

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

# THÈSE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

Discipline : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : pharmacologie cellulaire et moléculaire

*par*

Marie PASCHAKI

---

*Effets de la régulation de Notch1  
sur le devenir des cellules souches neurales  
et sur des lignées tumorales du système nerveux*

---

Soutenue publiquement le 25 juin 2005

devant les membres du jury

Docteur	<b>Éliane MOHIER</b>	DR CNRS, Strasbourg,	Directeur de thèse
Professeur	<b>François LASBENNES</b>	Professeur ULP, Strasbourg,	Rapporteur interne
Docteur	<b>Pierre HUBERT</b>	CR INSERM, Marseille,	Rapporteur externe
Docteur	<b>Rajesh LADHER</b>	DR RIKEN, Kobe, Japon,	Rapporteur externe

*à mamaki*  
*για την απεραντη αγαπη σου*  
*για ολες τις θυσιες που εκανες ολα αυτα τα χρονια*  
*σ' αγαπω πολυ*

*à mon père, j'aurais tant voulu qu'il soit là*

*à Julien*

*à Kana*

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Éliane Mohier de m'avoir fait découvrir la voie Notch, un domaine aussi passionnant que complexe. Durant ces trois années elle m'a aidée à évoluer non seulement à un niveau professionnel mais aussi à un niveau personnel. Je tiens tout particulièrement à la remercier pour sa patience durant les moments difficiles. Je la remercie pour ses conseils et son investissement personnel dans l'élaboration du manuscrit de thèse.

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

Je remercie M. le professeur François Lasbennes d'avoir accepté sans hésitation de juger ce travail, et je le prie de m'excuser de ne pas avoir pu lui remettre le manuscrit plus tôt. Je le remercie également pour son soutien et pour ses précieux conseils durant mon cursus universitaire. Je lui suis reconnaissante d'avoir trouvé les mots justes pour me donner la force de poursuivre mes études au moment où ma motivation était au plus bas. Sans ses qualités scientifiques et humaines, je pense que je n'aurais pas pu arriver jusqu'à la thèse.

Je remercie M. le docteur Pierre Hubert pour ses suggestions et ses conseils concernant le manuscrit. Je le remercie également d'avoir accepté de se déplacer à Strasbourg un samedi pour assister à la soutenance de thèse. J'ai également beaucoup apprécié les discussions scientifiques que nous avons pu avoir au Centre de Neurochimie.

I would like to thank Dr Raj Ladher, for accepting to make a round world travel in order to assist to my PhD. But even more, I am really grateful because he accepted to read the thesis in French without any hesitation. I would also like to thank him, for supporting my application for a post-doctoral fellowship and for all his help when I was preparing the post-doctoral application.

Si aujourd'hui je suis arrivée à achever cette thèse, c'est aussi grâce aux conseils et au soutien de ceux sur qui j'ai pu compter dans les moments difficiles. Je ne les oublierai jamais. Merci à Flo, Laurence, Marie et MLR, Carole, Caro, Cedric, Celinou, Djalil, Jeremy, Valérie, Huguette et Lindzy. L'ordre n'a aucune importance, vous comptez tous énormément pour moi...

Je tiens à remercier Gérard Labourdette, car, durant ces trois années, il a toujours été là, pour répondre à mes questions, m'accompagner et m'aider dans les manips. Je le remercie pour les longues discussions scientifiques, pour ses conseils, sa patience et sa compréhension.

Durant la période éprouvante des travaux de rénovation au laboratoire, la bonne volonté du personnel de l'animalerie du Centre de Neurochimie, Séverine, Nicolas et aussi le personnel de l'animalerie de l'IBMC et plus particulièrement Bruno a été précieuse. Je remercie également Dominique Guenôt pour son aide à la réalisation du projet concernant les études dans les « nues »

Je remercie la Société pour la Promotion de la Science de m'avoir donné la chance de travailler au Japon et le Dr Asahara de m'avoir accueillie pendant 3.5 mois dans son laboratoire. Je remercie également M. le Professeur Nakatani de m'avoir accompagnée dans mes démarches de recherche d'un Post-Doc.

Je remercie la Ligue contre le Cancer – Région Alsace d'avoir soutenu mon travail de thèse durant ces deux dernières années.

---

# Sommaire

---

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<u>INTRODUCTION GENERALE</u> .....	4
<u>1. LES CELLULES SOUCHES NEURALES (CSN)</u> .....	7
1.1. Les cellules souches.....	7
1.2. Les cellules souches neurales.....	7
<u>2. LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH</u> .....	8
2.1. Structure type des récepteurs Notch.....	8
2.2. Structure des récepteurs et des ligands de la voie Notch.....	9
2.2.1. Les récepteurs Notch.....	9
2.2.2. Les ligands de la famille Delta et Serrate.....	9
2.3. Fragment intracellulaire et transduction du signal.....	10
<u>3. LE SYSTEME MODELE DES NEUROSPHERES ET LA VOIE NOTCH</u> .....	12
<u>4. LA VOIE NOTCH ET LE CANCER</u> .....	14
4.1. Notch proto-oncogène ou suppresseur de tumeur.....	14
4.2. Tumeurs du système nerveux.....	14
4.2.1. Notion de tumeur.....	14
4.2.2. Les neuroblastomes périphériques.....	15
4.2.3. Les neuroblastomes du système nerveux central.....	15
4.2.4. Les oligodendrogliomes.....	16
4.2.5. Les astrocytomes.....	16
4.2.6. Les glioblastomes.....	17
4.3. Cancers associés à des altérations de la voie Notch.....	17
4.3.1. Formes tronquées de Notch.....	17
4.3.2. Surexpression d'éléments de la voie Notch.....	17
4.3.3. Sous-expression d'éléments de la voie Notch.....	17
4.3.4. Thérapies possibles.....	18
<b>1. INTERACTIONS DES VOIES NOTCH ET STAT3 DANS LE DÉTERMINISME NEURONES/GLIALES À PARTIR DES CELLULES SOUCHES NEURALES</b> .....	19
<u>1.1. LES EFFETS DU tCFA15 SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES NEURALES PASSENT PAR NOTCH1</u> .....	21
1.1.1. Le tCFA15 agit sur la différenciation des cellules souches neurales en augmentant la proportion de neurones au dépens des astrocytes.....	21
1.1.2. Le tCFA15 diminue l'expression de Notch1.....	21
<u>1.2. STAT3 REGULE L'EXPRESSION DE NOTCH1</u> .....	23
1.2.1. Le tCFA15 diminue la phosphorylation de STAT3.....	23
1.2.2. La transcription de Notch1 est régulée par STAT3.....	23
1.2.3. Autorégulation de l'expression de Notch1.....	24
1.2.3.1. Effets de l'inhibition de Notch1.....	24
1.2.3.2. Effets de l'activation de Notch1.....	25
1.2.4. Conclusion.....	25

<b>2. EFFETS DU tCFA15 SUR DES LIGNEES TUMORALES</b> .....	27
<b>2.1. LE tCFA15 REVERSE LE PHENOTYPE DE FIBROBLASTES TRANSFORMES PAR ras</b> <b>(CELLULES DTU)</b> .....	28
2.1.1. Notch1 et lignées transformées par ras.....	28
2.1.2. Modèle d'étude : les cellules DTU.....	28
2.1.3. Effets du tCFA15 sur la voie Notch dans les cellules DTU.....	28
2.1.4. Effets du tCFA15 sur le phénotype des cellules DTU.....	29
2.1.5. Effets du tCFA15 sur le développement des tumeurs dérivées de cellules DTU.....	29
2.1.6. Conclusion.....	30
<b>2.2. EFFETS DU tCFA15 SUR DES LIGNEES DE NEUROBLASTOMES, D'OLIGODENDROGLIOMES</b> <b>ET D'ASTROCYTOMES</b> .....	31
2.2.1. Notch1 et lignées tumorales neurales.....	31
<b>2.3. EFFETS DU tCFA15 SUR DES CELLULES DE GLIOBLASTOME DE RAT (C6) ET DE</b> <b>NEUROBLASTOME DE RAT (B104)</b> .....	32
2.3.1. Lignées C6 et B104.....	32
2.3.2. Expression des gènes de la voie Notch dans ces lignées, effets du tCFA15.....	32
2.3.3. Effets du tCFA15 sur la phosphorylation de STAT3 dans les cellules C6 et B104.....	33
2.3.4. Effets phénotypiques de la diminution de l'expression de Notch1 induite par le tCFA15 dans les cellules C6 et B104.....	33
2.3.4.1. Effet du tCFA15 sur la différenciation des cellules C6 et B104.....	33
2.3.4.2. Effet du tCFA15 sur la prolifération in vitro des cellules C6 et B104.....	34
2.3.4.3. Effet du tCFA15 sur le développement de tumeurs de C6 et B104 dans des souris athymiques.....	35
2.3.5. Conclusion.....	35
<b>2.4. EFFETS DU tCFA15 SUR DES LIGNEES TUMORALES HUMAINES DU SYSTEME NERVEUX</b> .....	37
2.4.1. Lignées SHSY-5Y, TC620 et U373.....	37
2.4.2. Expression des gènes de la voie Notch et phosphorylation de STAT3 dans les lignées SHSY-5Y, TC620 et U373, effets du tCFA15.....	37
2.4.3. Effet du tCFA15 sur la prolifération in vitro des cellules SHSY-5Y, TC620 et U373.....	38
2.4.4. Effets du tCFA15 sur le développement de tumeurs issues des cellules SHSY-5Y, TC620 et U373, dans des souris athymiques.....	38
<b>2.5. CONCLUSION</b> .....	39
<b>3. INTERACTIONS RÉCIPROQUES ENTRE LES CELLULES ENDOTHÉLIALES</b> <b>ET LES NEUROSPHÈRES</b> .....	40
<b>3.1. INTRODUCTION</b> .....	41
3.1.1. Cellules souches neurales tumorales et angiogenèse.....	41
3.1.2. Modèles d'étude.....	41
3.1.3. Mécanismes des interactions cellules endothéliales/neurosphères.....	42
<b>3.2. MATERIEL ET METHODES</b> .....	43
3.2.1. Précurseurs des cellules endothéliales.....	43
3.2.2. Précurseurs des cellules endothéliales totalement différenciées (tdCE).....	43
3.2.3. Cellules souches neurales adultes.....	43
3.2.4. Cocultures avec contact cellulaire.....	44
3.2.4.1. Cocultures PCE/neurosphères.....	44
3.2.4.2. Cocultures tdCE/neurosphères.....	44
3.2.5. Coculture sans contact cellulaire.....	45
3.2.6. Milieux conditionnés.....	45
3.2.7. Expression des gènes.....	45

<b>3.3. LES PRECURSEURS DE CELLULES ENDOTHELIALES ORIENTENT LE DETERMINISME DES CSN VERS LES CELLULES ENDOTHELIALES</b> .....	46
3.3.1. Les PCE induisent l'expression de mDII4 dans les neurosphères .....	46
3.3.2. Les neurosphères en coculture avec les PCE expriment des marqueurs endothéliaux .....	46
3.3.3. Signalisation PCE/neurosphères.....	46
3.3.3.1. VEGF .....	47
3.3.3.2. Cytokines.....	47
<b>3.4. LES CSN INDUISENT L'EXPRESSION DE DLL4 DANS LES PCE</b> .....	48
3.4.1. Expression de gènes spécifiques des cellules endothéliales.....	48
3.4.2. Signalisation PCE/neurosphères.....	48
3.4.2.1. DIII .....	48
3.4.2.2. VEGF .....	48
<b>3.5. LES PCE INDUISENT L'EXPRESSION DE NOTCH1 DANS LES NEUROSPHERES</b> .....	49
3.5.1. Induction de l'expression de Notch1 .....	49
3.5.2. Maintien des CSN.....	49
3.5.3. Signalisation PCE/neurosphères.....	49
<b>3.6. LES PCE INDUISENT L'EXPRESSION DE LA GFAP DANS LES NEUROSPHERES</b> .....	51
3.6.1. Augmentation des ARNm de mNotch1 et de mGFAP .....	51
3.6.2. Signalisation PCE → CSN .....	51
<b>3.7. CONCLUSION</b> .....	52
<b>4. EFFETS D'ALCOOL GRAS INDOLIQUES (IFA) SUR LA DIFFÉRENCIATION DES NEUROSPHÈRES</b> .....	53
<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	55
<i>Lien fonctionnel entre Notch1 et STAT3</i> .....	55
<i>Modèle de boucle de régulation de Notch1</i> .....	56
<i>Liens possibles entre bFGF ou EGF et STAT3-Notch1</i> .....	57
<i>Autres effets du tCFA15 sur la voie Notch</i> .....	57
<i>STAT3 et cancer</i> .....	58
<i>Notch et cancer</i> .....	59
<i>Notch et oligodendrogliomes</i> .....	59
<i>Notch et astrocytomes</i> .....	59
<i>Notch et glioblastomes</i> .....	60
<i>Applications potentielles de la régulation de Notch1</i> .....	60
<b>MÉTHODES EXPÉRIMENTALES</b> .....	62
<b>1. CULTURES CELLULAIRES</b> .....	62
<b>1.1. ANIMAUX ET PRINCIPAUX PRODUITS UTILISES</b> .....	62
1.1.1. Animaux et animaleries.....	62
1.1.2. Origine des principaux produits utilisés pour la culture cellulaire .....	62
<b>1.2. PRODUITS UTILISES POUR TRAITER LES CELLULES</b> .....	63
1.2.2. Le tCFA15 et le 5mIFA18 .....	63
1.2.3. Modulation de la voie Notch .....	63
1.2.3.1. Oligonucléotides antisens dirigés contre Notch1 .....	63
1.2.3.2. Inhibiteur de gamma sécrétase de classe XII (GSI).....	64
1.2.3.3. Transfection transitoire des cellules par le domaine intracellulaire de Notch1 (ICN1).....	64
1.2.4. Modulation de l'activité de STAT3.....	64
1.2.4.1. Utilisation de CNTF et de LIF pour activer STAT3 .....	64
1.2.4.2. Peptide bloquant de la dimérisation de STAT3.....	65

<b>1.3. CULTURE DE NEUROSPHERES DERIVANT DES CELLULES SOUCHES NEURALES</b> .....	65
1.3.1. Obtention de neurosphères primaires.....	65
1.3.2. Entretien des cultures secondaires de neurosphères.....	66
1.3.3. Différenciation des neurosphères.....	66
<b>1.4. CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES, ASTROCYTES ET OLIGODENDROCYTES</b> .....	67
1.4.1. Culture primaire de neurones corticaux.....	67
1.4.2. Cultures primaires d'astrocytes.....	67
1.4.3. Cultures de précurseurs d'oligodendrocytes.....	68
1.4.3.1. Cultures primaires mixtes enrichies en cellules oligodendrogiales.....	68
1.4.3.2. Cultures secondaires de précurseurs d'oligodendrocytes.....	68
<b>1.5. CULTURE DE LIGNEES TUMORALES ET TRANSFORMEES</b> .....	69
1.5.1. Culture des lignées cellulaires.....	69
1.5.2. Test de prolifération clonale en milieu semi-solide (agarose mou).....	69
1.5.2. Souris athymiques et modèles de tumeurs.....	70
<b>1.6. TESTS DE PROLIFERATION ET DE MORTALITE CELLULAIRE</b> .....	71
1.6.1. Essais colorimétriques MTT.....	71
1.6.2. Essais permettant de détecter les cellules vivantes et les cellules mortes.....	72
1.6.3. Détection des cellules en mitose par incorporation de la bromodésoxyuridine.....	73
1.6.4. Détection des cellules en apoptose par la méthode TUNEL.....	73
<b>2. IMMUNOCYTOCHIMIE</b> .....	75
2.1. Fixation et perméabilisation des cellules.....	76
2.2. Saturation des sites aspécifiques et incubation avec les anticorps primaires.....	76
2.3. Incubation avec les réactifs secondaires/tertiaires.....	77
2.4. Marquage des noyaux.....	77
2.5. Observation du marquage immunocytochimique.....	77
2.6. Quantification des résultats et analyse statistique.....	77
<b>3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET DE BIOCHIMIE</b> .....	79
<b>3.1. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEES AUX ARN</b> .....	79
3.1.1. Extraction des ARN totaux.....	79
3.1.2. Reverse transcription.....	79
3.1.3. Réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	79
3.1.4. Électrophorèse des acides nucléiques.....	81
3.1.4.1. Séparation électrophorétique des ADNc.....	81
3.1.4.2. Séparation électrophorétique des ARN.....	82
<b>3.2. ÉLECTROPHORESE, ELECTROTRANSFERT ET IMMUNODETECTION DE PROTEINES</b> .....	82
3.2.1. Préparation des échantillons.....	82
3.2.2. Séparation par SDS-PAGE.....	83
3.2.3. Transfert liquide sur membrane de nitrocellulose.....	83
3.2.4. Immunodétection des protéines.....	83
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	84

---

## Liste des abréviations

---

---

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

---

A2B5	Anticorps monoclonal dirigé contre des gangliosides (GT3, GQ1c et GP1c)
acLDL-DiI	perchlorate de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindocarbocyanine
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 »)
C11	Lignée de fibroblastes 3T3, témoin non transformé des cellules DTU
CE	Cellule endothéliale
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
DTU	Lignée de fibroblastes C11, transformée par ras
E14	14 <sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire
ECN	Domaine extracellulaire de Notch
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme (« epidermal growth factor »)
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 »)
GFAP	Protéine acide gliofibrillaire (« gliofibrillary acidic protein »)
GSI	Inhibiteur du complexe gamma sécrétase (« gamma secretase inhibitor »)
HES	Homologue murin du gène « Enhancer of split »
HPV	« Human papilloma virus »
ICN	Domaine intracellulaire de Notch
IgG	Immunoglobuline G

IgM	Immunoglobuline M
IL-6	Interleukine 6
JAK	Kinase Janus
kDa	KiloDalton
LIF	« Leukaemia inhibitory factor »
LNR	Motif « LIN12/Notch repeat »
MAP	Protéines associées aux microtubules
MAPK	« Mitogen activated protein kinase »
5mIFA18	3-(18-Hydroxyoctadécyl)-5-méthoxy-1/H/-indole
MTT	Bromure de 3-(4-5 diméthylthiazol-2-yl)-diphényl tétrazolium
NS	Neurosphères
NTM	Domaine transmembranaire de Notch
pb	paires de bases
PBS	Solution tamponnée à pH 7,4 (Phosphate buffered saline) contenant : NaCl 150 mM ; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O 2,5 mM ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O 13 mM
PFA	Paraformaldéhyde
PM	Poids moléculaire
Poly-HEMA	Poly (2-hydroxy-éthyl-méthacrylate)
PS	Préséniline
O4	Anticorps contre les sulfatides membranaires
PCE	Précurseur de cellules endothéliales
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (« Polymerase chain reaction »)
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (« Platelet-derived growth factor »)
PDGFR- $\alpha$	Récepteur $\alpha$ au PDGF
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
tdCE	Cellule endothéliale totalement différenciée
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 $\beta$ 3 tubuline

TUNEL	« Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling »
VEGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (« Vascular endothelial growth factor »)

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

*Notch1* : gène Notch1

NOTCH1 : protéine Notch1

Notch : dénomination plus générale, qui englobe à la fois le gène et la protéine (ex : fonction Notch, voie Notch...)

---

# Introduction

---

---

## INTRODUCTION

---

### INTRODUCTION GENERALE

La voie Notch intervient dans le déterminisme neurones/cellules gliales à partir des cellules souches neurales.

Dans le premier chapitre, nous avons étudié les effets de petites molécules non peptidiques sur le déterminisme neurones/cellules gliales à partir de cellules de neurosphères qui représentent la descendance clonale de cellules souches neurales (CSN), *in vitro*. Après des études préliminaires, nous avons sélectionné une petite molécule, la 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexène-1-one (tCFA15), qui s'est révélée agir sur la différenciation des cellules souches neurales en favorisant les neurones aux dépens des cellules gliales. Cet effet rappelait celui de l'inhibition de la voie Notch précédemment mis en évidence dans notre laboratoire. Nous avons donc émis l'hypothèse que le mécanisme d'action du tCFA15 passait par la voie Notch. Afin de la vérifier, nous avons dans un premier temps analysé l'effet du tCFA15 sur l'expression des gènes clés de la voie Notch et nous avons trouvé qu'il diminuait spécifiquement l'expression de *Notch1*. Dans un deuxième temps, nous avons recherché le mécanisme d'action du tCFA15. Nous avons trouvé que le tCFA15 induit une déphosphorylation de STAT3. Ceci nous a conduit à étudier le rôle de STAT3 dans l'expression de *Notch1*. En évaluant les conséquences de l'activation ou de l'inactivation de STAT3 et de *Notch1*, nous avons établi que STAT3 régule positivement l'expression de *Notch1*.

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.

Dans le deuxième chapitre nous avons étudié les effets du tCFA15 sur des lignées tumorales. Récemment, il a été montré que le maintien de la tumorigénicité de lignées transformées par l'oncogène ras, nécessitait l'activation de *Notch1*. Nous avons alors testé si une diminution de l'expression de *Notch1*, induite par le tCFA15, pouvait entraîner une modification, voire une réversion du phénotype tumoral de ces cellules. Nous avons vérifié que le tCFA15 diminuait l'expression de *Notch1* dans une lignée transformée par ras (comme il le fait dans la plupart des

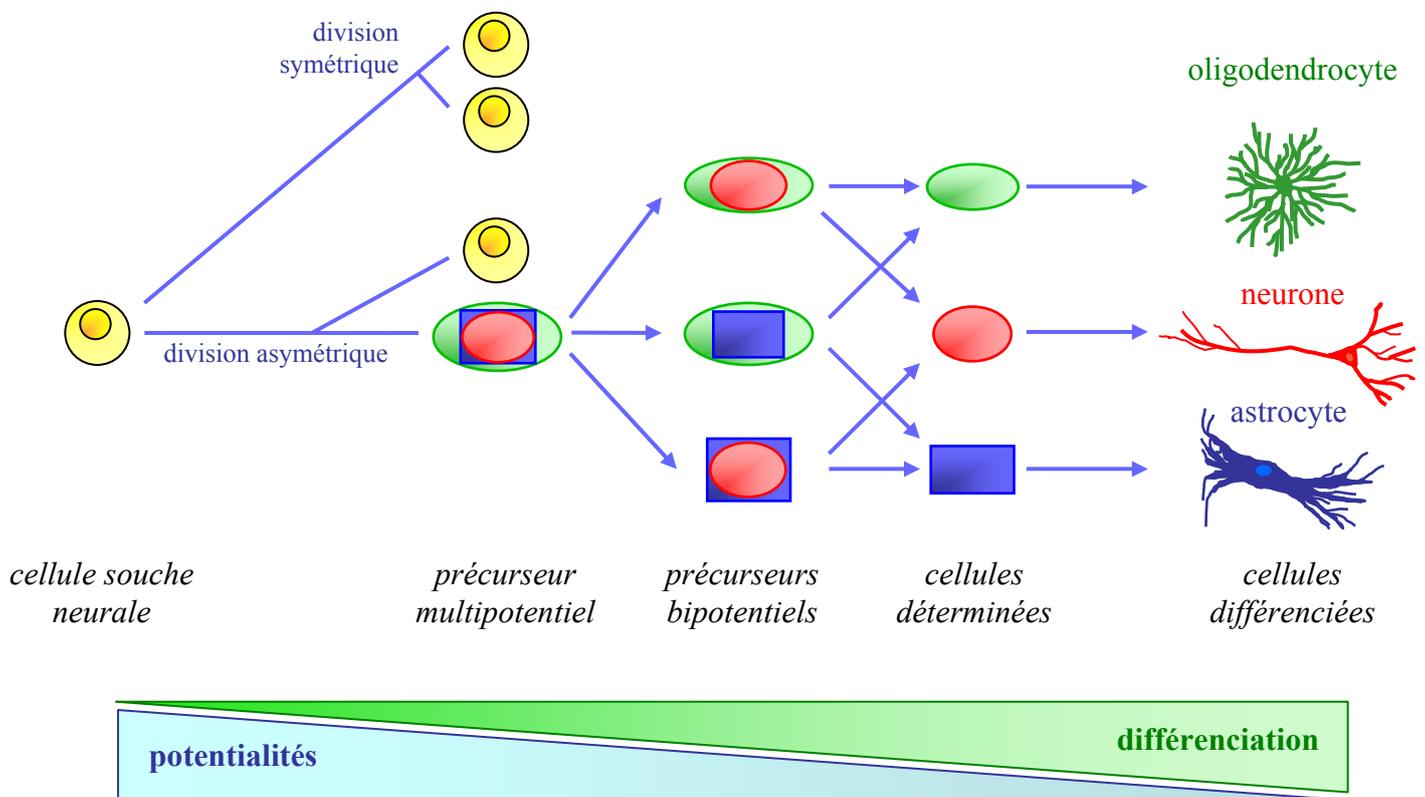
types cellulaires que nous avons examinés jusqu'à maintenant) et nous avons montré que cette diminution entraîne une réversion du phénotype tumoral *in vitro* et *in vivo*.

Ensuite, compte tenu du fait que les cellules tumorales sont souvent caractérisées par un faible degré de différenciation et étant donnée l'importance de la voie Notch dans le contrôle de la différenciation des cellules neurales, nous avons entrepris d'étudier les effets du tCFA15 sur la différenciation et la prolifération de différentes lignées tumorales du système nerveux. Pour cela, nous avons utilisé des lignées établies de neuroblastomes de rat (B104) ou humaines (SHSY-5Y) ; de gliomes de rat (C6) et humaines (U373), et d'oligodendrogliome humain (TC620). Nous avons montré que dans les cellules B104, C6 et TC620, comme il le fait dans les cellules normales, le tCFA15 inhibe l'expression de *Notch1* et la phosphorylation de STAT3. Puisque Notch et STAT3 stimulent la prolifération et inhibent la différenciation de certains types cellulaires non transformés, par exemple des précurseurs neuronaux et oligodendrogliaux, leur suractivation pourrait contribuer à la manifestation du caractère tumoral de ces cellules. Comme le tCFA15 est un inhibiteur de ces deux facteurs, il pourrait réinduire la différenciation et inhiber la prolifération de ces cellules *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats sur les lignées tumorales étudiées semblent confirmer cette hypothèse : en effet le tCFA15 inhibe le développement de neuroblastomes et d'oligodendrogliomes.

Le travail présenté dans le troisième chapitre a été effectué dans le laboratoire du Dr. Asahara (Japon). Sur la base de l'observation que les CSN sont en contact étroit avec les cellules endothéliales *in vivo*, nous avons recherché l'existence d'interactions réciproques entre les neurosphères et des précurseurs des cellules endothéliales (PCE) *in vitro* et nous avons recherché le rôle éventuel de la voie Notch dans ces interactions. Nos résultats principaux montrent que les précurseurs de cellules endothéliales (PCE) orientent le déterminisme des cellules des neurosphères vers les cellules endothéliales, par un mécanisme qui pourrait impliquer le VEGF et *Dll4*, et que les cellules des neurosphères induisent la différenciation des cellules endothéliales.

Dans le quatrième chapitre, nous avons étudié les effets d'une autre molécule non peptidique, le 5mIFA18, sur les neurosphères et sur l'expression des gènes de la voie Notch. Ce composé agit sur les neurosphères en augmentant le nombre des cellules neuronales, mais sans modifier le nombre des cellules gliales ; nous avons montré qu'il induit une diminution spécifique de l'expression du gène *Notch4*. L'étude des effets du 5mIFA sur l'expression des gènes de la voie Notch dans le modèle des neurosphères a été réalisée en collaboration avec le Dr. Coowar (UMR 7123, CNRS - Université Louis Pasteur, Strasbourg).

Le manuscrit commencera par une introduction présentant le système modèle des neurosphères, la voie de signalisation Notch et son rôle dans les cellules souches neurales et la cancérogenèse, Ensuite suivront les quatre chapitres déjà décrits, puis un chapitre “conclusion et perspectives” et un chapitre précisant les méthodes expérimentales utilisées terminera le manuscrit.



**Figure 1. 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.

## 1. LES CELLULES SOUCHES NEURALES (CSN)

### 1.1. Les cellules souches

Le concept de cellule souche s'applique à toute cellule non différenciée, capable d'auto-renouvellement, et qui peut donner naissance aux différentes lignées cellulaires constituant le tissu dont elles sont issues.

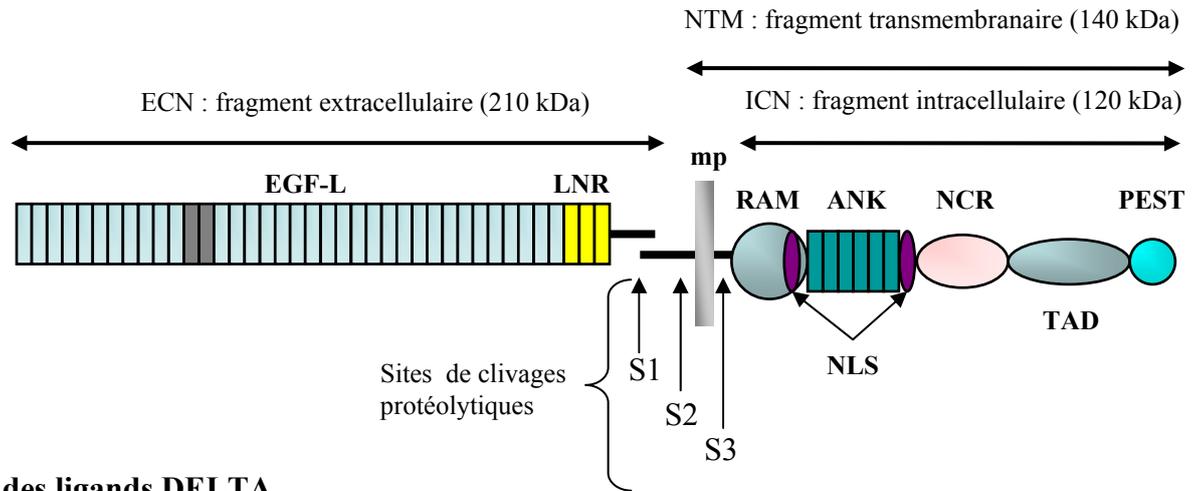
Un type particulier de cellule souche est la cellule embryonnaire initiale, le zygote, qui est à l'origine de toutes les cellules de l'organisme et qui est totipotente. Au cours du développement embryonnaire, les cellules souches s'engagent dans des voies de différenciation spécifiques et leur potentiel de développement est ainsi restreint.

### 1.2. Les cellules souches neurales

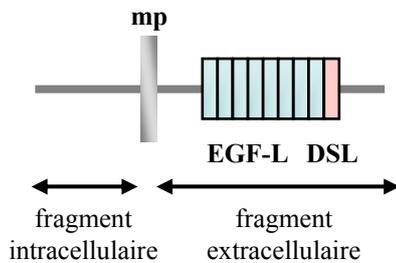
Les cellules souches neurales (CSN) sont des cellules multipotentes capables de se renouveler et de donner naissance aux cellules majeures du système nerveux central : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes (Anderson, 2001). Des cellules souches neurales existent dans le cerveau de l'embryon (Reynolds et Weiss, 1992) et subsistent dans le cerveau adulte. En fait, l'existence des précurseurs cellulaires capables de proliférer dans le cerveau de rat adulte était connue depuis longtemps (Altman et Das, 1965). Plus récemment, les CSN ont été décrites comme appartenant au lignage glial (Alvarez-Buylla et al., 2001).

Mais comment les cellules souches en général et les cellules souches neurales en particulier donnent-elles naissance à différents types cellulaires d'un tissu donné ? Les connaissances dans ce domaine ne cessent d'évoluer mais le mécanisme exact reste encore mal connu (Figure 1). Les cellules souches neurales subissent des 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 à la cellule d'origine et une cellule aux potentialités plus restreintes que celles de la cellule d'origine. 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 (Chen et al., 2002).

## A. Structure type des récepteurs NOTCH



## B. Structure des ligands DELTA



■ membrane plasmique	■ domaine LNR	○ domaine NCR
■ domaine DSL	■ domaine ANK	○ domaine TAD
■ motif EGF-L	■ domaine NLS	○ domaine PEST
■ interaction avec Delta	○ domaine RAM	

### Figure 2. Organisation 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.

## 2. LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH

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 et la différenciation, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

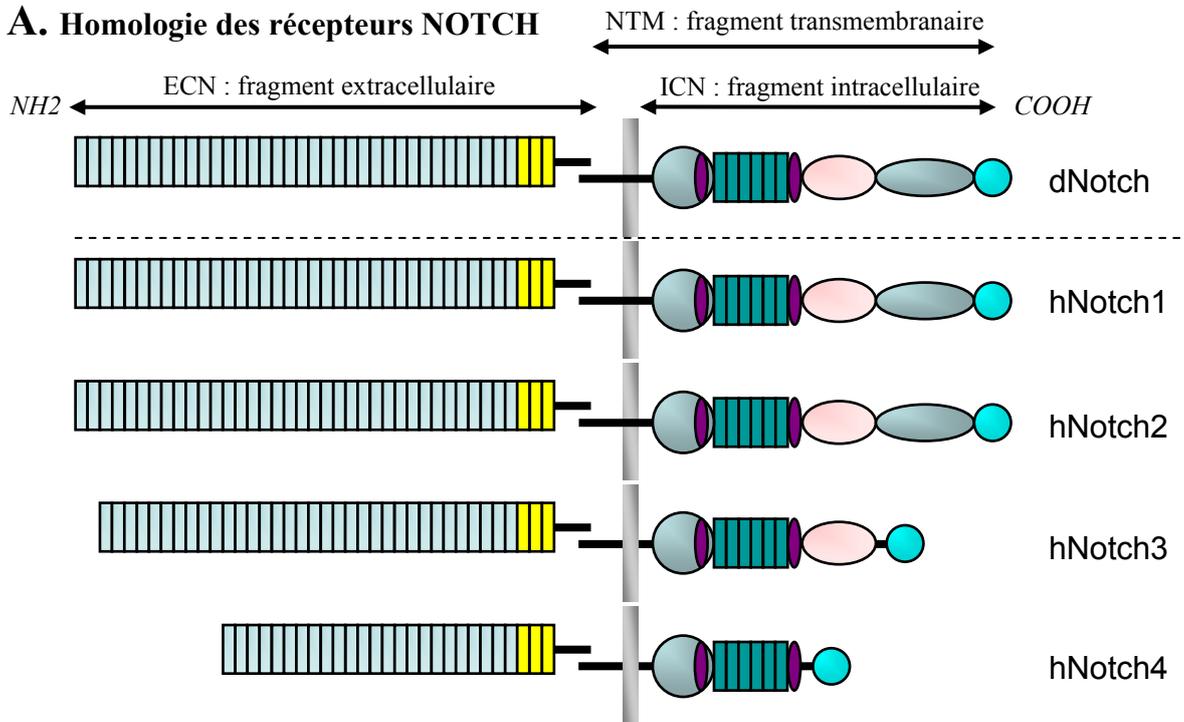
Initialement décrite chez la drosophile, la voie Notch repose sur un récepteur transmembranaire, NOTCH, activé par liaison avec un ligand également transmembranaire, DELTA, présent sur une cellule contiguë. La voie de signalisation Notch est bien conservée au cours de l'évolution et participe à la détermination cellulaire chez tous les organismes pluricellulaires étudiés jusqu'à maintenant, des nématodes aux humains (Weinmaster, 1997; Egan et al., 1998; Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

On considère généralement que la fonction Noth a pour effet de maintenir les cellules dans un état indifférencié. Dans un groupe de cellules ayant les mêmes potentialités, lorsqu'une cellule s'engage dans une voie de différenciation, elle émet des signaux qui ont pour effet de maintenir les cellules voisines dans un état indifférencié. C'est le mécanisme d'inhibition latérale (Simpson, 1990; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). La fonction Notch peut aussi induire la différenciation de certains types cellulaires comme dans le cas des astrocytes (Lundkvist et Lendahl, 2001; Morrison, 2001). Dans les deux cas la voie Notch est responsable de la diversité cellulaire au cours du développement. Il était donc logique de se poser la question de son rôle dans la génération de neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes.

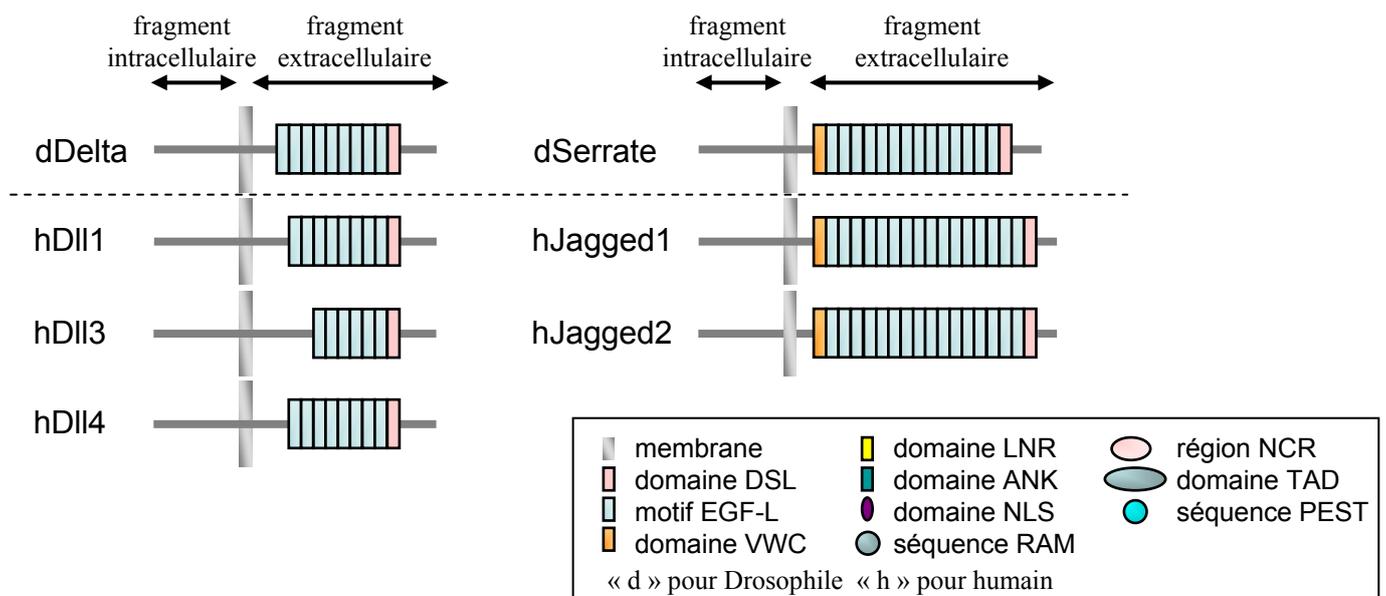
### 2.1. Structure type des récepteurs Notch

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**). Le fragment extracellulaire est constitué de motifs de type EGF (Epidermal 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**) (Wharton et al., 1985; Blaumueller et Artavanis-Tsakonas, 1997) et d'une région **PEST** (Pro-Glu-Ser-Thr) qui pourrait intervenir dans le processus de sa dégradation par ubiquitination (Greenwald, 1998; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Les récepteurs NOTCH1-2 et

### A. Homologie des récepteurs NOTCH



### B. Homologie des ligands de NOTCH



**Figure 3. 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).

NOTCH3 des mammifères ont également une région de réponse aux cytokines (**NCR**) et un domaine **TAD** (transcriptional activation domain) (Figure 2A).

