our next objective in a future study.

We observed an incorporation of BrdU in the Rd-treated cultures of astrocytes. This indicates that the increase in the number of astrocytes could be attributed partially to the specific

proliferation of mitotic astrocytes. Thus the increased number of astrocytes could be due to the superimposition of differentiation and proliferation effects.

We used a bioassay-guided fractionation approach to investigate the crude extract of medicinal plants. This approach showed that only ginsenoside-Rd induced the differentiation of neurospheres to astrocytes; several other ginsenosides of the same plants whose chemical structures are slightly different are inactive.

The ultimate purpose of CNS regeneration is the production of functional neurons. The generation of functional neurons is influenced by many elements, including the presence of astrocytes. Traditionnally, astrocytes are assigned a supportive role for neurons, but, according to recent studies, astrocytes play an active role by establishing signals with neurons. These exchanges include ions fluxes, neurotransmitters, cell adhesion molecules and specialized signaling molecules released from synaptic and nonsynaptic regions of the neurons (Fields and Stevens-Graham, 2002; Song et al., 2002).

Our present study indicated that a low molecular weight compound, ginsenoside-Rd, could promote the differentiation of neural stem cells into astrocytes. However several points remain to be clarified in particular the implication in the Notch signaling pathway. Advanced investigations regarding the chemistry and biological activity of triterpenoid saponins are continuing to be conducted in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grants from Meiji Dairies Corporation (Japan) to B.L and to J.B. We acknowledge the confocal facility service of IFR 37 (Strasbourg, France). The authors wish to thank Prof. G.Ourisson and Dr E. Mohier for their support and for the review of this manuscript.

REFERENCES

- Cao, Q.L., Benton, R.L., Whitemore, S.R., 2002. Stem cell repair of central nervous system injury. *J. Neurosci. Res.*, 68, 501-510.
- Connor, B., Dragunow, M., 1998. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Rev.*, 27, 1-39.
- Dai, C., Holland, E.C., 2003. Astrocyte Differentiation states and Glioma Formation. *Cancer Journal*, 9, 72-80.
- Ding, S., Wu, T.Y.H., Brinker, A., Peters, E.C., Hur, W., Gray, N.S., Schultz, P.G., 2003. Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (13), 7632-7637.
- Fields, R.D., Stevens-Graham, B., 2002, New Insights into neuron-Glia communication. *Science*, 298, 556-562.
- Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science*, 287, 1433-1438.
- Ge, W., Martinowich, K., Wu, X., He, F., Miyamoto, A., Fan, G., Weinmaster, G., Sun, Y.E.,

3. Effets du Ginsenoside-Rd dans la différenciation des neurosphères

2002. Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *J. Neurosci. Res.*, 69, 848-60.
- Gonzalez de Aguilar, J.-L., Girlanda-Junges, C., Coowar, D., Duportail, G., Loeffler, G., Luu, B., 2001. Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res.* 920, 65-73.
- Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M.D., Hrabe de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S., Mohier, E., 2003. Delta-Notch signalling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development*, 130, 1391-1402.
- Hall, P.A., Watt, F.M., 1989. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, 106, 619-633.
- Hrabe de Angelis, M., Mc Intyre, J., Gossler, A., 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DIII. *Nature* 386: 717-21.
- Jiang, K.Y., Qian, Z.-N., 1995. Effects of *Panax notoginseng* saponins on posthypoxic cell damage of neurons *in vitro*. *Acta Pharmacologica sinica*, 16, 399-402.
- Johansson, C., Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A., Frisen, J., 1999. Neural stem cells in the adult human brain. *Experimental Cell Res*, 253, 733-736.
- Kruger, G.M., Morrison, S.J., 2002. Brain repair by endogenous progenitors. *Cell*, 110(4) 399-402.
- Ma, W.G., Mitzutani, M., Malterud, K.E., Lu S.L., Ducrey, B., Tahara, S., 1999, Saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry*, 52, 1133-1139.
- Matsuura, H., Kasai, R., Tanaka, O., Saruwatari, Y.I., Fuwa, T; Zhou, J., 1983. Further studies on Dammarane-saponins of Sanchi-ginseng. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 2281-2287
- Okano, H., 2002. Stem cell biology of the central nervous system. *J. Neuroscience Res*, 69, 698-707.
- Perraud, F., Besnard, F., Pettmann, B., Sensenbrenner, M., Labourdette, G., 1988. Effect of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF and bFGF) on the proliferation and the glutamine synthetase expression of rat astroblasts in culture. *Glia*, 1, 124-31.
- Price J., 2001. Neural stem cells – where are you? *Nature Medicine*, 7, 998-999.
- Reynolds, B.A., Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707-1710.
- Reynolds, B.A., Weiss, S., 1996, Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev. Biol.*, 175, 1-13.
- Song, H.J., Stevens C.F., Gage, F.H., 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417, 39-44.
- Tanaka, O., Yahara, S., 1978. Dammarane saponin of leaves of *Panax pseudoginseng* sub sp. *Himalaicus*. *Phytochemistry*, 17, 1353-1358.
- Weissmann, IL., 2000. Stem cells: units of development, units of generation and units in evolution, *Cell* 100: 157-168.
- Yang, T-R., Kasai, R., Zhou, J., Tanaka, O., 1983. Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry*, 22, 1473-1478.
- Zhao, P., Liu, Y.-Q., Yang, C.R., 1996. Minor dammarane saponins from *Panax notoginseng*. *Phytochemistry*, 41, 1419-1422.
- Zhou, J., Wu, M.Z., Taniyasu, S., Besso, H., Tanaka, O., Saruwatari, Y., Fuwa, T., 1981. Dammarane-saponins of sanchi-ginseng, roots of *Panax notoginseng* (Burk); F.H. Chen (Araliaceae): Structures of new saponins, notoginsenosides-R1 and -R2, and identification of ginsenoside-Rg₂ and -Rh₁. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 2844-2850.

3.4. Données complémentaires et discussion

Après avoir publié cet article, nous avons analysé les effets du Ginsenoside-Rd sur la voie Notch à partir d'échantillons de neurosphères traitées au cours de la phase de prolifération et/ou de différenciation. L'analyse de l'expression des gènes clé de la voie Notch par RT-PCR n'a montré aucune variation des gènes, que ce soit au niveau des récepteurs, des ligands ou des effecteurs *Hes1* et *Hes5*.

Il est donc probable que le Ginsenoside-Rd induise la prolifération des précurseurs d'astrocytes au cours de la phase de prolifération des neurosphères (figure 4iii de la publication) comme dans le cas des culture d'astrocytes (figure 5).

Aucune diminution de la proportion de neurones n'étant observée dans les cultures de neurosphères sauvages traitées (figure 2). Dans le cas des neurosphères mutantes traitées, la diminution de la proportion de neurones observée (40% environ) est explicable par la très forte augmentation de la proportion d'astrocytes (plus de 300%) (figure 3).