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 ligand DELTA est constitué de motifs de type EGF et d'une région DSL (nommée ainsi sur la base du nom des ligands de Notch : Delta et Serrate chez la Drosophile et Lag-2 chez *C. elegans*) (Figure 2B).

Le récepteur NOTCH est synthétisé sous forme d'un précurseur de 300 kDa, qui est clivé constitutivement dans le Golgi par une furine (S1) (Figure 2A) (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998; Guidos, 2002). 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.

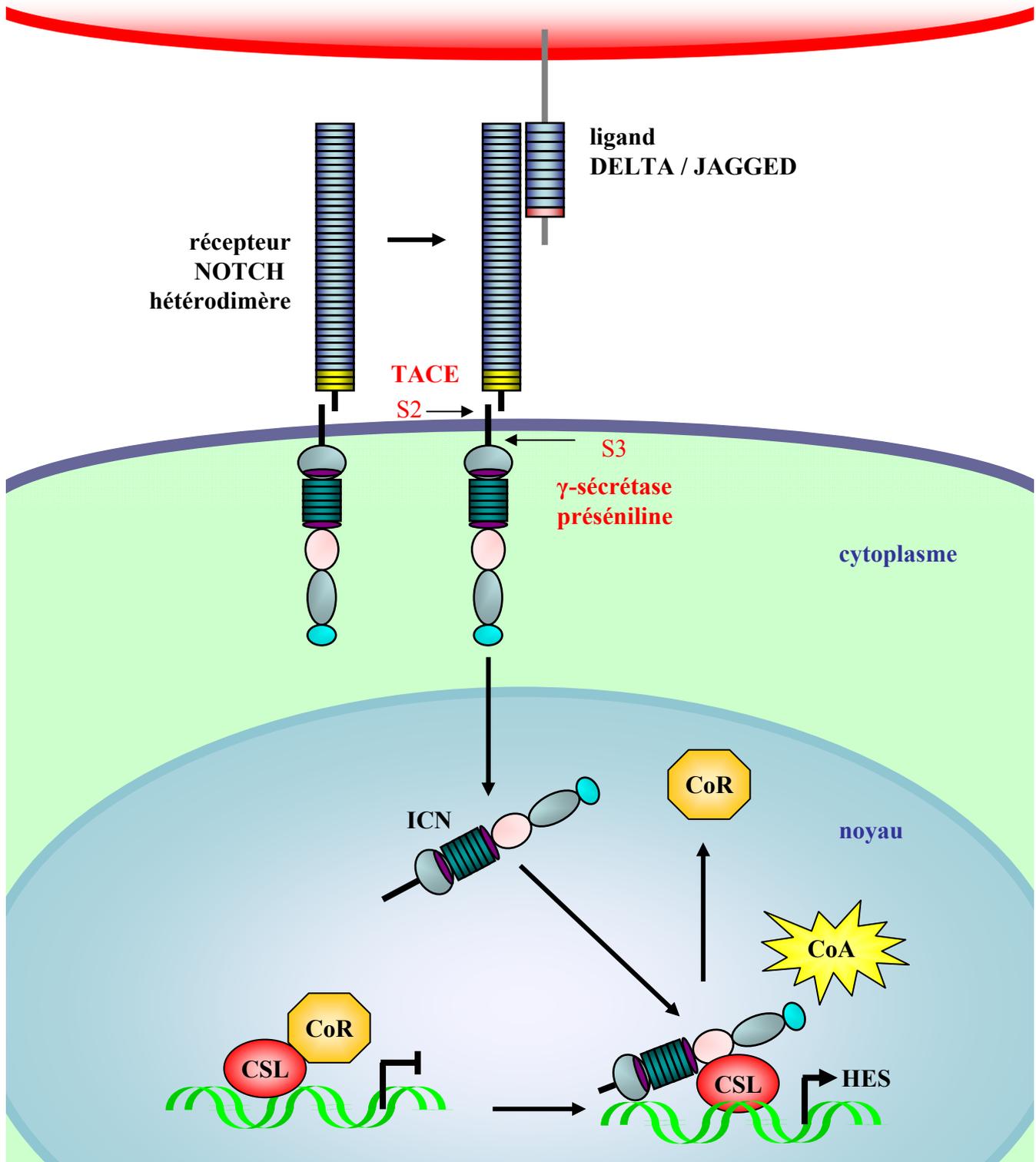
## 2.2. Structure des récepteurs et des ligands de la voie Notch

### 2.2.1. Les récepteurs Notch

La voie Notch a été bien conservée au cours de l'évolution et, de plus, elle a subi plusieurs amplifications, si bien que plusieurs orthologues ont été identifiés pour chacun de ses gènes. 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 forte variabilité. Ainsi, les récepteurs NOTCH1 -2 et -3 des mammifères ont également une région de réponse aux cytokines (**NCR**) qui régule leur activité fonctionnelle 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, une région RAM, 7 domaines ANK (Lubman et al., 2004), une région NLS et un domaine intracellulaire avec une région PEST (Egan et al., 1998). Chez *C. elegans* les récepteurs appelés LIN-12 et GLP-1 ont des structures similaires mais seulement 13 et 10 domaines de type EGF respectivement. Chez les mammifères, NOTCH1 et NOTCH2 ont 36 domaines EGF, alors que NOTCH3 et NOTCH4 en ont 34 et 24 respectivement (Figure 3A).

### 2.2.2. Les ligands de la famille Delta et Serrate

Les ligands de ces récepteurs sont également bien conservés. Chez la drosophile les ligands de Notch sont codés par les gènes *Delta* et *Serrate*. La partie extracellulaire du ligand DELTA contient un domaine DSL suivi de 9 motifs de type EGF. Chez les mammifères, 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



**Figure 4. Modèle moléculaire de l'activation de NOTCH**

La liaison du récepteur avec l'un des ligands déclenche un clivage extracellulaire (S2) assuré par la protéase TACE (tumour-necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/metalloproteïnase), membre de la famille ADAM et un deuxième clivage intracellulaire (S3) par le complexe  $\gamma$ -sécrétase. Ceci permet la libération 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 des CSL. Ainsi, Notch active la transcription des gènes cibles comme les facteurs de transcription de la famille *Hes*.

CoR : co-Répresseurs

CoA:co-Activateurs

(Adapté de Radtke et al., 2003)

quatrième ligand pour NOTCH chez les mammifères, structurellement proche des gènes de la famille DELTA, appelé PREF1 ou DELTA LIKE (Dlk) (Kaneta et al., 2000; Baladron et al., 2005). 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 troisième domaine impliqué probablement dans les processus de dimérisation (domaine de von Willebrand de type C ; VWR). Les séquences N et C 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 (Figure 3B).

Un nouveau ligand de NOTCH a été décrit, c'est la F3/CONTACTINE. Présente sur les axones, elle active la voie Notch/Deltex dans les oligodendrocytes (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 sont encore mal connus.

### 2.3. Fragment intracellulaire et transduction du signal

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 dernier clivage au site 3 (S3) (Figure 2A) est effectué par le complexe  $\gamma$ -sécrétase. Ce clivage permet la libération de l'ICN qui 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* (Chen et al., 1997; Egan et al., 1998; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). HES constitue une famille de répresseurs transcriptionnels qui régulent négativement l'expression de facteurs de transcription tissus spécifiques (Ohsako et al., 1994; Iso et al., 2003b) (Figure 4). Les expressions de *Hes1* et de *Hes5* sont favorisées par l'activation de NOTCH et empêchent la différenciation des cellules souches neurales d'embryons de souris. Les cellules progénitrices sont maintenues à l'état non différencié, et la neurogenèse ainsi que la différenciation des oligodendrocytes sont inhibées (Ohtsuka et al., 1999).

*Hes* code des protéines de type bHLH (basic helix-loop-helix) importantes dans la neurogenèse et l'hématopoïèse (Nakamura et al., 2000; Kawamata et al., 2002). Il semble que la  $\gamma$ -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 $\beta$ ), dans l'espace extracellulaire (Okochi et al., 2002).

La  $\gamma$ -sécrétase est un complexe multiprotéique du type préséniline – nicastrine – Aph – Pen2 (Fortini, 2001; De Strooper, 2003). Les présénilines (PS) constituent la partie active du complexe protéique. Ces protéines traversent plusieurs fois la membrane plasmique et les parties N- et C-terminales (NTF et CTF) contribuent à la structure du site catalytique. La nicastrine est une protéine intégrale qui se lie aussi bien à la partie NTF que sur la partie CTF des PS, et elle serait un facteur permettant de stabiliser les fragments des PS. D'autres protéines assurent l'assemblage de la forme active du complexe enzymatique. Deux autres protéines, Aph1 et Aph2, identifiées chez *C.elegans*, sont impliquées dans le phénotype de la déficience du pharynx antérieur ('Anterior Pharynx-defective Phenotpe'). Aph2 est l'homologue de la Nicastrine chez les mammifères, alors que Aph1 est similaire aux PS. Les composantes du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase et leurs principales fonctions sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Nom	<i>C. elegans</i>	Mammifères	Fonctions
<b>Présénilines</b>	HOP-1 SEL-2 (PSEN chez la Drosophile)	PS1 PS2	Sous-unité catalytique
<b>Nicastrine</b>	APH-2	Nct	Assemblage du complexe et stabilisation des PS et PEN-2
<b>APH-1</b>	APH-1 (PEN-1)	Aph1aL et AphaS Aph1b (Aph1c chez les rongeurs)	Assemblage du complexe et stabilisation des PS/Nct
<b>PEN-2</b>	PEN-2	LIN-12 GLP-1	Assemblage du complexe et implication dans le processus catalytique des PS

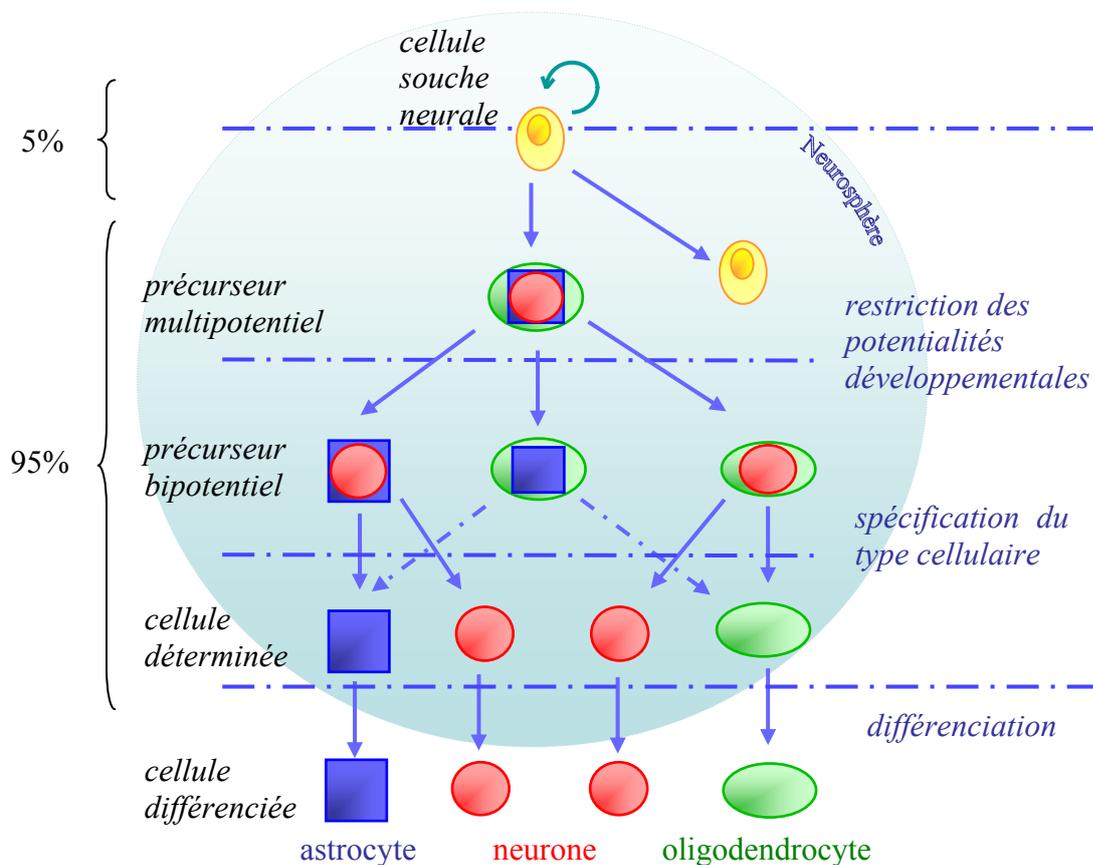
Les différents facteurs de la cascade moléculaire Notch chez la Drosophile, *C. elegans* et les mammifères sont décrits dans le tableau ci-dessous :

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



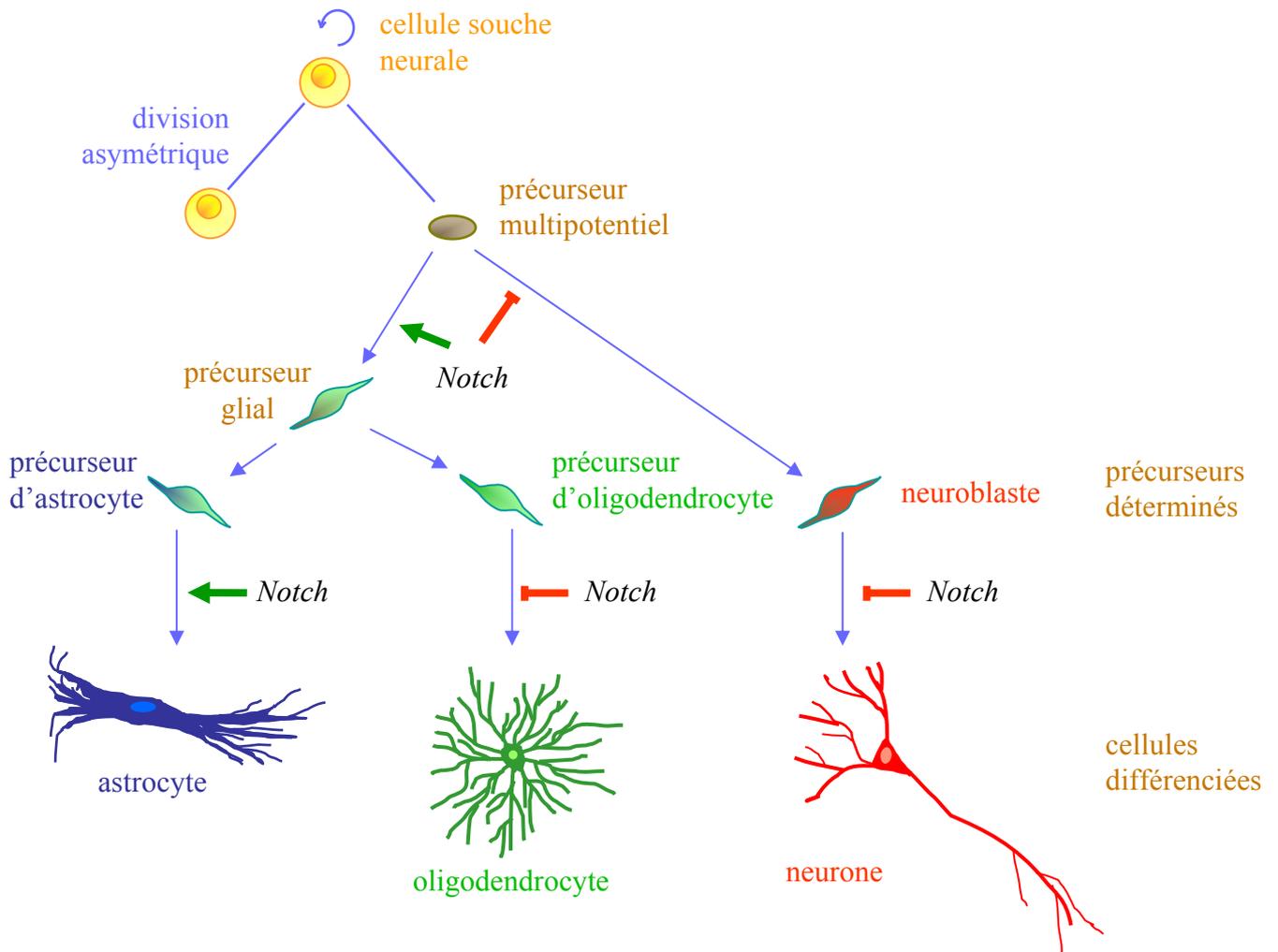
### 3. LE SYSTEME MODELE DES NEUROSPHERES ET LA VOIE NOTCH

Les neurosphères représentent la descendance clonale des cellules souches neurales. Il est possible de sélectionner les CSN et de les cultiver dans un milieu chimiquement défini, en présence d'EGF (Reynolds et Weiss, 1992) (Figure 5, 6). Dans ces conditions, les cellules souches neurales sont sélectionnées et prolifèrent pour donner naissance à des clones de cellules non différenciées flottant dans le milieu de culture : les neurosphères. Sur un substrat auquel elles adhèrent, les neurosphères se différencient en neurones, oligodendrocytes et astrocytes selon des proportions définies. Les neurosphères constituent donc un modèle d'étude du devenir des cellules souches neurales sous l'effet de signaux externes comme des molécules chimiques ou biologiques.



**Figure 6. Corrélation entre le lignage théorique des cellules souches neurales (CSN) et les neurosphères**

Les neurosphères sont constituées de CSN (environ 5%), qui résultent de la division symétrique de la CSN initiale, et des précurseurs non différenciés à différents stades de développement ; certains de ces précurseurs sont déjà engagés dans une voie de différenciation spécifique (ils sont déterminés). La différenciation proprement dite a lieu lorsque les neurosphères sont déposées sur un support auquel elles adhèrent (phase de différenciation) ; les progéniteurs déjà déterminés donnent alors naissance aux neurones, astrocytes et oligodendrocytes.



**Figure 7. Rôle de la voie Notch dans la génération des neurones et cellules gliales à partir des cellules souches dans le système des neurosphères**

Il a été montré par notre laboratoire 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)

Dans le cas de l'étude du rôle de la voie Notch dans le devenir des cellules souches neurales, il serait intéressant de disposer d'animaux transgéniques, mutants pour les gènes d'intérêt. Malheureusement, la perte de fonction de la plupart des gènes de la voie Notch s'accompagne d'une létalité précoce (avant la neurogenèse), ce qui restreint les possibilités d'utilisation des souris homozygotes mutantes (Krebs et al., 2000).

Cependant, il est possible de produire des neurosphères à partir d'embryons mutants pour les gènes de la voie Notch. Ainsi, les neurosphères constituent un système modèle de substitution qui permet d'étudier le rôle des gènes de la voie Notch dans la différenciation des cellules souches neurales en comparaison avec des neurosphères de type sauvage utilisées comme témoins.

De cette façon, en utilisant des neurosphères mutantes pour le ligand *DIII*, dans lesquelles la voie Notch est inactivée, il a été montré par notre laboratoire que la voie Notch joue un rôle dans la neurogenèse 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 (Figure 7) (Grandbarbe et al., 2003).

## 4. LA VOIE NOTCH ET LE CANCER

### 4.1. Notch proto-oncogène ou suppresseur de tumeur

Nous avons vu précédemment que la voie Notch joue un rôle dans le déterminisme cellulaire dans de nombreux tissus et qu'elle contribue au renouvellement et à la survie de cellules multipotentes pendant le développement et chez l'adulte. Elle 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 dérèglements de la voie Notch pourront entraîner des pathologies et en particulier la formation de cancers.

### 4.2. Tumeurs du système nerveux

#### 4.2.1. Notion de tumeur

Les tumeurs se caractérisent par la prolifération anormale, biologiquement autonome, d'une ou de parfois plusieurs populations cellulaires d'un tissu organisé. Cette prolifération mal contrôlée est la conséquence d'anomalies moléculaires dérégulant des mécanismes physiologiques fondamentaux que sont la prolifération, la différenciation, la sénescence et la mort cellulaire programmée (apoptose).

Les tumeurs peuvent être bénignes, dans ce cas leur croissance est lente, les cellules conservent des caractères différenciés, et elles sont en général bien délimitées. Les tumeurs malignes croissent plus rapidement, les cellules sont peu ou pas différenciées, et les tumeurs peuvent être nécrotiques, elles sont invasives et parfois métastatiques.

Deux types de tumeurs peuvent se développer dans le système nerveux: celles provenant de métastases, où celles générées par les cellules nerveuses. Ces dernières tumeurs sont classées d'après leur caractérisation morphologique, selon le type cellulaire sain correspondant et elles sont également classées selon leur gravité comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Dénomination	Gravité	Apparemment
Astrocytomes pilocytiques	+	Astrocytes
Oligodendrogliomes A	++	Oligodendrocytes
Oligodendrogliomes B	+++	Oligodendrocytes
Glioblastomes	++++	Précurseurs gliaux
Gangliogliomes	+	Astrocytes et neurones
Médulloblastomes	++++	Précurseurs de neurones granulaires du cervelet
Neuroblastomes	Grades I-IV	Neurones (périphériques)

#### 4.2.2. Les neuroblastomes périphériques

La voie Notch favorise la différenciation des astrocytes tandis qu'elle réprime la différenciation des neurones et celle des oligodendrocytes (Figure 7). Nous savons également que le degré de gravité des tumeurs est lié au degré de différenciation des cellules qui les constituent. Ainsi la régulation de la voie Notch est une cible intéressante si on considère que par cette voie, il serait possible d'induire la différenciation de certaines cellules tumorales et d'améliorer ainsi le pronostic tumoral.

Le neuroblastome est un cancer du système nerveux sympathique, relativement rare, qui affecte principalement les enfants. Le degré de différenciation des neuroblastomes a été très étudié dans le but d'élaborer une thérapie de différenciation qui consisterait à induire la différenciation des tumeurs pour stopper leur prolifération. Ce concept a fait ses preuves au niveau clinique où les dérivées de l'acide rétinoïque sont utilisées pour le traitement des neuroblastomes et de la leucémie promyélocytaire aiguë (Matthay et al., 1998; Soignet et al., 1998). Les neuroblastomes sont ainsi devenus un modèle d'étude de la thérapie contre le cancer par la différenciation.

Des lignées humaines, dérivées de telles tumeurs sont utilisées comme modèles. Il s'agit principalement de la lignée SK-N-SH (Biedler et al., 1973), obtenue à partir d'une métastase (provenant de ganglion sympathique) présente dans la moelle osseuse d'une fillette de 4 ans, et de sa lignée dérivée SHSY-5Y (Biedler et al., 1978). L'acide rétinoïque induit leur différenciation (Pahlman et al., 1984; Sidell et al., 1986). Dans le système nerveux périphérique (SNP), comme dans le SNC, la voie Notch bloque la différenciation neuronale et induit la différenciation gliale (Morrison et al., 2000). Une inhibition de la voie Notch pourrait donc réinduire la différenciation des cellules tumorales en neurones et s'inscrire dans une thérapie de différenciation. De plus, l'acide rétinoïque inhibe l'expression de Notch1 dans le système des neurosphères (Wang et al., 2004). D'une part, la surexpression de Notch1 dans ces cellules empêche l'acide rétinoïque d'agir sur la différenciation des neurosphères, ce qui montre que l'effet de l'acide rétinoïque passe par l'intermédiaire de l'inhibition de Notch1 (Franklin et al., 1999; Axelson, 2004a). D'autre part, l'inhibition directe de Notch permet une croissance des neurites (Franklin et al., 1999).

#### 4.2.3. Les neuroblastomes du système nerveux central

Les neuroblastomes du SNC, extrêmement rares, sont essentiellement de deux types : les médulloblastomes dérivés précurseurs de neurones granulaires du cervelet et présents seulement chez les enfants, et les esthésioneuroblastomes ou neuroblastomes olfactifs se développant à partir de l'épithélium olfactif dans la fosse nasale supérieure.

Il existe des tumeurs mixtes, les gangliogliomes, qui sont composées de cellules astrocytaires et de cellules neuronales. Cette mixité de populations pourrait suggérer que ces tumeurs proviennent de précurseurs multipotentiels.

Il y a aussi des neuroblastomes simples, trouvés dans le cerveau. Seuls quelques cas ont été décrits (White et al., 2002; Yaris et al., 2004). Ils sont considérés comme provenant du tube neural. On les trouve surtout chez le jeune enfant.

Un modèle de neuroblastome central est fourni par la lignée de rat B104 qui a été obtenue par mutagenèse à la méthyl nitrosourée (Schubert et al., 1974). Ces cellules n'ont pas été très étudiées du point de vue de leur différenciation.

#### 4.2.4. Les oligodendrogliomes

La fréquence des oligodendrogliomes a longtemps été sous-estimée. La présence d'une néovascularisation représente l'élément clé de l'évolutivité et du pronostic de ces tumeurs gliales. Le grade A (77%) se caractérise par l'absence de néovascularisation. Le grade B (23%) ou anaplasique se caractérise par l'existence d'une néoangiogenèse, son ablation doit être suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie.

La lignée de cellules TC620 obtenue à partir d'un oligodendrogliome humain (Manuelidis, 1965; Manuelidis et al., 1977) est utilisée comme modèle. Ces cellules expriment la CNP (2', 3'-cyclic nucléotide phosphodiesterase, marqueur précoce des oligodendrocytes) et la vimentine (marqueur de précurseurs gliaux) mais pas la MAG (myelin-associated glycoprotein, marqueur tardif des oligodendrocytes), ce qui indique qu'elles correspondent à des oligodendrocytes immatures (Kashima et al., 1993).

#### 4.2.5. Les astrocytomes

Les astrocytomes pilocytiques s'observent surtout au niveau du cervelet, des voies optiques et de la partie antérieure du plancher du IIIème ventricule, plus rarement au niveau du tronc cérébral ou des hémisphères cérébraux. Ils sont habituellement bien délimités. On n'observe en pratique jamais de dégénérescence maligne secondaire; au contraire, des cas de régression spontanée ont été observés au niveau des voies optiques, et le potentiel de croissance de ces tumeurs est extrêmement variable. Ce sont les seules tumeurs cérébrales dont on peut vraiment guérir.

La lignée U373 (Ponten et Macintyre, 1968; Lachman et al., 1987) que nous avons utilisée comme modèle d'astrocytome provient d'un homme âgé de 61 ans. Elle n'a pas été caractérisée de façon approfondie.

#### 4.2.6. Les glioblastomes

Les glioblastomes multiformes sont la forme tumorale la plus fréquente et la plus maligne du système nerveux chez l'homme, ils représentent 20% du nombre total des tumeurs. La survie des patients est très faible et n'excède que rarement une année. Les glioblastomes sont des cancers très expansifs et agressifs qui résistent le plus souvent aux traitements conventionnels.

La lignée de cellules C6, obtenue à partir d'une tumeur cérébrale de rat induite par la méthyl nitrosourée (Benda et al., 1968) est utilisée comme modèle de glioblastome. Une délétion inactive le gène p16/ink4a dans ces cellules (Schlegel et al., 1999), altération retrouvée dans de nombreux glioblastomes humains.

### **4.3. Cancers associés à des altérations de la voie Notch**

Le rôle de la voie Notch dans la différenciation des cellules nerveuses saines n'est pas le seul élément qui renforce l'hypothèse selon laquelle cette voie serait une cible intéressante pour le traitement contre le cancer. La suractivation ou l'inhibition anormale de la voie Notch sont également impliquées dans différents types de cancers.

#### 4.3.1. Formes tronquées de Notch

Chez l'homme, 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 telles formes de récepteurs aboutit à une transformation des cellules. Ainsi, chez la souris, l'expression excessive d'ICN2 ou d'ICN3 (intracellular Notch2, 3) (Bellavia et al., 2000) provoque des lymphomes, 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).

#### 4.3.2. Surexpression d'éléments de la voie Notch

Des 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).

#### 4.3.3. Sous-expression d'éléments de la voie Notch

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 HPV-positifs dans

lesquels NOTCH1 est sous-exprimé et où sa surexpression induit un arrêt de la prolifération (Talora et al., 2005).

#### 4.4.4. Thérapies possibles

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 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 pour l'instant 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 cancer liés à un dérèglement de la fonction Notch chez l'Homme ainsi que les thérapies potentielles sont résumés dans le tableau ci-dessous :

<b>Dérèglements de la voie Notch et cancers chez l'Homme</b>		
<b>Mécanisme moléculaire</b>	<b>Exemple possible des tumeurs</b>	<b>Thérapies potentielles</b>
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

# Chapitre 1

---

Interactions des voies Notch et STAT3  
dans le déterminisme neurones / cellules  
gliales à partir des cellules souches neurales

---

---

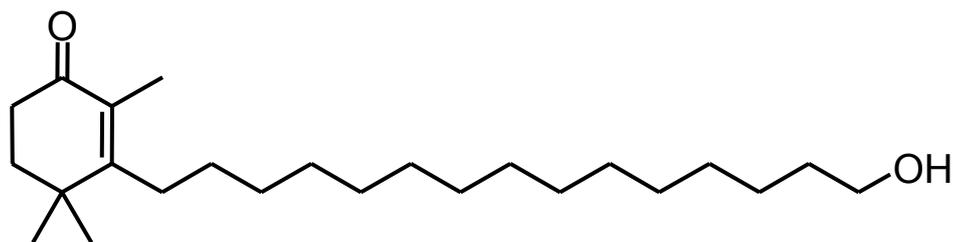
## **1. INTERACTIONS DES VOIES NOTCH ET STAT3 DANS LE DÉTERMINISME NEURONES/CELLULES GLIALES À PARTIR DES CELLULES SOUCHES NEURALES**

---

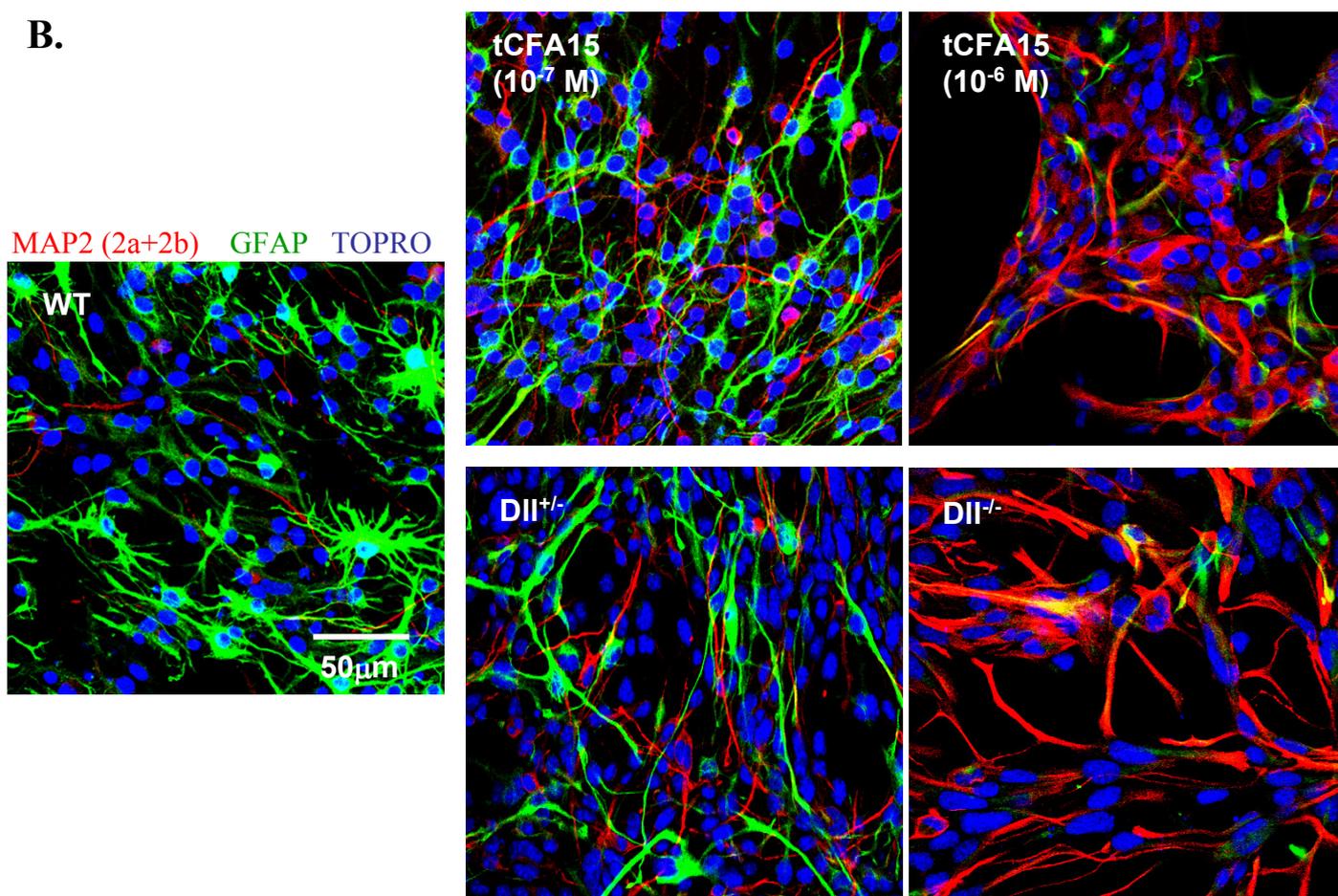
Notre équipe étudie le rôle de la voie Notch dans la différenciation des neurones et des cellules gliales à partir des cellules souches neurales. Lorsque je suis arrivée au laboratoire, Julien Bouissac et Luc Grandbarbe avaient abordé cette thématique dans le système modèle des neurosphères qui représente la descendance clonale de cellules souches neurales (CSN) (Anderson, 2001). En utilisant des neurosphères produites à partir d'embryons murins mutants pour le gène codant un des ligands du récepteur NOTCH, DELTA-LIKE-1 (Dll1), dont ils avaient étudié la différenciation en comparaison avec celle de neurosphères issues d'embryons de type sauvage, ils ont pu montrer que la voie Notch agissait à deux niveaux. Dans une première étape, la voie Notch agit sur le déterminisme neurones/cellules gliales en favorisant le lignage glial aux dépens du lignage neuronal; dans une seconde étape, la voie Notch agit sur la différenciation proprement dite en favorisant la différenciation des astrocytes tandis qu'elle réprime celle des neurones et des oligodendrocytes (Grandbarbe et al., 2003). Parallèlement à cette étude, et dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR 7123 (Strasbourg, CNRS - Université Louis Pasteur), notre équipe a testé des petites molécules non peptidiques pour leur capacité éventuelle à influencer la production de neurones/cellules gliales à partir de cellules souches neurales. Le système des neurosphères se prête particulièrement bien à cette analyse, puisqu'il permet de caractériser les effets qualitatifs et quantitatifs d'un produit sur la production de neurones et de cellules gliales, par simple analyse immunocytoologique.

Les molécules testées sont dérivées de molécules extraites de plantes médicinales chinoises. Pour certaines d'entre elles, des effets biologiques ont déjà été démontrés. Par exemple, le n-hexacosanol, un alcool gras à longue chaîne de carbone (N=26), possède des propriétés neurotrophiques, favorisant la survie neuronale ainsi que la croissance neuritique (Borg et al., 1987). Une autre molécule, la 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexène-1-one (tCFA15) (Girlanda-Junges et al., 2000) (Figure 8A) possède également des propriétés neurotrophiques (Gonzalez de Aguilar et al., 2001), qui s'exercent même en présence d'inhibiteurs de la croissance neuritique (Hanbali et al., 2004). Des études préliminaires ont suggéré que cette dernière molécule avait aussi un effet sur le déterminisme neurones/cellules gliales dans les neurosphères. Nous avons donc poursuivi l'étude des effets de cette molécule, le

**A.** 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexène-1-one (tCFA15)



**B.**



**Figure 8. Effets du tCFA15 sur la différenciation des neurosphères; comparaison avec le phénotype de neurosphères hétérozygotes et homozygotes mutantes pour le gène *Dll1***

(A) Structure de la 2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxypentadécyl)-2-cyclohexène-1-one (tCFA15) (PM 364).

(B) Le tCFA15 agit sur la différenciation des neurosphères en augmentant la proportion de neurones aux dépens des astrocytes. Après 3 jours de traitement au tCFA15 durant la phase de différenciation, on observe une augmentation des cellules MAP(2a+2b)-positives (en rouge, neurones), et une diminution des cellules GFAP-positives (en vert, astrocytes). Les noyaux sont en bleu (TOPRO).

Le phénotype des neurosphères sauvages après traitement au tCFA15 à 10<sup>-7</sup> M est proche du phénotype des neurosphères hétérozygotes pour le gène *Dll1* et à 10<sup>-6</sup> M le phénotype des neurosphères sauvages se rapproche de celui des neurosphères mutantes pour le gène *Dll1*.

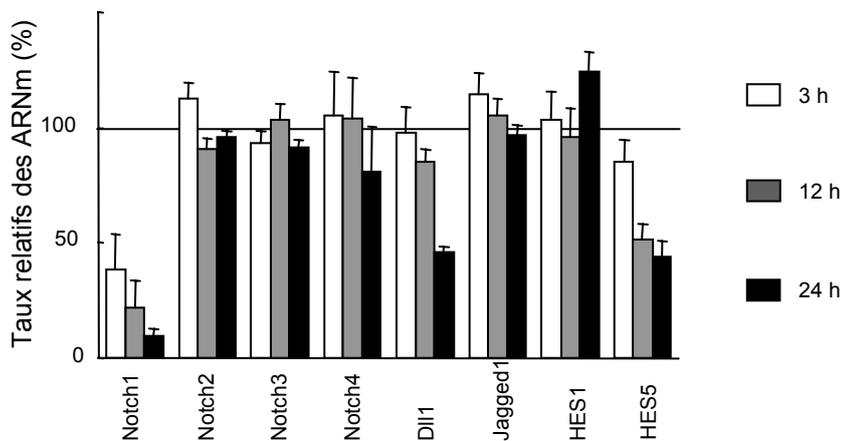
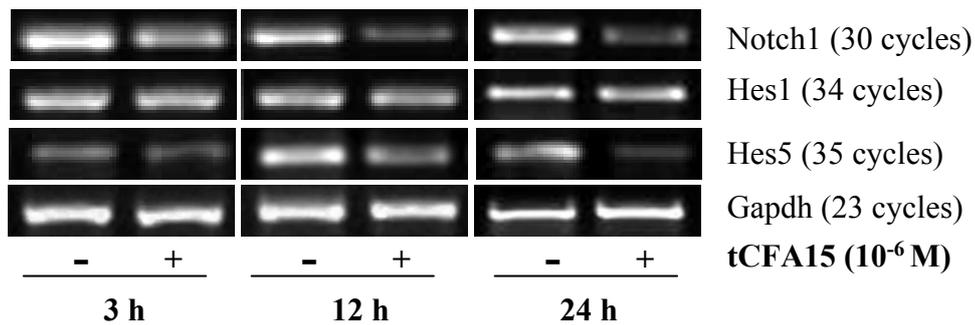
tCFA15, et nous avons montré qu'il augmentait la production des neurones et diminuait celle des astrocytes et des oligodendrocytes, selon des modalités suggérant l'implication de la voie Notch (Figure 8B).

Mon travail a consisté à étudier les effets moléculaires du tCFA15 sur des gènes clés de la voie Notch. Ce travail a montré que le tCFA15 provoque une diminution spécifique de l'expression du gène *Notch1*. Ce résultat nous a conduit à étudier les mécanismes de régulation du gène *Notch1* et nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un lien entre les voies de signalisation Notch et STAT.

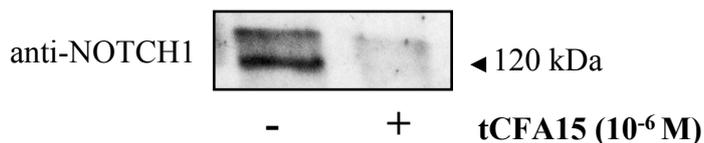
L'ensemble de ce travail est en cours de publication (Publication 1).

### A. Taux relatifs des ARNm (RT PCR)

Neurosphères (3 jours de prolifération)



### B. Taux des protéines (Western Blot)



#### Figure 9. Effets du tCFA15 sur l'expression des gènes de la voie Notch dans les neurosphères

Nous avons analysé l'effet du tCFA15 sur l'expression de gènes de la voie Notch dans des neurosphères qui ont proliféré durant 3 jours. Les ARN totaux ont été extraits 3 h, 12 h ou 24 h après traitement au tCFA15.

(A) Le taux d'expression des gènes de la voie Notch a été analysé par RT-PCR semi-quantitative. 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). (n = 3 expériences indépendantes)

Le tCFA15 (10<sup>-6</sup> M), dès 3 heures de traitement, diminue spécifiquement l'expression de *Notch1* à 38% de son niveau dans les neurosphères non traitées (100%). Après 24 h de traitement, le taux d'expression de *Notch1* chute à 9%. Nous observons également une chute de l'expression de *Hes5* à 52%, mais seulement à partir de 12 heures.

(B) Analyse du taux de la protéine NOTCH1 par Western Blot. On observe, après 24 h de traitement au tCFA15 (10<sup>-6</sup> M), une diminution de NOTCH1. 30 µg de protéines ont été déposés par puits. Les deux bandes correspondent respectivement au fragment transmembranaire (140 kDa) et au fragment intracellulaire (120 kDa) de NOTCH1.

## 1.1. LES EFFETS DU tCFA15 SUR LA DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES NEURALES PASSENT PAR NOTCH1

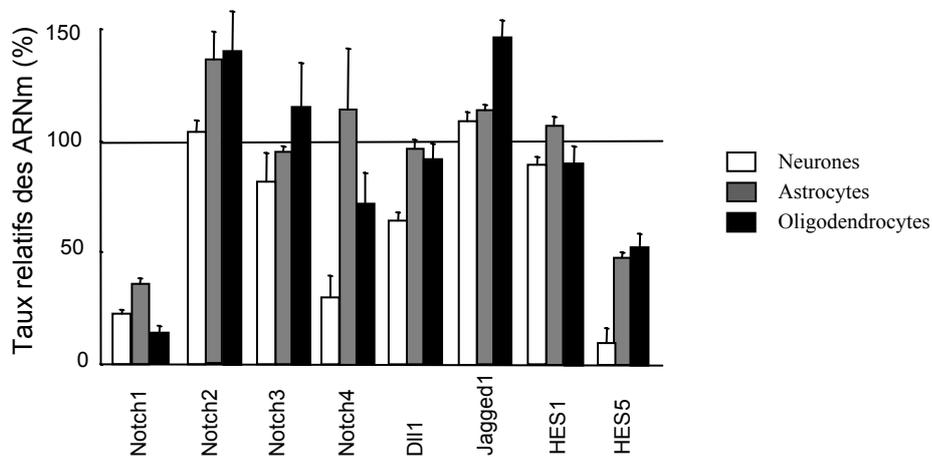
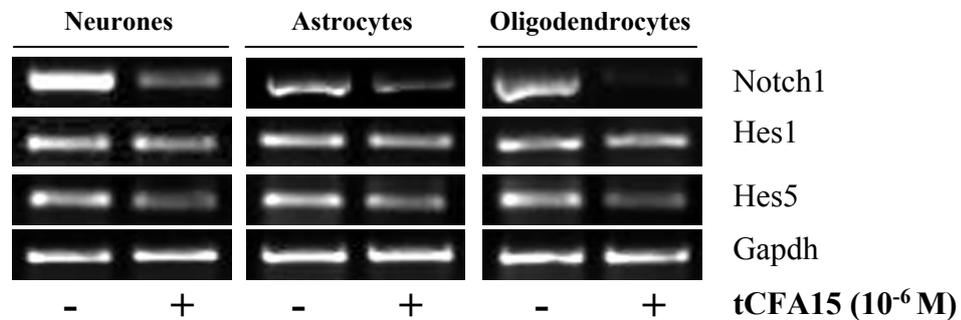
### 1.1.1. Le tCFA15 agit sur la différenciation des cellules souches neurales en augmentant la proportion de neurones au dépens des astrocytes

Nous avons montré que le tCFA15 agit sur le déterminisme des neurosphères en augmentant la proportion de neurones au dépens des astrocytes. Ainsi, le phénotype des neurosphères sauvages après traitement au tCFA15 à  $10^{-7}$  M est proche du phénotype des neurosphères hétérozygotes pour le gène *Dll1*<sup>+/-</sup>, et à  $10^{-6}$  M de tCFA15, il se rapproche de celui des neurosphères homozygotes pour le gène *Dll1*<sup>-/-</sup>, dans lesquelles la voie Notch est inactivée (Figure 8B). Par ailleurs, comme nous l'avons vu plus haut, le tCFA15 a été décrit comme activateur de la croissance neuritique (Gonzalez de Aguilar et al., 2001; Hanbali et al., 2004) alors que Notch1 est connu pour inhiber la croissance neuritique (Berezovska et al., 1999; Sestan et al., 1999; Levy et al., 2002). L'ensemble de ces observations nous a conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle le tCFA15 pourrait agir par l'intermédiaire de la voie Notch.

### 1.1.2. Le tCFA15 diminue l'expression de *Notch1*

Pour tester si le tCFA15 agit sur la voie Notch, nous avons examiné l'expression de gènes clés de la voie Notch par RT-PCR semi-quantitative, dans des neurosphères traitées ou non par le tCFA15 (Figure 9A). Nous avons observé que le tCFA15 ( $10^{-6}$  M), dès 3 heures de traitement, diminue spécifiquement l'expression de *Notch1* à 38% de son niveau d'expression dans les neurosphères non traitées (100%). Après 24 heures de traitement au tCFA15, le taux d'expression de *Notch1* chute à 9%. En revanche, les gènes *Notch* (-2, -3 et -4) ne sont pas affectés, pas plus que les gènes des ligands *Jagged* et *Delta*. Nous observons également une chute de l'expression de *Hes5* à 52%, à partir de 12 heures de traitement. Nous avons confirmé par Western Blot que la diminution de l'expression du gène *Notch1* se manifestait aussi au niveau protéique (Figure 9B). Ces observations suggèrent que les effets du tCFA15 sur la différenciation des neurosphères passent par la voie Notch et plus précisément par *Notch1* dont il diminue l'expression.

Nous avons montré que des oligonucléotides antisens dirigés contre *Notch1* (Austin et al., 1995; Faux et al., 2001) augmentent la proportion des neurones aux dépens des astrocytes, de façon analogue au traitement au tCFA15, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle le tCFA15 exerce son effet sur les neurosphères par l'intermédiaire de Notch1.



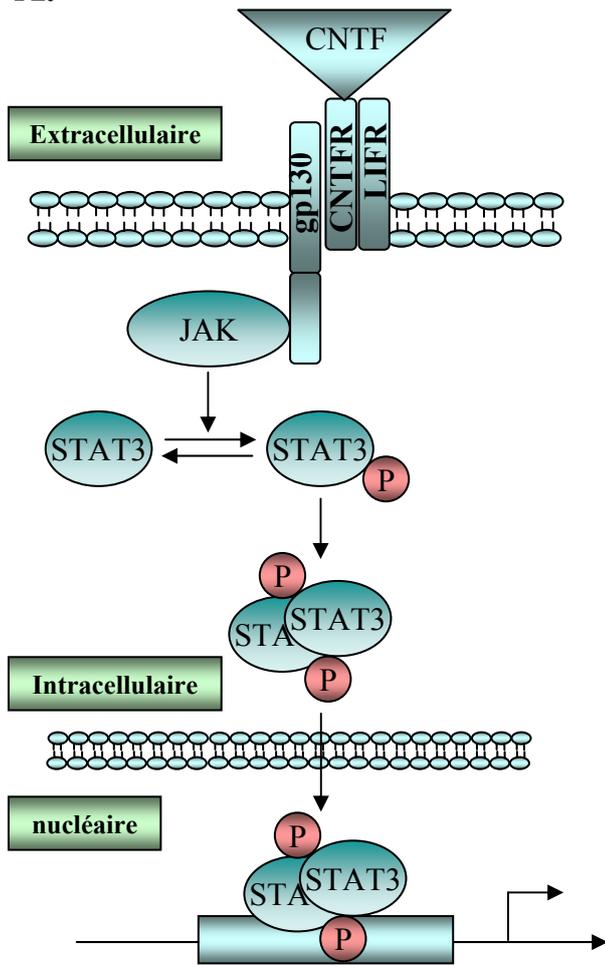
**Figure 10. Effets du tCFA15 sur l'expression des gènes de la voie Notch dans des cultures primaires de neurones, astrocytes et oligodendrocytes**

Nous avons analysé l'effet du tCFA15 sur l'expression de gènes de la voie Notch dans des cultures primaires de neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Les cellules ont été traitées au tCFA15 ( $10^{-6}$  M) 24 h avant extraction des ARN totaux. Le taux d'expression des gènes de la voie Notch a été analysé par RT-PCR semi-quantitative et représenté comme dans la Figure 9. (n = 3 expériences indépendantes pour chaque type de cultures primaires)

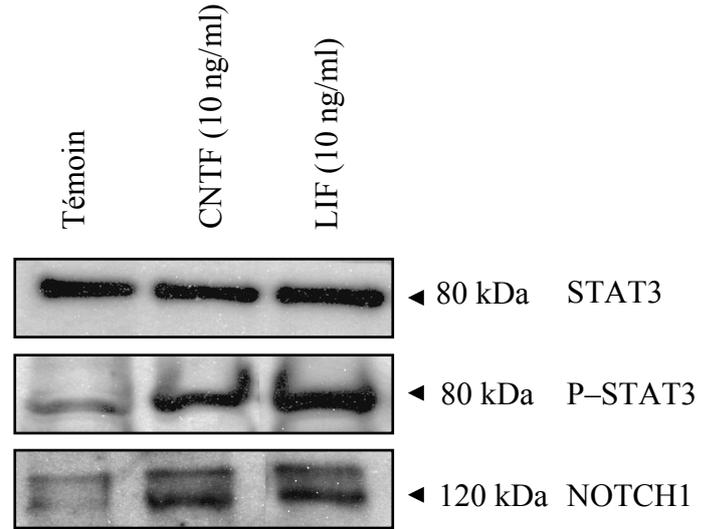
Après traitement au tCFA15 ( $10^{-6}$  M), l'expression de *Notch1* chute à 23% dans les neurones, à 36% dans les astrocytes et à 14% dans les oligodendrocytes. Dans les mêmes conditions, on observe une chute du taux d'expression de *Hes5* dans les neurones (à 10%), dans les astrocytes (à 48%) et dans les oligodendrocytes (à 53%).

Les neurosphères sont des structures hétérogènes constituées de CSN (environ 5%) et d'une majorité de cellules dérivées des CSN, engagées dans les lignages neuronaux et gliaux à différents degrés du développement. Nous nous sommes demandés si les effets du tCFA15 que l'on a déterminés ci-dessus s'appliquaient à tous les types cellulaires des neurosphères. Pour le tester nous avons analysé les effets du tCFA15 sur l'expression de gènes de la voie Notch dans des cultures primaires de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes. Nous avons constaté (Figure 10) qu'après traitement au tCFA15 ( $10^{-6}$  M), l'expression de *Notch1* chute à 23% dans les neurones, à 36% dans les astrocytes et à 14% dans les oligodendrocytes. Dans ces conditions, nous avons également observé une chute du taux d'expression de *Hes5* dans les neurones (à 10%), dans les astrocytes (à 48%) et dans les oligodendrocytes (à 53%), alors que l'expression des autres gènes analysés ne varie pas. *Notch1* et *Hes5* sont donc les seuls gènes dont le niveau d'ARNm varie dans les trois types cellulaires analysés, avec cependant quelques variations quantitatives minimales. Ceci indique que l'effet du tCFA15 est général, au moins pour les cellules du système nerveux central, mais que son efficacité dépend de facteurs spécifiques à chaque type cellulaire.

**A.**



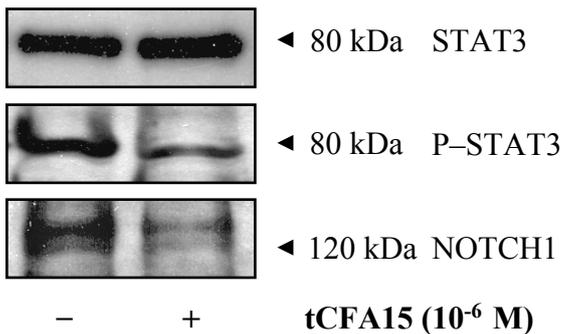
**B. Western Blot**



**Figure 11. Effets du CNTF et du LIF sur STAT3 et sur Notch1 dans les neurosphères**

**(A)** Schéma montrant l'activation de la voie JAK/STAT par le CNTF. 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. STAT3 est phosphorylé et forme des homodimères qui, après translocation dans le noyau, exercent un rôle de régulateur de la transcription de certains gènes.

**(B)** Western-Blot. Les neurosphères ont été traitées au CNTF (10 ng/ml) ou au LIF (10 ng/ml). Les cellules ont été récoltées après 30 minutes de traitement pour analyser le taux de STAT3 et de sa forme phosphorylée, et après 72 heures pour analyser le taux de la protéine NOTCH1. 30 µg de protéines ont été déposés par puits. On constate que le taux de STAT3 ne change pas mais que sa phosphorylation augmente, ainsi que le taux de NOTCH1.



**Figure 12. Effets du tCFA15 sur le taux de NOTCH1 et sur la phosphorylation de STAT3**

Western Blot. Les neurosphères ont été traitées dans les mêmes conditions que dans la Figure 11B. Le tCFA15 (10<sup>-6</sup> M) induit une diminution de la phosphorylation de STAT3 (Tyr 705) alors que le niveau d'expression de STAT3 non phosphorylé reste constant. Dans les mêmes conditions expérimentales, le taux de la protéine NOTCH1 diminue également.

## 1.2. STAT3 REGULE L'EXPRESSION DE *NOTCH1*

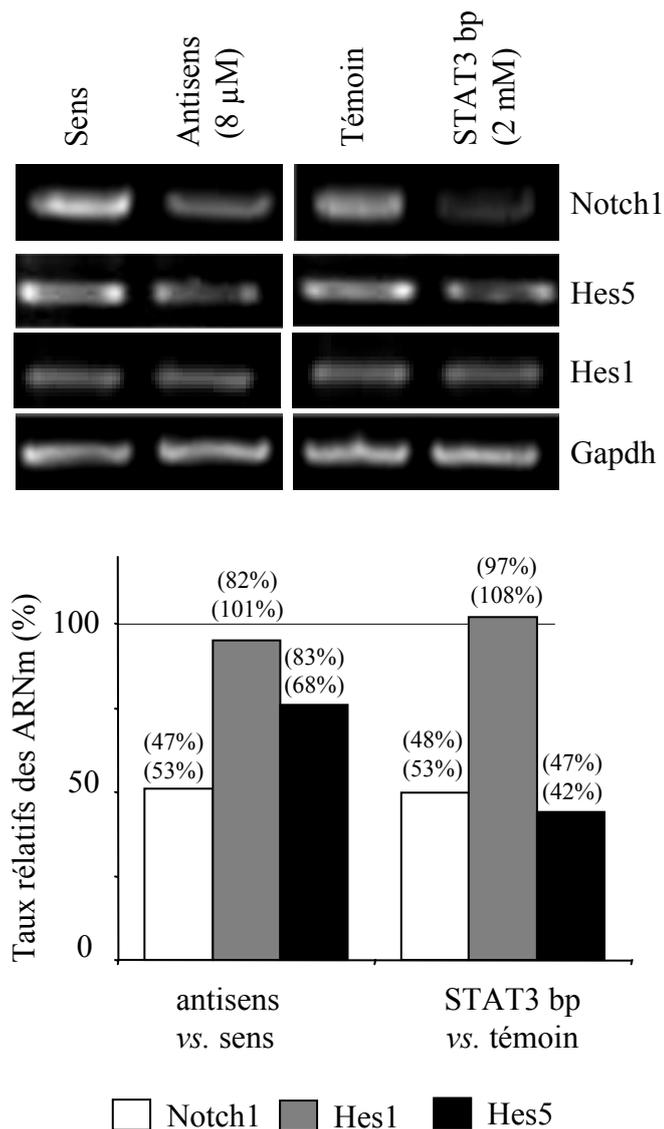
### 1.2.1. Le tCFA15 diminue la phosphorylation de STAT3

Dans le but de comprendre le mécanisme d'action du tCFA15, nous avons entrepris d'analyser son action éventuelle sur les facteurs qui contrôlent l'expression de *Notch1*. Cet aspect de l'expression des gènes codant les récepteurs NOTCH est peu connu, l'essentiel des travaux portant sur les mécanismes en aval de l'activation des récepteurs NOTCH. Néanmoins, deux facteurs de croissance, le CNTF (ciliary neurotrophic factor) et le LIF (leukemia inhibitory factor) ont été décrits pour favoriser le renouvellement des cellules précurseurs (Shimazaki et al., 2001). Cette action passe par Notch1 (Chojnacki et al., 2003). Or le CNTF et le LIF activent la voie JAK/STAT (Janus kinases/signal transducers and activators of transcription) en induisant la phosphorylation de STAT3. Le STAT3 phosphorylé (P-STAT3) forme des homodimères et, après transport dans le noyau, il exerce sa fonction de facteur de transcription (Figure 11A). Lorsque les neurosphères sont traitées avec du CNTF (10 ng/ml) ou du LIF (10 ng/ml), la phosphorylation de STAT3 (Tyr 705) augmente, ce qui montre que l'effet du CNTF et du LIF sur la phosphorylation de STAT3 a bien lieu dans le système des neurosphères. L'augmentation de la phosphorylation de STAT3 s'accompagne d'une augmentation du taux de la protéine NOTCH1 (Figure 11B).

Nous avons donc testé l'effet du tCFA15 sur l'expression et la phosphorylation de STAT3. Nous avons observé qu'après traitement au tCFA15 ( $10^{-6}$  M), la phosphorylation de STAT3 (Tyr 705), détectée à l'aide d'un anticorps spécifique anti-P-STAT3, diminue fortement alors que le niveau d'expression de STAT3 non phosphorylé reste constant. Dans les mêmes conditions expérimentales, la protéine NOTCH1 diminue également (Figure 12). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'effet du tCFA15 passe par la voie JAK/STAT.

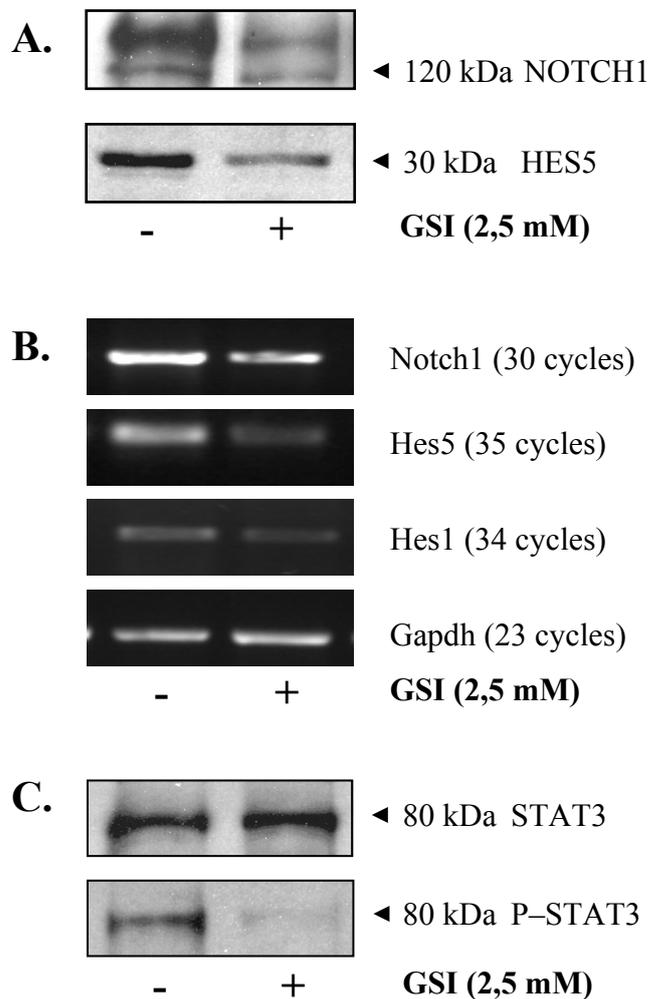
### 1.2.2. La transcription de *Notch1* est régulée par STAT3

Nous avons établi que le tCFA15 inhibe l'expression de *Notch1* et la phosphorylation de STAT3. Cela suggère l'existence d'un lien fonctionnel entre STAT3 et Notch1. Afin de tester directement cette hypothèse nous avons inhibé l'expression de *Stat3* par des oligonucléotides antisens (adapté de (Konnikova et al., 2003)) et nous avons également inactivé STAT3 par un peptide bloquant spécifiquement la dimérisation de P-STAT3 (PpYLKTK) appelé STAT3 bp (Rojas et al., 1998; Turkson et al., 2001). Dans les deux cas, l'inhibition de STAT3 a induit une diminution de l'expression de *Notch1*, ainsi que de celle de *Hes5*. Les autres gènes de la voie



**Figure 13. Effets des inhibiteurs de STAT3 sur les expressions de *Notch1*, *Hes1* et *Hes5***

Des neurosphères ont proliféré durant 3 jours en présence d'oligonucléotides antisens (8  $\mu$ M) bloquant l'expression de STAT3 ou en présence du peptide PpYLKTK (STAT3 bp) (2 mM) bloquant la dimérisation de P-STAT3. Les ARN totaux ont été analysés par RT-PCR semi-quantitative (n=2 expériences indépendantes). L'inhibition de STAT3 par des oligonucléotides antisens induit une chute de l'expression de *Notch1* (50%), ainsi que de celle de *Hes5* (75%). De même, l'inactivation de STAT3 par STAT3 bp induit un chute de l'expression de *Notch1* (50%), ainsi que de celle de *Hes5* (44%).



**Figure 14. Effets de l'inhibition de Notch1 par le GSI**

Nous avons examiné l'effet du GSI (inhibiteur de  $\gamma$ -sécrétase de type XII) sur l'expression des gènes de la voie Notch. Les neurosphères ont proliféré pendant 3 jours en présence de GSI (2,5 mM) avant extraction des ARN totaux et des protéines.

(A) Le GSI induit une diminution des protéines NOTCH1 et HES5.

(B) Le GSI induit une diminution des ARNm de *Notch1*, de *Hes5* ainsi que de celui de *Hes1*.

(C) Le GSI induit une diminution de la phosphorylation de STAT3.

Notch restant inchangés (Figure 13). Ces résultats montrent que STAT3 régule l'expression de *Notch1*.

### **1.2.3. Autorégulation de l'expression de *Notch1***

Récemment, il a été décrit que l'activation de Notch1 active STAT3 par le biais de la formation d'un complexe JAK/HES plus actif que JAK seul pour phosphoryler STAT3 (Kamakura et al., 2004). Si tel est le cas, on pourrait supposer qu'il existe une boucle de régulation de Notch1. Ainsi, l'activation de Notch1 entraînerait celle de STAT3 qui, d'après nos résultats, induit l'expression de *Notch1*, ce qui aurait pour résultat l'autorégulation positive de Notch1. Pour tester cette hypothèse nous avons réalisé deux types d'expériences. Le premier a consisté à inhiber NOTCH1 et à analyser les effets de cette inhibition sur la phosphorylation de STAT3 et sur la transcription de *Notch1*. Le second, à l'inverse, a consisté à activer NOTCH1 pour tester si dans ces conditions STAT3 était activé et Notch1 surexprimé.

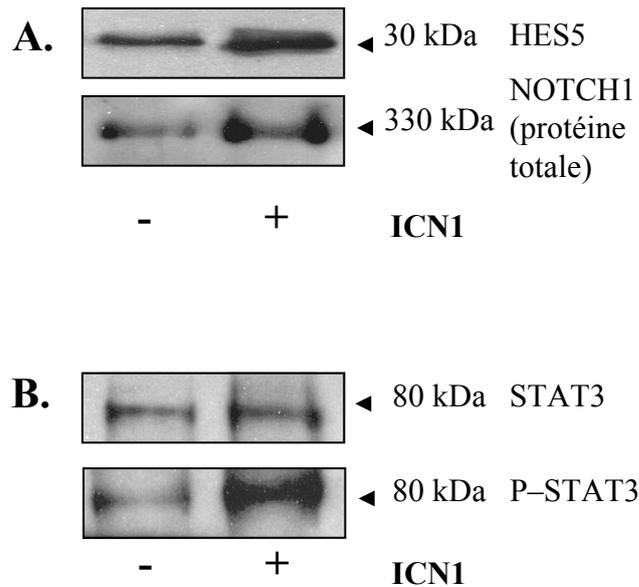
#### 1.2.3.1. Effets de l'Inhibition de NOTCH1

Nous avons inhibé NOTCH1 avec le GSI, un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase de classe XII. Le GSI empêche le clivage du récepteur NOTCH1 et par conséquent bloque la libération du fragment intracellulaire ICN1 qui transmet l'information (Weijzen et al., 2002). Nous avons vérifié par Western Blot que le GSI entraîne bien une diminution de l'ICN1. De plus, nous avons montré que le GSI induit une diminution de la protéine HES5, ce qui confirme la diminution fonctionnelle de NOTCH1 (Figure 14A).

Ensuite nous avons analysé par RT-PCR semi-quantitative les conséquences de cette inactivation de NOTCH1 sur l'expression de *Notch1* et de *Hes5*. Nous avons observé une diminution du taux d'expression des gènes *Notch1* et de *Hes5* après traitement au GSI (Figure 14B). Cette observation nous permet de conclure que l'inhibition de NOTCH1 se traduit par une diminution de son expression. Sous l'effet du GSI, nous avons également observé une diminution de la phosphorylation de STAT3 (Figure 14C).

Ces résultats suggèrent que l'inactivation du récepteur NOTCH1 induit une diminution de son taux d'ARNm via une inactivation de STAT3.

Le GSI induit également une chute de l'expression de *Hes1* (Figure 14B). Rappelons que cette diminution n'apparaît pas lors de l'inactivation de Notch1 par le tCFA15. Ceci indique que la modulation des effets de Notch1 par le tCFA15 et par le GSI n'induit pas des effets strictement identiques. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ces mécanismes.



**Figure 15. Western blot. Effets de l'activation de Notch1 sur STAT3**

Des neurosphères (trois jours de prolifération) ont été transfectées avec de le fragment intracellulaire du récepteur NOTCH1 (ICN1) humain.

**(A)** Après transfection avec l'ICN1, nous avons observé une augmentation de HES5, preuve que la voie Notch a bien été activée.

**(B)** La transfection avec l'ICN1 induit la phosphorylation de STAT3.

### 1.2.3.2. Effets de l'activation de NOTCH1

Nous avons activé la voie Notch en transfectant les neurosphères avec un plasmide codant le fragment intracellulaire NOTCH1 (ICN1) (Aster et al., 1997). Nous avons étudié les effets de la transfection sur l'expression de HES5, sur la phosphorylation de STAT3 et sur l'expression de la protéine endogène NOTCH1.

Après transfection avec l'ICN1, nous avons observé une augmentation de HES5, preuve que la voie Notch est activée (Figure 15A). Puis nous avons trouvé une augmentation de la phosphorylation de STAT3 (Figure 15B). Enfin, nous avons analysé l'expression protéique de NOTCH1. Afin d'éviter toute contamination par la protéine exogène (ICN1) nous avons étudié l'expression du récepteur NOTCH1 entier (330 kDa) par Western Blot et nous avons observé qu'elle augmentait après activation par l'ICN1 (Figure 15A).

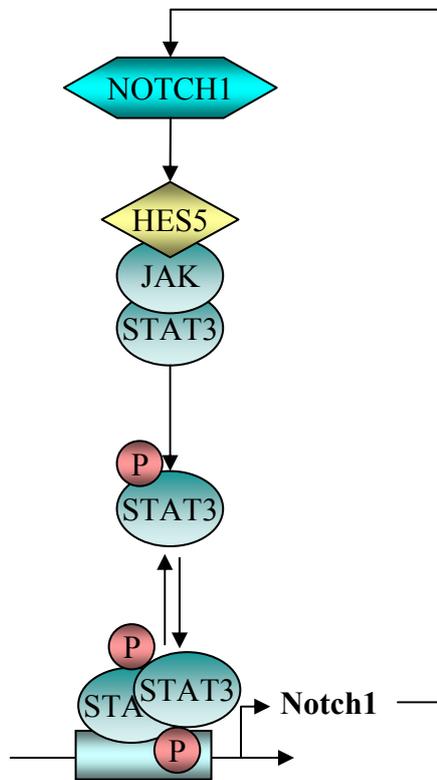
### **1.2.4. Conclusion**

Les résultats présentés dans ce chapitre apportent des informations sur les effets de la molécule tCFA15, sur le déterminisme et la différenciation des cellules du SNC, sur le mécanisme d'action de cette molécule, sur l'existence d'une connexion entre les voies STAT3 et Notch1 et en conséquence, sur l'existence potentielle d'une boucle d'auto-amplification de Notch1.

La molécule tCFA15, dont les effets neurotrophiques ont été reconnus il y a assez longtemps, s'est révélée agir sur le déterminisme des CSN et sur la différenciation des cellules précurseurs qui en sont issues *in vitro*, et ceci d'une façon très semblable à celle résultant de l'inhibition de la voie Notch. Les effets neurotrophiques du tCFA15, caractérisés par la stimulation de la croissance neuritique, vont également dans le même sens que ceux produits par une inhibition de Notch1 (Sestan et al., 1999). Tandis qu'inversement, une activation de Notch1 produit une inhibition de cette croissance neuritique (Berezovska et al., 1999; Sestan et al., 1999)

Ces corrélations nous ont amenés à examiner directement l'effet du tCFA15 sur l'expression des éléments de la voie Notch. Nous avons trouvé que l'expression de Notch1 était alors réduite. Des expériences complémentaires ont permis de montrer que le tCFA15 exerçait bien ses effets sur les cellules de neurosphères par l'intermédiaire de l'inhibition de Notch1. Il est probable que ses effets sur la croissance neuritique passent également par Notch1, mais cela reste à démontrer.

D'autres analogies, cette fois entre les effets de Notch1 et du CNTF (Chojnacki et al., 2003) (Shimazaki et al., 2001) sur les neurosphères nous ont conduits à rechercher si le tCFA15 pouvait affecter la voie CNTF/JAK/STAT. Nous avons trouvé qu'il inhibait la phosphorylation



**Figure 16. Modèle d'autorégulation de Notch1**

Les résultats obtenus permettent de proposer un modèle de régulation de Notch1.

L'activation du récepteur NOTCH1 par un ligand aboutirait à une augmentation de la synthèse de *Notch1*, permettant ainsi une amplification du signal donné par le ligand.

de P-STAT3. Comme pour Notch1, nous avons pu montrer que le tCFA15 agissait par l'intermédiaire d'une inhibition de la phosphorylation de STAT3.

Nous avons donc deux intermédiaires pour transmettre l'effet biologique du tCFA15. Il était possible qu'un lien existe entre eux. En ce qui concerne l'effet sur le déterminisme cellulaire, nous avons montré que ce lien existait et que Notch1 est sous la dépendance de STAT3. Auparavant, la gp130, partie active du récepteur du CNTF, avait été trouvée en amont de Notch1, mais la voie de transduction utilisée n'avait pas été déterminée (Chojnacki et al., 2003).

Finalement, une autre connexion entre les voies Notch et STAT3 a été décrite récemment (Kamakura et al., 2004), mais dans ce cas, STAT3 était placé en aval de Notch1, Notch1 agissant comme un coactivateur de STAT3 par l'intermédiaire des protéines HES1 ou HES5 qui s'associent à JAK2. Cela suggérait la possibilité d'une boucle Notch1-HES5-STAT3-Notch1 conduisant à une auto-amplification de l'expression de Notch1. Pour tester cette hypothèse nous avons inhibé ou activé Notch1. Cela s'est traduit respectivement par une inhibition ou une activation de l'expression de Notch1. Ainsi nous avons pu proposer un modèle de cette boucle (Figure 16). Son utilité physiologique reste à définir. On pourrait supposer qu'elle a pour objet d'activer la mise en oeuvre de la voie Notch dès qu'elle est déclenchée par une signalisation même très faible.

---

# Publication 1

---

# STAT3 controls the determinism of neurons / glia from neural stem cells via Notch1 while its effect on astrocytic differentiation is Notch1-independent

Julien Bouissac <sup>1,#</sup>, Marie Paschaki <sup>1,#</sup>, Céline Girlanda-Jungès <sup>2</sup>, Gérard Labourdette <sup>3</sup>, Jeremy Garwood <sup>4</sup>, Bang Luu <sup>2</sup> and Eliane Mohier <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine, UPR 2356 CNRS, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Chimie Organique des Substances Naturelles, UMR 7123, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

<sup>3</sup> Physiopathologie du Système Nerveux, INSERM U375, Strasbourg, France

<sup>4</sup> 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 activity in neurospheres*

## 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 down regulates the expression of *Notch1* and subsequently of *Hes5*. In addition, tCFA15 decreased the level of tyrosine-phosphorylation of STAT3, suggesting a link between the two pathways. STAT3 and Notch1 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 astrocytes 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 confirms that modulating STAT3 results in a variation of Notch1 mRNA and protein.

## 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 lose potential and gain differentiated properties.

This can be recapitulated *in vitro*: isolated neural stem cells proliferate to form clonally derived floating clusters known as neurospheres. Neurospheres contain neural stem cells (about 5 %, ensuring self-renewal) and progenitors at various stages of development. When provided with a solid support where they attach, neurospheres ultimately differentiate to neurons, oligodendrocytes and astrocytes.

Because they allow dissociating experimentally the proliferation phase (where cell fate decisions are assumed to occur) and the differentiation phases (where differentiation strictly speaking occurs), neurospheres allow defining 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., 1995; Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Notch signalling 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 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 signalling in neurospheres caused a shift in the production of neurons versus glia which could be rescued by temporally modulating Notch activity. From those results, we have inferred that Notch signalling was 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 strictly speaking and further promotes the differentiation of astrocytes while inhibiting the differentiation of neurons and oligodendrocytes (Grandbarbe et al., 2003).

Several other factors have been shown to influence the generation of neurons and /or glia from multipotential progenitors, some of them promoting neurons such as PDGF and NT-3 (Park et al., 1999) and others, like LIF and CNTF promoting astrocytes, an effect which could be accompanied by an inhibition of neuron generation (Bonni et al., 1997; Koblar et al., 1998).

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) which we had shown previously, 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 further characterize its mechanism of action, tCFA15 was shown to decrease specifically *Notch1* expression and to decrease tyrosine-phosphorylation of STAT3. This led us to investigate the correlation between the two pathways. Making use of gain and loss-of-function strategies, added 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 confirms that modulation of STAT3 results in a 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 proteins with JAK2 and STAT3 proteins, suggest a positive regulatory feedback mechanism of Notch1 expression mediated through STAT3.

## 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 (Figure 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% (Figure 1C). Higher concentrations of the compound were cytotoxic as determined by MTT and Live Dead assay (Mol. 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 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  $\beta$ -III-tubulin (TuJ1) after 6 days of differentiation for tCFA15 treated and not treated neurospheres (Figure 1D). This is further 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 lost the stellar shape of astrocytes and they extended instead numerous long processes (Figure 1B). The number of O4-expressing cells was strongly diminished, but the few remaining ones appeared more differentiated, indicating that tCFA15 decreases the specification of oligodendrocytes but promotes their differentiation (Figure 1E). We next investigated whether tCFA15 acted on cell fate decision or differentiation. To address this, tCFA15 was added to neurospheres during either the proliferation phase, or the differentiation phase, which comprise essentially multipotential uncommitted progenitors, or committed progenitors, respectively (Grandbarbe et al., 2003).

Preliminary time-course experiments revealed that tCFA15 was rapidly inactivated in the medium (within 1-2 hr), and that its effect progressively decreases in the treated cells (see below, and data not shown) and that the molecule could therefore be used for transient treatments. The observation that an application of tCFA15 at the beginning of the proliferation phase only (Figure 1F, b), was sufficient to induce a significant and irreversible increase in the number of MAP2/TuJ1-positive cells and a decrease in GFAP-positive cells, suggested that tCFA15 was acting on the cell fate decision of multipotential progenitors. Similarly, a shift in neurons and astrocytes was observed when tCFA15 was applied during the differentiation phase only (Figure 1F, c), suggesting that the product was also acting on the differentiation of already committed progenitors. These observations, together with the effect of tCFA15 on neuritogenesis and on OPC differentiation, copy closely the phenotypic modifications resulting from a genetic impairment of the Notch pathway in neurospheres derived from *Dll1*<sup>LacZ/LacZ</sup> mutant embryos (Figure 1.G; Grandbarbe et al., 2003) and prompted us to investigate the effect of tCFA15 on the Notch signalling 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, treated with tCFA15 ( $10^{-6}$  M) (Figure 2A). All were expressed in control neurospheres. After 24 h of tCFA15 treatment, the expression of *Notch1* mRNA was down-regulated, 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 (figure 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 (Figure 2A).

Time course experiments showed that tCFA15 treatment caused a significant decrease in *Notch1* mRNA as soon as 3 h after the beginning of the treatment, whereas, in the same experiment, the decrease in *Hes5* mRNA occurred only after 12 h (Figure 2A), indicating that the effect of tCFA15 on *Hes5* mRNA is likely 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 (Figure 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 cell types tested. Other genes exhibited more contrasted responses depending on the cell type analyzed: *Dll1* 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 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 (Figure 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. This effect is observed when the treatment takes place during either proliferation and/or differentiation, indicating that Notch1 is acting on both cell fate decision as well as on cell differentiation. These observations confirmed that Notch1 controls the production of neurons versus glia from neural stem cells and further suggest 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. One candidate was the JAK/STAT pathway 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 tyrosin-phosphorylation which typically occurs through JAK proteins, and allows dimerization and translocation to the nucleus. We therefore examined the possible effect of tCFA15 on the tyrosin-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 tyrosin-phosphorylated STAT3 was strongly decreased (Figure 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 STAT 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 homo-dimers, thereby hampering the STAT3 DNA binding activity (Turkson et al., 200x). Both types of manipulations resulted in an increase in neurons at the expense of astrocytes (Figure 3B, C). These results indicate that STAT3 inactivation mimics the phenotypic response of neurospheres to tCFA15 and to *Notch1* antisense oligonucleotides. Because they were observed 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 likely 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 STAT3 tyrosin-phosphorylation in treated neurospheres (Figure 3A, right). As expected, these treatments resulted in a significant increase in the number of GFAP-positive cells and in a decrease in MAP2/TuJ1-positive cells (Figure 3E). However, when neurospheres were treated with both tCFA15 and CNTF (or LIF), the effect of tCFA15 was abolished, perhaps 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**

In order 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  $\gamma$ -secretase inhibitor ( $\gamma$ -secretase inhibitor, class XII) which specifically 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* expression as a result of *Notch1* activation or inhibition, respectively (Figure 5B). Gain-of-function for STAT3 was achieved by CNTF which induces an increase in P-STAT3 (Figure 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 3 additional days. Immunocytology showed that constitutively active Notch1 (ICN) fragment was able to override the increased proportion of neurons induced by the inactivation of STAT3 (Figure 4A). These data indicate that activated-Notch1 effect on cell fate decision is not dependant on STAT3 and places Notch1 downstream of STAT3 in the process of cell fate decision.