L'ensemble de ces résultats laissent penser que le Ginsenoside Rd n'a aucun effet ni sur la spécification des CSN, ni sur la différenciation des précurseurs de neurones. Cette molécule induirait simplement la prolifération des précurseurs d'astrocytes, et ce, par un mécanisme autre que la voie Notch.

Chapitre 5

Discussion et perspectives

1. Rôles de la voie Notch dans l'autorenouvellement des cellules souches neurales

Nous avons montré que *Hes1* est nécessaire au le maintien des CSN. Des études contemporaines à nos travaux ont également montré l'importance des gènes de la voie Notch *Hes1* (Nakamura et al., 2000), *Hes5* (Ohtsuka et al., 2001) ainsi que de *Notch1*, *RBPJK* et de la *Preséniline-1* (Hitoshi et al., 2002) dans le maintien des CSN, aussi bien in-vivo qu'in-vitro.

Par contre, nous avons montré que dans le cas des neurosphères homozygotes mutantes pour *Dll1*, la mutation de ce ligand de Notch ne semble pas empêcher le maintien des CSN. Nous avons en effet réussi à conserver ces lignées pendant de nombreux passages alors que nous avons été dans l'impossibilité de maintenir les lignées de neurosphères homozygotes mutantes pour *Hes1*, comme pour *Notch1* (résultats non présentés) dans les mêmes conditions expérimentales. Ce résultat est d'autant plus intéressant que nous avons montré que l'inactivation de *Dll1* s'accompagnait de l'absence d'expression du facteur de transcription directement régulé par Notch, *Hes5*. Or les études du groupe de Kageyama (Ohtsuka et al., 2001) ont montré que *Hes5*, au même titre que *Hes1*, était nécessaire à l'autorenouvellement des CNS dans le système des neurosphères.

Il semblerait donc que l'absence de *Hes5* dans les neurosphères *Dll1*^{-/-} puisse être compensée par d'autres mécanismes permettant le maintien des cellules souches neurales.

2. Rôle de Notch1 dans la spécification des cellules souches neurales

Nous avons montré que *Notch1* joue dans la spécification des cellules souches neurales en augmentant la proportion de neurones au dépend de la proportion de cellules gliales.

Les travaux de Van Der Kooy ont quant à eux suggéré que *Notch1* n'influence pas le phénotype de différenciation des neurosphères (Hitoshi et al., 2002), même si ce n'était pas l'objectif principal de leur étude. Ces résultats vont à l'encontre de ce que nous avons observé dans les neurosphères sauvages traitées par le tCFA15 ou plus directement par des oligonucléotides antisens dirigés contre *Notch1*.

De plus, nous avons montré que le tCFA15 a un effet dose dépendant à la fois sur l'inhibition de l'expression de *Notch1* et sur le phénotype de différenciation des neurosphères alors que dans les mêmes conditions de culture, les neurosphères hétérozygotes mutantes pour *Notch1* n'ont pas de phénotype particulier (données non présentées).

Cette différence pourrait être expliquée si l'on se place dans le cadre de l'inhibition latérale et que l'on garde à l'esprit que l'activation de Notch1 pourrait être remplacée par l'activation d'un autre homologue de Notch. L'inactivation génétique (utilisation de mutants) de *Notch1* dans l'ensemble des cellules composant les neurosphères pourrait ne pas bouleverser l'équilibre ligands /récepteurs entre les cellules équivalentes alors que l'inhibition sélective du niveau de Notch1 dans certaines cellules plus sensibles ou plus accessibles au tCFA15 ou aux antisens pourrait quant à elle bouleverser cet équilibre instable et ainsi jouer sur le déterminisme neurones / cellules gliales.

3. Rôle de *Hes1* et *Hes5* dans la spécification et la différenciation des cellules souches neurales

La plupart des laboratoires étudiant la voie Notch dans la neurogenèse semblent n'utiliser le système des neurosphères que pour étudier le maintien des CSN. Nous avons montré au cours de nos travaux que la voie Notch joue également dans la spécification des CSN en cellules gliales et neuronales, comme nous l'avons mis en évidence dans des neurosphères mutantes pour *Dll1* ou dans des neurosphères dans lesquelles l'expression de *Notch1* avait été inhibée (traitement au tCFA15). Les neurosphères *Dll1*^{-/-} et les neurosphères sauvages traitées au tCFA15 ont un phénotype de différenciation semblable, dans lequel une partie des cellules gliales semble remplacée par des neurones. Au niveau moléculaire, le point commun identifié entre les neurosphères mutantes pour *Dll1* et les neurosphères traitées au tCFA15 est l'absence (ou forte inhibition) de l'expression de *Hes5*. Le phénotype de différenciation de ces neurosphères suggère que *Hes5* pourrait agir sur la spécification neurones / cellules gliales à partir des CSN.

Par contre, dans le cas des neurosphères mutantes pour *Hes1*, nous n'avons vu aucun effet de ce gène sur la spécification neurones / cellules gliales, l'augmentation observée du nombre de neurones dans les mutants *Hes1* n'étant pas corrélée avec une diminution du nombre de cellules gliales.

Ainsi, *Hes1* pourrait inhiber la différenciation ou la prolifération des précurseurs neuronaux, comme cela a été montré par ailleurs in-vitro et in-vivo (Nakamura et al., 2000), sans toutefois influencer le déterminisme à partir des CSN. *Hes5* quant à lui inhiberait à la fois la différenciation des neurones et la spécification des CSN vers la voie neuronale comme nos résultats obtenus avec le tCFA15 le montrent.

Des expériences complémentaires permettraient de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Pour cela, il faudrait utiliser des neurosphères sauvages traitées à l'aide d'oligonucléotides

antisens dirigés contre *Hes1* et contre *Hes5* ou mieux des neurosphères mutantes pour *Hes1* et pour *Hes5*. L'étude du phénotype de différenciation de ces neurosphères, de la prolifération/apoptose des précurseurs neuronaux et gliaux et de l'expression de gènes proneuraux (tels que *NeuroD*) dans ces neurosphères permettrait de mieux comprendre les rôles de ces homologues murins de *E(spl)*.

4. Rôle de *Notch4* dans la spécification et la différenciation des cellules souches neurales

Les travaux réalisés à l'aide du 5mIFA18 ou d'oligonucléotides antisens dirigés contre *Notch4* indiquent que *Notch4* inhibe la différenciation des neurones sans toutefois jouer sur le déterminisme des CSN dans le système des neurosphères, ce qui n'avait pas été montré auparavant. Le rôle de *Notch4* avait surtout été mis en évidence dans les mécanismes de la vasculogénèse (Krebs et al., 2000) et dans le développement des cancers du sein (Lee et al., 1999).

Il serait intéressant, pour compléter cette étude d'étudier le rôle de *Notch4* dans l'expression des facteurs de transcription *Hes1* et *Hes5*. Nous pensons en effet que l'inhibition de *Notch4* pourrait dans notre système inhiber uniquement l'expression de *Hes1* et non de *Hes5* (vu que le 5mIFA18 ne joue pas sur le déterminisme), ce qui pourrait expliquer l'effet du tCFA15 dans les neurosphères.

5. Lien fonctionnel entre *Notch1* et *STAT3*

Les apports fondamentaux dans la recherche sur les cellules souches ont souvent été obtenus grâce à l'utilisation de molécules pharmacologiques et à l'analyse de leurs effets d'abord sur des processus physiologiques et ensuite sur les processus moléculaires susceptibles de leur être associés. C'est cette démarche que nous avons suivie avec le tCFA15.

Le tCFA15, qui semble inhiber l'expression de *Notch1* dans toutes les cellules, et qui inhibe aussi l'activation de *STAT3*, nous a permis d'établir un lien entre *STAT3* et *Notch1*. Ainsi, dans les neurosphères, *Notch1* est exprimé sous le contrôle de *STAT3*. Bien que quelques données sur le contrôle de *Notch1* par la gp130, récepteur des cytokines du type CNTF, LIF et Il-6, dont la voie de transduction principale est celle de JAK/STAT, aient été rapportées dans la littérature (Chojnacki et al., 2003), rien n'indiquait directement que c'était *STAT3* qui intervenait.

On peut supposer l'expression de *Notch1* n'est pas sous le contrôle exclusif de *STAT3* et ne serait donc pas universelle dans la mesure où la régulation de l'expression de gènes est le plus

souvent multifactorielle, dépendant en particulier du type cellulaire et/ou de son état de différenciation, et *in vitro*, des conditions de culture. Les cibles de STAT3 sont en cours d'identification dans différents laboratoires, les premiers résultats ne montrent pas Notch1 comme l'une de ses cibles (Alvarez et Frank, 2004). Toutefois, cette étude a été réalisée sur des fibroblastes matures, cellules et conditions très différentes des nôtres.

6. Existence d'une boucle de régulation de Notch1 via STAT3 ?

L'étude du mécanisme d'action du tCFA15 nous a permis de montrer que STAT3 se situe en amont de Notch1. Ces travaux ont été renforcés par l'utilisation d'une stratégie de gain et de perte de fonction de STAT3 et/ou de Notch1.

D'autres travaux publiés récemment ont montré que Notch1, par l'intermédiaire des facteurs de transcription qu'il régule, Hes1 (ou Hes5) conduit à augmenter l'activation de STAT3 (Kamakura et al., 2004), ce qui placerait Notch1 en amont de STAT3, contrairement à nos résultats. Nous avons d'abord vérifié que l'activation de Notch1 dans notre système conduit bien à une augmentation de la phosphorylation de STAT3, ce qui est le cas.

Ces résultats suggèrent l'existence d'une boucle de régulation permettant une suractivation réciproque des voies Notch et STAT3. Cette boucle pourrait être également appliquée au mécanisme d'inhibition latérale (Introduction, §3.2.2). Ainsi, un facteur extrinsèque, tel que le CNTF ou le LIF (ligands de la gp130) pourrait être à l'origine du déséquilibre initial entre cellules équivalentes :

(i) Un facteur de type CNTF pourrait agir sur son récepteur, à des concentrations très faibles et activer STAT3. (ii) STAT3, une fois activé pourrait induire l'expression de Notch1, permettant à la voie Notch d'être activée dans cette cellule, et non dans ses voisines, ce qui conduirait à l'inhibition de l'expression de ligands de Notch à sa surface. (iii) L'activation de la voie Notch dans la cellule réceptrice par ses voisines suractiverait STAT3, ce qui conduirait à amplifier les effets de STAT3 sans avoir besoin de plus de ligand de type CNTF ou de plus de récepteur de type gp130. (iv) La suractivation de la voie STAT3 conduirait à une suractivation réciproque de Notch dans la cellule émettrice.

Plutôt qu'à une boucle proprement dite, on aurait affaire à une opération en deux temps. D'abord le CNTF met en place la voie Notch1. Ensuite une synergie s'établit entre les deux voies conduisant à leur suractivation réciproque.

Ce mécanisme pourrait donc contribuer aux mécanismes d'inhibition latérale en permettant à un ligand de type CNTF/LIF de déstabiliser l'équilibre existant entre cellules équivalentes.

7. Rôle de la voie Notch dans les processus de cancérisation du système nerveux

Nous avons montré que la voie Notch exerce des effets phénotypiques similaires dans des lignées tumorales du système nerveux que dans des les cellules saines correspondantes.

Une inhibition de Notch par l'intermédiaire du tCFA15 semble ainsi améliorer le phénotype de lignées de neuroblastomes et d'oligodendrogliomes. Par contre, dans le cas des astrocytomes, qui représentent la forme la plus fréquente et la plus grave de cancers du système nerveux, l'inhibition de la voie Notch aurait un effet aggravant. Mais certaines tumeurs sont mixtes, composées de cellules astrocytaires et oligodendrocytaires ou de cellules astrocytaires et neuronales, voire des trois types cellulaires. Ainsi, avant d'utiliser des agents pharmacologiques inhibant ou activant la voie Notch, il faudrait caractériser précisément la tumeur.

Des travaux récents (Purow et al., 2005) ont également montré l'importance de Notch1 dans la prolifération des gliomes. Les auteurs de ces travaux ont montré que les gènes *Notch1*, *Jagged1* et *Dll1* sont surexprimés (3 à 20 à fois) dans de nombreuses lignées de cellules tumorales ainsi que dans quelques glioblastomes humains, démontrant le rôle protooncogène de *Notch1*. Lorsque ces cellules sont transplantées dans des souris athymiques, la durée de survie des souris est doublée quand les cellules ont été traitées avec de l'ARNi de *Notch1* (Purow et al., 2005). Ce qui montre bien le rôle prépondérant de la voie Notch dans le développement de ces tumeurs, et qu'ainsi elle pourrait constituer une cible thérapeutique.

Enfin, une inhibition de la voie Notch pouvant inhiber le maintien des CSN, l'utilisation d'agents pharmacologiques ciblant la voie Notch pourraient inhiber le maintien des « cellules souches cancéreuses », ce qui rendrait le traitement plus efficace dans certains types de cancers malins.