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  $\gamma$ -secretase (GSI) down-regulated HES5 protein (Figure 5B) and increased and decreased the number in neurons and astrocytes, respectively (Figure 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 astrocytes differentiation**

The differentiation of astrocytes, defined by an increasing morphological complexity and a strong immunolabelling with anti-GFAP, is promoted by active Notch1 (ICN) even in the presence of STAT3 blocking peptide (Figure 4A; STAT3 b.p.+ICN condition), an effect which could be anticipated if Notch1 is downstream of STAT3; surprisingly, the astrocytic differentiation is also promoted by CNTF even in the presence of GSI, and this despite the failure of CNTF to rescue the shift induced by GSI (Figure 4B; CNTF+GSI condition). 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 resulted from the genetic impairment of the ligand *Dll1* gene. Neurospheres prepared from *Dll1*<sup>LacZ/LacZ</sup> mutant embryos differentiate mainly into neurons (Grandbarbe et al., 2003). In the presence of CNTF, although the ratio of astrocytes to neurons is unchanged with respect to the untreated neurospheres, astrocytes appear significantly more differentiated than in the control (Figure 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 (Figure 3D). Next, we examined the effect of activating STAT3 by the addition of CNTF or LIF to growing neurospheres. RT-PCR and western analyses (data not shown; Figure 3A) showed that *Notch1* mRNA and protein were significantly increased, respectively. 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 suggests 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 (Figure 2A; 3D).

### **8. Autoregulation of Notch1 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 is in a positive regulatory loop, mediated through STAT3 activation.

We verified that in neurospheres, Notch1 is responsible for STAT3 phosphorylation; we inactivated Notch1 with GSI and we found a decrease in STAT3 phosphorylation; the converse gain-of-function experiment, in which we introduced the activated Notch1 (ICN) resulted in an increase in STAT3 phosphorylation (Figure 5C). Combining these data together with the data presented above, suggests a loop whereby Notch1 positively regulates its own expression. One prediction is that by inhibiting Notch1 function, *Notch1* expression would decrease. We examined the level of *Notch1* mRNA in GSI-treated neurospheres and found that it was indeed significantly decreased with respect to the control (Figure 5A). We further examined the effect of GSI treatment in comparison with ICN treatment by western analysis. As a control of GSI efficiency, we observed a decrease in the intracellular Notch1 proteolytic fragment (120 Kda) as it could be anticipated from the inability for Notch1 protein to undergo  $\gamma$ -secretase mediated cleavage. In addition, we observed a decrease in HES5 protein, consistent with the decrease in *Hes5* mRNA, and which likely results from the inactivation of Notch1. On the other hand, treatment of neurospheres with ICN, resulted in an increase in HES5 protein, as a control of Notch1 activation, and in addition, in an increase in NOTCH1 full length (330 Kd) 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 tyrosin-phosphorylation of STAT3, leading us to postulate a link between both signaling pathways. The possibility of applying to neurospheres concepts like dominance, commonly used in genetics for establishing a hierarchy between genes likely involved in the same processes, in addition to the possibility of distinguishing practically between the processes of cell fate decision and differentiation, make the neural stem cells-derived neurospheres, a system particularly relevant for the study of the functional relationship between Notch1 and STAT3.

Like Notch1, STAT3 has been reported to be necessary for maintaining embryonic stem cell and to promote astrocytic differentiation; for STAT3, the latter function has been mostly inferred from the effect of cytokine, essentially the CNTF, which promotes gliogenesis by driving instructively multipotential progenitors along the astroglial lineage (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 transcriptional level (antisense oligonucleotides) or the functional level (STAT3 blocking peptide) results in a shift in the production of neurons vs. astrocytes, closely resembling that

resulting from Notch1 attenuation. Because this effect takes place whether the treatment is applied during either the proliferation or the differentiation phase (data not shown) we conclude that, as Notch1, STAT3 acts on cell fate decisions.

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, and indicating that the effect of STAT3 on cell fate decision, is likely mediated through Notch1. This statement was fully corroborated by molecular analysis showing that under these conditions, the inactivation of STAT3 consistently resulted in a decrease in Notch1 expression.

When addressing the differentiation of astrocytes (estimated from morphological criteria of the GFAP-expressing cells) from the same set of experiments, we observed that activated NOTCH1 stimulates astrocytes differentiation even in the absence of STAT3, and reciprocally, the CNTF-mediated activation of STAT3 stimulates the differentiation of astrocytes, disregarding Notch1 activity, thereby suggesting that, based on these dominance relationship experiments, Notch1 and STAT3 signalling were acting independently of each other on the differentiation of astrocytes. This finding is consistent with earlier data showing the independence of activated Notch1 as well as STAT3 on the stimulation of astrocytic differentiation (Bonni et al., 1997; Ge et al., 2002; Rajan and McKay, 1998; Tanigaki et al., 2001); however, it is at odds with the recent finding (Kamakura et al., 2004) that activated Notch1 (ICN) failed to stimulate 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 astrocytes differentiation was dependent on STAT3. Beside the trivial explanation that this discrepancy results from experimental differences such as the presence of 10% serum, the cellular material and preparation of “neurospheres”, we believe that this difference may actually reflect the intricacy of the relationship between Notch1 and STAT3 signalling. 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 astrocyte, indicating that in all the neurosphere-comprising cell types, STAT3 was likely controlling the expression of Notch1. From this however, it should be undue to conclude to the generalisation of this process; on the contrary, we propose that this control of Notch1 by STAT3 may be limited to certain cell types, in keeping with the context-dependence of both STAT3 and Notch1 functions. Likewise, we assume this relationship may be highly 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). This assumption is corroborated by the failing to identify Notch1 as a putative target of STAT3 in micro-array screenings, realised in mature fibroblasts cultures (David Frank, personal communication). These observations are consistent with the role of STAT3 in maintaining pluripotency of stem cells; the induction of Notch1 might then be considered as associated with the loss of pluripotency. The time-dependence of the relationship between Notch1 and STAT3 is the next step for investigation.

More work is needed to explore the mechanism of action of tCFA15 and to define its targets. Here we report that it has a decreasing effect on tyrosine phosphorylation which is unlikely to be restricted to STAT3 (data not shown). This effect is reminiscent of the tyrphostin activity and suggests that tCFA15 may be endowed with a tyrphostin-like effect although it has none

of the structural characteristics of these products (for review, Levitzki, 2002). This supposed widespread effect contrasts with its specific effect on Notch1, while other Notch receptors and ligand-coding genes, although expressed in neurospheres were not significantly altered by tCFA15. This observation suggests that they obey different mechanisms of regulation as could be predicted from their distinct spatio-temporal patterns of expression during development. It is interesting to note that the attenuation of Notch signalling as that 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 myelination, while it diminishes astrogliogenesis, thereby reducing reactive gliosis, a major disadvantage to neural regenerative therapies. tCFA15 thus appears as providing a trail for developing molecules with a therapeutic use whether or not accompanied by neural stem cell transplantation.

As a corollary of the similarity of functions between Notch1 and STAT3, is the similarity of pathologies associated with their dysfunction. Notch1 as well as STAT3 have been reported to be implicated in many cancers. If the relationship between the two genes presented in this study is conserved in tumorigenesis, it may be of interest for therapeutically purposes.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Production, maintenance and differentiation of neurospheres

Primary neurospheres were prepared from telencephalons of wild type embryos (E14.5) as described by (Tropepe et al., 1999) and maintained as secondary neurospheres by successive passages in "neurosphere medium", a serum-free culture medium (Reynolds and Weiss, 1996) containing EGF (10 ng/ml). After various times of proliferation, 50-100 neurospheres were plated onto polyornithine (Sigma)-coated coverslips in the presence of 2ng /ml of EGF and 0.5% FBS to allow their differentiation. *Delta-like-1* mutant neurospheres (*Dll1*<sup>LacZ/LacZ</sup>) neurospheres were prepared from homozygote mutant embryos following the same method. We have previously described the phenotype and obtention of *Dll1*<sup>LacZ/LacZ</sup> mutant neurospheres in (Grandbarbe et al., 2003).

### Cell primary cultures

Primary cell cultures of murine cortical neurons were prepared from mouse embryos (E13-14), essentially as described by (Larm et al., 1996). Briefly, cells were plated at a concentration of  $2.10^5$  cells per  $cm^2$  in Petri dishes (Nunc) previously coated with poly-D-lysine, in neurosphere medium without EGF. 24 h after plating, the medium was replaced by fresh medium complemented with tCFA15 (see below). Homogeneous cultures of astrocytes were established from newborn rat brains as described by (Perraud et al., 1988). Briefly, the cells were grown in DMEM basal medium containing 10% FBS, for 30 days. One day before treatment, the culture medium was replaced by the neurosphere medium without EGF. For oligodendrocytes, mixed primary cultures containing astrocytes and oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) were established from cerebral hemispheres of newborn rat as previously described (Tryoen-Toth et al., 1998). OPCs were collected and grown for 2 days in the neurosphere medium without EGF, in order to allow their differentiation into oligodendrocytes.

### Treatment of cultures with tCFA15

The synthesis of 2,4,4-trimethyl-3-(15-hydroxypentadecyl)-2-cyclohexen-1-one, hereafter designated as tCFA15 has previously been described in (Girlanda-Junges et al., 1998).

tCFA15 was freshly dissolved in ethanol ( $10^{-3}$  M) and was added to cultures at the desired concentrations, at a final dilution of 1  $\mu$ l/ml. tCFA15 was added at various times of the cell culture and for various periods of time, as described in the text. The control consisted in 1  $\mu$ l/ml of ethanol (at this dilution, ethanol elicits no effect on the differentiation of cultures). Medium was change everyday with fresh medium complemented with tCFA15 or ethanol.

### **Treatment with CNTF and LIF**

Recombinant human ciliary neurotrophic factor (CNTF, R&D Systems) and recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF, PeproTech Inc.) were added to neurosphere cultures at the concentration of 10 ng/ml, at the beginning of proliferation and differentiation phases.

### **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, was 5'-TACATCAGCAGACTACACGAGTC. The antisense oligonucleotide for STAT3 was 5'-TCCAGTTTCTTAATTTGTTG, and for the control-sense oligonucleotide, was 5'-CAACAAATTAAGAACTGGA (adapted from (Konnikova et al., 2003)). The oligonucleotides were added to neurospheres cultures at the concentration of 10  $\mu$ M according to the temporal protocol shown in the figures, at the beginning of both proliferation and differentiation phases.

The STAT3-SH2 domain-binding peptide has been designed to block STAT3 activity in vitro by preventing the formation of STAT3 homodimers (Turkson et al., 2001). It was added to neurospheres cultures at the concentration of 2 mM, at the beginning of proliferation and differentiation phases.

Gamma Secretase Inhibitor (GSI, Novagen) was added to neurospheres cultures at 5 mM (Weijzen et al., 2002) as described in the text. As GSI was dissolved in Dimetoxysulfoxyde (DMSO) and add to cultures at a final dilution of 0.1%, the control consisted in adding 1  $\mu$ l/ml of DMSO (at this concentration, DMSO has no effect on the differentiation of neurospheres).

### **Transient transfection by intracellular Notch-1**

Cells were dissociated prior to transfection with expression vectors coding for intracellular Notch-1 (i.c. Notch-1) (Aster et al., 1997) kindly provided by Dr Jon C. Aster (USA). As a control for transfection the empty vector (pcDNA3) was used. In all experiments 10  $\mu$ g DNA and 120mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma) were used. The cells were then treated and harvested as described for immunostaining and Western blot analyses.

### **Immunostaining**

The treatment was as previously described (Grandbarbe et al., 2003). Neurospheres or primary cultures were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde. Primary antibodies used were mouse monoclonal anti-MAP(2a+2b) (1/800, Sigma) specific for mitotic neurons, mouse monoclonal anti  $\beta$ 3-tubulin for post-mitotic neurons (TUJ-1, 1/500, Convance); rabbit polyclonal anti-GFAP (1/1000, Dako) for astrocytes; mouse monoclonal A2B5 (1/2, clone) (Abney et al., 1983) for OPCs; rabbit anti-GalC (1/20, Boehringer) and mouse monoclonal anti-O4 (1/50, Dako) for immature oligodendrocytes, respectively. 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 (1/15000, Molecular Probes). Preparations were mounted in Aquamount (Polyscience), and viewed for triple immunofluorescence using a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

Presented data were based on three independent experiments, an average of 15 areas were analysed per treatment and per experiment. The results were expressed as 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  $P \leq 0.05$  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**

RNA was purified from cultured cells (Chomczynski and Sacchi, 1987) and reverse transcribed. Three independent RNA samples 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 where 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 percent in gene expression in tCFA15-treated cells relative to untreated cells (control conditions adjusted to 100% after normalisation to GAPDH). The relative mRNA levels were quantified by NIHimage1.36 software and graphed results are shown as means  $\pm$ S.E.M..

### **Western-blot analysis**

Cultured cells were treated from 24h to 3 days and then were processed for Western blot analysis following standard protocol. Briefly, cells were collected in a denaturing lysis buffer: SDS 3%, Tris HCl 62.5 mM, glycerin 10%,  $\beta$ -mercaptoethanol 3.3%, with protease inhibitor cocktail (SIGMA) and 1 mM orthovanadate for phosphorylation studies. 25-50  $\mu$ 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 protein levels deposition on the SDS PAGE were estimated by Coomassie blue coloration. A common 33kDa band on Coomassie stained gel was used as a loading control.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Dr F. Pfrieder 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 and peptide facility services of IFR 37, Strasbourg.

## REFERENCES

- Abney, E. R., Williams, B. P., and Raff, M. C. (1983). Tracing the development of oligodendrocytes from precursor cells using monoclonal antibodies, fluorescence-activated cell sorting, and cell culture. *Dev Biol* *100*, 166-171.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* *268*, 225-232.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* *284*, 770-776.
- 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*, 11336-11343.
- 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*, 3637-3650.
- 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*, 477-483.
- 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*, 406-410.
- Bromberg, J., and Darnell, J. E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* *19*, 2468-2473.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.
- 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*, 5587-5596.
- 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*, 848-860.
- 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*, 1391-1402.
- 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*, 547-554.

- Koblar, S. A., Turnley, A. M., Classon, B. J., Reid, K. L., Ware, C. B., Cheema, S. S., Murphy, M., and Bartlett, P. F. (1998). Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3178-3181.
- 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.
- Larm, J. A., Cheung, N. S., and Beart, P. M. (1996). (S)-5-fluorowillardiine-mediated neurotoxicity in cultured murine cortical neurones occurs via AMPA and kainate receptors. *Eur J Pharmacol* 314, 249-254.
- Levitzki, A. (2002). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer* 38 Suppl 5, S11-18.
- 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, 5429-5434.
- Park, J. K., Williams, B. P., Alberta, J. A., and Stiles, C. D. (1999). Bipotent cortical progenitor cells process conflicting cues for neurons and glia in a hierarchical manner. *J Neurosci* 19, 10383-10389.
- 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, 124-131.
- Rajan, P., and McKay, R. D. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18, 3620-3629.
- 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.
- 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, 166-188.
- 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, 141-150.
- Turkson, J., Ryan, D., Kim, J. S., Zhang, Y., Chen, Z., Haura, E., Laudano, A., Sebti, 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, 45443-45455.
- 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, 979-986.

## LEGEND OF THE FIGURES

### Figure 1. tCFA15 promotes neurons at the expense of glia in neural stem cells-derived neurospheres

(A) General experimental protocol. Single cell dissociated neurospheres were allowed to proliferate in serum-free medium containing 10 ng/ml EGF for 3 days (proliferation phase). The resulting neurospheres were plated onto poly-ornithin coated coverslips and allowed to differentiate for additional 3 (B,C) or 6 days (D,E) in the presence of 2 ng/ml EGF (differentiation phase); the neurospheres were then processed for immunocytochemistry and analysed by confocal microscopy. Markers were MAP2 or  $\beta$ 3-tubulin coupled to Alexa 555 (red), for neurons (B, D, G); GFAP coupled to Alexa 488 (green), for astrocytes (B, G); O4 coupled to Alexa 555 (red), for oligodendrocytes (E). Arrowheads indicate time-points when tCFA15 was added. (B) Dose-dependence response of neurospheres to increasing concentrations of tCFA15. (C) The results were quantified and expressed as percentages of total cell number estimated from TO-PRO, a marker specific for nuclei (in blue). (F) Time-dependence response of neurospheres to treatment with tCFA15 during the proliferation and/or the differentiation phase: quantitative estimation. tCFA15 ( $10^{-6}$ M) was added only once at the beginning of proliferation or differentiation phase as visualized by the arrowheads on the diagram. (G) Differentiation of heterozygous ( $Dll1^{+/LacZ}$ ) and homozygous ( $Dll1^{LacZ/LacZ}$ ) neurospheres.

### 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 3h, 12h or 24h before total RNA extraction for semi-quantitative RT-PCR analysis. The results are normalized relative to the presence 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 24h 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 expression in neurospheres treated with tCFA15 ( $10^{-6}$ M) for 24h before protein extraction. (D) Effect of Notch1 down-regulation by antisense treatment on the generation of neurons and astrocytes from neurospheres. Dissociated neurospheres were grown and allowed to differentiate in the presence of Notch1 antisense oligonucleotides (10  $\mu$ M) during the proliferation phase (b), the differentiation phase (c), or both (d) as schematized in the diagram. The spheres were analysed after 3 days of differentiation. Quantification of the results and the markers were as described in Figure 1.

### Figure 3. The effect of STAT3 on the generation of neurons and astrocytes from neurospheres correlates with an effect on Notch1 mRNA expression

(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 (10ng/ml) for 1 day and then subjected to immunoblot analysis, with anti-Notch1, anti-STAT3 or anti-P-STAT3. (B,C) Effect of STAT3 inhibition on the generation of neurons and astrocytes from neurospheres. Neurospheres were treated with (10mM) STAT3 sense (a), antisense (b) and (2mM) STAT3 blocking peptide (d); the treatment was applied at the beginning of each of the proliferation and the differentiation phase, and spheres were then analysed by

immunocytochemistry; the markers were the same as those used in Figure 1. (C) Quantification of the results. (D) A fraction of neurospheres corresponding to each of the above treatments was harvested at the end of the proliferation phase; the total mRNA was extracted and analysed by semi-quantitative RT-PCR. (E) Combined effect of tCFA15, CNTF and LIF on the generation of neurons and astrocytes from 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 quantify.

**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 (2mM), 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 and quantification of the results were the same as in Figure 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 *Dll1<sup>LacZ/LacZ</sup>* neurospheres. Neurospheres were prepared from embryos homozygous for *Dll1* 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 and the differentiation phases. The markers and the quantification of the results were the same as in Figure 1.

**Figure 5. STAT3 and Notch1 interaction results in a positive regulatory feedback of Notch1 expression**

(A) Dissociated neurospheres were treated with GSI and the expression of *Notch1* and *Hes5* mRNA relative levels were analysed. (B,C) Dissociated neurospheres were treated with GSI or transfected with ICN. Immunoblot was analysed for NOTCH1, HES5, STAT3, and P-STAT3.

**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 signalling is acting as a switch that promotes glial fate while inhibiting neuronal fate. In a second step, Notch signaling further inhibits the differentiation of neurons and oligodendrocytes, while it stimulates the differentiation of astrocytes. The Notch1 antisense experiments reported in the present study allow assigning these effects 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). 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 STAT3 to promote its phosphorylation, thereby suggesting that Notch1 is necessary for STAT3 activity. We checked that the Kamakura's results could be obtained in the neurospheres system, thus leading us to propose a positive regulatory control between the two pathways.

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

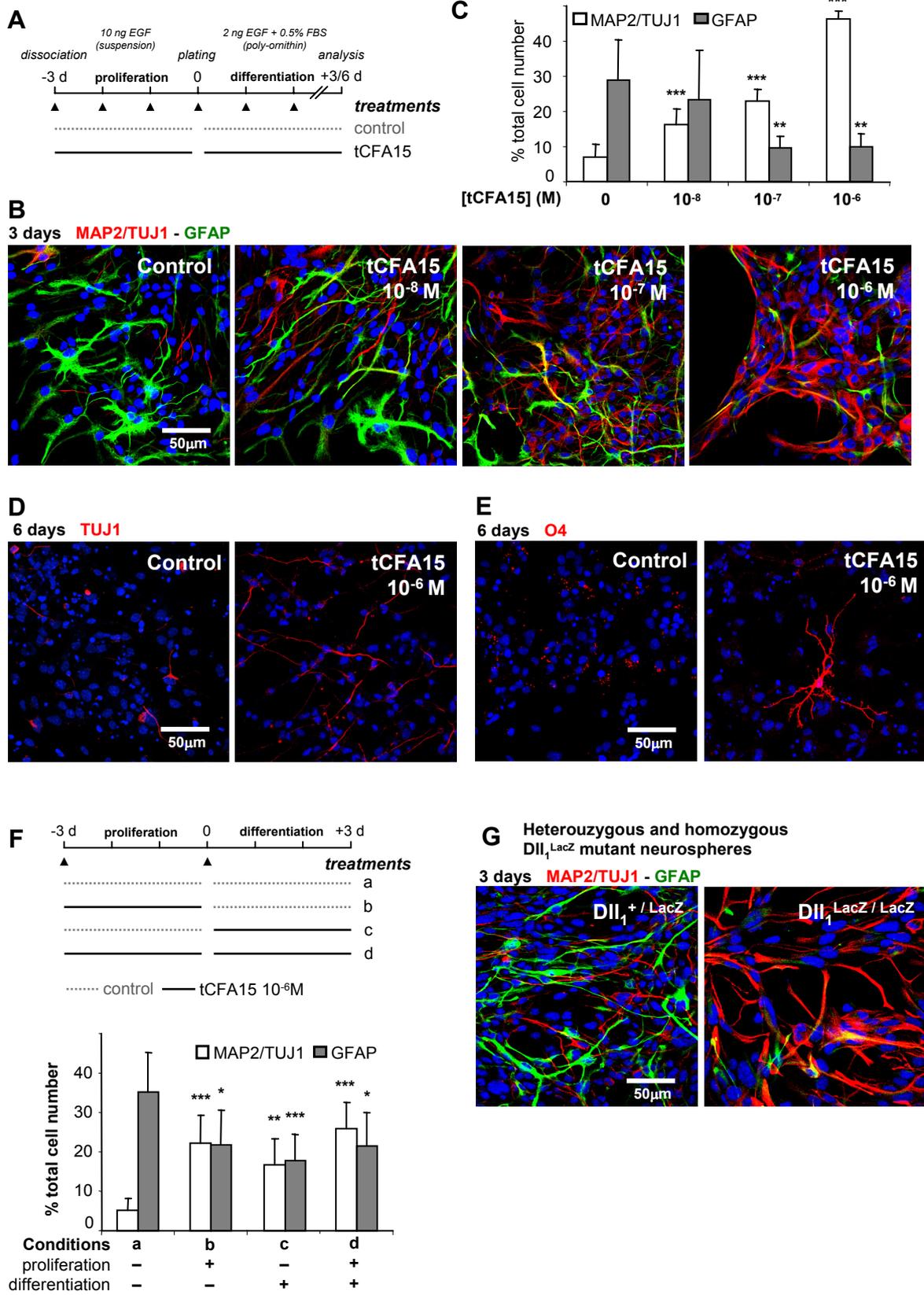


Fig. 1

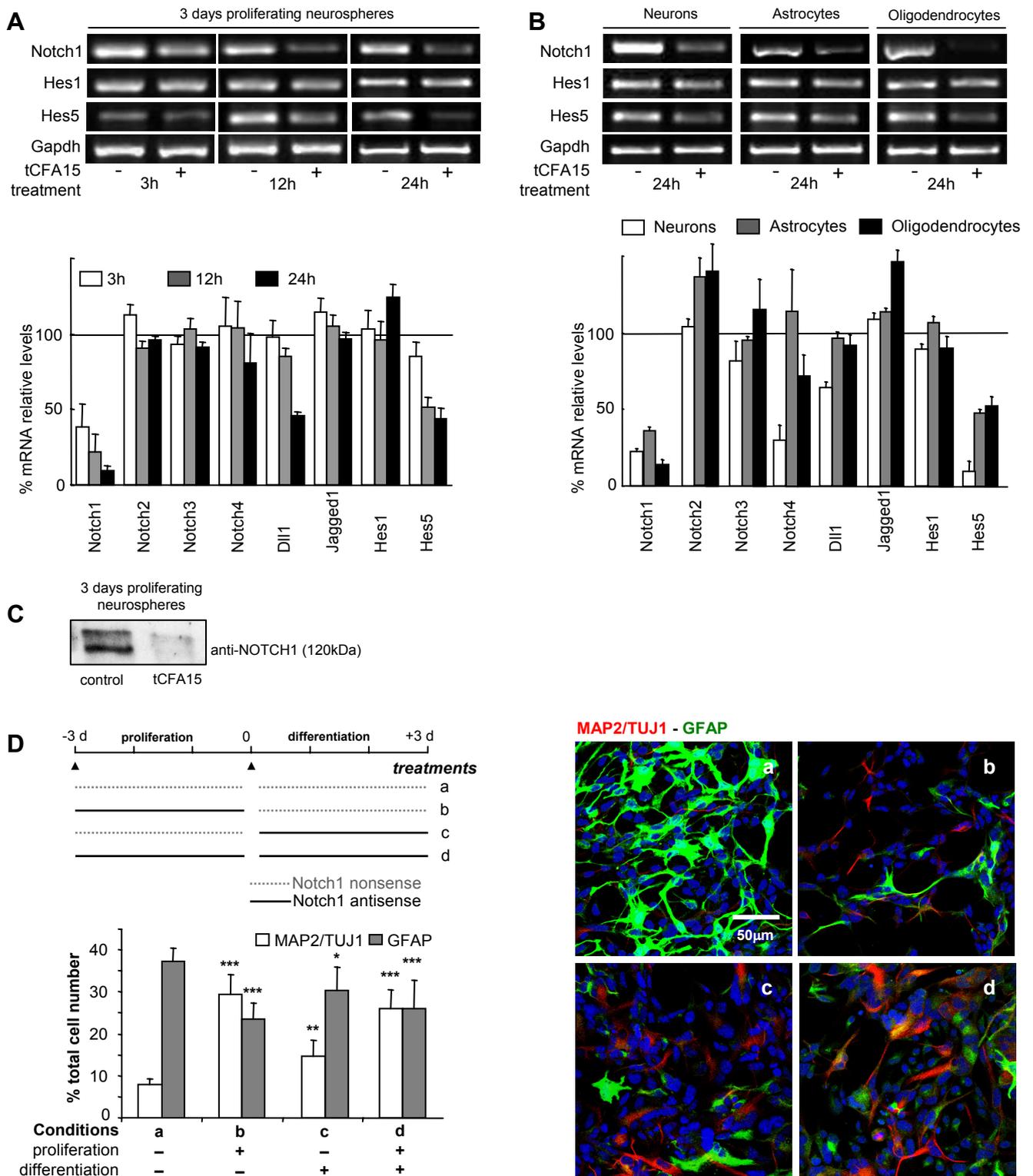


Fig. 2

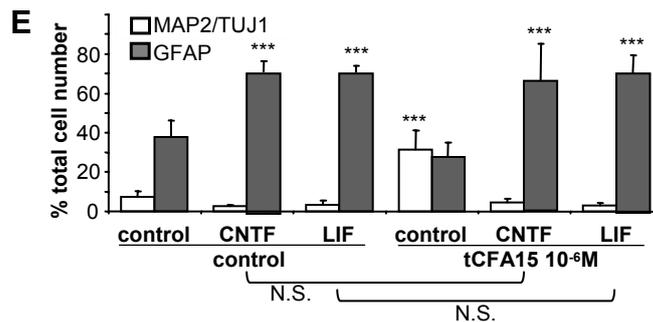
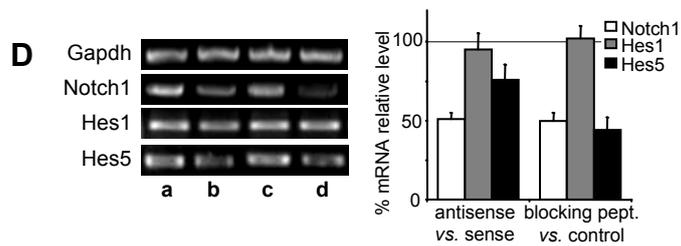
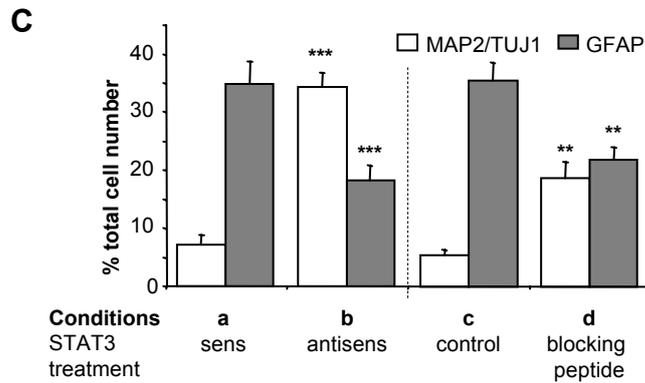
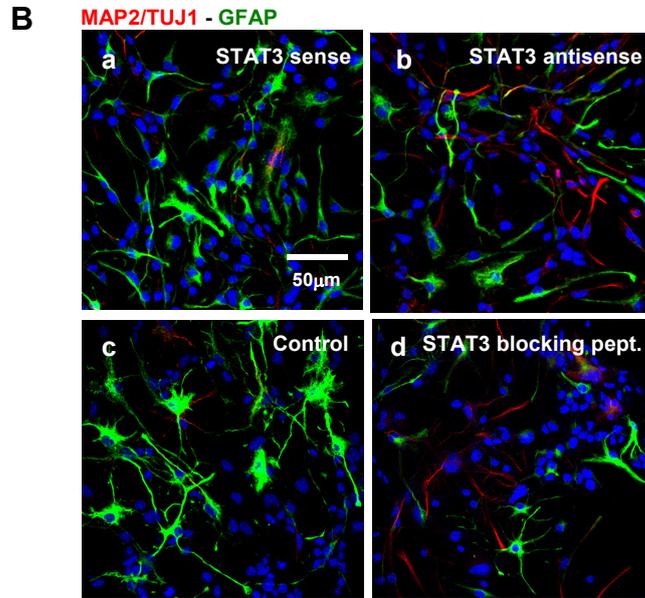
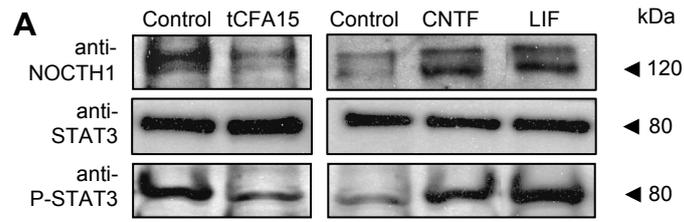


Fig. 3

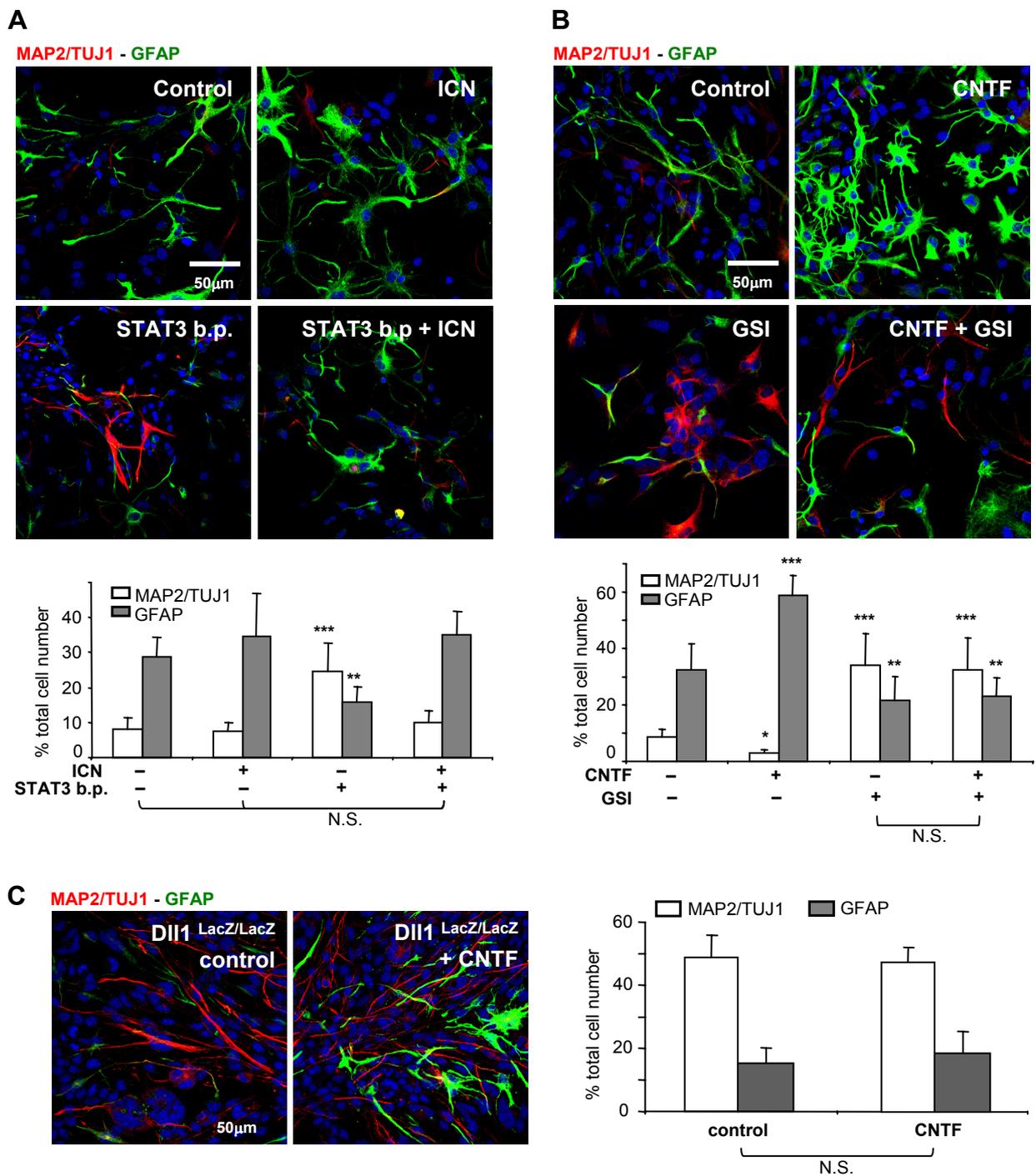


Fig. 4

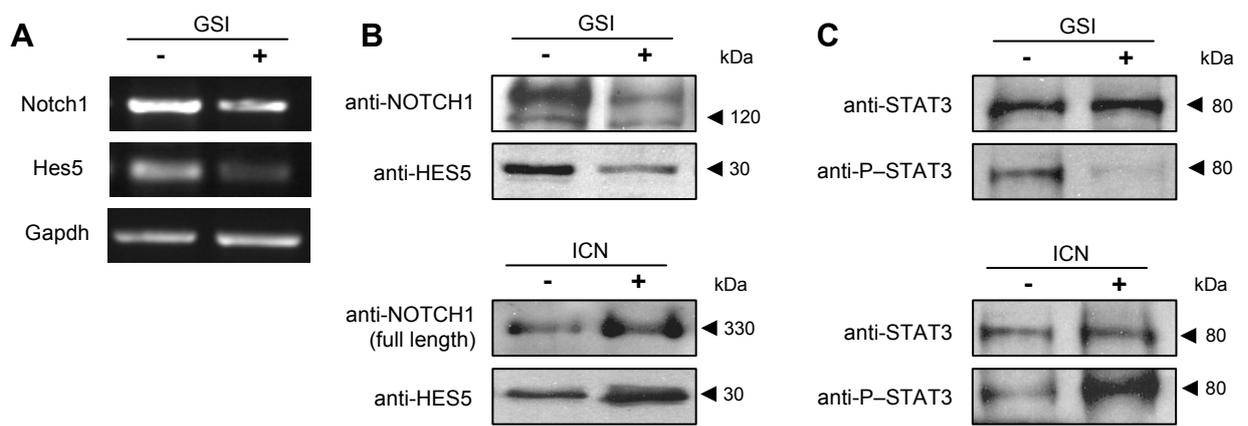


Fig. 5

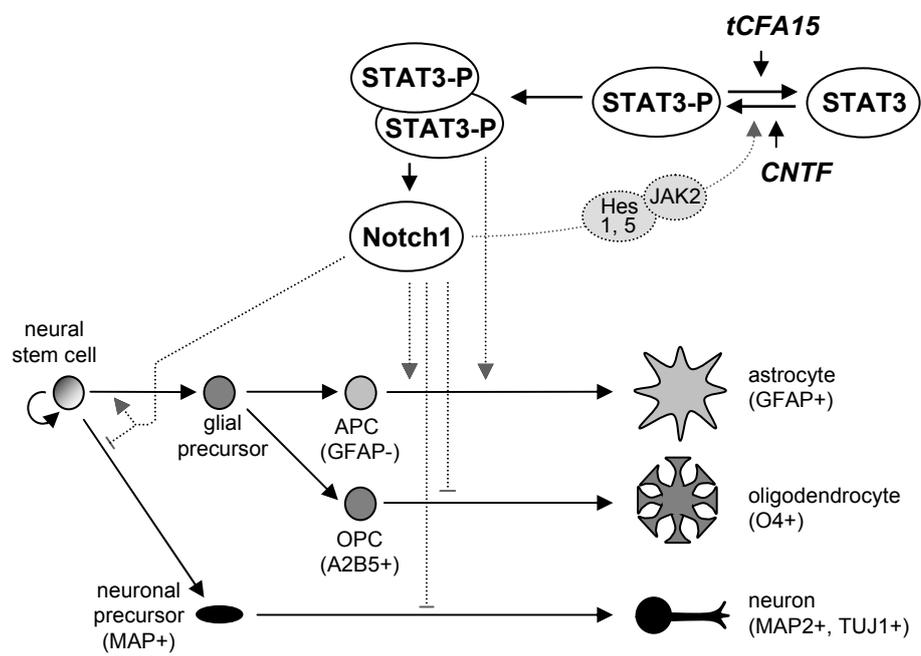


Fig. 6

Genes	Sequence	Neurospheres	Neurons	Oligodendrocytes	Astrocytes
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'				
DII-1 F	5' - GAA AGA CTC ATC AGC CGC CT -3'	32	32	35	35
DII-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

## Chapitre 2

---

### Effets du tCFA15 sur des lignées tumorales

---

---

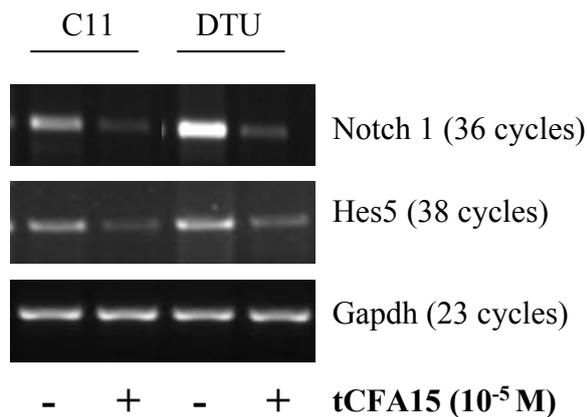
## 2. EFFETS DU tCFA15 SUR DES LIGNEÉS TUMORALES

---

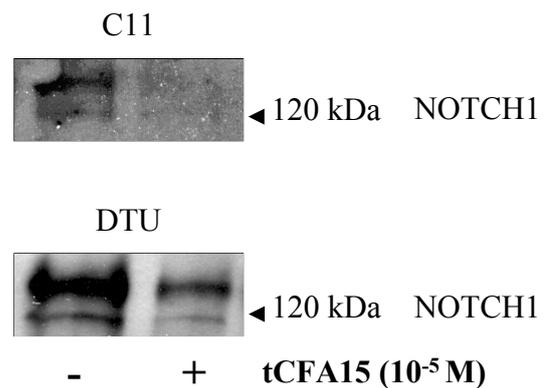
Etant donné l'ubiquité de la voie Notch et la diversité de ses fonctions, il n'est pas étonnant que ses dérèglements fonctionnels soient à l'origine de nombreuses pathologies qui vont des maladies neurodégénératives à certains cancers (Axelson, 2004b). Le plus souvent, ces maladies sont liées à une hyperactivité de la voie Notch. Chez l'homme, un lien de causalité entre hyperactivité de la voie Notch et cancer a été établi pour la première fois dans les leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules-T (T-ALL) (Ellisen et al., 1991). Dans ce cas, ainsi que dans celui des tumeurs mammaires, Notch se comporte comme un proto-oncogène. Inversement, Notch peut se comporter comme un suppresseur de tumeurs dans des contextes cellulaires différents, comme dans le cas de certains cancers de la peau (Nicolas et al., 2003). Ainsi, le rôle de la voie Notch dans la cancérogenèse semble dépendant du contexte cellulaire. De la même façon, la fonction Notch a des effets opposés sur la différenciation selon le type cellulaire considéré.