Chapitre 6

Références bibliographiques

- Aguayo, A. J., Epps, J., Charron, L. and Bray, G. M.** (1976). Multipotentiality of Schwann cells in cross-anastomosed and grafted myelinated and unmyelinated nerves: quantitative microscopy and radioautography. *Brain Res* **104**, 1-20.
- Allenspach, E. J., Maillard, I., Aster, J. C. and Pear, W. S.** (2002). Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther* **1**, 466-76.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M. and Tramontin, A. D.** (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* **2**, 287-93.
- Alvarez, J. V. and Frank, D. A.** (2004). Genome-wide analysis of STAT target genes: elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biol Ther* **3**, 1045-50.
- Anderson, D. J., Choi, G. and Zhou, Q.** (2002). Olig genes and the genetic logic of CNS neural cell fate determination. *Clinical Neuroscience Research* **2**, 17-28.
- Anderson, D. J., Gage, F. H. and Weissman, I. L.** (2001). Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* **7**, 393-5.
- Annaert, W. and De Strooper, B.** (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci* **22**, 439-43.
- Artavanis-Tsakonas, S., Delidakis, C. and Fehon, R. G.** (1991). The Notch locus and the cell biology of neuroblast segregation. *Annu Rev Cell Biol* **7**, 427-52.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. and Fortini, M. E.** (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-32.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Artavanis-Tsakonas, S. and Simpson, P.** (1991). Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. *Trends Genet* **7**, 403-8.
- Aster, J. C., Robertson, E. S., Hasserjian, R. P., Turner, J. R., Kieff, E. and Sklar, J.** (1997). Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J Biol Chem* **272**, 11336-43.
- Austin, C. P., Feldman, D. E., Ida, J. A., Jr. and Cepko, C. L.** (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* **121**, 3637-50.
- Baker, N. E.** (2000). Notch signaling in the nervous system. Pieces still missing from the puzzle. *Bioessays* **22**, 264-73.
- Baladron, V., Ruiz-Hidalgo, M. J., Nueda, M. L., Diaz-Guerra, M. J., Garcia-Ramirez, J. J., Bonvini, E., Gubina, E. and Laborda, J.** (2005). dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res* **303**, 343-59.
- Baron, M.** (2003). An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 113-9.
- Becker, A. J., Mc, C. E. and Till, J. E.** (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**, 452-4.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M. P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M. et al.** (2000). Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *Embo J* **19**, 3337-48.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Checquolo, S., Balestri, A., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lendahl, U., Fehling, H. J., Hayday, A. C., Frati, L. et al.** (2002). Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3788-93.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. and Sweet, W.** (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* **161**, 370-1.
- Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Eberhart, C. G., Watkins, D. N., Chen, J. K., Cooper, M. K., Taipale, J., Olson, J. M. et al.** (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* **297**, 1559-61.
- Beverly, L. J. and Capobianco, A. J.** (2003). Perturbation of Ikaros isoform selection by MLV integration is a cooperative event in Notch(IC)-induced T cell leukemogenesis. *Cancer Cell* **3**, 551-64.
- Biedler, J. L., Helson, L. and Spengler, B. A.** (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* **33**, 2643-52.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. and Vescovi, A. L.** (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**, 534-7.
- Bland, C. E., Kimberly, P. and Rand, M. D.** (2003). Notch-induced proteolysis and nuclear localization of the Delta ligand. *J Biol Chem* **278**, 13607-10.
- Blaumueller, C. M. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes. *Perspect Dev Neurobiol* **4**, 325-43.
- Bogler, O., Wren, D., Barnett, S. C., Land, H. and Noble, M.** (1990). Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6368-72.

- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. and Greenberg, M. E.** (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**, 477-83.
- Booher, J. and Sensenbrenner, M.** (1972). Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**, 97-105.
- Borg, J., Toazara, J., Hietter, H., Henry, M., Schmitt, G. and Luu, B.** (1987). Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons. *FEBS Lett* **213**, 406-10.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. and Blau, H. M.** (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-9.
- Brockes, J. P. and Kumar, A.** (2002). Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 566-74.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumanò, A., Roux, P., Black, R. A. and Israel, A.** (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* **5**, 207-16.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. and Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Cadigan, K. M. and Nusse, R.** (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* **11**, 3286-305.
- Caldwell, M. A., He, X., Wilkie, N., Pollack, S., Marshall, G., Wafford, K. A. and Svendsen, C. N.** (2001). Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* **19**, 475-9.
- Capobianco, A. J., Zagouras, P., Blaumueller, C. M., Artavanis-Tsakonas, S. and Bishop, J. M.** (1997). Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. *Mol Cell Biol* **17**, 6265-73.
- Chen, L., Zhang, J., Tang, D. C., Fibach, E. and Rodgers, G. P.** (2002). Influence of lineage-specific cytokines on commitment and asymmetric cell division of haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* **118**, 847-57.
- Chojnacki, A., Shimazaki, T., Gregg, C., Weinmaster, G. and Weiss, S.** (2003). Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **23**, 1730-41.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U. and Frisen, J.** (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **288**, 1660-3.
- Cong, Y. S., Wright, W. E. and Shay, J. W.** (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 407-25, table of contents.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J.** (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-45.
- Coowar, D., Bouissac, J., Hanbali, M., Paschaki, M., Mohier, E. and Luu, B.** (2004). Effects of indole fatty alcohols on the differentiation of neural stem cell derived neurospheres. *J Med Chem* **47**, 6270-82.
- Costa, R. M., Honjo, T. and Silva, A. J.** (2003). Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol* **13**, 1348-54.
- Craig, C. G., Tropepe, V., Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Weiss, S. and van der Kooy, D.** (1996). In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* **16**, 2649-58.
- Crosio, C., Heitz, E., Allis, C. D., Borrelli, E. and Sassone-Corsi, P.** (2003). Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J Cell Sci* **116**, 4905-14.
- Cui, X. Y., Hu, Q. D., Tekaya, M., Shimoda, Y., Ang, B. T., Nie, D. Y., Sun, L., Hu, W. P., Karsak, M., Duka, T. et al.** (2004). NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J Biol Chem* **279**, 25858-65.
- D'Amour, K. A. and Gage, F. H.** (2002). Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted? *Nat Med* **8**, 213-4.
- de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. et al.** (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-48.
- De Strooper, B.** (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**, 9-12.
- Ding, S. and Schultz, P. G.** (2004). A role for chemistry in stem cell biology. *Nat Biotechnol* **22**, 833-40.
- Ding, S. and Schultz, P. G.** (2005). Small molecules and future regenerative medicine. *Curr Top Med Chem* **5**, 383-95.
- Doetsch, F.** (2003a). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* **6**, 1127-34.