Dans les travaux présentés dans ce chapitre nous avons utilisé le tCFA15 comme outil pharmacologique dans le but de voir d'une part s'il inhibait l'expression de *Notch1*, comme dans les cellules normales, et d'autre part s'il serait capable d'influencer la progression tumorale.

### A. Taux relatifs des ARNm (RT-PCR)



### B. Taux des protéines (Western Blot)



### Figure 17. Effets du tCFA15 sur l'expression de Notch1 dans les cellules NIH 3T3 témoins (C11) et transformées par ras (DTU)

Les cellules C11 et DTU ont été ensemencées dans des boîtes de 60 mm traitées à la poly-L-lysine (300 000 cellules/boîte) dans du milieu DMEM complété avec 5% de FBS. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement.

(A) Les cellules ont été traitées pendant 24 h au tCFA15 (10<sup>-5</sup> M) avant l'extraction des ARN totaux et l'analyse des taux d'expression de *Notch1* et de *Hes5* par RT-PCR semi-quantitative. On observe une diminution des expressions de *Notch1* et de *Hes5* sous l'effet du traitement au tCFA15. L'expression de la *Gapdh* a servi de référence.

(B) Les cellules ont été traitées pendant 72 heures. Les milieux ont été changés chaque jour et le traitement a été renouvelé à chaque changement de milieu. 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits. On observe une diminution de la protéine NOTCH1 après traitement au tCFA15 dans les cellules C11 et DTU.

On remarque que dans les conditions témoins (sans traitement au tCFA15) *Notch1* est plus fortement exprimé dans les DTU (cellules transformées par ras) que dans les C11, et ceci se reflète au niveau protéique.

## **2.1. LE tCFA15 REVERSE LE PHENOTYPE DE FIBROBLASTES TRANSFORMES PAR RAS (CELLULES DTU)**

### **2.1.1. NOTCH1 et lignées transformées par ras**

Divers travaux suggèrent que ras peut réguler l'expression de Notch1. Directement, il a été montré que le maintien de la tumorigénicité de lignées transformées par l'oncogène ras, nécessite l'activation de Notch1 (Weijzen et al., 2002), et dans l'épithélium mammaire de souris, ras a été également décrit en amont de Notch1 (Kiaris et al., 2004). Indirectement, il a été rapporté que le bFGF, qui exerce ses effets principalement par la voie des MAPK incluant ras, induit l'expression de Notch1 dans des précurseurs neuroépithéliaux (Faux et al., 2001) et dans des précurseurs oligodendrocytaires (Bongarzone et al., 2000). Ainsi, dans le cas des tumeurs où le facteur ras (ou le bFGF) joue un rôle dans le processus de cancérogenèse, Notch1 devient une cible thérapeutique potentielle.

Nous avons donc examiné si une diminution de Notch1 par le biais du tCFA15, pouvait entraîner une modification, voire une réversion du phénotype tumoral des lignées transformées par ras.

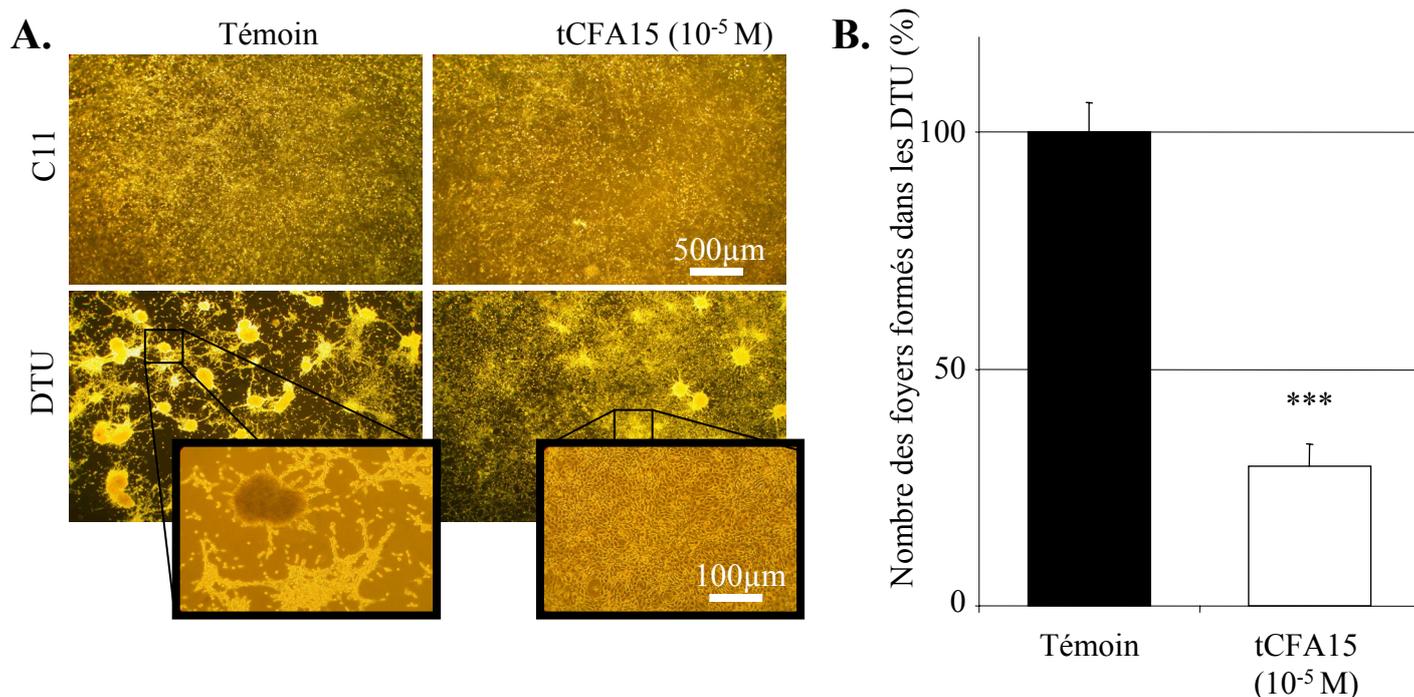
### **2.1.2. Modèle d'étude : les cellules DTU**

Pour cette étude, nous avons utilisé une lignée de fibroblastes d'embryon de souris (NIH 3T3) transformée par le proto-oncogène ras (DTU) et la lignée témoin NIH 3T3 (C11) qui avait été utilisée pour générer les cellules DTU (B.Wasylyk, IGBMC, Strasbourg).

Dans un premier temps, nous avons déterminé le seuil de toxicité et d'efficacité du tCFA15 dans ces lignées et nous avons défini les conditions optimales de culture et de traitement au tCFA15. Les cellules C11 et DTU sont cultivées dans du milieu DMEM complémenté avec 5% de FBS. Nous avons déterminé par divers tests de mortalité cellulaire (test MTT et Live Dead Viability Cytotoxicity kit) que dans ces conditions de culture le tCFA15 n'est significativement cytotoxique que pour des concentrations supérieures ou égales  $10^{-4}$  M.

### **2.1.3. Effets du tCFA15 sur la voie Notch dans les cellules DTU**

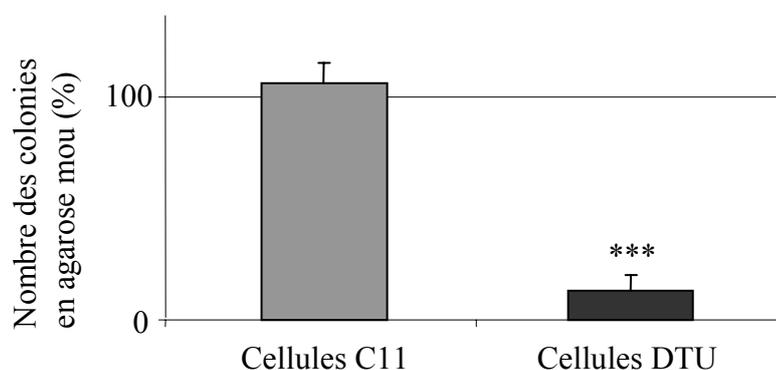
Nous avons analysé par RT-PCR semi-quantitative l'expression des gènes de la voie Notch après traitement des cellules au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) pendant 24 h, avant extraction des ARN totaux. Nous avons constaté que le taux d'expression de *Notch1* est plus fort dans les cellules DTU que dans les C11, en accord avec les résultats de Weijzen (Weijzen et al., 2002).



**Figure 18. Effets du tCFA15 sur le phénotype des cellules NIH 3T3 transformées par ras (DTU)**

(A) Les cellules C11 et DTU ont étéensemencées dans des boîtes de 100 mm traitées à la poly-L-lysine (500 000 cellules/boîte) dans du milieu DMEM complétementé avec 5% de FBS. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M). Les milieux ont été changés et les cellules ont été traitées quotidiennement.

(B) L'aspect des cellules et le nombre de «foyers» formés ont été analysés après 5 jours de prolifération. (n = 4 expériences indépendantes). On observe une diminution de 71% du nombre des « foyers » formés par les DTU sous l'effet du traitement au tCFA15 et l'aspect général de la culture se rapproche de celui de la lignée témoin C11.



**Figure 19. Effets du tCFA15 sur le nombre des colonies formées par les lignées C11 et DTU en agarose mou**

Les cellules C11 et DTU ont étéensemencées dans des boîtes de 60 mm traitées à la poly-L-lysine (250 000 cellules/boîte) dans du milieu DMEM complétementé avec 5% de FBS. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M). Les milieux ont été changés et les cellules traitées chaque jour. Après 3 jours de traitement, les cellules ont été détachées de la boîte, comptées en présence de bleu de Trypan, et remises en culture dans de l'agarose mou, traité ou non au tCFA15, à la densité de 30 000 cellules/ml, dans des boîtes de 35 mm de diamètre (50 000 cellules/boîte). Un ml de milieu de culture est déposé sur l'agarose après son durcissement. Ce milieu a été changé 2 fois par semaine et le traitement a été renouvelé à chaque changement de milieu. Après 21 jours, le nombre de colonies obtenues par boîtes est compté et rapporté au nombre de colonies de la condition témoin (100%). (n = 5 expériences indépendantes)

Nous observons une forte diminution du nombre des colonies formées dans les cultures de cellules DTU traitées au tCFA15 (13% par rapport au témoin). Dans les mêmes conditions les cellules C11 forment des clones plus petits et le tCFA15 n'affecte ni leur nombre ni leur aspect.

Nous avons observé que le tCFA15 provoque une diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5* dans les cellules C11 et dans les cellules DTU (Figure 17A). Nous avons également examiné par Western Blot le niveau d'expression de NOTCH1. Pour cela, les cellules C11 et DTU ont été traitées pendant 72 h dans les mêmes conditions de culture que pour l'analyse des ARN totaux. Les résultats montrent une chute du taux de la protéine NOTCH1 après traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) (Figure 17B).

#### **2.1.4. Effets du tCFA15 sur le phénotype des cellules DTU**

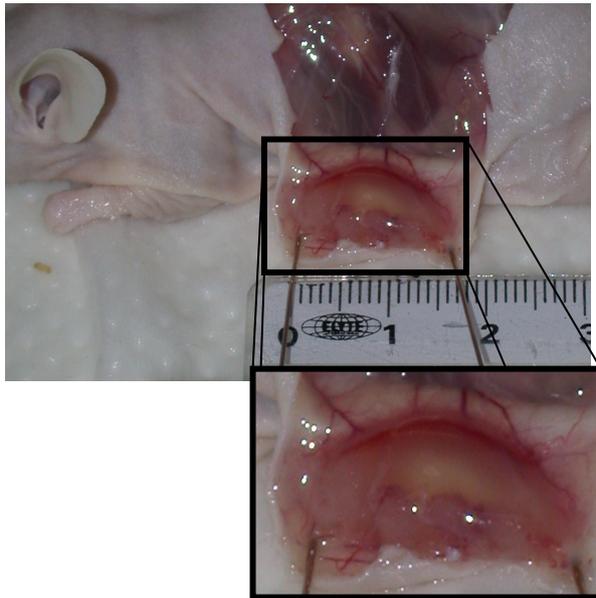
Nous avons examiné l'effet du tCFA15 sur l'aspect phénotypique des cellules DTU in vitro. En culture, ces cellules présentent un aspect caractérisé par la formation de « foyers » (agrégats tridimensionnels de cellules) résultant vraisemblablement de la perte d'inhibition de contact consécutive à la transformation par ras. Après traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M), les cultures présentent un aspect voisin de celui de la lignée témoin C11, avec une diminution de 71% du nombre de « foyers ». Ce résultat indique que la diminution de l'expression de *Notch1* par le tCFA15 est susceptible d'induire une réversion du caractère tumoral, du moins au niveau phénotypique (Figure 18).

Nous avons ensuite examiné la capacité des cellules DTU à proliférer en agarose mou. Elles y forment des colonies, mais après traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) le nombre de colonies chute à 13% par rapport au nombre des colonies formées par les cellules DTU en absence de traitement (100%). Dans les mêmes conditions les cellules C11 forment des clones beaucoup plus petits et le tCFA15 n'affecte ni leur nombre ni leur aspect (Figure 19).

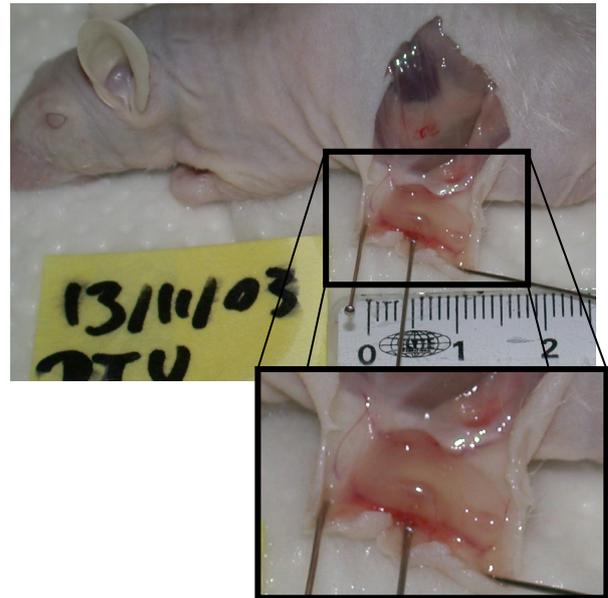
#### **2.1.5. Effets du tCFA15 sur le développement des tumeurs dérivées de cellules DTU**

Enfin, nous avons examiné l'effet du tCFA15 sur la capacité des cellules DTU à générer des tumeurs in vivo. Les lignées transformées par ras (DTU) 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 ont été préalablement traitées au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) in vitro, pendant 3 jours, avant d'être transplantées. Les souris ont ensuite été traitées au tCFA15 ( $5 \cdot 10^{-6}$  M) localement et par injection intrapéritonéale aux jours 5 et 10 après transplantation. Dans tous les cas, le poids des tumeurs traitées au tCFA15 est tombé à 24% de celui des tumeurs témoins (Figure 20).

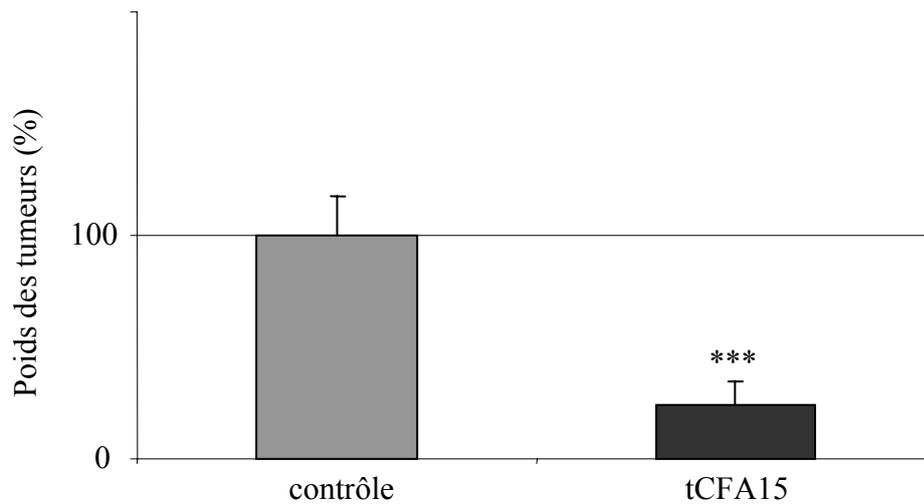
**A.** Souris contrôle



Souris traitée au tCFA15



**B.**



**Figure 20. Effets du tCFA15 sur le développement des tumeurs issues de cellules DTU dans des souris athymiques (nude)**

(A) Les cellules DTU ont été traitées au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) in vitro, pendant 3 jours avant d'être transplantées dans des souris athymiques. Les cellules ont été dissociées, comptées et transplantées bilatéralement par injection sous-cutanée ( $1.10^7$  cellules par point d'injection, dans 200  $\mu$ l de DMEM avec 5% de FBS). Les souris ont ensuite été traitées au tCFA15 ( $5.10^{-6}$  M) localement et par injection intrapéritonéale aux jours 5 et 10. Les animaux ont été sacrifiés au jour 15 après transplantation, et les tumeurs formées ont été disséquées et pesées.

(B) Le poids des tumeurs de cellules DTU traitées au tCFA15 chute à 24% par rapport au poids des tumeurs témoins (non traitées au tCFA15). (n = 4 expériences indépendantes)

### 2.1.6. Conclusion

Nous avons montré que dans des cellules transformées par ras, le tCFA15 inhibe l'expression de *Notch1* et qu'il réduit la tumorigénicité des cellules. Comme il a été rapporté que dans ce type de cellules (transformées par ras), l'activation de Notch1 est nécessaire pour le maintien de la tumorigénicité (Weijzen et al., 2002), on peut supposer que l'effet du tCFA15 passe dans ce cas par l'inhibition de l'expression de Notch1. Il faudra le démontrer par les méthodes utilisées dans le chapitre 1, par exemple en traitant simultanément les cellules au tCFA15 et à l'ICN1 en même temps pour voir si l'effet du tCFA15 est annulé. Cependant, quel que soit le mécanisme d'action du tCFA15, cette molécule exerce un effet anti-tumoral, au moins sur ces cellules. Cela laisse espérer la possibilité de son utilisation dans une perspective thérapeutique.

## 2.2. EFFETS DU tCFA15 SUR DES LIGNÉES DE NEUROBLASTOMES, D'OLIGODENDROGLIOMES ET D'ASTROCYTOMES

### Notch1 et lignées tumorales neurales

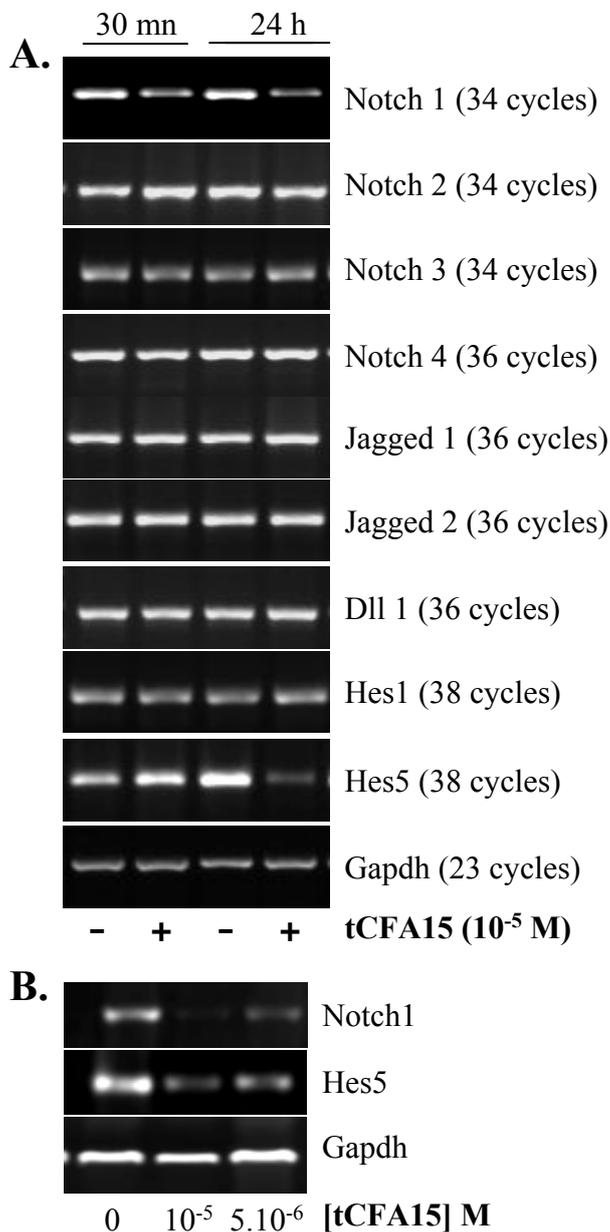
Nous avons montré dans le chapitre 1 que Notch inhibe la différenciation des neurones et des oligodendrocytes tandis qu'il favorise la différenciation des astrocytes.

Nous nous sommes demandés si cette opposition physiologique avait un corollaire pathologique dans les lignées tumorales correspondantes. Nous supposons en effet qu'une diminution de la voie Notch devrait avoir des effets opposés sur les neuroblastomes et oligodendrogliomes, d'une part, et sur les astrocytomes d'autre part.

Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé le tCFA15. Nous avons examiné les effets de la diminution de *Notch1* par le tCFA15 dans trois types de lignées et nous avons examiné 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.

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude détaillée des effets du tCFA15 sur des cellules tumorales de rat ; neuroblastome B104 (Schubert et al., 1974) et glioblastome C6 (Benda et al., 1968) 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 cherché à étendre ces résultats à des lignées humaines de neuroblastome (SHSY-5Y) (Biedler et al., 1973), d'astrocytome (U373) (Ponten et Macintyre, 1968; Lachman et al., 1987) et d'oligodendrogliome (TC620) (Manuelidis et al., 1977), pour tenter de généraliser le rôle de Notch dans ces lignées.

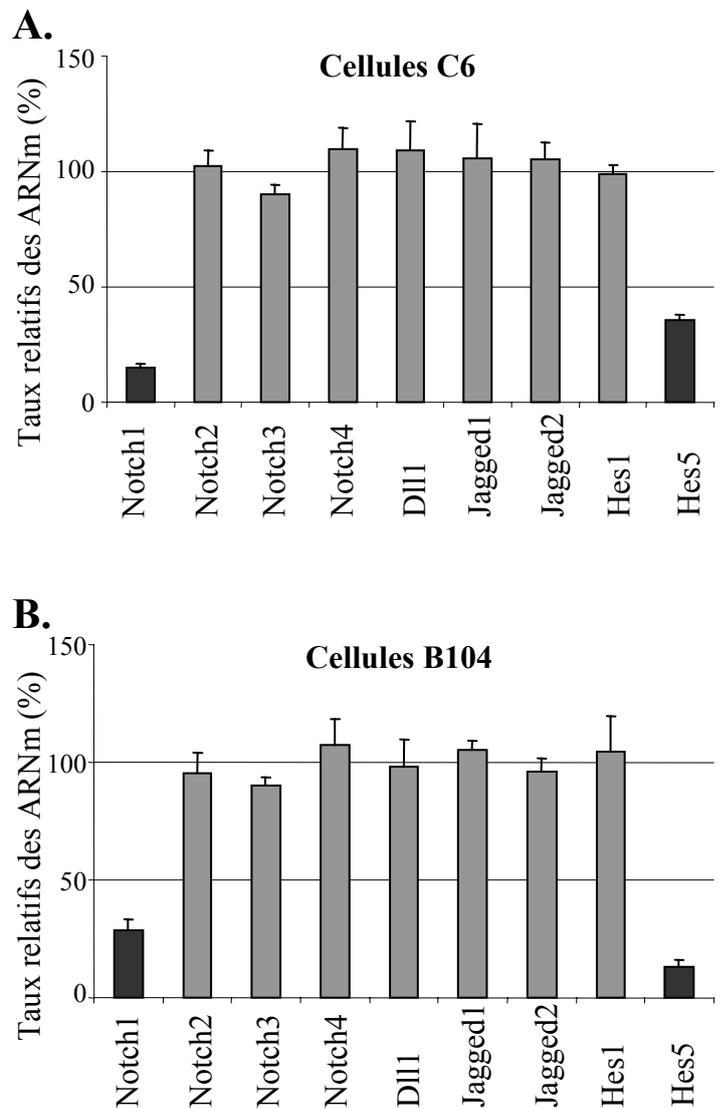


**Figure 21. Effets du tCFA15 sur l'expression des gènes de la voie Notch dans des cellules de glioblastome de rat (lignée C6)**

Les cellules C6 ont été ensemencées dans des boîtes de 60 mm traitées à la poly-L-lysine (300 000 cellules/boîte) dans du milieu DMEM complété avec 5% de FBS. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement. Elles ont été traitées au tCFA15 (10<sup>-5</sup> M) avant extraction des ARN totaux et analyse par RT-PCR semi-quantitative des taux d'expression des principaux gènes de la voie Notch. L'expression de la *Gapdh* a servi de témoin.

(A) Le taux d'expression des gènes de la voie Notch a été analysé à 30 min et 24 h après traitement au tCFA15 (10<sup>-5</sup> M). Nous avons observé une diminution de l'expression de *Notch1* dès 30 mn et jusqu'à 24 h, ainsi qu'une diminution de l'expression de *Hes5* après traitement au tCFA15 à 24 h. L'expression des autres gènes analysés est restée constante.

(B) Des traitements au tCFA15 (5.10<sup>-6</sup> M et 10<sup>-5</sup> M) montrent que les effets du tCFA15 sur la diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5* sont dose-dépendants



**Figure 22. Effets du tCFA15 sur l'expression de gènes de la voie Notch dans les lignées C6 et B104**

Les cellules ont été récoltées après 24 heures de traitement au tCFA15 (10<sup>-5</sup> M). Les PCR ont été effectuées deux fois sur chaque échantillon et les résultats sont exprimés en pourcentage d'expression du gène dans les cellules traitées en comparaison avec les cellules non traitées après normalisation par la *Gapdh*. (n = 5 expériences indépendantes pour la lignée C6 et n = 3 expériences indépendantes pour la lignée B104)

On observe une diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5* dans les cellules C6 (à 15% pour *Notch1* et à 36% pour *Hes5*) (A), et dans les cellules B104 (à 28% pour *Notch1* et à 13% pour *Hes5*) (B) après traitement au tCFA15. L'expression des autres gènes analysés reste constante.

## 2.3. EFFETS DU tCFA15 SUR DES CELLULES DE GLIOBLASTOME DE RAT (C6) ET DE NEUROBLASTOME DE RAT (B104)

### 2.3.1. Lignées C6 et B104

Les cellules C6 dérivent clonalement d'une tumeur de rat qui a été induite chimiquement par la méthyle nitrosourée. Ces cellules sont classées dans la catégorie des glioblastomes-astrocytomes d'après leur aspect phénotypique proche de celui des fibroblastes, tout en étant en partie GFAP-positives. Elles expriment également une protéine que l'on trouve principalement dans les astrocytes, la protéine S100b.

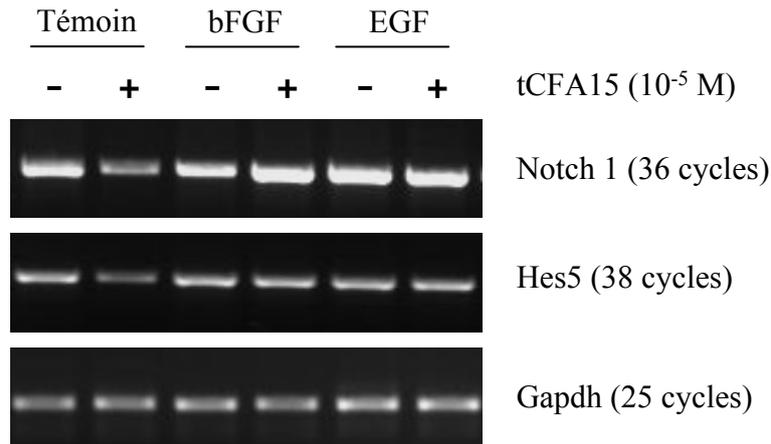
Les cellules B104 sont classées dans la catégorie des neuroblastomes d'après leur caractérisation phénotypique. L'aspect cellulaire est proche de celui des neuroblastes.

Nous avons optimisé les conditions de culture et de traitement au tCFA15 pour ces deux lignées. Comme pour les cellules C11 et les DTU, les cellules C6 et les B104 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.

### 2.3.2. Expression des gènes de la voie Notch dans les lignées C6 et B104, 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 ( $10^{-5}$  M) 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 (Figure 21A). 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 22). Après traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) l'expression de *Hes5* avait diminué à 36% dans les cellules C6, et à 13% dans les cellules B104, résultats allant dans le sens de ceux obtenus dans les neurosphères. L'expression des autres gènes analysés est constante (Figure 22). Des traitements au tCFA15 à deux concentrations ( $5 \cdot 10^{-6}$  M à  $10^{-5}$  M) ont montré que les effets du tCFA15 sur la diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5* sont dose-dépendants (Figure 21B).

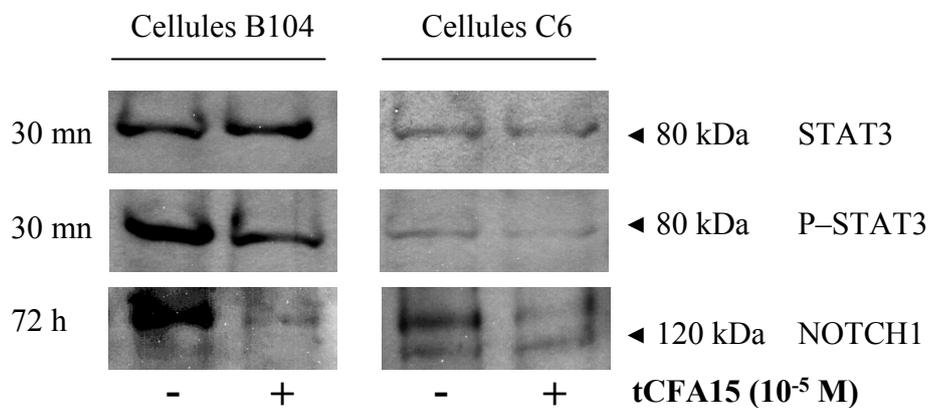
Dans ces expériences, les effets du tCFA15 sur l'expression de *Notch1* et de *Hes5* observés dans les cellules C6 et B104 étaient similaires mais plus forts que ceux observés avec les neurosphères



**Figure 23. Effets du bFGF et de l'EGF sur la diminution de l'expression de Notch1 après traitement au tCFA15, dans les cellules C6**

Les cellules C6 ont étéensemencées dans des boîtes de 60 mm traitées à la poly-L-lysine (300 000 cellules/boîte), dans du milieu DMEM défini (sans sérum) mais complété pour permettre la survie des cellules. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement. Les cellules ont été traitées pendant 24 h - tCF15 (10<sup>-6</sup>M), bFGF (10 ng/ml), EGF (20 ng/ml) - avant extraction des ARN totaux et analyse des taux d'expression des gènes *Notch1* et *Hes5* par RT-PCR semi-quantitative. L'expression du gène de la *Gapdh* a servi de référence.

On observe une diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5* sous l'effet du tCFA15. Cette diminution est abolie en présence de bFGF ou d'EGF.



**Figure 24. Effets du tCFA15 sur les taux de NOTCH1 et sur la phosphorylation de STAT3 dans les cellules C6 et les B104**

Western Blot. Les cellules C6 et B104 ont étéensemencées dans des boîtes de 60 mm traitées à la poly-L-lysine (300 000 cellules/boîte), dans du milieu DMEM complété avec 5% de FBS. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h avant le début du traitement. Elles ont été traitées au tCFA15 (10<sup>-5</sup>M) et récoltées après 30 minutes pour analyser le taux de phosphorylation de STAT3 et après 72 heures pour analyser le taux d'expression de NOTCH1 par Western Blot. 30 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits.

On observe une diminution du taux de NOTCH1 intracellulaire et de la phosphorylation de STAT3 après traitement au tCFA15 (10<sup>-5</sup> M). L'expression de STAT3 est la même avec ou sans traitement au tCFA15.

(chapitre I). Nous nous sommes demandés si les différences, dans les conditions de milieu de culture, entre les lignées tumorales et les neurosphères pouvaient expliquer les différences quantitatives de réponses au tCFA15. En effet, le milieu de culture des cellules C6 et B104 ne contient pas d'EGF, contrairement au milieu de culture des neurosphères. Par contre, il contient 5% de FBS. Or il a été décrit que l'EGF ou le bFGF augmentent l'expression de *Notch1* (Faux et al., 2001). Nous avons alors traité des cellules C6 au tCFA15 dans du milieu DMEM sans aucun complément. Nous avons observé une diminution de l'expression de *Notch1*, à condition de baisser la concentration de tCFA15 à  $10^{-6}$  M. En effet, dans ces conditions de culture, le tCFA15 est toxique à la concentration utilisée auparavant ( $10^{-5}$  M). Puis nous avons testé l'effet du bFGF (10 ng/ml) et de l'EGF (20 ng/ml) sur l'expression de *Notch1*. Nous avons trouvé qu'aussi bien le bFGF que l'EGF abolissent l'effet de tCFA15, suggérant que le mécanisme d'action du tCFA15 pourrait passer par la voie de signalisation de ces facteurs de croissance ou bien que le taux d'expression de *Notch1* qui augmente sous l'effet du bFGF ou de l'EGF pourrait être un facteur limitant l'efficacité du tCFA15 (Figure 23). Des études complémentaires sont en cours.

### **2.3.3. Effets du tCFA15 sur la phosphorylation de STAT3 dans les cellules C6 et B104**

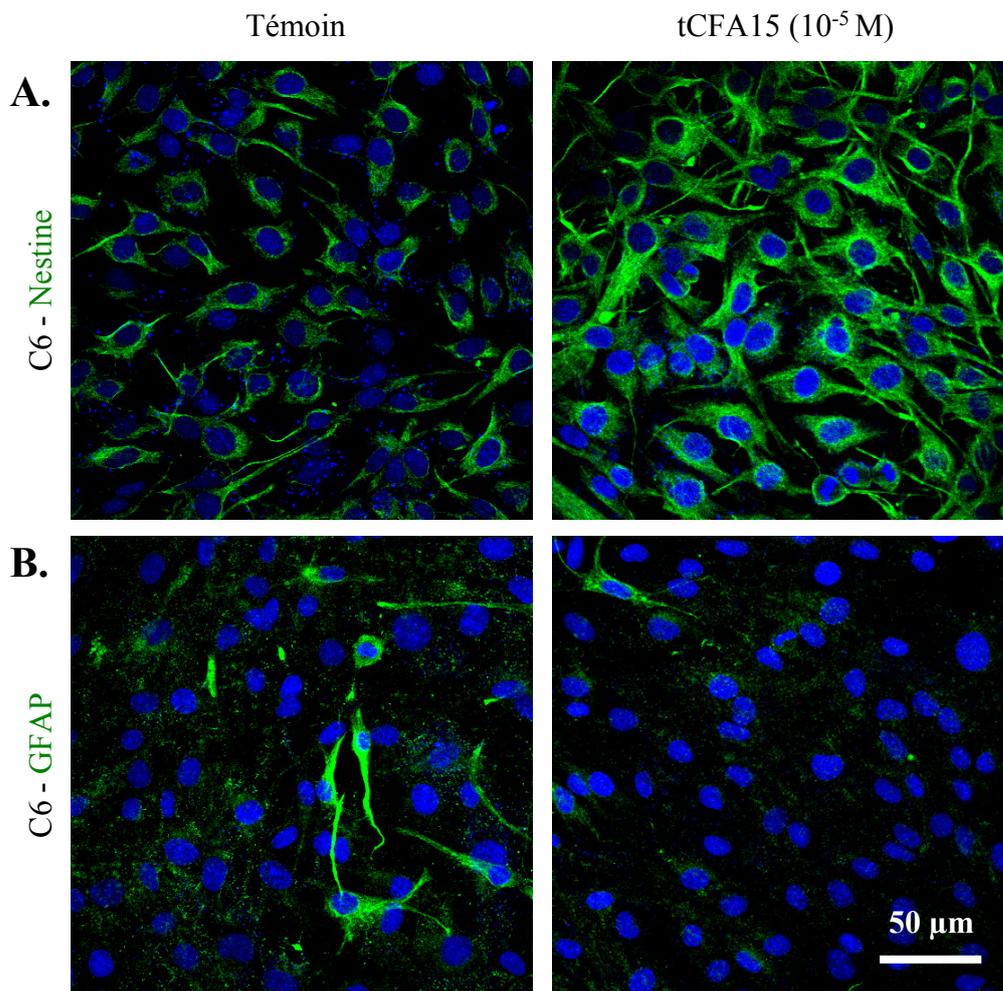
Nous avons montré que, dans les neurosphères (chapitre I), le tCFA15 inhibe l'expression de *Notch1* par l'intermédiaire d'une inactivation de STAT3. Nous avons testé si ce mécanisme d'action du tCFA15 fonctionnait aussi dans les cellules C6 et B104. Pour cela nous avons d'abord examiné par Western Blot si la diminution de *Notch1* se reflétait au niveau protéique. Nous avons trouvé, en accord avec nos résultats dans les neurosphères, que le traitement au tCFA15 induisait une diminution de la protéine NOTCH1 dans les cellules C6 et B104. Nous avons également observé une diminution de STAT3 phosphorylé (Tyr705) dans les deux types cellulaires (Figure 24). 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.