- Doetsch, F.** (2003b). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 543-50.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-16.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A.** (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* **36**, 1021-34.
- Dunwoodie, S. L., Clements, M., Sparrow, D. B., Sa, X., Conlon, R. A. and Beddington, R. S.** (2002). Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene *Dll3* are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm. *Development* **129**, 1795-806.
- Edlund, T. and Jessell, T. M.** (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-24.
- Egan, S. E., St-Pierre, B. and Leow, C. C.** (1998). Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 273-324.
- Eglitis, M. A. and Mezey, E.** (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4080-5.
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. and Sklar, J.** (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649-61.
- Evans, M. J. and Kaufman, M. H.** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6.
- Faux, C. H., Turnley, A. M., Epa, R., Cappai, R. and Bartlett, P. F.** (2001). Interactions between fibroblast growth factors and Notch regulate neuronal differentiation. *J Neurosci* **21**, 5587-96.
- Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* **61**, 523-34.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. and Mavilio, F.** (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-30.
- Fitzgerald, K. and Greenwald, I.** (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signalling activity of their extracellular domains in vivo. *Development* **121**, 4275-82.
- Fleming, R. J.** (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 599-607.
- Forsyth, N. R., Wright, W. E. and Shay, J. W.** (2002). Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* **69**, 188-97.
- Fortini, M. E.** (2001). Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 627-34.
- Fortini, M. E.** (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 673-84.
- Fortini, M. E., Rebay, I., Caron, L. A. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1993). An activated Notch receptor blocks cell-fate commitment in the developing *Drosophila* eye. *Nature* **365**, 555-7.
- Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X. M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F. Y., Jones, S., Shulok, J. et al.** (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J Biol* **1**, 10.
- Freeman, M. R. and Doe, C. Q.** (2001). Asymmetric Prospero localization is required to generate mixed neuronal/glial lineages in the *Drosophila* CNS. *Development* **128**, 4103-12.
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z. Z., Morrow, E. M. and Cepko, C. L.** (2000). *rax*, *Hes1*, and *notch1* promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* **26**, 383-94.
- Gabay, L., Lowell, S., Rubin, L. L. and Anderson, D. J.** (2003). Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron* **40**, 485-99.
- Gage, F. H.** (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* **287**, 1433-8.
- Gage, F. H., Coates, P. W., Palmer, T. D., Kuhn, H. G., Fisher, L. J., Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Suhr, S. T. and Ray, J.** (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11879-83.
- Gaiano, N., Nye, J. S. and Fishell, G.** (2000). Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**, 395-404.
- Gallahan, D. and Callahan, R.** (1997). The mouse mammary tumor associated gene *INT3* is a unique member of the NOTCH gene family (*NOTCH4*). *Oncogene* **14**, 1883-90.
- Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M. G., Bjornson, C., Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M. G., Fiocco, R., Cossu, G. et al.** (2000). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* **3**, 986-91.
- Ge, W., Martinowich, K., Wu, X., He, F., Miyamoto, A., Fan, G., Weinmaster, G. and Sun, Y. E.** (2002). Notch signaling promotes astroglial gene activation via direct CSL-mediated glial gene activation. *J Neurosci Res* **69**, 848-60.

- Girlanda-Junges, C., Lutz-Bucher, B., Gonzalez de Aguilar, J. L., Loeffler, J. P. and Luu, B.** (2000). 3-(15-Hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and its effect on neuropeptide secretion. *Bioorg Med Chem Lett* **10**, 2537-9.
- Gonzalez de Aguilar, J. L., Girlanda-Junges, C., Coowar, D., Duportail, G., Loeffler, J. P. and Luu, B.** (2001). Neurotrophic activity of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one in cultured central nervous system neurons. *Brain Res* **920**, 65-73.
- Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabe de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S. and Mohier, E.** (2003). Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* **130**, 1391-402.
- Greenwald, I.** (1998). LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* **12**, 1751-62.
- Gridley, T.** (2003). Notch signaling and inherited disease syndromes. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**, R9-13.
- Grove, E. A., Williams, B. P., Li, D. Q., Hajihosseini, M., Friedrich, A. and Price, J.** (1993). Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Development* **117**, 553-61.
- Guidos, C. J.** (2002). Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol* **14**, 395-404.
- Guillemot, F.** (1999). Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res* **253**, 357-64.
- Guillemot, F.** (2000). Signaux extracellulaires et programmes transcriptionnels controlant la neurogenese. *Medecine/Sciences* **16**, 159-163.
- Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israel, A. and Brou, C.** (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol* **166**, 73-83.
- Haines, N. and Irvine, K. D.** (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 786-97.
- Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J. R. and Tsujimoto, Y.** (1999). Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* **126**, 3415-24.
- Hanbali, M., Bernard, F., Berton, C., Gatineau, G., Perraut, M., Aunis, D., Luu, B. and Bagnard, D.** (2004). Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound. *J Neurochem* **90**, 1423-31.
- Harper, J. A., Yuan, J. S., Tan, J. B., Visan, I. and Guidos, C. J.** (2003). Notch signaling in development and disease. *Clin Genet* **64**, 461-72.
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* **131**, 5539-50.
- Heitzler, P. and Simpson, P.** (1991). The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. *Cell* **64**, 1083-92.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, L., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J.** (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* **7**, 661-70.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N. and Gotoh, Y.** (2004). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* **131**, 2791-801.
- Hitoshi, S., Alexson, T., Tropepe, V., Donoviel, D., Elia, A. J., Nye, J. S., Conlon, R. A., Mak, T. W., Bernstein, A. and van der Kooy, D.** (2002). Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* **16**, 846-58.
- Hitoshi, S., Seaberg, R. M., Kosciak, C., Alexson, T., Kusunoki, S., Kanazawa, I., Tsuji, S. and van der Kooy, D.** (2004). Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* **18**, 1806-11.
- Hojo, M., Ohtsuka, T., Hashimoto, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2000). Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina. *Development* **127**, 2515-22.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd and Gossler, A.** (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DIII. *Nature* **386**, 717-21.
- Hsieh, J. and Gage, F. H.** (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 461-9.
- Hsieh, J., Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E. and Gage, F. H.** (2004). Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16659-64.
- Hu, Q. D., Ang, B. T., Karsak, M., Hu, W. P., Cui, X. Y., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Sankar, N., Ng, Y. K. et al.** (2003). F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* **115**, 163-75.
- Imatani, A. and Callahan, R.** (2000). Identification of a novel NOTCH-4/INT-3 RNA species encoding an activated gene product in certain human tumor cell lines. *Oncogene* **19**, 223-31.

- Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R. and Guillemot, F.** (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* **9**, 3136-48.
- Iso, T., Kedes, L. and Hamamori, Y.** (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* **194**, 237-55.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. and Goodell, M. A.** (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107**, 1395-402.
- Jan, Y. N. and Jan, L. Y.** (1998). Asymmetric cell division. *Nature* **392**, 775-8.
- Jang, M. S., Zlobin, A., Kast, W. M. and Miele, L.** (2000). Notch signaling as a target in multimodality cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* **2**, 55-65.
- Jarriault, S., Le Bail, O., Hirsinger, E., Pourquie, O., Logeat, F., Strong, C. F., Brou, C., Seidah, N. G. and Isra I, A.** (1998). Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol* **18**, 7423-31.
- Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H. D., Shawber, C., Norton, C. R., Serreze, D. V., Weinmaster, G. and Gridley, T.** (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* **12**, 1046-57.
- Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U. and Frisen, J.** (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25-34.
- Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M. and McKay, R. D.** (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* **10**, 3129-40.
- Ju, B. G., Jeong, S., Bae, E., Hyun, S., Carroll, S. B., Yim, J. and Kim, J.** (2000). Fringe forms a complex with Notch. *Nature* **405**, 191-5.
- Kadesch, T.** (2004). Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 506-12.
- Kamakura, S., Oishi, K., Yoshimatsu, T., Nakafuku, M., Masuyama, N. and Gotoh, Y.** (2004). Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* **6**, 547-54.
- Kaneta, M., Osawa, M., Sudo, K., Nakauchi, H., Farr, A. G. and Takahama, Y.** (2000). A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* **164**, 256-64.
- Kashima, T., Tiu, S. N., Merrill, J. E., Vinters, H. V., Dawson, G. and Campagnoni, A. T.** (1993). Expression of oligodendrocyte-associated genes in cell lines derived from human gliomas and neuroblastomas. *Cancer Res* **53**, 170-5.
- Katsube, K. and Sakamoto, K.** (2005). Notch in vertebrates - molecular aspects of the signal. *Int J Dev Biol* **49**, 369-74.
- Kawamata, S., Du, C., Li, K. and Lavau, C.** (2002). Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* **21**, 3855-63.
- Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. et al.** (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-6.
- Kimble, J. and Simpson, P.** (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 333-61.
- Klein, C. and Fishell, G.** (2004). Neural stem cells: progenitors or panacea? *Dev Neurosci* **26**, 82-92.
- Klueg, K. M., Parody, T. R. and Muskavitch, M. A.** (1998). Complex proteolytic processing acts on Delta, a transmembrane ligand for Notch, during Drosophila development. *Mol Biol Cell* **9**, 1709-23.
- Kondo, T. and Raff, M.** (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* **289**, 1754-7.
- Krebs, L. T., Shutter, J. R., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K. L. and Gridley, T.** (2004). Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev* **18**, 2469-73.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R. et al.** (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* **14**, 1343-52.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Sundberg, J. P., Beatus, P., Lendahl, U., Joutel, A. and Gridley, T.** (2003). Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis* **37**, 139-43.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J. and Gage, F. H.** (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* **17**, 5820-9.
- Labourdette, G., Roussel, G., Ghandour, M. S. and Nussbaum, J. L.** (1979). Cultures from rat brain hemispheres enriched in oligodendrocyte-like cells. *Brain Res* **179**, 199-203.
- Labourdette, G., Roussel, G. and Nussbaum, J. L.** (1980). Oligodendroglia content of glial cell primary cultures, from newborn rat brain hemispheres, depends on the initial plating density. *Neurosci Lett* **18**, 203-9.

- Lachman, L. B., Brown, D. C. and Dinarello, C. A.** (1987). Growth-promoting effect of recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor for a human astrocytoma cell line. *J Immunol* **138**, 2913-6.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L. and Grompe, M.** (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* **6**, 1229-34.
- Lai, E. C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.
- Le Borgne, R., Bardin, A. and Schweisguth, F.** (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* **132**, 1751-62.
- Le Borgne, R. and Schweisguth, F.** (2003). Notch signaling: endocytosis makes delta signal better. *Curr Biol* **13**, R273-5.
- Lee, J. S., Haruna, T., Ishimoto, A., Honjo, T. and Yanagawa, S.** (1999). Intracisternal type A particle-mediated activation of the Notch4/int3 gene in a mouse mammary tumor: generation of truncated Notch4/int3 mRNAs by retroviral splicing events. *J Virol* **73**, 5166-71.
- Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M. and McKay, R. D.** (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**, 675-9.
- Lei, L., Xu, A., Panin, V. M. and Irvine, K. D.** (2003). An O-fucose site in the ligand binding domain inhibits Notch activation. *Development* **130**, 6411-21.
- Levison, S. W. and Goldman, J. E.** (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* **10**, 201-12.
- Li, W., Cogswell, C. A. and LoTurco, J. J.** (1998). Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J Neurosci* **18**, 8853-62.
- Lillien, L.** (1998). Neural progenitors and stem cells: mechanisms of progenitor heterogeneity. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 37-44.
- Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A. and Heibel, R. P.** (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* **105**, 71-7.
- Lissemore, J. L. and Starmer, W. T.** (1999). Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Mol Phylogenet Evol* **11**, 308-19.
- Loeffler, M. and Roeder, I.** (2004). Conceptual models to understand tissue stem cell organization. *Curr Opin Hematol* **11**, 81-7.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. and Israel, A.** (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Lu, P. and Tuszynski, M. H.** (2005). Can bone marrow-derived stem cells differentiate into functional neurons? *Exp Neurol* **193**, 273-8.
- Lutolf, S., Radtke, F., Aguett, M., Suter, U. and Taylor, V.** (2002). Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* **129**, 373-85.
- Luu, B., Gonzalez de Aguilar, J. L. and Girlanda-Junges, C.** (2000). Cyclohexenonic Long-Chain Fatty Alcohols as neuronal growth stimulators. *Molecules* **5**, 1439-1460.
- Manuelidis, L., Yu, R. K. and Manuelidis, E. E.** (1977). Ganglioside content and pattern in human gliomas in culture. Correlation of morphological changes with altered gangliosides. *Acta Neuropathol (Berl)* **38**, 129-35.
- Marin-Husstege, M., Muggironi, M., Liu, A. and Casaccia-Bonnel, P.** (2002). Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *J Neurosci* **22**, 10333-45.
- Marshman, E., Booth, C. and Potten, C. S.** (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* **24**, 91-8.
- Martinez Arias, A., Zecchini, V. and Brennan, K.** (2002). CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev* **12**, 524-33.
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G. and Sun, Y. E.** (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* **302**, 890-3.
- Mathon, N. F., Malcolm, D. S., Harrisingham, M. C., Cheng, L. and Lloyd, A. C.** (2001). Lack of replicative senescence in normal rodent glia. *Science* **291**, 872-5.
- Matsuzaki, F.** (2000). Asymmetric division of Drosophila neural stem cells: a basis for neural diversity. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 38-44.
- Mayer-Proschel, M., Kalyani, A. J., Mujtaba, T. and Rao, M. S.** (1997). Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* **19**, 773-85.
- McConnell, S. K.** (1995). Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* **15**, 761-8.
- McGinnis, R. E., Fox, H., Yates, P., Cameron, L. A., Barnes, M. R., Gray, I. C., Spurr, N. K., Hurko, O. and St Clair, D.** (2001). Failure to confirm NOTCH4 association with schizophrenia in a large population-based sample from Scotland. *Nat Genet* **28**, 128-9.
- McKay, R.** (2000). Stem cells--hype and hope. *Nature* **406**, 361-4.
- Meachem, S., von Schonfeldt, V. and Schlatt, S.** (2001). Spermatogonia: stem cells with a great perspective. *Reproduction* **121**, 825-34.

- Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zhu, G., Gokhan, S. and Kessler, J. A.** (2000). Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev Neurosci* **22**, 74-85.
- Mezey, E. and Chandross, K. J.** (2000). Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* **405**, 297-302.
- Mione, M. C., Cavanagh, J. F., Harris, B. and Parnavelas, J. G.** (1997). Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **17**, 2018-29.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S. et al.** (2000). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369-75.
- Morrison, S. J.** (2001). Stem cell potential: can anything make anything? *Curr Biol* **11**, R7-9.
- Morshead, C. M., Benveniste, P., Iscove, N. N. and van der Kooy, D.** (2002). Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* **8**, 268-73.
- Muller-Sieburg, C. E., Whitlock, C. A. and Weissman, I. L.** (1986). Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: a committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1-lo hematopoietic stem cell. *Cell* **44**, 653-62.
- Mumm, J. S. and Kopan, R.** (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**, 151-65.
- Muroyama, Y., Kondoh, H. and Takada, S.** (2004). Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 915-21.
- Nagato, M., Heike, T., Kato, T., Yamanaka, Y., Yoshimoto, M., Shimazaki, T., Okano, H. and Nakahata, T.** (2005). Prospective characterization of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. *J Neurosci Res* **80**, 456-66.
- Nakamura, Y., Sakakibara, S., Miyata, T., Ogawa, M., Shimazaki, T., Weiss, S., Kageyama, R. and Okano, H.** (2000). The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* **20**, 283-93.
- Nam, Y., Aster, J. C. and Blacklow, S. C.** (2002). Notch signaling as a therapeutic target. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 501-9.
- Namiki, J. and Tator, C. H.** (1999). Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 489-98.
- Nickoloff, B. J., Osborne, B. A. and Miele, L.** (2003). Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* **22**, 6598-608.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P. and Radtke, F.** (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* **33**, 416-21.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O. and Guillemot, F.** (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* **29**, 401-13.
- Nishino, H., Hida, H., Takei, N., Kumazaki, M., Nakajima, K. and Baba, H.** (2000). Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum. *Exp Neurol* **164**, 209-14.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. and Smith, A.** (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* **12**, 2048-60.
- Nye, J. S., Kopan, R. and Axel, R.** (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* **120**, 2421-30.
- Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. and Caudy, M.** (1994). Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev* **8**, 2743-55.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (1999). *Hes1* and *Hes5* as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* **18**, 2196-207.
- Ohtsuka, T., Sakamoto, M., Guillemot, F. and Kageyama, R.** (2001). Roles of the basic helix-loop-helix genes *Hes1* and *Hes5* in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* **276**, 30467-74.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W. et al.** (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**, 3291-301.
- Okajima, T. and Irvine, K. D.** (2002). Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* **111**, 893-904.
- Okano, H., Ogawa, Y., Nakamura, M., Kaneko, S., Iwanami, A. and Toyama, Y.** (2003). Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 191-8.
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M. and Haass, C.** (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *Embo J* **21**, 5408-16.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M. et al.** (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-5.

- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H.** (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242-5.
- Palmer, T. D., Takahashi, J. and Gage, F. H.** (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* **8**, 389-404.
- Panin, V. M., Shao, L., Lei, L., Moloney, D. J., Irvine, K. D. and Haltiwanger, R. S.** (2002). Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J Biol Chem* **277**, 29945-52.
- Pardal, R., Clarke, M. F. and Morrison, S. J.** (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 895-902.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and Goff, J. P.** (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-70.
- Pettmann, B., Labourdette, G., Devilliers, G. and Sensenbrenner, M.** (1981). Effects of brain extracts from chick embryo on the development of astroblasts in culture. *Dev Neurosci* **4**, 37-45.
- Pevny, L. and Placzek, M.** (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 7-13.
- Poeggeler, B., Miravalle, L., Zagorski, M. G., Wisniewski, T., Chyan, Y. J., Zhang, Y., Shao, H., Bryant-Thomas, T., Vidal, R., Frangione, B. et al.** (2001). Melatonin reverses the profibrillogenic activity of apolipoprotein E4 on the Alzheimer amyloid Abeta peptide. *Biochemistry* **40**, 14995-5001.
- Ponten, J. and Macintyre, E. H.** (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**, 465-86.
- Potten, C. S. and Loeffler, M.** (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-20.
- Poulson, D. F.** (1937). Chromosomal deficiencies and embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **23**, 133-137.
- Poulson, D. F.** (1940). The effects of certain X-chromosome deficiencies in the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* **83**, 271-325.
- Priller, J., Persons, D. A., Klett, F. F., Kempermann, G., Kreutzberg, G. W. and Dirnagl, U.** (2001). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* **155**, 733-8.
- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C. et al.** (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299-308.
- Purow, B. W., Haque, R. M., Noel, M. W., Su, Q., Burdick, M. J., Lee, J., Sundaresan, T., Pastorino, S., Park, J. K., Mikolaenko, I. et al.** (2005). Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* **65**, 2353-63.
- Raff, M.** (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 1-22.
- Raff, M. C., Miller, R. H. and Noble, M.** (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* **303**, 390-6.
- Rajan, P. and McKay, R. D.** (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* **18**, 3620-9.
- Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C. and Heitzler, P.** (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* **11**, 1729-38.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P. et al.** (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* **20**, 3427-36.
- Reid, C. B., Liang, I. and Walsh, C.** (1995). Systematic widespread clonal organization in cerebral cortex. *Neuron* **15**, 299-310.
- Reiter, R. J.** (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* **56**, 359-84.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L.** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-11.
- Reynolds, B. A. and Rietze, R. L.** (2005). Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods* **2**, 333-6.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S.** (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707-10.
- Reynolds, B. A. and Weiss, S.** (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**, 1-13.
- Roegiers, F. and Jan, Y. N.** (2004). Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 195-205.
- Romanko, M. J., Rola, R., Fike, J. R., Szele, F. G., Dizon, M. L., Felling, R. J., Brazel, C. Y. and Levison, S. W.** (2004). Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol* **74**, 77-99.