### **2.3.4. Effets phénotypiques de la diminution de l'expression de *Notch1* induite par le tCFA15 dans les cellules C6 et B104**

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

Dans un premier temps nous avons étudié l'effet de la diminution de l'expression de *Notch1* par le 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  $\beta$ 3-tubuline pour les neurones, la GFAP pour les astrocytes, et la nestine pour les cellules indifférenciées.

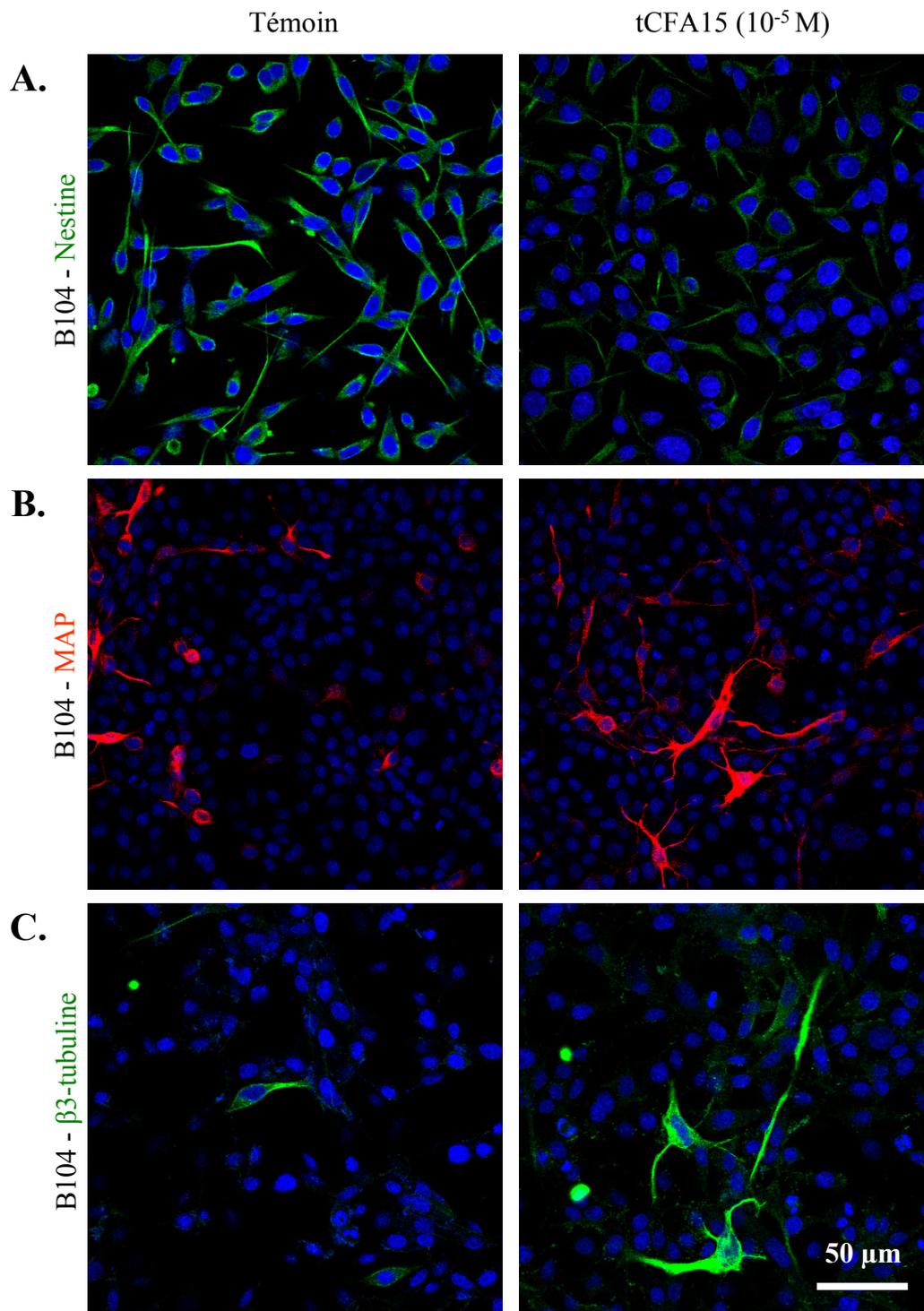
Dans les cellules C6, le tCFA15 induit une diminution faible mais significative du nombre des cellules GFAP-positives et inversement une augmentation de la proportion de cellules positives



**Figure 25. 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).

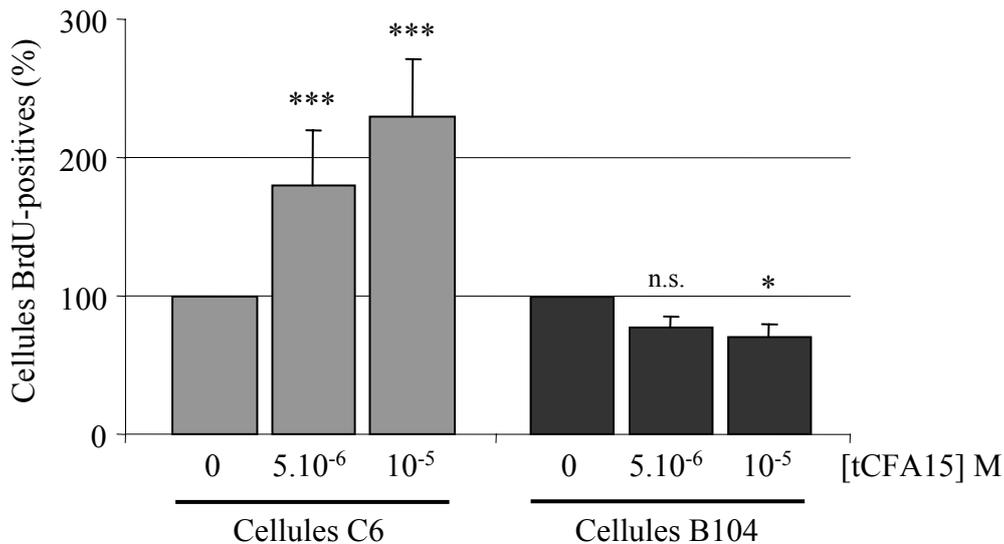
Le tCFA15 induit une augmentation du nombre des cellules positives à la nestine et une augmentation de l'intensité de ce marquage, ainsi qu'une diminution du nombre des cellules positives à la GFAP.



**Figure 26. Effets du tCFA15 sur la différenciation des cellules B104**

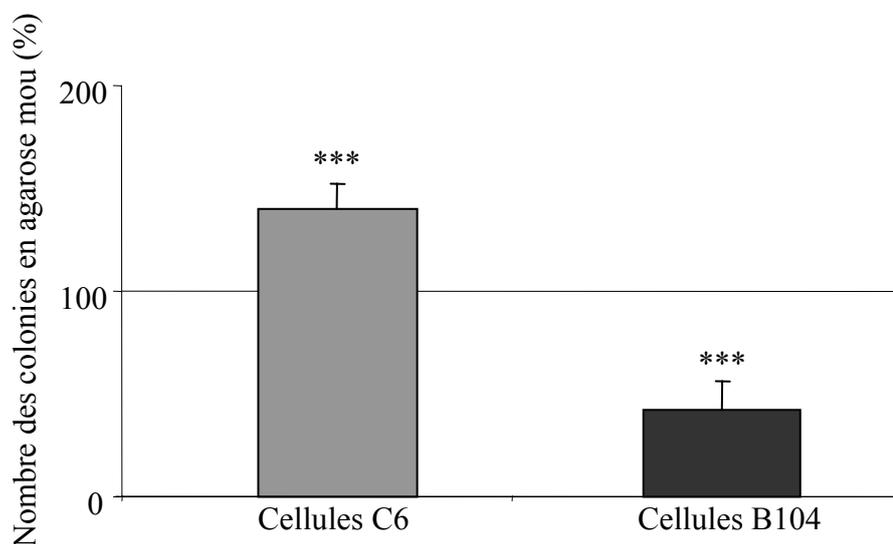
Les cellules ont été traitées comme décrit dans la Figure 25. La nestine pour les cellules indifférenciées (vert) (A), la MAP(2a+2b) pour les neurones (rouge) (B) et la  $\beta$ 3-tubuline pour les neurones (vert) (C) ont été utilisées comme marqueurs de différenciation. Les noyaux sont marqués au TOPRO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

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



**Figure 27. 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 l'incorporation de la BrdU dans les cellules C6 tandis qu'il provoque une diminution de l'incorporation de la BrdU dans les cellules B104.



**Figure 28. Effets du tCFA15 sur le nombre des colonies formées par les cellules C6 et B104 en agarose mou**

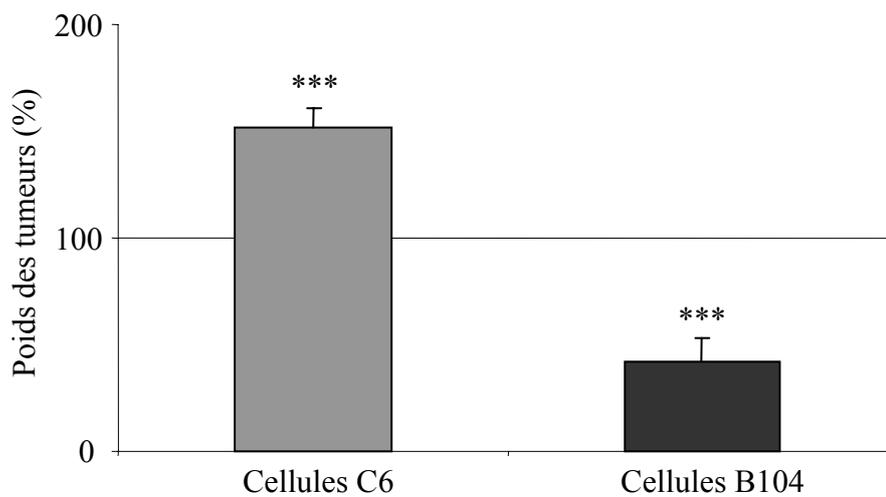
Les cellules C6 et B104 ont été traitées comme décrit dans la Figure 19. (n = 4 expériences indépendantes). On observe une augmentation du nombre des colonies formées par les cellules C6 à 140% après traitement au tCFA15 en comparaison avec les témoins, tandis que le nombre des colonies formées par les cellules B104 chute à 42%.

pour la nestine (Figure 25). 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  $\beta$ 3-tubuline-positives et une diminution de la proportion de cellules positives pour la nestine (Figure 26). Le tCFA15 diminue de façon similaire l'expression de *Notch1* dans les cellules C6 et B104. En revanche, les effets phénotypiques de cette diminution de *Notch1* sont opposés dans les cellules C6 et les B104 et semblent concerner le degré de différenciation des ces deux lignées. Il apparaît ainsi que la diminution de *Notch1* induit la différenciation du neuroblastome B104 alors qu'elle augmente la proportion des cellules indifférenciées (nestine positives) dans le gliome C6. Ces observations sont en accord avec le rôle physiologique de la voie Notch dans la différenciation des astrocytes et des neurones.

#### 2.3.4.2. Effet du tCFA15 sur la prolifération in vitro 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 leur prolifération. Nous avons examiné par des tests d'incorporation de la BrdU les effets de la diminution de *Notch1* sur la prolifération des cellules C6 et B104. Nous avons observé une augmentation de l'incorporation de la BrdU dans les cellules C6, tandis que dans les B104 une faible diminution de l'incorporation de la BrdU a été induite par le tCFA15 ( $10^{-5}$  M) (Figure 27). Nos résultats avaient montré que le tCFA15 induisait une diminution de l'expression de *Notch1* dans les cellules C6 et dans les cellules B104. Cette diminution de *Notch1* a des conséquences opposées sur ces deux types cellulaires : elle stimule la différenciation des B104 d'après l'augmentation des cellules Map(2a+2b) et  $\beta$ 3-tubuline positives et la diminution des cellules indifférenciées exprimant la nestine. Cet effet sur la différenciation s'accompagne d'une diminution faible mais significative de la prolifération. Inversement, la diminution de *Notch1* inhibe la différenciation des C6 comme le montrent l'augmentation des cellules nestine-positives et la diminution des cellules GFAP-positives. Cet effet s'accompagne d'une augmentation de la prolifération des C6.

Les lignées tumorales sont caractérisées par leur capacité à proliférer en agarose mou, dans lequel elles forment des 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 (Figure 28). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par incorporation de BrdU.



**Figure 29. Effets du tCFA15 sur le développement des tumeurs de cellules C6 et B104 dans des souris athymiques**

Les cellules C6 et B104 ont été traitées comme décrit dans la Figure 20. (n = 3 expériences indépendantes)

Nous observons que le poids des tumeurs générées après injection des cellules C6 augmente à 152% quand celles-ci sont traitées au tCFA15. Par contre, le poids des tumeurs générées par les cellules B104 est réduit à 42% après traitement au tCFA15.

### 2.3.4.3. Effet du tCFA15 sur le développement de tumeurs issues des cellules C6 et B104, dans des souris athymiques

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 intrapéritonéale pendant 15 jours, tous les 5 jours. Nous avons observé que le poids des tumeurs générées après injection des C6 augmente à 152% quand elles sont traitées au tCFA15 par rapport aux témoins non traités. Par contre, le poids des tumeurs générées par les B104 dans les souris chute à 42% après traitement au tCFA15 (Figure 29).

Ces résultats confirment les observations précédentes et montrent qu'une inhibition de *Notch1* induit la différenciation des B104 et inhibe leur prolifération in vitro et in vivo.

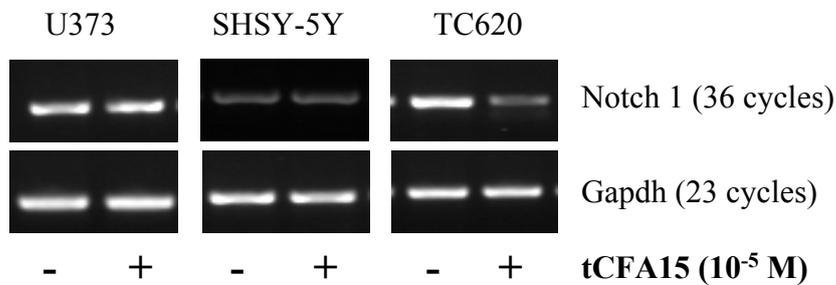
Au contraire, l'inhibition de la voie Notch semble maintenir les C6 dans un état indifférencié et induire leur prolifération in vitro et in vivo.

### **2.3.5. Conclusion**

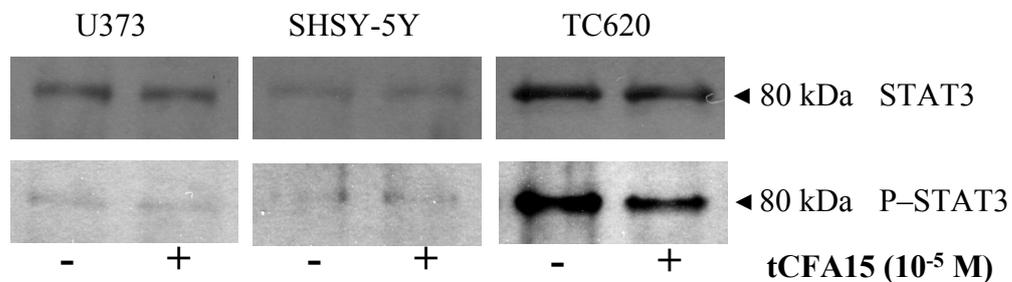
Dans deux lignées de cellules tumorales, un astrocytome et un neuroblastome, le tCFA15 induit une diminution de l'expression de *Notch1* et de *Hes5*. Un tel effet avait déjà été observé dans les divers types cellulaires que nous avons analysés : neurosphères, astrocytes, neurones, précurseurs d'oligodendrocytes et cellules C11 et DTU. Cet effet pourrait donc être général et ne pas dépendre du type cellulaire. Pour le prouver, il faudrait tester un plus grand nombre de types cellulaires divers in vitro, et éventuellement effectuer quelques études in vivo, bien que nos résultats avec les cellules DTU transplantées apportent un élément de réponse positive. Dans ces deux lignées, 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 tumeurs. Cette inhibition pourrait donc ouvrir un large potentiel thérapeutique au tCFA15. Mais ces effets biochimiques n'indiquent rien quant aux effets physiologiques. 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 des deux lignées. Le tCFA15 stimule la différenciation des cellules tumorales neuronales 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 est inhibée.

### A. Taux relatifs d'ARNm (RT-PCR)



### B. Taux des protéines (Western Blot)



### Figure 30. Effets du tCFA15 sur l'expression de Notch1 et la phosphorylation de STAT3 dans les cellules U373, SHSY-5Y et TC620

Les cellules ont été cultivées comme décrit dans la Figure 24.

**(A)** Analyse de l'effet du tCFA15 ( $10^{-5}$  M) sur l'expression de *Notch1* par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules U373, SHSY-5Y et TC620 après 24 h de traitement. L'expression de la *Gapdh* a servi de témoin. Nous observons une chute du taux d'expression de *Notch1* dans les TC620 après traitement au tCFA15. Aucun effet du tCFA15 n'est observé sur le taux d'expression de *Notch1* dans les cellules U373 et SHSY-5Y.

**(B)** Les cellules ont été traitées au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) et récoltées après 30 minutes (en présence d'orthovanadate 5 mM) pour analyser le taux de phosphorylation de STAT3 par Western-Blot. 30  $\mu$ g de protéine ont été déposés par puits.

Nous observons une diminution du taux de phosphorylation de STAT3 après traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) dans les TC620. L'expression de STAT3 est identique avec ou sans traitement au tCFA15. Aucun effet du tCFA15 n'est observé sur le taux de phosphorylation de STAT3 dans les U373 et les SHSY-5Y.

## 2.4. EFFETS DU tCFA15 SUR DES LIGNÉES TUMORALES HUMAINES DU SYSTEME NERVEUX

Nous avons examiné si les effets du tCFA15 sur les cellules C6 et B104 pouvaient être étendus 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).

### 2.4.1. Lignées SHSY-5Y, TC620 et U373

Les cellules U373 ont une morphologie proche des cellules épithéliales et sont classées dans la catégorie des glioblastomes-astrocytomes de niveau III. Elles expriment très fortement la nestine, ce qui suggère un faible degré de différenciation.

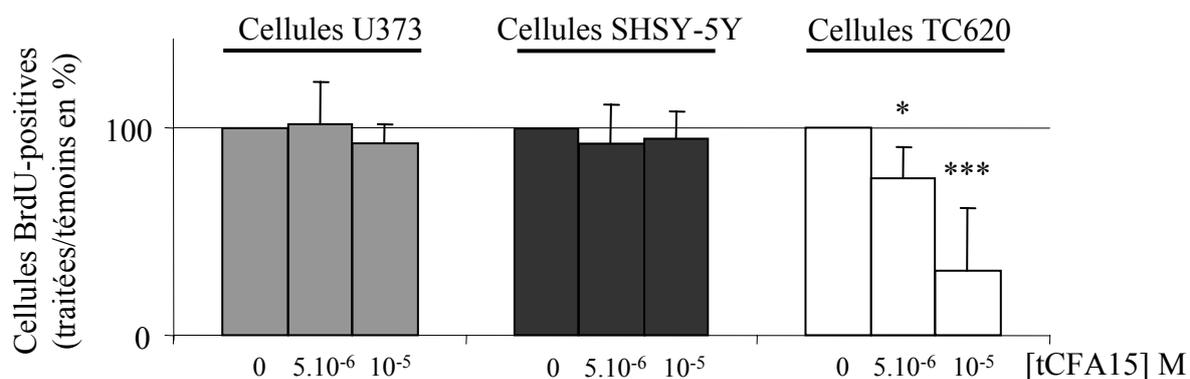
Les SHSY-5Y sont classées dans la catégorie des neuroblastomes d'après leur caractérisation morphologique, proche de celle des neuroblastes.

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

En suivant le même protocole que pour les cellules C6 et B104, nous avons déterminé par des tests de mortalité cellulaire (test MTT et Live Dead Viability Cytotoxicity kit) que le tCFA15 n'est significativement toxique qu'à partir de  $10^{-4}$  M pour ces cellules.

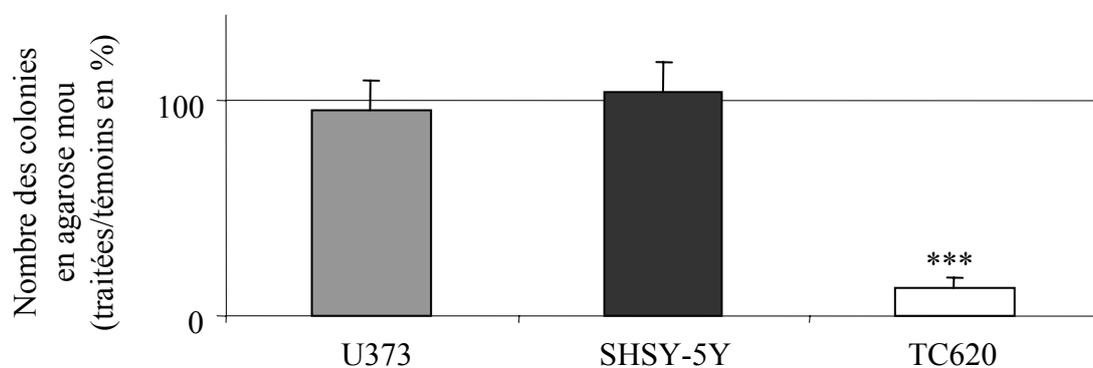
### 2.4.2. Expression des gènes de la voie Notch et phosphorylation de STAT3 dans les lignées SHSY-5Y, TC620 et U373, effets du tCFA15

Nous avons analysé par RT-PCR semi-quantitative le taux d'expression de *Notch1* dans ces trois lignées avec ou sans traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$  M). Nous avons observé une diminution de l'expression de *Notch1* dans les cellules TC620, mais pas dans les U373 et les SHSY-5Y (Figure 30A). 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 (Figure 30B). Ces résultats suggèrent que le tCFA15 n'agit pas sur les cellules SHSY-5Y et U373, du moins dans nos conditions expérimentales. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour savoir si les deux



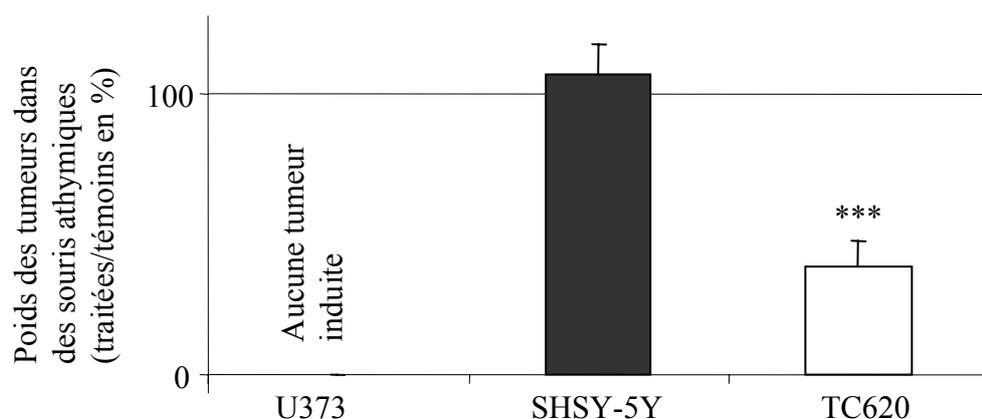
**Figure 31. Effets du tCFA15 sur la prolifération des lignées U373, SHSY-5Y et TC620**

Les cellules U373, SHSY-5Y et TC620 ont été traitées comme décrit dans la Figure 27. (n=3 expériences indépendantes). On observe une diminution de l'incorporation de la BrdU dans les cellules TC620. Aucun effet du tCFA15 sur l'incorporation de la BrdU n'est observé dans les cellules U373 et SHSY-5Y.



**Figure 32. 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 19. (n = 3, 3 et 4 expériences indépendantes pour les lignées U373, SHSY-5Y et TC620 respectivement). On observe que le nombre des colonies formées par les U373 et les SHSY-5Y avec ou sans traitement au tCFA15 (10<sup>-5</sup> M) est stable. En revanche, le nombre de colonies formées par les cellules TC620 après traitement au tCFA15 (10<sup>-5</sup> M) chute à 13%, en comparaison avec les conditions témoins fixées à 100%.



**Figure 33. 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 20. (n = 3 expériences indépendantes). Les cellules U373 injectées n'ont pas donné de tumeurs jusqu'à 45 jours après transplantation. Le poids des tumeurs générées par les cellules SHSY-5Y est resté le même, avec ou sans traitement au tCFA15. En revanche, après traitement au tCFA15, le poids des tumeurs générées par les cellules TC620 chute à 39% de celui des tumeurs témoins (non traitées au tCFA15).

lignées réfractaires à l'effet du tCFA15, les SHSY-5Y et U373, le sont pour des raisons pratiques (conditions de culture ou de traitement) ou pour des raisons plus fondamentales, le mécanisme d'action du tCFA15 étant inopérant en raison d'altérations fonctionnelles propres à ces cellules tumorales.

#### **2.4.3. 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 les SHSY-5Y tandis que l'incorporation de la BrdU chutait dans les TC620 (Figure 31).

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 ( $10^{-5}$ M). En revanche, le nombre des colonies formées par les cellules TC620 après traitement au tCFA15 ( $10^{-5}$ M) chute à 13% en comparaison avec les conditions témoins fixées à 100% (Figure 32).

#### **2.4.4. 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. Ces cellules ont été traitées au tCFA15 ( $10^{-5}$  M) in vitro, pendant 3 jours avant d'être injectées dans les souris. Les souris ont ensuite été traitées au tCFA15 ( $5.10^{-6}$  M) localement et par injection intrapéritonéale pendant 15 jours, tous les 5 jours. Les cellules U373 injectées n'ont pas formé de tumeurs après 45 jours. 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 à 39% après traitement au tCFA15 (Figure 33).

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 ( $10^{-5}$  M), sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle une inactivation de la voie Notch (qui inhibe la différenciation des oligodendrocytes) pourrait induire la différenciation des cellules des oligodendrogliomes et par conséquent inhiber leur prolifération.

## 2.5. CONCLUSION

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 attendrait si la voie Notch exerce sur les cellules tumorales des effets semblables à ceux qu'elle exerce sur les cellules saines du même type.

## Chapitre 3

---

### Interactions réciproques entre les cellules endothéliales et les neurosphères

---

---

### **3. INTERACTIONS RÉCIPROQUES ENTRE LES CELLULES ENDOTHÉLIALES ET LES NEUROSPHÈRES**

---

Ce travail, a été effectué au laboratoire du Dr. Asahara (RIKEN, Japon) au début de 2004 et a été financé par une bourse de la Société Japonaise pour la Promotion de la Science (JSPS) d'une durée de 3,5 mois. Certains résultats présentés ont été entre temps publiés par d'autres auteurs. Les autres résultats seront développés en vue de leur publication en collaboration avec le Dr. Asahara.

## 3.1. INTRODUCTION

### 3.1.1. Cellules souches neurales tumorales et angiogénèse

De nombreux travaux suggèrent que les gliomes et neuroblastomes seraient issus de la cancérisation des cellules souches neurales (CSN) (Lewis, 1968; Oliver et Wechsler-Reya, 2004; Singh et al., 2004; Walton et al., 2004). Ces cellules seraient les véritables cellules tumorales, proliférant activement et donnant naissance à une descendance de cellules plus ou moins différenciées selon le contexte génétique et épigénétique (Berger et al., 2004; Galli et al., 2004; Yuan et al., 2004). Par ailleurs, on sait que la néovascularisation est indispensable au maintien et au développement des tumeurs solides et qu'elle est favorisée par la sécrétion de VEGF-A par les cellules tumorales (Samoto et al., 1995; Chaudhry et al., 2001). Cette vascularisation est particulièrement importante dans le cas des glioblastomes multiformes qui sont produits à partir de cellules très peu différenciées. Dès 1971 Folkman et collaborateurs proposaient la thérapie anti-angiogénique comme un traitement prometteur contre le cancer (Folkman, 1971). Cette stratégie est exploitée dans diverses directions en vue de limiter le développement tumoral, en particulier dans le cas des tumeurs cérébrales (Jansen et al., 2004; Takano et al., 2004; Farhadi et al., 2005).

Il est admis que la néovascularisation associée aux tumeurs se développe par l'intermédiaire de précurseurs de cellules endothéliales (PCE) soit déjà présents dans les vaisseaux en croissance, soit circulants (Iwami et al., 2004). Ceux-ci sont dirigés vers la tumeur par chemoattraction, par l'intermédiaire de facteurs sécrétés par la tumeur comme le PDGF, le VEGF, l'angiogénine-1 ou l'Il-8 (Eberle et al., 2000; Annabi et al., 2004; Brat et al., 2005).

Dans certaines conditions, les CSN peuvent donner naissance à quelques types cellulaires non nerveux comme des cellules musculaires, *in vitro* (Tsai et McKay, 2000; Oishi et al., 2002) et des cellules hématopoïétiques, *in vivo* (Harder et al., 2004; Mokry et al., 2005). Comme nous avons vu plus haut que de nombreuses tumeurs cérébrales pourraient dériver de CSN tumorales, nous nous sommes demandés si ces CNS tumorales ne pourraient pas conserver cette multipotentialité et produire elles-mêmes des cellules endothéliales qui contribueraient à la néovascularisation et si la voie de signalisation Notch était impliquée dans ces mécanismes.

### 3.1.2. Modèles d'étude

Comme nous ne disposons pas de CSN tumorales, nous avons utilisé comme premier modèle d'approche, un modèle de développement constitué de CSN normales. En pratique, on ne

dispose pas de CSN isolées in vitro mais de neurosphères, qui dérivent clonalement des cellules souches neurales et qui contiennent 5% de CSN. Ce modèle permet d'aborder la question de savoir si, au cours du développement, les CSN pourraient également donner naissance à des cellules endothéliales.

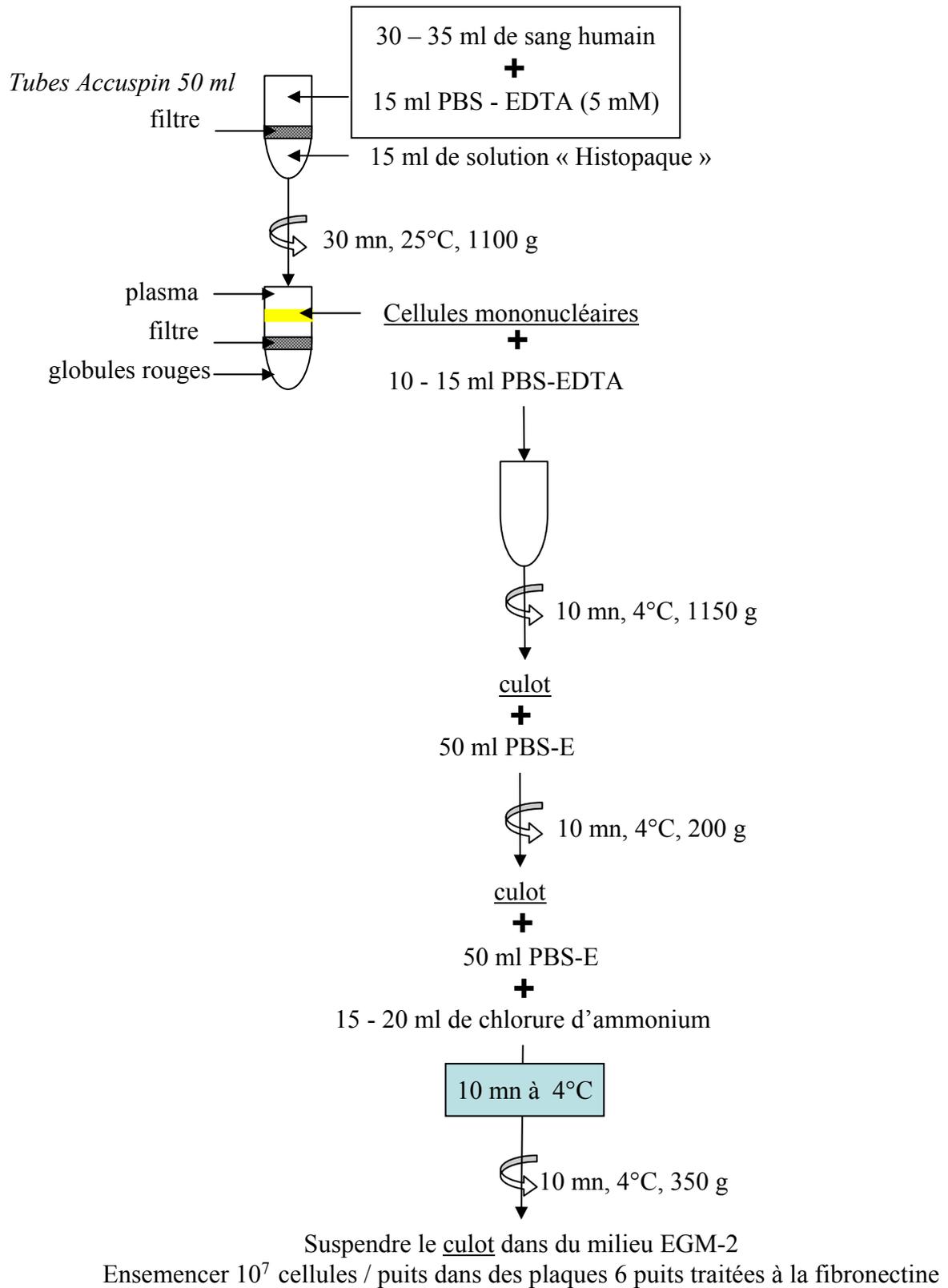
Pendant le développement, et chez l'adulte, les CSN sont situées dans une niche richement vascularisée, en contact direct avec la paroi de vaisseaux sanguins (Doetsch, 2003). Des signaux induisant la différenciation des CSN en cellules endothéliales (CE) pourraient provenir de CE différenciées présentes dans ces vaisseaux ou de précurseurs de CE (PCE) présents dans la paroi des vaisseaux ou dans la circulation sanguine (Asahara et al., 1997) puisqu'une néovascularisation est déjà en cours.

Pour tester ces hypothèses, nous avons mis au point des systèmes de cocultures cellules endothéliales/neurosphères et PCE/neurosphères, avec ou sans contacts intercellulaires.

### **3.1.3. Mécanismes des interactions cellules endothéliales/neurosphères**

La voie Notch est impliquée dans le processus de différenciation de cellules souches. Certains membres de la voie Notch sont connus pour participer au développement des cellules du SNC, par exemple Notch1 et Dll1 sont impliqués à différents niveaux dans le maintien des cellules souches neurales ainsi que dans le déterminisme neurones/cellules gliales et dans la différenciation de ces cellules (Tanigaki et al., 2001; Hitoshi et al., 2002; Chojnacki et al., 2003; Grandbarbe et al., 2003). Notch4 et Dll4 sont liés plus spécifiquement au développement des cellules endothéliales (Krebs et al., 2000; Shutter et al., 2000). Dll4 serait essentiel à la néovascularisation des tumeurs car il est faiblement exprimé dans les tissus adultes, mais fortement exprimé dans les tumeurs endogènes ou exogènes (Mailhos et al., 2001). Notch1 et Notch4 sont exprimés dans l'épithélium vasculaire et constituent des récepteurs potentiels pour Dll4 (Shutter et al., 2000).

Dans le travail présenté, nous avons étudié l'expression de ces quatre gènes de la voie Notch dans le système de coculture cellules endothéliales/neurosphères.



**Figure 34. Protocole de purification des précurseurs de cellules endothéliales (PCE)**

## 3.2. MATERIEL ET METHODES

Pour réaliser ce projet, j'ai du mettre au point un certain nombre de méthodes expérimentales et plus particulièrement le système des cocultures cellules endothéliales/neurosphères.

### 3.2.1. Précurseurs des cellules endothéliales

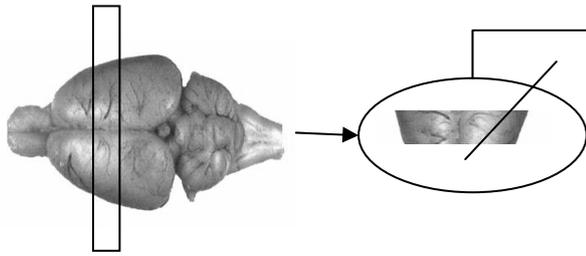
Les précurseurs des cellules endothéliales sont purifiés à partir du sang de volontaires humains par des centrifugations différentielles dans des tubes Accuspin (Sigma). Brièvement, 30 ml de sang sont mélangés avec 15 ml de PBS-EDTA (5 mM) et déposés sur 15 ml de solution Histopaque (Sigma). Après centrifugation (30 mn ; 25°C ; 1100 g) les cellules mononucléaires, contenant les précurseurs des cellules endothéliales sont prélevées à l'aide d'une seringue et après différents cycles de centrifugations elles sont resuspendues dans 5 ml de PBS-EDTA et 15 ml de chlorure d'ammonium. Après centrifugation (10 mn; 4°C; 350 g)  $10^7$  cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits traitées à la fibronectine (Becton Dickinson) dans du milieu EGM-2 (Cambrex) (Figure 34). Après 4 jours, le milieu est changé et la culture est maintenue pendant 7 jours. Les cellules sont dissociées tous les 7 jours pour éviter leur différenciation (Murasawa et al., 2002).

### 3.2.2. Précurseurs des cellules endothéliales totalement différenciées (tdCE)

Lorsque les cultures de PCE sont maintenues à long terme dans le milieu EGM-2 (Bioscience), on observe l'apparition de clones de PCE totalement différenciés identifiables au microscope à fluorescence par une coloration au 1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate (acLDL-DiI). En effet, les cellules endothéliales totalement différenciées (tdCE) se colorent modérément au bout d'une heure avec 20 µg/ml d'acLDL-DiI alors que les PCE se colorent fortement après 30 minutes avec 5 µg/ml d'acLDL-DiI. Les cellules non endothéliales ne se colorent pas (Murasawa et al., 2002). Les tdCE sont dissociées tous les 7 jours à la trypsine et réensemencées ou congelées.