- Rossi, F. and Cattaneo, E.** (2002). Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* **3**, 401-9.
- Roybon, L., Christophersen, N. S., Brundin, P. and Li, J. Y.** (2004). Stem cell therapy for Parkinson's disease: where do we stand? *Cell Tissue Res* **318**, 261-73.
- Rusconi, J. C. and Corbin, V.** (1998). Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in *Drosophila*. *Mech Dev* **79**, 39-50.
- Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S. and Katsube, K.** (2002). Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Dev Biol* **241**, 313-26.
- Sanchez-Pernaute, R., Studer, L., Bankiewicz, K. S., Major, E. O. and McKay, R. D.** (2001). In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res* **65**, 284-8.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O. et al.** (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805-9.
- Sasamura, T., Sasaki, N., Miyashita, F., Nakao, S., Ishikawa, H. O., Ito, M., Kitagawa, M., Harigaya, K., Spana, E., Bilder, D. et al.** (2003). neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* **130**, 4785-95.
- Saura, C. A., Choi, S. Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B. S., Chattarji, S., Kelleher, R. J., 3rd, Kandel, E. R., Duff, K. et al.** (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42**, 23-36.
- Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Tarikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J. H., Culp, W. and Brandt, B. L.** (1974). Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* **249**, 224-7.
- Schweisguth, F.** (2004). Notch signaling activity. *Curr Biol* **14**, R129-38.
- Sell, S.** (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **51**, 1-28.
- Sergent-Tanguy, S., Chagneau, C., Neveu, I. and Naveilhan, P.** (2003). Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population. *J Neurosci Methods* **129**, 73-9.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S. and Rakic, P.** (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* **286**, 741-6.
- Seugnet, L., Simpson, P. and Haenlin, M.** (1997). Requirement for dynamin during Notch signaling in *Drosophila* neurogenesis. *Dev Biol* **192**, 585-98.
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J. and Tonegawa, S.** (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* **89**, 629-39.
- Shi, S. and Stanley, P.** (2003). Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5234-9.
- Shimazaki, T., Shingo, T. and Weiss, S.** (2001). The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* **21**, 7642-53.
- Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Takahashi, T., Kumano, K., Hamada, Y. and Hirai, H.** (2002). Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain. *Embo J* **21**, 294-302.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T. and Dirks, P. B.** (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* **23**, 7267-73.
- Song, M. R. and Ghosh, A.** (2004). FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* **7**, 229-35.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L.** (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62.
- Stone, J. S., Oesterle, E. C. and Rubel, E. W.** (1998). Recent insights into regeneration of auditory and vestibular hair cells. *Curr Opin Neurol* **11**, 17-24.
- Struhl, G., Fitzgerald, K. and Greenwald, I.** (1993). Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell* **74**, 331-45.
- Studer, L., Tabar, V. and McKay, R. D.** (1998). Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* **1**, 290-5.
- Sun, X. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*. *Development* **124**, 3439-48.
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Shen, J., ter Borg, M. G., Rosser, A. E., Tyers, P., Karmioli, S. and Dunnett, S. B.** (1997). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **148**, 135-46.

- Svendsen, C. N., Clarke, D. J., Rosser, A. E. and Dunnett, S. B.** (1996). Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* **137**, 376-88.
- Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G. and Gridley, T.** (1994). Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* **8**, 707-19.
- Talora, C., Cialfi, S., Segatto, O., Morrone, S., Kim Choi, J., Frati, L., Paolo Dotto, G., Gulino, A. and Screpanti, I.** (2005). Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. *Exp Cell Res* **305**, 343-54.
- Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H. and Honjo, T.** (2001). Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**, 45-55.
- Temple, S.** (2001). The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112-7.
- Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M. and Krause, D. S.** (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-40.
- Till, J. E. and Mc, C. E.** (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213-22.
- Tosh, D. and Slack, J. M.** (2002). How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 187-94.
- Tropepe, V., Craig, C. G., Morshead, C. M. and van der Kooy, D.** (1997). Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* **17**, 7850-9.
- Tropepe, V., Sibilina, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F. and van der Kooy, D.** (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* **208**, 166-88.
- Turkson, J., Ryan, D., Kim, J. S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebt, S., Hamilton, A. D. and Jove, R.** (2001). Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* **276**, 45443-55.
- Uyttendaele, H., Ho, J., Rossant, J. and Kitajewski, J.** (2001). Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci US A* **98**, 5643-8.
- Varnum-Finney, B., Purton, L. E., Yu, M., Brashem-Stein, C., Flowers, D., Staats, S., Moore, K. A., Le Roux, I., Mann, R., Gray, G. et al.** (1998). The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* **91**, 4084-91.
- Wagers, A. J., Christensen, J. L. and Weissman, I. L.** (2002). Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther* **9**, 606-12.
- Wang, S., Sdrulla, A. D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G. and Barres, B. A.** (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**, 63-75.
- Wang, W., Prince, C. Z., Mou, Y. and Pollman, M. J.** (2002). Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 21723-9.
- Wei, J. and Hemmings, G. P.** (2000). The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nat Genet* **25**, 376-7.
- Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S. M., Zlobin, A., Osborne, B. A., Gottipati, S., Aster, J. C., Hahn, W. C. et al.** (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* **8**, 979-86.
- Weinberg, H. J. and Spencer, P. S.** (1976). Studies on the control of myelinogenesis. II. Evidence for neuronal regulation of myelin production. *Brain Res* **113**, 363-78.
- Weinmaster, G.** (1997). The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* **9**, 91-102.
- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**, 567-81.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A. and Jessell, T. M.** (2002). Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* **110**, 385-97.
- Wobus, A. M. and Boheler, K. R.** (2005). Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* **85**, 635-78.
- Wu, A. M., Till, J. E., Siminovitch, L. and McCulloch, E. A.** (1968). Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med* **127**, 455-64.
- Wurmser, A. E., Nakashima, K., Summers, R. G., Toni, N., D'Amour, K. A., Lie, D. C. and Gage, F. H.** (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* **430**, 350-6.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G. and Gridley, T.** (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* **8**, 723-30.

- Yan, X. Q., Sarmiento, U., Sun, Y., Huang, G., Guo, J., Juan, T., Van, G., Qi, M. Y., Scully, S., Senaldi, G. et al.** (2001). A novel Notch ligand, Dll4, induces T-cell leukemia/lymphoma when overexpressed in mice by retroviral-mediated gene transfer. *Blood* **98**, 3793-9.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A.** (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-92.
- Yoon, K. and Gaiano, N.** (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* **8**, 709-15.
- Yoon, K., Nery, S., Rutlin, M. L., Radtke, F., Fishell, G. and Gaiano, N.** (2004). Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J Neurosci* **24**, 9497-506.
- Yun, K., Fischman, S., Johnson, J., Hrabe de Angelis, M., Weinmaster, G. and Rubenstein, J. L.** (2002). Modulation of the notch signaling by Mash1 and Dlx1/2 regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* **129**, 5029-40.
- Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B., 3rd, Birchmeier, W. and Birchmeier, C.** (2003). beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol* **258**, 406-18.
- Zhao, X., Ueba, T., Christie, B. R., Barkho, B., McConnell, M. J., Nakashima, K., Lein, E. S., Eadie, B. D., Willhoite, A. R., Muotri, A. R. et al.** (2003). Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6777-82.