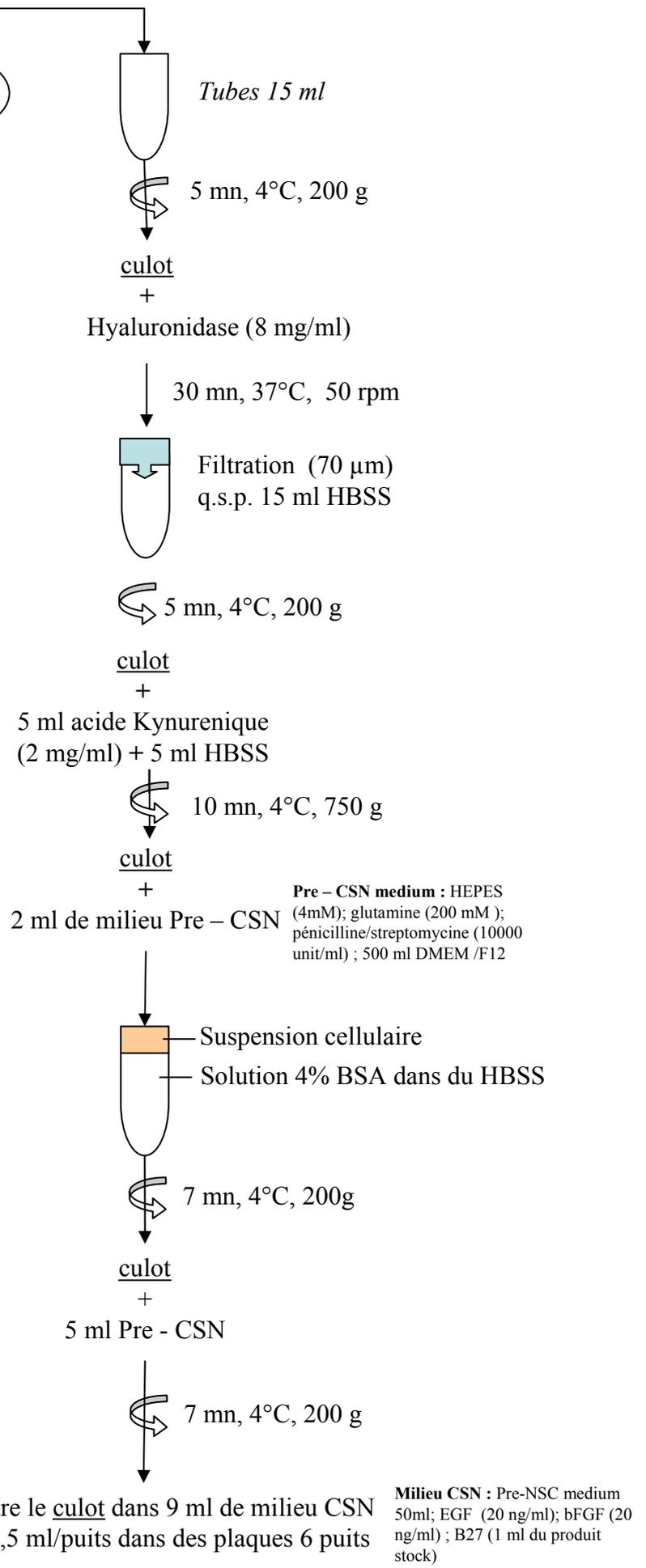
### 3.2.3. Cellules souches neurales adultes

Les neurosphères sont préparées à partir de cerveau de souris âgées de 3 à 8 semaines. Brièvement, les animaux sont anesthésiés au penthobarbital et le sang circulant est aspiré dans le ventricule gauche. Le cerveau est extrait et la partie antérieure est prélevée. Les cellules sont dissociées mécaniquement. Après une série de centrifugations différentielles, les cellules sontensemencés dans des plaques 6 puits (Costar) et cultivées dans du milieu DMEM-F-12 complémenté avec 20 ng/ml d'EGF humain (Roche), 20 ng/ml de bFGF (Roche) et 2% de



**Figure 35. Protocole de purification des cellules souches neurale (CSN)**

Les neurosphères sont obtenues à partir de cerveau de souris âgés de 3 à 8 semaines. Le cerveau est extrait et la partie subventriculaire est prélevée. Après centrifugations différentielles les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits et cultivées dans du milieu DMEM-F-12 complété avec 20 ng/ml d'EGF humain, 20 ng/ml de bFGF et 2% de B-27.



supplément B-27 (Gibco) (Figure 35). Ces compléments sont rajoutés au milieu de culture une fois par semaine jusqu'à apparition des neurosphères en général après 15 ou 30 jours de culture.

### **3.2.4. Cocultures avec contact cellulaire**

Les neurosphères entières, de tailles similaires, sont cultivées sur un tapis de cellules endothéliales (PCE ou tdCE) de 7 jours, à mi-confluence. La proportion est de 1 cellule de neurosphères pour 5 cellules endothéliales.

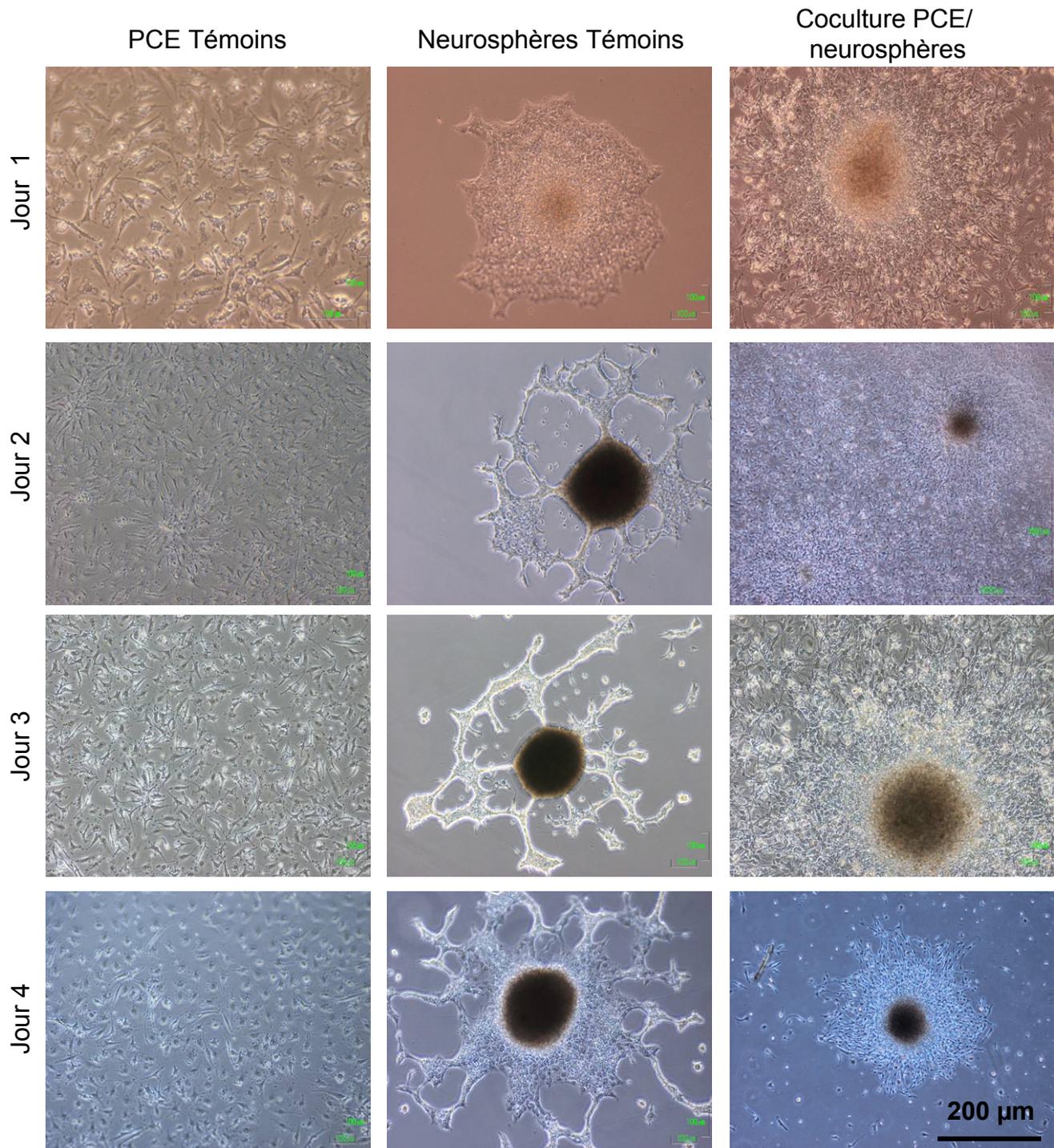
#### 3.2.4.1. Cocultures PCE/neurosphères

Dans un premier temps nous avons dû définir le milieu de coculture. Séparément, les PCE et les neurosphères ont été maintenues dans leurs milieux optimum respectifs. Le milieu choisi pour les cocultures est le DMEM-F12 sans complément. En effet, l'EGF et le bFGF inhibent la différenciation des neurosphères et augmentent l'expression de *Notch1* (Faux et al., 2001) et le VEGF induit les expressions de *Notch1* et de *Dll4* dans les cellules endothéliales (Shutter et al., 2000). Nous avons choisi un milieu neutre, qui n'influence pas l'expression des 4 gènes étudiés (*Dll1*, *Dll4*, *Notch1* et *Notch4*). Dans ces conditions les cocultures ont pu être maintenues jusqu'à quatre jours.

En pratique, 12 jours après leur dissociation, des neurosphères ont été mises à différencier sur un tapis cellulaire de PCE dans des plaques de 6 puits traitées à la fibronectine, dans le milieu DMEM : F12 sans EGF ni bFGF. Des PCE et des neurosphères cultivés séparément, mais dans les mêmes conditions et le même milieu de culture, ont servi de témoins. Les cultures ont été suivies en microscopie optique. Nous avons observé que les neurosphères adhéraient au tapis de PCE et semblaient survivre et se différencier, alors que les neurosphères témoins paraissaient moins bien survivre dans les conditions de culture utilisées (Figure 36).

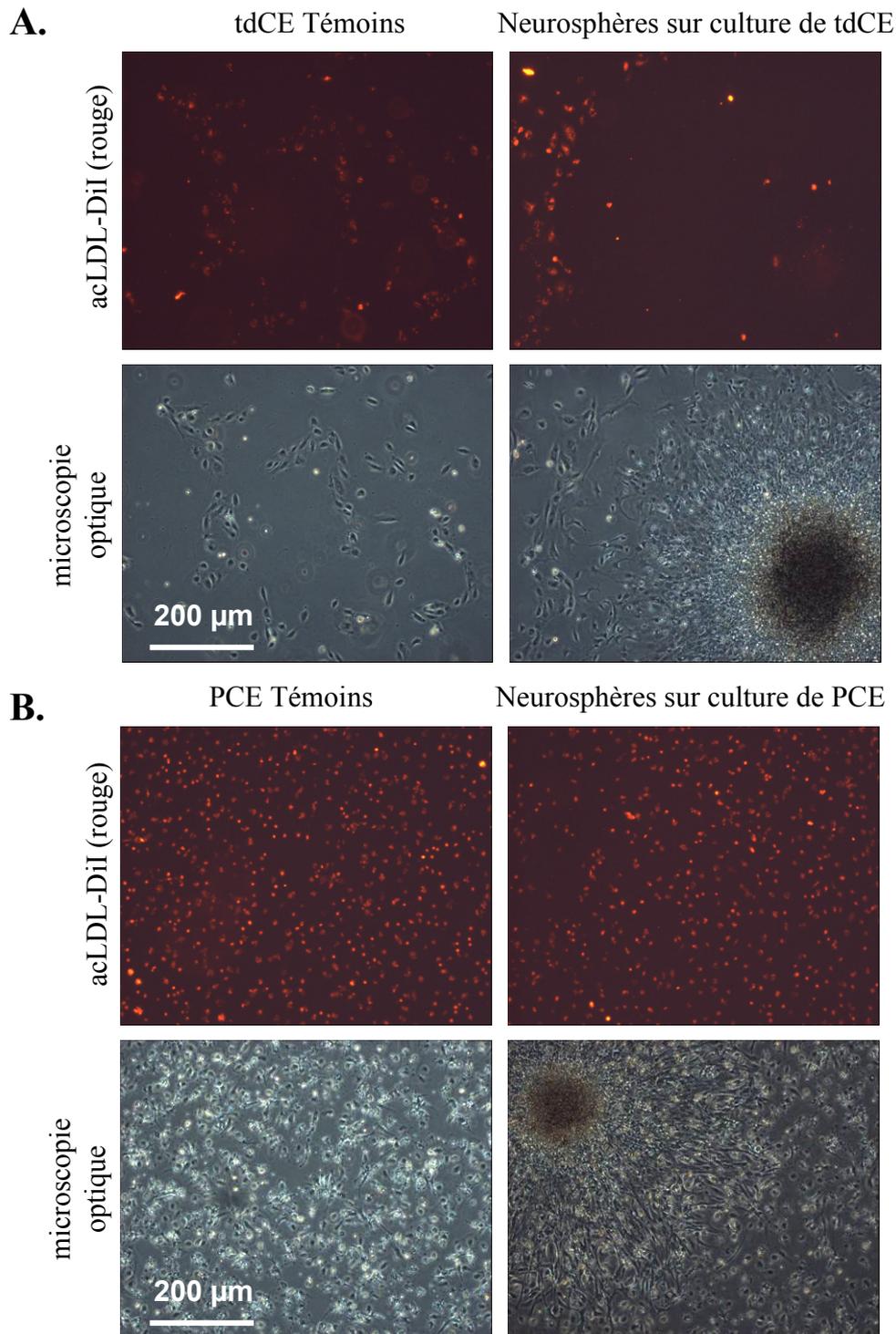
#### 3.2.4.2. Cocultures tdCE/neurosphères

Nous avons mis au point des cocultures de PCE totalement différenciés (tdCE) et de neurosphères. Par observation en microscopie, nous avons trouvé que les neurosphères n'adhèrent pas sur le tapis de tdCE, mais uniquement sur les zones dépourvues de cellules endothéliales. La coloration des cellules endothéliales à l'acLDL-DiI, a montré une limite franche entre les neurosphères et les tdCE en culture (Figure 37A), contrairement à ce qui se passe dans les cocultures avec les PCE, où les neurosphères adhèrent à la couche de PCE (Figure 37B). Aucun marquage à l'acLDL-DiI n'a été observé dans les neurosphères dans les conditions témoins.



**Figure 36. Coculture PCE/neurosphères avec contacts cellulaires**

12 jours après leur dissociation, des neurosphères ont été mises à différencier sur un tapis cellulaire de PCE dans des plaques de 6 puits traitées à la fibronectine, dans le milieu DMEM : F12 sans EGF ni bFGF. Des PCE et des neurosphères cultivées séparément, dans les mêmes conditions et le même milieu de culture, ont servi de témoins. Les cultures ont été observées en microscopie optique. Nous avons observé que les neurosphères adhéraient au tapis de PCE et semblaient survivre et se différencier, alors que les neurosphères témoins paraissaient moins bien survivre dans les conditions de culture utilisées.



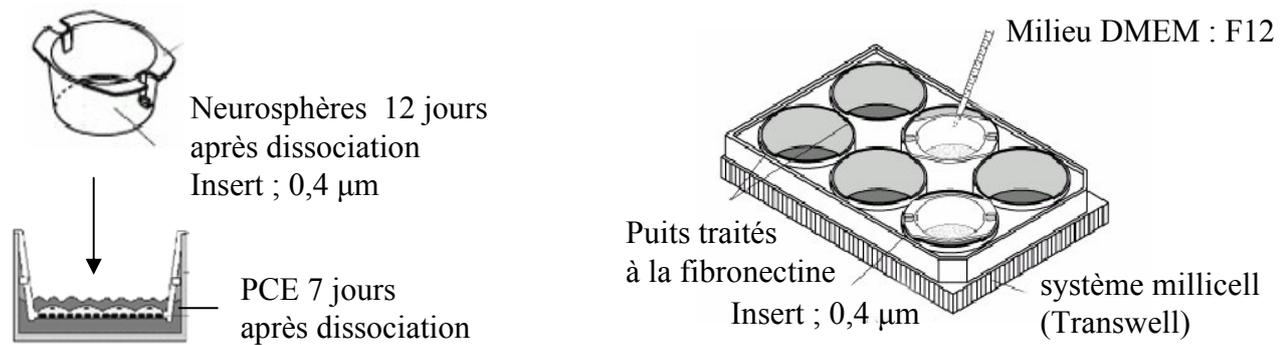
**Figure 37. Cocultures PCE/neurosphères et tdCE/neurosphères avec contacts cellulaires**

Les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles de la Figure 36.

**(A)** Par observation en microscopie, nous avons trouvé que les neurosphères n'adhèrent pas sur le tapis de tdCE, mais uniquement sur les zones dépourvues de cellules endothéliales. La coloration des cellules endothéliales à l'acLDL-DiI (rouge) qui colore exclusivement les cellules vasculaires, a montré une limite franche entre les neurosphères et les tdCE en culture.

**(B)** Dans les cocultures avec les PCE, les neurosphères adhèrent à la couche de PCE.

Aucun marquage à l'acLDL-DiI n'a été observé dans les neurosphères dans les conditions témoins.



**Figure 38. Protocole de coculture sans contact cellulaire**

Les PCE de 7 jours sont cultivés dans des plaques 6 puits traités à la fibronectine. 12 jours après leur dissociation les neurosphères sont cultivées sur la membrane de l'insert. Ainsi, les deux populations cellulaires ne sont pas en contact direct et seules les molécules solubles passent d'un type cellulaire à l'autre.

	séquence (5' - 3')	cycles	fragment (pb)	programme PCR
<b>mNotch1</b>	F CTT GGC TGC CCG ATA CTC TC R TCA CGG CGG ATC GAC AG	42	465	30 s à 94°C, 60 s à 55°C, 30 s à 72°C
<b>mNotch4</b>	F GTT TAG GAT GTC CGG TTG AG R CCA TGA GCT TTC GGG TTC	42	370	30 s à 94°C, 60 s à 55°C, 30 s à 72°C
<b>mDII1</b>	F GCG ATG AGT GCA TCC GAT AC R GCC TCC GTC AGG GTT ATC T	35	400	30 s à 94°C, 60 s à 56°C, 30 s à 72°C
<b>mDII4</b>	F TGC TGG CGG TAC TGT R GTC TGT TCG CCA AAT CTT AC	42	420	30 s à 94°C, 60 s à 62°C, 30 s à 72°C
<b>mGFAP</b>	F GCC CTG AGA GAG ATT CGC ACT CAA T R TCT CGA TGT CCA GGG CTA GCT TAA C	32	514	30 s à 94°C, 180 s à 64°C, 45 s à 72°C
<b>mMAP</b>	F ACG GAC CAC CAG GTC AGA ACC AAT T R GTG GTG AGC ATT GTC AAG TGA GCC A	32	388	30 s à 94°C, 180 s à 64°C, 45 s à 72°C
<b>mGapdh</b>	F TGT TCC AGT ATG ACT CCA CTC ACG G R ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCG TAT T	38	720	30 s à 94°C, 180 s à 64°C, 45 s à 72°C
<b>hNotch1</b>	F CTG GCC GCC CGC TAC TC R AGC ACC TTG GCG GTC TCG TA	35	450	30 s à 94°C, 60 s à 56°C, 30 s à 72°C
<b>hNotch4</b>	F CCA CCA GAG GCC CGT CAC AA R AGG AGG CGG GAT CGG AAT G	42	500	30 s à 94°C, 60 s à 62°C, 30 s à 72°C
<b>hDII1</b>	F TGC GAA TGT GCC CGA AGC TA R CAT TCT TGT CGG CGC TGT G	42	390	30 s à 94°C, 60 s à 62°C, 30 s à 72°C
<b>hDII4</b>	F TGC TGG CGG TAC TGT R GTC TGT TCG CCA AAT CTT AC	42	370	30 s à 94°C, 60 s à 62°C, 30 s à 72°C
<b>hAC133</b>	F CGT GGA TGC AGA ACT TGA CAA C R CAC ACA GTA AGC CCA GGT AGT AAA A	45	365	30 s à 94°C, 60 s à 56°C, 30 s à 72°C
<b>hCD34</b>	F AAT GAG GCC ACA ACA AAC ATC ACA R CTG TCC TTC TTA AAC TCC GCA CAG C	45	380	30 s à 94°C, 60 s à 56°C, 30 s à 72°C
<b>hKDR</b>	F CAA ATG TGA AGC GGT CAA CAA AGT C R ATG CTT TCC CCA ATA CTT GTC GTC T	45	468	30 s à 94°C, 60 s à 56°C, 30 s à 72°C
<b>hGapdh</b>	F CTG ATG CCC CCA TGT TCG TC R CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA TTC G	40	600	30 s à 94°C, 60 s à 55°C, 40 s à 72°C

**Tableau 1. Séquence des amorces et programmes de PCR pour les gènes étudiés**

Les gènes spécifiques, dans les neurosphères, ont été appelés *mNotch1*, *mNotch4*, *mDII1*, *mDII4*, *mGFAP* et *mMAP* (« m » pour murin) et dans le PCE, *hNotch1*, *hNotch4*, *hDII1*, *hDII4*, *hAC133*, *hCD34* et *hKDR* (« h » pour humain). Le gène de la *Gapdh* sert de référence. Les amorces spécifiques pour chaque lignée ont été dessinées avec le logiciel Oligo6.

### 3.2.5. Coculture sans contact cellulaire

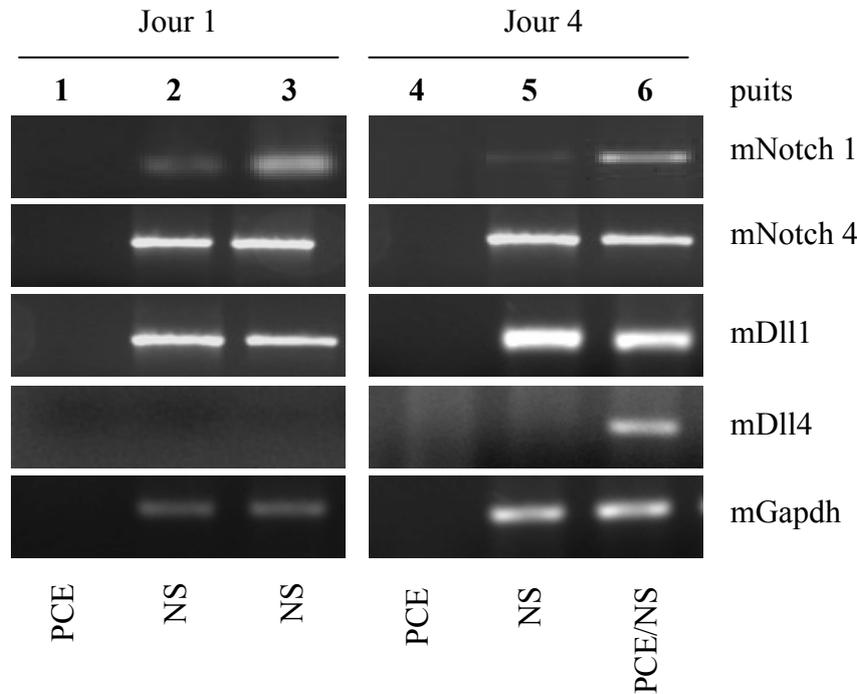
La coculture est réalisée avec le système millicell (Transwell) (Figure 38). Les PCE de 7 jours sont cultivés dans des plaques 6 puits traités à la fibronectine. 12 jours après leur dissociation les neurosphères sont cultivées sur la membrane de l'insert. Ainsi, les deux populations cellulaires ne sont pas en contact direct et seules les molécules solubles passent d'un type cellulaire à l'autre. Toutes les expériences décrites en coculture PCE/neurosphères ou tdEC/neurosphères avec contact cellulaires ont été également effectuées avec le système de coculture millicell (Transwell), sans contacts cellulaires. Les résultats obtenus avec le système de cocultures sans contact cellulaires sont identiques à ceux obtenus avec les cocultures avec contacts cellulaires et ne seront pas représentés sous forme de figure.

### 3.2.6. Milieux conditionnés

Les neurosphères ou les PCE sont cultivées dans du milieu DMEM-F12 pendant 4 jours. Le milieu est alors prélevé, centrifugé à 1000 rpm pendant 8 minutes, et filtré (0,8 µm). Ensuite les neurosphères sont cultivées dans du milieu contenant 30% de milieu conditionné par des PCE, et vice versa, pendant 4 jours. La moitié du milieu est changée après 48 heures.

### 3.2.7. Expression des gènes

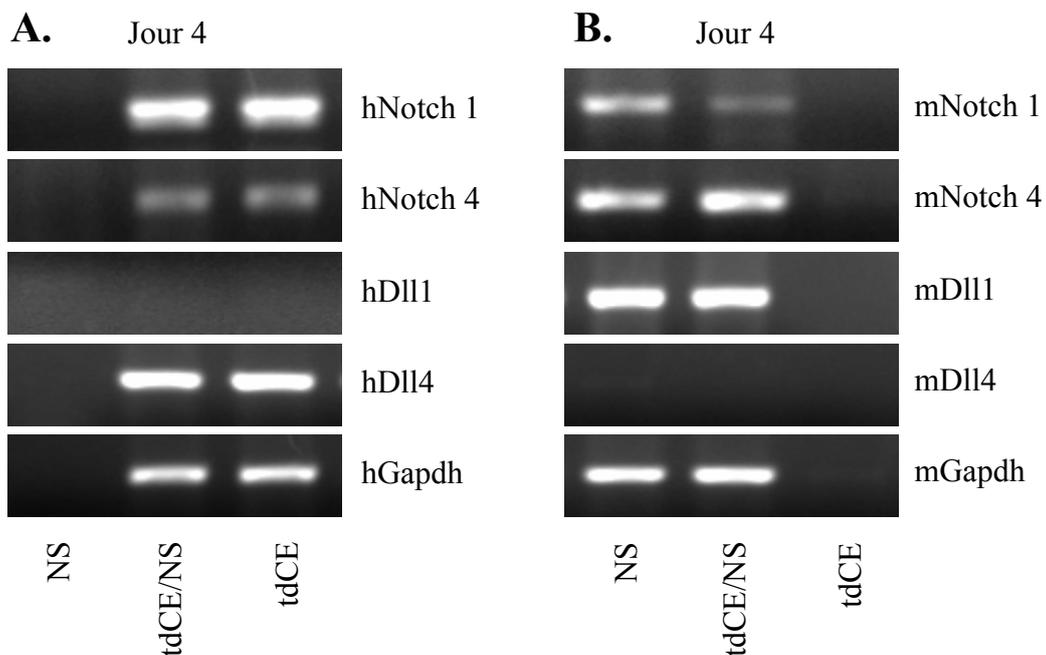
Les ARN totaux sont extraits avec un kit Ambion. Une digestion enzymatique de l'ADN contaminant est effectuée (Sigma). L'ARN est rétrotranscrit et l'analyse de l'expression des gènes est faite par RT-PCR. Des amorces spécifiques pour les échantillons humains et murins ont été synthétisées et aucune réactivité croisée n'a été observée. L'utilisation d'amorces spécifiques pour les échantillons humains permet d'étudier spécifiquement l'expression des gènes exprimés dans les PCE ou dans les tdCE. De même, les amorces spécifiques pour les échantillons murins permettent d'étudier spécifiquement l'expression des gènes exprimés dans les neurosphères. Dans les neurosphères, les gènes étudiés ont été appelés *mNotch1*, *mNotch4*, *mDll1*, *mDll4*, *mGFAP*, *mMAP* et *mGapdh* (« m » pour murin) et dans le PCE, *hNotch1*, *hNotch4*, *hDll1*, *hDll4*, *hAC133*, *hKDR*, *hCD34* et *hGapdh* (« h » pour humain). La séquence des amorces et les programmes de PCR sont décrits dans le tableau 1.



**Figure 39. Expression des gènes *mNotch1*, *mNotch4*, *mDll1* et *mDll4* dans les cocultures PCE/neurosphères avec contacts cellulaires**

Les conditions de culture sont identiques à celle de la Figure 36.

Des amorces spécifiques pour neurosphères (m pour murin) ont été synthétisées. Aucune réactivité croisée n'a été observée dans les PCE. On observe que dans les neurosphères, *mDll1* et *mNotch4* sont exprimés et que leur expression ne varie pas entre les cocultures et les conditions témoins (puits 2, 3 et 5, 6). Par contre, le gène *mDll4* n'est pas exprimé dans les témoins (puits 2, 5) mais il est exprimé dans les neurosphères en coculture après 4 jours (puits 6). Les neurosphères isolées expriment *mNotch1* à un faible taux (puits 2, 5). En cocultures on note une augmentation de l'expression de *mNotch1*, visible après 1 jour et qui se poursuit jusqu'à 4 jours (puits 3, 6).



**Figure 40. Expression des gènes *Notch1*, *Notch4*, *Dll1* et *Dll4* dans les cocultures tdCE/neurosphères avec contacts cellulaires**

(A) *hDll4* est exprimé dans les tdCE dans toutes les conditions de culture

(B) *mDll4* n'est pas exprimé dans les cocultures tdCE/neurosphères

### 3.3. LES PRECURSEURS DE CELLULES ENDOTHELIALES ORIENTENT LE DETERMINISME DES CSN VERS LES CELLULES ENDOTHELIALES

#### 3.3.1. Les PCE induisent l'expression de *mDll4* dans les neurosphères

En utilisant le système de coculture PCE/neurosphères, nous observons que dans les neurosphères, *mDll1* et *mNotch4* sont exprimés et que leur expression ne varie pas entre les cocultures (tous types) et les conditions témoins (Figure 39, puits 2, 3 et 5, 6)

Par contre, le gène *mDll4* n'est pas exprimé dans les témoins (Figure 39, puits 2, 5). Ce qui n'est pas surprenant puisqu'il n'est pas ou très peu exprimé dans le tissu nerveux (Rao et al., 2000; Mailhos et al., 2001). Mais il est exprimé dans les neurosphères en coculture (avec ou sans contact), après 4 jours (Figure 39, puits 6).

#### 3.3.2. Les neurosphères en coculture avec les PCE expriment des marqueurs endothéliaux

Le gène *Dll4* semble relativement spécifique des cellules endothéliales, même si une expression est détectée dans certains organes comme le foie, le poumon, le cœur ou le rein (Shutter et al., 2000). Dans nos conditions de coculture *Dll4* est exprimé dans les tdEC indépendamment du milieu utilisé ou de la présence des neurosphères (Figure 40A). Nos résultats suggèrent que les cellules des neurosphères en coculture s'engagent dans le lignage endothélial puisqu'elles expriment *mDll4* (Figure 39, puit 6).

Il faut noter que dans les cocultures tdCE/neurosphères on n'observe pas d'expression de *mDll4* dans les neurosphères (Figure 40B). Ceci indique que l'induction du gène *mDll4* dans le neurosphères est due à des molécules sécrétées spécifiquement par les PCE, et non par les tdCE.

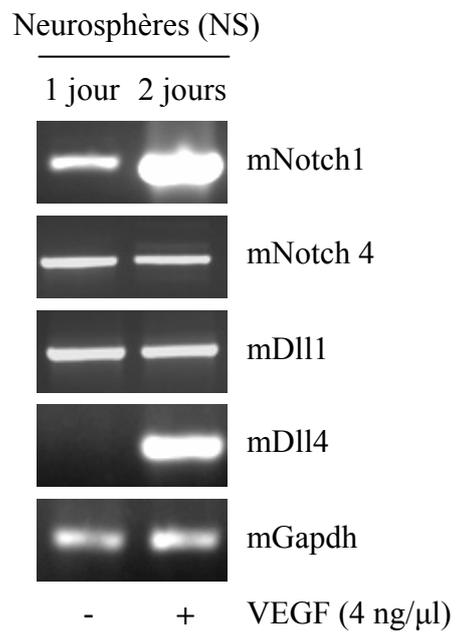
Un article paru en fin d'année 2004 a montré que les CSN embryonnaires pouvaient, dans certaines conditions de culture, donner naissance à des structures vasculaires contenant des cellules endothéliales (Oishi et al., 2004). D'autres auteurs ont rapporté l'expression de marqueurs des cellules endothéliales dans des neurosphères en différenciation (Parati et al., 2002). Ces travaux confirment nos résultats et montrent de plus que l'interaction avec les PCE n'est pas indispensable pour déclencher la différenciation des cellules des neurosphères en cellules endothéliales.

#### 3.3.3. Signalisation PCE/neurosphères

Puisque l'influence des PCE sur les cellules des neurosphères a lieu avec ou sans contacts intercellulaires et même avec du milieu conditionné, on peut supposer qu'elle se fait uniquement

**Figure 41. Effets du VEGF sur l'expression de *mDl14* et de *mNotch1***

12 jours après dissociation, les neurosphères sont cultivées comme dans les conditions témoins de la Figure 36. Le milieu de culture est complété avec du VEGF. Le VEGF induit l'expression de *mDl14* et de *mNotch1* dans les neurosphères au bout de 2 jours.



par l'intermédiaire de molécules diffusibles. Malheureusement, nous disposons de peu de données sur les propriétés des PCE et plus précisément sur leur capacité à produire des facteurs diffusibles. Nous pouvons néanmoins émettre quelques hypothèses sur l'identité de ces facteurs.

### 3.3.3.1. VEGF

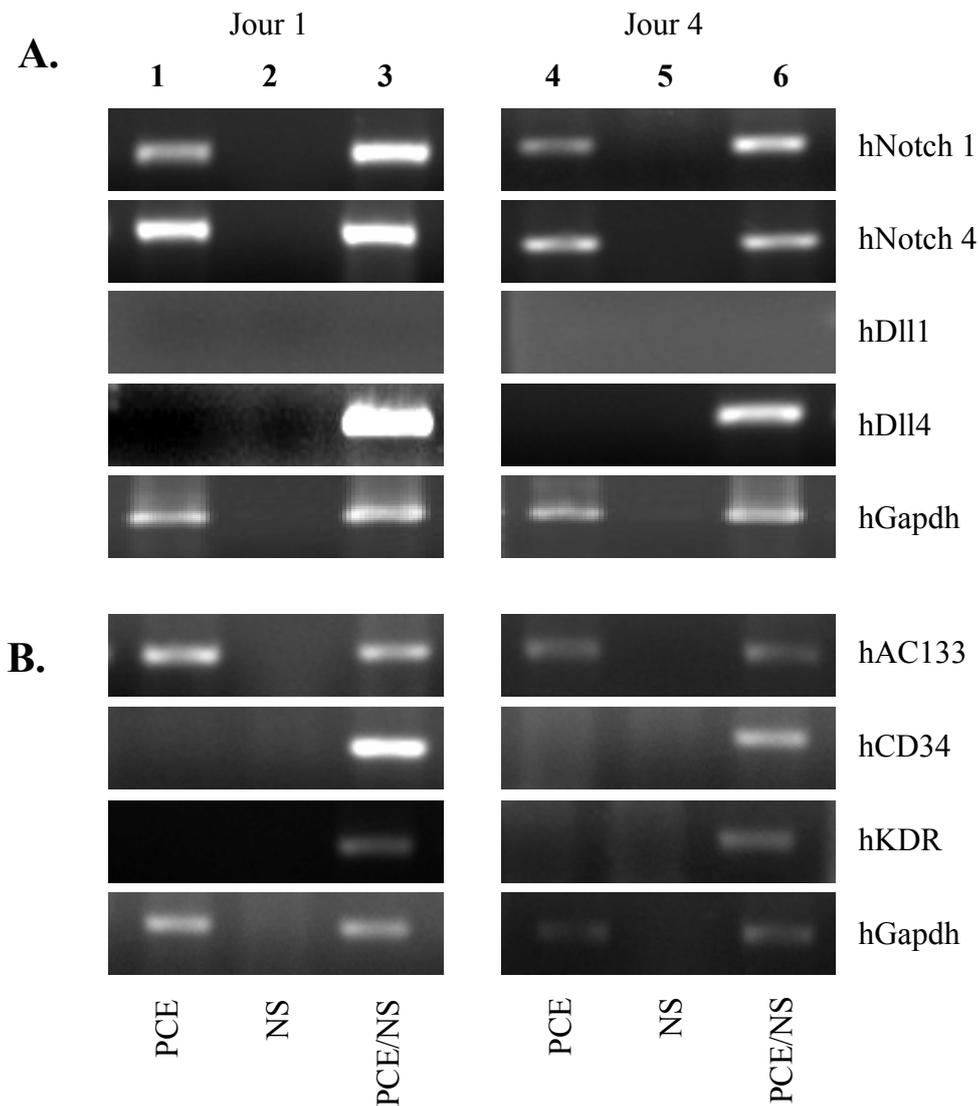
Une molécule de signalisation PCE → neurosphères pourrait être le VEGF puisque le traitement des neurosphères par ce facteur induit également l'expression de *mDll4* (Figure 41) (et de *Notch1*). Cet effet est tout à fait similaire à celui des PCE ou de leur milieu conditionné. On sait que certaines cellules endothéliales peuvent sécréter du VEGF (Bartoli et al., 2003) mais il faudra voir si les PCE en synthétisent. L'absence d'effet des tdCE pourrait être lié à l'absence, ou à une moindre production de VEGF et/ou à une recapture du VEGF sécrété par les tdCE elles-mêmes, dans la mesure où, dans les cocultures tdCE/neurosphères, les deux types cellulaires ne sont pas en contact étroit comme dans le système PCE/neurosphères.

### 3.3.3.2. Cytokines

Une autre hypothèse serait que la molécule diffusible ne soit pas le VEGF mais une molécule qui induirait la production de VEGF dans les neurosphères, par exemple une cytokine comme le LIF ou l'Il-6, qui activent STAT3. Certaines cellules endothéliales produisent ces deux cytokines en réponse à des stress comme l'inflammation ou l'hypoxie (Chi et al., 2001; Von der Thusen et al., 2003). Si les PCE en produisaient, on pourrait proposer que dans les neurosphères une cascade (abrégée) (Il-6 ou LIF) → gp130 → STAT3 → VEGF → VEGFR → Dll4

serait activée conduisant à la différenciation des cellules de neurosphères en cellules du lignage endothélial. Elle nécessiterait la mise en œuvre d'une boucle autocrine/paracrine de VEGF qui expliquerait la longue durée nécessaire à l'expression de *Dll4*, au bout de 4 jours de coculture (Figure 39, puits 6). Tout cela reste à démontrer en examinant les expressions des différents maillons de la chaîne et en les inhibant pour déterminer la réalité de leur fonction.

Dans les deux articles rapportant l'expression de marqueurs des cellules endothéliales dans des neurosphères en différenciation (Parati et al., 2002; Oishi et al., 2004) les cellules étaient cultivées dans du Matrigel ou du collagène dans lesquels un microenvironnement est créé, favorisant les mécanismes autocrines ou paracrines. Dans ces conditions, des facteurs libérés par les cellules des neurosphères pourraient agir sur les PCE pour induire directement la différenciation endothéliale. Ces facteurs pourraient être, comme on l'a vu plus haut, le VEGF ou des cytokines, sécrétés par exemple par les cellules astrocytaires, les glies radiaires ou les neuroblastes (Lafortune et al., 1996; Virgintino et al., 2003; Loeffler et al., 2005; Miyajima et al., 2005; West et al., 2005).



**Figure 42. Expression des gènes *hNotch1*, *hNotch4*, *hDll1*, *hDll4*, *hAC133*, *hCD34* et *hKDR* dans les cocultures PCE/ neurosphères avec contacts cellulaires**

(A) Dans les PCE, que ce soit dans les cellules isolées ou dans tous les types de coculture, on observe que le gène *hDll1* n'est jamais exprimé et que les gènes *hNotch1* et *hNotch4* le sont toujours (puits 1, 3 et 4, 6). On peut voir une augmentation de l'expression de *hNotch1* à 1 et à 4 jours de coculture. *hDll4* n'est pas exprimé dans les PCE, mais il l'est dans les cocultures.

(B) *hAC133* (marqueur des cellules précurseurs) était exprimé dans toutes les conditions alors que *hKDR* (VEGFR2) et *hCD34* (marqueur des cellules hématopoïétiques exprimé plus tardivement que *hAC133*) n'étaient exprimés que dans les conditions de coculture.

### 3.4. LES CSN INDUISENT L'EXPRESSION DE DLL4 DANS LES PCE

#### 3.4.1. Expression de gènes spécifiques des cellules endothéliales

Pour ces expériences, seules les différentes cocultures PCE/neurosphères ont été utilisées.

Dans les PCE, que ce soit dans les cellules isolées ou dans tous les types de coculture, on constate que le gène *hDll1* n'est jamais exprimé et que les gènes *hNotch1* et *hNotch4* le sont toujours (Figure 42A, puits 1, 3 et 4, 6). Cependant, on peut voir une augmentation de l'expression de *hNotch1*, à 1 et à 4 jours de coculture.

La situation est très différente pour le gène *hDll4*. Il n'est pas exprimé dans les PCE, mais il l'est dans les cocultures. Comme nous l'avons vu plus haut, nous considérons le gène *Dll4* comme un marqueur du lignage endothélial et également comme un marqueur de degré de différenciation des cellules endothéliales. Cela suggère que les neurosphères induisent la différenciation des PCE en tdCE. Le gène *Dll4* étant connu pour être spécifique des cellules endothéliales en différenciation (Krebs et al., 2000).

Plus directement, nous avons examiné par RT-PCR l'expression de quelques gènes marqueurs du lignage endothélial. Nous avons trouvé que *hAC133* (marqueur des cellules précurseurs) était exprimé dans toutes les conditions alors que *hKDR* (VEGFR2) et *hCD34* (marqueur des cellules hématopoïétiques exprimé plus tardivement que *hAC133*) n'étaient exprimés que dans les conditions de coculture (Figure 42B). Ces résultats montrent que la différenciation des PCE est induite sous l'effet des CSN. Des études complémentaires sont en cours pour le confirmer.

#### 3.4.2. Signalisation PCE/neurosphères

##### 3.4.2.1. Dll1

En ce qui concerne les mécanismes moléculaires possibles, on pourrait supposer qu'une molécule diffusible, par exemple une forme soluble de *mDll1*, puisque *Dll1* est synthétisé par la neurosphères (Figure 39 puits 2, 3, 5, 6), activerait le récepteur *hNotch1* des PCE, induisant leur différenciation (Nosedá et al., 2004). Le phénomène pourrait s'amplifier par le fait que *hDll4*, apparaissant sur les CE différenciées, activerait lui aussi *hNotch1* et *hNotch4* présents sur les PCE.

##### 3.4.2.2. VEGF

Puisque le VEGF stimule la différenciation des PCE, on pourrait supposer que le VEGF produit par diverses cellules nerveuses issues des neurosphères (Lafortune et al., 1996; Virgintino et al., 2003; Miyajima et al., 2005; West et al., 2005) agirait sur les PCE.

### 3.5. LES PCE INDUISENT L'EXPRESSION DE NOTCH1 DANS LES NEUROSPHERES

#### 3.5.1. Induction de l'expression de Notch1

Dans les conditions de culture que nous avons utilisées, les neurosphères isolées expriment *mNotch1* à un faible taux (Figure 39, puits 2, 5). En coculture (tous types, et avec le milieu conditionné de PCE), on note une augmentation rapide de cette expression, visible dès 1 jour et maintenue à 4 jours (Figure 39, puits 3, 6).

#### 3.5.2. Maintien des CSN

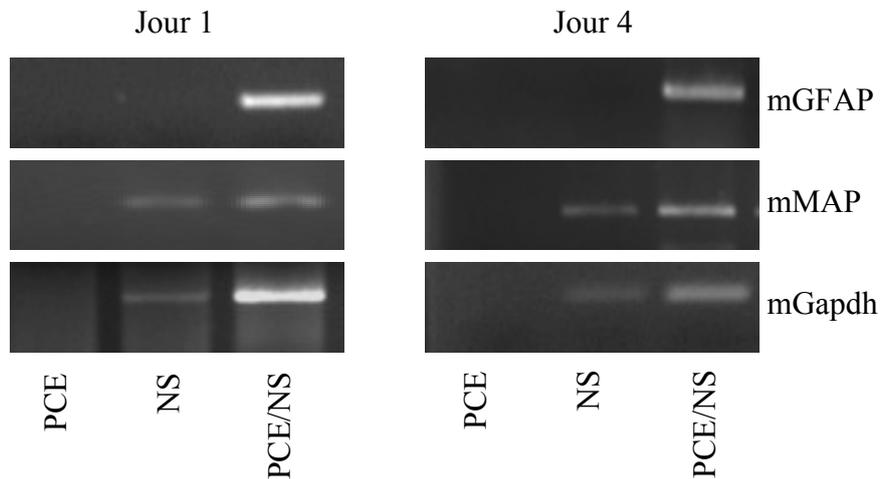
Les travaux de notre laboratoire et ceux d'autres auteurs indiquent que Notch1 est nécessaire au maintien des CSN (Ohtsuka et al., 2001; Hitoshi et al., 2002; Chojnacki et al., 2003; Hatakeyama et al., 2004). Nos observations suggèrent que les PCE contribuent au renouvellement des neurosphères. Ceci est confirmé par le fait que dans nos cocultures, les neurosphères survivent mieux et une plus grande quantité de cellules est produite. Un résultat semblable au nôtre vient d'être publié montrant l'effet positif de facteurs diffusibles sécrétés par les cellules endothéliales sur le renouvellement des CSN, mais aucune explication n'est proposée (Shen et al., 2004).

Ces observations sont à rapprocher du fait que dans le cerveau, les cellules souches neurales se trouvent toujours en contact étroit avec des vaisseaux sanguins qui participeraient ainsi au maintien des CSN dans leur état indifférencié et prolifératif. Les cellules endothéliales pourraient être les acteurs qui agiraient sur les CSN grâce à l'établissement de contacts intercellulaires directs ou/et à la sécrétion de molécules diffusibles produites en quantités limitantes de façon à agir à courte distance. Nos résultats vont dans ce sens. Ils indiquent que les cellules endothéliales précurseurs exercent leur effet par l'intermédiaire de molécules diffusibles, non encore identifiées, ce qui conduit à une augmentation de l'expression de Notch1.

#### 3.5.3. Signalisation PCE/neurosphères

Nos travaux ayant montré que l'expression de *Notch1* est sous la dépendance de STAT3 (chapitre1). Nous pouvons supposer qu'une molécule diffusible activerait STAT3 dans les neurosphères. Comme nous l'avons vu plus haut, cette molécule pourrait être une cytokine comme le LIF (ou Il-6) qui a été décrit pour sa capacité à assurer le renouvellement des CSN (Shimazaki et al., 2001; Wright et al., 2003; Pitman et al., 2004). Le LIF et/ou l'Il-6 peuvent être produits par les CE sous l'effet de stress, il est possible qu'elles soient produites constitutivement par les PCE. Cette possibilité sera examinée.

Une telle cytokine pourrait être à l'origine d'une cascade (Il-6 ou LIF) → gp130 → STAT3 → Notch1. Cette cascade, plus directe que celle impliquant VEGF, agirait plus rapidement et serait compatible avec l'expression de Notch1 induite dès le jour 1.



**Figure 43. Expression des gènes *mGFAP* et *mMAP* dans les cocultures PCE/neurosphères avec contacts cellulaires**

Des amorces pour les gènes de la *mGFAP* et de la *mMAP* ont été synthétisées. Nous avons trouvé que l'expression de la *mMAP* est semblable dans les neurosphères isolées et en cocultures. Par contre, la *mGFAP* n'est pratiquement pas exprimée dans les neurosphères isolées alors qu'elle l'est fortement dans les neurosphères en coculture.

### 3.6. LES PCE INDUISENT L'EXPRESSION DE LA GFAP DANS LES NEUROSPHERES

#### 3.6.1. Augmentation des ARNm de *mNotch1* et de *mGFAP*

Dans le paragraphe ci-dessus, nous avons vu que les neurosphères expriment peu *mNotch1* dans les conditions de culture particulières utilisées (Figure 39, puits 2, 5). Dans les cocultures avec les PCE l'expression de *Notch1* est beaucoup plus forte, aussi bien à 1 qu'à 4 jours (Figure 39, puits 3, 6). *Notch1* peut orienter le déterminisme des cellules des neurosphères vers les cellules gliales. Nous avons donc caractérisé les cellules dans ces conditions.

Lorsque les neurosphères adhèrent à un support (comme dans nos conditions de culture et de coculture), elles se différencient en astrocytes, neurones et oligodendrocytes. Les cellules formées peuvent être identifiées par immunocytochimie ou par l'expression de marqueurs spécifiques. Pour le moment, nous les avons caractérisées par l'expression des ARNm de la *mGFAP* (protéine spécifique des astrocytes) et de la *mMAP* (spécifique des neurones).

Nous avons trouvé que l'expression de la *mMAP* est semblable dans les neurosphères isolées et en cocultures. Ce qui suggère qu'il n'y a pas de grande variation dans les proportions de neurones produits. Par contre, la *mGFAP* n'est pratiquement pas exprimée dans les CSN isolées alors qu'elle l'est fortement dans les neurosphères en cocultures (Figure 43). Ainsi, comme prévu d'après l'expression accrue de *Notch1*, ceci doit correspondre à une plus forte proportion d'astrocytes.

#### 3.6.2. Signalisation PCE → CSN

Pour les mécanismes moléculaires, on peut penser que *Notch1*, induit dans les CSN par un facteur diffusible issu des PCE, est activé par *Dll1* qui est exprimé dans les neurosphères. *mDll4* pourrait aussi participer à l'activation de *Notch1* puisque cette interaction *Dll4-Notch1* a déjà été décrite comme fonctionnelle (Liu et al., 2003).

### 3.7. CONCLUSION

Ces travaux montrent que diverses interactions s'établissent entre les cellules endothéliales et les cellules des neurosphères, CSN ou issues des CSN, et qu'elles ont des conséquences fonctionnelles multiples et importantes.

Une partie des résultats de ce travail a été publiée par d'autres auteurs, c'est le cas du renouvellement des CSN sous l'effet des CE (Shen et al., 2004), et celui de la différenciation des CSN en CE (Parati et al., 2002; Oishi et Uchida, 2003; Oishi et al., 2004). Cependant, la recherche des facteurs impliqués dans ces interactions intercellulaires n'a pas été entreprise, ni celle des mécanismes intracellulaires mis en jeu pour aboutir aux effets observés.

Nos résultats donnent des pistes. Par exemple, celles du VEGF ou de la voie Notch. Cette recherche devra être poursuivie. Pour obtenir des informations sur les vecteurs de l'information transmise dans les deux sens il faudrait inhiber, dans les cocultures, certains facteurs de croissance comme le PDGF, le CNTF, l'Il-6, le LIF ou les VEGF, ou divers maillons de la voie Notch comme *jagged1* qui est exprimé dans les vaisseaux des tumeurs et après des traumatismes vasculaires, et dans les artères (Villa et al., 2001; Taichman et al., 2002; Iso et al., 2003a; Bicknell et Harris, 2004; Shawber et Kitajewski, 2004). L'inhibition de certaines voies de transduction, permettrait de cerner les mécanismes intracellulaires mis en jeu dans les CSN.

Même si l'émergence de cellules endothéliales à partir des CSN a déjà été publiée, il faudrait déterminer si ce mécanisme de production opère *in vivo*, et quelle est l'importance de sa contribution à l'angiogenèse pendant le développement et dans les situations pathologiques.

Il faudra voir aussi si des CSN tumorales peuvent également donner naissance à des CE. Une approche *in vivo* consisterait à transplanter dans le cerveau des neurosphères marquées pour voir si des capillaires marqués se forment. L'expérience serait probablement plus facile en transplantant dans des cerveaux de rats des cellules tumorales comme les cellules C6-EGFP (Zhang et al., 2002) qui donnent des tumeurs très vascularisées.

## Chapitre 4

---

Effets d'alcool gras indoliques (IFA)  
sur la différenciation des neurosphères

---

---

## 4. EFFETS D'ALCOOL GRAS INDOLIQUES (IFA) SUR LA DIFFÉRENCIATION DES NEUROSPHÈRES

---

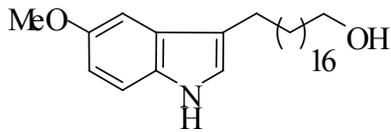
Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, dans le cadre d'une collaboration avec l'UMR 7123, nous avons testé les effets de petites molécules non peptidiques, sur la différenciation des cellules du SCN en utilisant le système modèle des neurosphères in vitro.

En parallèle avec nos études sur les effets du tCFA15 sur la différenciation des neurosphères, le Dr. Djalil Coowar a testé l'activité neurotrophique d'alcools gras indoliques (Indole Fatty Alcohols : IFA). Il a trouvé que le 3-(18-Hydroxyoctadécyl)-5-méthoxy-1/H/-indole (5mIFA18) (Figure 44A) 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).

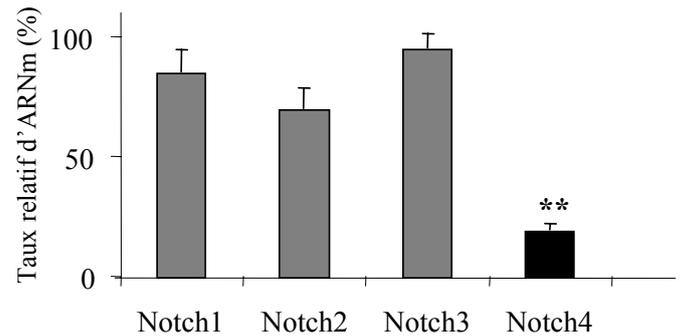
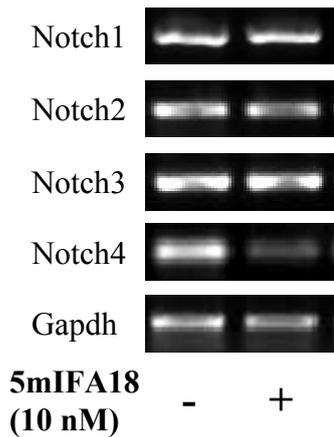
Ma contribution à ce travail a consisté à déterminer si les effets du 5mIFA18 pouvaient passer par la voie Notch (voire Figure 5 de la publie ci-jointe). Pour cela, nous avons analysé par RT-PCR l'expression des principaux gènes de la voie Notch dans les neurosphères traitées ou non au 5mIFA18 (10 nM) pendant leur phase de différenciation. Nous avons trouvé que le 5mIFA18 induit une diminution d'expression d'un seul des gènes testés, *Notch4* (Figure 44B).

La question est maintenant de savoir si cette diminution d'expression de *Notch4* est réellement liée à la régulation de la différenciation neuronale des neurosphères. Nous avons vu dans le chapitre 1 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 (Figure 44C). Nous avons vu, également dans le chapitre 1, 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

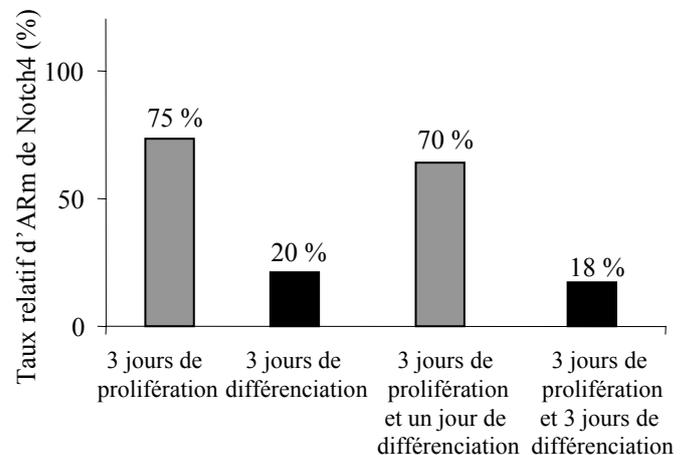
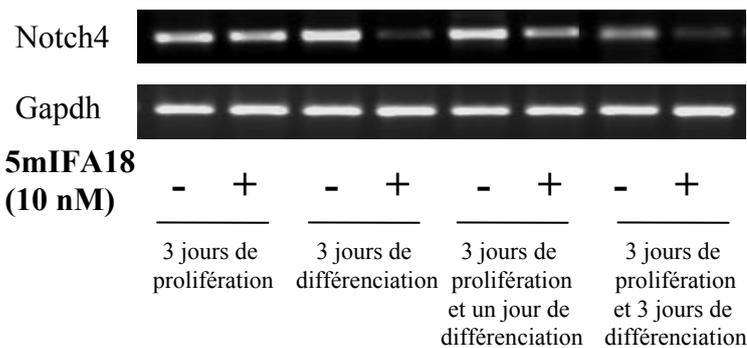
**A.** 3-(18-Hydroxyoctadécyl)-5-méthoxy-1/H/-indole (5mIFA18)



**B.** RT-PCR



**C.** RT-PCR



**Figure 44. Effets du 5mIFA18 sur l'expression des récepteurs Notch1 - 4 dans le système des neurosphères**

Nous avons analysé l'effet du 5mIFA18 sur l'expression de gènes Notch1-Notch4 dans des neurosphères. Le traitement a été renouvelé tous les jours.

(A) Structure du 3-(18-Hydroxyoctadécyl)-5-méthoxy-1/H/-indole (5mIFA18) (PM 416)

(B) Après dissociation, les neurosphères ont été traitées au 5mIFA18 (10 nM) durant 3 jours de différenciation avant extraction des ARN totaux. Le 5mIFA induit une diminution de l'expression de Notch4. Les autres récepteurs Notch analysés sont inchangés, ainsi que les autres gènes de la voie Notch.

(C) Après dissociation, les neurosphères ont été traitées au 5mIFA18 (10 nM) durant 3 jours de prolifération; 3 jours de différenciation; 3 jours de prolifération et le premier jour de différenciation; ou durant 3 jours de prolifération et 3 jours de différenciation, avant extraction des ARNm totaux. Le taux d'expression des gènes de la voie Notch a été analysé par RT-PCR semi-quantitative (n = 3 expériences indépendantes). Le 5mIFA induit une diminution de l'expression de Notch4 quand le traitement est effectué durant la phase de différenciation.

système des neurosphères et dans celui des cultures primaires de neuroblastes, pourraient apporter des indications sur leurs rôles respectifs.

Les résultats obtenus avec le 5mIFA18 présentent un intérêt particulier parce que Notch4 est exprimé préférentiellement dans les cellules endothéliales et parce qu'il joue un rôle important dans l'élaboration du réseau vasculaire pendant le développement normal et au cours de la croissance tumorale. En effet, si les souris homozygotes mutantes pour Notch4 ne présentent pas de phénotype évident, les souris nulles pour Notch1 présentent des anomalies de leur système vasculaire, et dans les doubles mutants, le système vasculaire est fortement affecté (Krebs et al., 2000). D'autre part, les souris mutantes exprimant une forme constitutivement active de Notch4 présentent un réseau vasculaire anormal et une structure des vaisseaux altérée (Uyttendaele et al., 2000). Ceci suggère qu'une thérapie anti-angiogénique plus efficace contre le cancer pourrait être élaborée en inhibant simultanément Notch1 par le tCFA15 et Notch4 par le 5mIFA18. Des études préliminaires sont en cours, mettant en oeuvre cette stratégie.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

**Effects of Indole Fatty Alcohols on the Differentiation of Neural Stem Cell Derived Neurospheres**

Djalil Coowar, Julien Bouissac, Mazen Hanbali, **Marie Paschaki**, Eliane Mohier, and Bang Luu

*Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, Vol. 47, N°25, Pages 6270 –6282

Pages 6270 –6282 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://pubs.acs.org/journals/query/subscriberSearch.jsp>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)

---

## Conclusion et perspectives

---

---

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

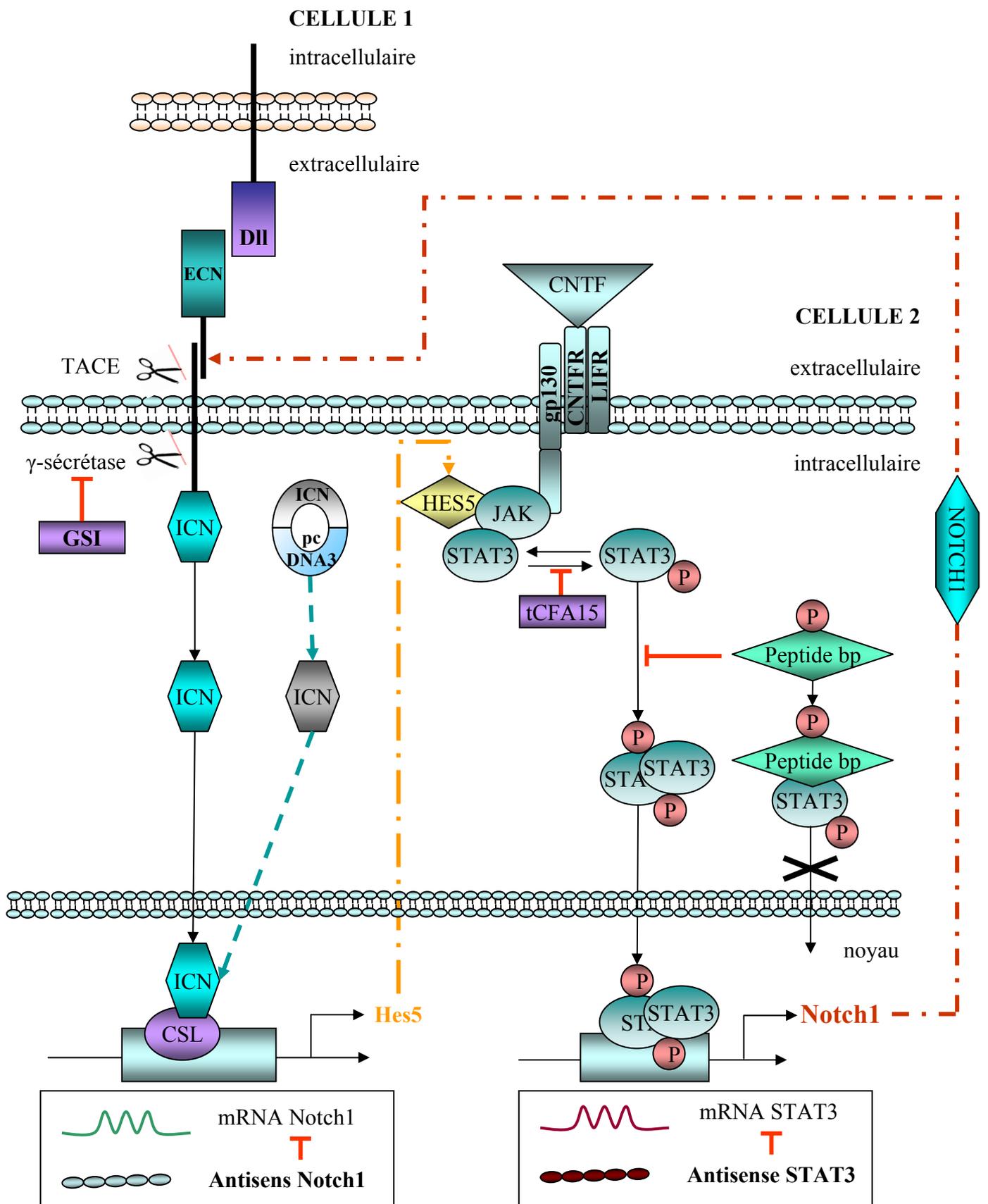
Les travaux présentés dans ce mémoire, effectués d'abord dans des perspectives thérapeutiques liées aux domaines des maladies neurodégénératives et du cancer, ont amené à plusieurs résultats dans le domaine fondamental. Ces travaux sont tous en rapport avec le développement des cellules nerveuses du système nerveux, cellules normales ou tumorales, et, dans la plupart des cas, ils concernent les effets de molécules pharmacologiques sur ce développement. L'ensemble du travail présenté indique que la régulation de la voie Notch constitue un objet d'étude aussi bien à un niveau de recherche fondamentale qu'à un niveau de recherche appliquée.

### Lien fonctionnel entre Notch1 et STAT3

Les apports fondamentaux ont été obtenus principalement grâce à l'utilisation de molécules pharmacologiques et à l'analyse de leurs effets d'abord sur des processus physiologiques comme le déterminisme cellulaire et la différenciation et ensuite sur les processus moléculaires susceptibles de leur être associés. Dans le chapitre 1, cette démarche nous a permis d'établir un lien entre Notch et STAT3, ce qui nous a amenés à proposer un schéma de régulation de *Notch1* par STAT3.

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 une nouvelle connexion entre STAT3 et *Notch1*. Dans certaines cellules (celles des neurosphère par exemple) 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 que c'était bien STAT3 qui intervenait.

On peut supposer que cette induction de l'expression de *Notch1* par STAT3 n'est 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 actuellement en voie d'être identifiées dans différents laboratoires, les résultats en cours ne montrent pas Notch1 comme l'une de ces cibles (Alvarez et Frank, 2004). Toutefois, cette étude a été réalisée sur des fibroblastes matures, cellules très différentes des nôtres.



**Figure 45. Schéma proposé pour la régulation de Notch1**

Ce schéma a été établi à partir de nos expériences d'activation ou d'inhibition de Notch et STAT3 qui ont montré que STAT3 régule l'expression de Notch1 et à partir des résultats publiés par d'autres auteurs (Kamakura et al., 2004), qui ont montré que HES5 stimule la phosphorylation de STAT3 grâce à la formation d'un complexe HES/JAK.

Modèle de boucle de régulation de Notch1

Nous avons rapproché cette nouvelle donnée de STAT3 placé en amont de Notch1, d'une autre, parue plus tard, et montrant que *Notch1*, par l'intermédiaire de son induction directe de Hes1 (ou Hes5), conduisait à augmenter l'activation de STAT3. Ceci plaçait STAT3 en aval de Notch1 contrairement à nos résultats. Si ces données sont exactes, on pouvait supposer qu'une boucle d'activation positive existait entre Notch1 et STAT3. Les résultats que nous avons obtenus par une stratégie de perte et gain de fonction renforcent cette hypothèse (Bouissac, Paschaki et al., soumis). Cette nouvelle donnée conduit à diverses questions, en particulier à la justification physiologique d'un tel mécanisme.

D'abord, cette boucle ne serait pas une boucle classique autocrine. En effet, elle ne concerne que le récepteur NOTCH1 qui, en absence de ligand, ne transmet pas de signal et en conséquence n'active pas la boucle. De plus, elle nécessite l'activation de STAT3 par JAK, donc l'activation de cette voie transduction sous l'effet d'un autre ligand comme le CNTF, le LIF ou l'Il-6. Ainsi, on pourrait proposer le mécanisme suivant (Figure 45) :

- 1) un facteur du type CNTF, présent à faible concentration au voisinage de la cellule, vient agir sur son récepteur et induire de faibles effets, dont certains par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT3.
- 2) STAT3 activé va induire l'expression de Notch1 permettant à la cellule de répondre à des ligands de Notch1.
- 3) Dès que des ligands de Notch1 seront présents dans le voisinage immédiat de la cellule, la voie Notch1 va suractiver STAT3, ce qui conduira à amplifier les effets de la voie STAT3 sans avoir besoin d'une plus forte concentration de ligands de type CNTF et/ou de récepteurs de ces ligands.
- 4) De plus, la suractivation de STAT3 va conduire à une surexpression de Notch1, donc à une suractivation de cette voie.

Donc, 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.

Liens possibles entre bFGF ou EGF et STAT3-Notch1

Comme Notch1 intervient dans le maintien des neurosphères dont le renouvellement est assuré par le bFGF, et plus tardivement par l'EGF, on peut se demander si un lien existe entre ces facteurs de croissance et STAT3 et/ou Notch1. Plusieurs données le suggèrent ou le montrent.

Le bFGF (comme le PDGF-AA) peut stimuler l'expression de *Notch1*, cela a été montré dans les précurseurs d'oligodendrocytes (Bongarzone et al., 2000). Dans certaines cellules (endothéliales), le bFGF induit le PAF (platelet-activating factor), un phospholipide inflammatoire qui agit sur la voie PAFR-JAK/STAT (Lukashova et al., 2003), et il en résulte une activation de STAT3 (Deo et al., 2002) qui pourrait induire *Notch1*. Enfin, dans des neurones, le bFGF active STAT3 (De-Fraja et al., 2000).

Dans des hépatocytes ou des kératinocytes, l'EGF active STAT3 (Guren et al., 1999; Chan et al., 2004) cet effet passerait par l'intermédiaire de Tyk2 et c-Src (Shi et Kehrl, 2004). Dans des cellules de cancer du sein, une interaction directe entre STAT3 et l'EGFR nucléaire a été décrite, conduisant à la transcription de gènes spécifiques (Lo et al., 2005).

Nos résultats, obtenus avec les cellules C6, B104 et les astrocytes, indiquent que lorsque ces cellules sont traitées au bFGF ou à l'EGF, le tCFA15 n'a plus d'effet sur l'expression de Notch1. Cela serait compatible avec une activation trop forte de STAT3 par ces facteurs de croissance. Un tel effet est aussi observé quand les neurosphères sont traitées au CNTF.

Pour mieux comprendre les rôles respectifs et les mécanismes d'action des signalisations cellulaires capables de moduler le déterminisme et la différenciation des cellules nerveuses, il faudra analyser plus précisément les voies de transduction et chercher leurs connexions à la lumière des données déjà existantes. Par exemple, il faudrait déterminer si, dans les neurosphères, l'EGF stimule l'expression de Notch1 et si cette stimulation passe par l'intermédiaire de STAT3.

De telles relations seraient peut-être plus facilement mises en évidence dans des cellules en culture homogène comme celles que nous avons utilisées : de neurones, astrocytes ou précurseurs d'oligodendrocytes. Il faudra cependant prendre en compte le fait que dans chaque type cellulaire des spécificités peuvent intervenir.

Autres effets du tCFA15 sur la voie Notch

On a vu que, si le tCFA15 inhibe l'expression de *Notch1* et de *Hes5* dans tous les types cellulaires nerveux examinés, ses effets sur l'expression d'autres éléments de la voie Notch

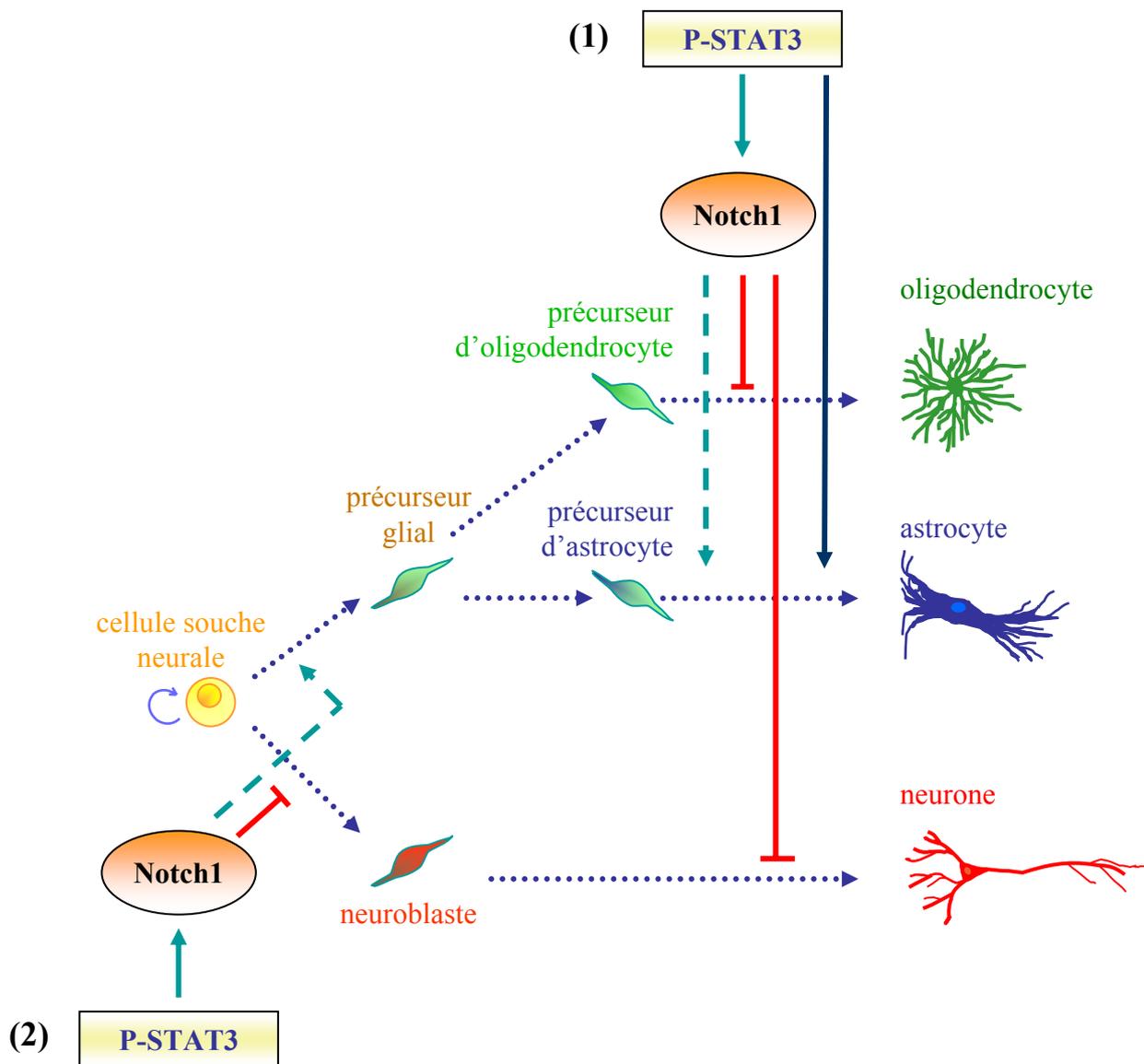
apparaissent dépendants du type cellulaire. Nous avons observé une augmentation de l'expression de *Notch2* et *Jagged1* dans les précurseurs d'oligodendrocytes et une diminution de *Notch4* et *Dll1* dans les neurones en culture. La question se pose alors de savoir si ces effets passent également par l'intermédiaire de *Notch1*, ou par un mécanisme éventuellement plus direct, ce qui élargirait le nombre des cibles du tCFA15.

Les neurosphères étant composées de cellules en majorité déjà déterminées, on peut supposer qu'elles ont déjà des spécificités et que les résultats globaux que l'on observe après l'action du tCFA15 par exemple, sont la résultante d'effets exercés sur ces divers types de cellules peu différenciées. Sous l'effet du tCFA15, le déterminisme cellulaire est orienté vers la voie neuronale et on pourrait penser que ces cellules possèdent déjà quelques caractéristiques des cellules neuronales jeunes que nous avons utilisées *in vitro*. Cela pourrait expliquer la diminution d'expression de *Dll1* observée dans ces conditions dans les neurosphères puisque l'on observe aussi une diminution d'expression de *Dll1* dans les neurones en culture (les expressions de base étant sensiblement identiques dans les neurosphères et les cultures de neurones). Il y a aussi une diminution de *Notch4*, mais moindre que dans les neurones. Ceci serait cohérent avec le fait que l'expression de *Notch4* dans les neurones est de l'ordre de 8 fois moindre que dans les neurosphères (résultats non montrés), ainsi la contribution des cellules neuronales à l'expression de *Notch4* dans les neurosphères serait très faible comparativement à celle des cellules gliales.

On peut remarquer que dans les cellules tumorales C6 et B104, le tCFA15 ne modifie l'expression que de *Notch1* et de *Hes5*. Il est possible que dans ces cellules tumorales, et qui de plus ont subi un grand nombre de passages, certains mécanismes de régulation soient perdus.

### STAT3 et cancer

STAT3 est activé constitutivement dans de nombreux cancers, par exemple dans la moitié des cancers du sein et des poumons. L'inhibition de l'activité de STAT3 est un objectif thérapeutique qui est poursuivi depuis quelques années (Darnell, 2005; Jing et Tweardy, 2005). Le tCFA15 serait un nouvel élément à tester dans le cadre de cette stratégie. Dans ces cancers, l'utilisation du tCFA15 serait moins risquée que dans ceux qui sont liés à Notch puisque STAT3 est plus généralement un oncogène que *Notch1*. Il faudrait donc tester son effet sur des cellules STAT3-dépendantes, *in vitro* et *in vivo* pour évaluer son efficacité car on se souvient que dans les cas où STAT3 était fortement activé (par le CNTF), le tCFA15 perdait son pouvoir inhibiteur.



**Figure 46. Schéma hypothétique du rôle de STAT3 et de Notch sur le lignage des cellules souches neurales**

L'analyse immunocytochimique des expériences d'activation ou d'inhibition de Notch et STAT3 ont montré que STAT3 et Notch1 induisent la différenciation des astrocytes de façon indépendante (1) tandis que les effets de STAT3 sur le déterminisme neurones / cellules gliales passent par Notch1 (2).

*Notch et cancer*

De nombreux travaux sont consacrés à l'étude des relations Notch-cancer. Une hyperactivité de la voie Notch est associée à certains cancers comme les leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules T ou certaines tumeurs mammaires. Notch a alors un effet oncogénique. Dans d'autres cancers, c'est l'inhibition de l'activité de Notch qui est liée à l'état cancéreux. Dans ce cas Notch se comporte comme un suppresseur de tumeur. Cette ambivalence de Notch n'est pas surprenante compte tenu des fonctions physiologiques de Notch (Figure 46). Dans certains types de cellules normales, Notch est un inhibiteur de différenciation (comme dans le cas des précurseurs d'oligodendrocytes et des neurones), dans ce cas sa suractivation peut être liée à la cancérogenèse. Dans d'autres cas, Notch induit la différenciation (cas des astrocytes) et c'est son inhibition qui serait cancérogène. Ce schéma est globalement respecté, indiquant que Notch conserve des effets presque normales dans les cellules transformées.

Nous n'avons pas travaillé avec des cellules transformées par la voie Notch. Mais nous avons manipulé l'expression de Notch1 dans des lignées tumorales. Avec la plupart des cellules tumorales que nous avons utilisées, nous avons retrouvé un effet « normal » de l'inhibition de l'expression de Notch1 sous l'effet du tCFA15. Dans les cellules de neuroblastome et d'oligodendrogliome (B104 et TC620) le tCFA15 entraîne une diminution de la prolifération, et une augmentation de la différenciation, l'effet est opposé avec les cellules d'astrocytome (C6).

*Notch et oligodendrogliomes*

Des données récentes de la littérature démontrent le dérèglement de la voie Notch et son implication dans des lignées tumorales nerveuses. Une étude sur des oligodendrogliomes primaires a montré une surexpression de divers éléments de la voie Notch. Surexpression de Notch1, 5 fois, dans la majorité des tumeurs, de Dll1, 3 fois, dans la moitié des tumeurs, et de Jagged1, mais faible (Purow et al., 2005). La voie Notch semble donc contribuer au caractère tumoral des cellules, sa surexpression est compatible avec l'activité connue de la voie Notch dans les précurseurs d'oligodendrocytes qui consiste à maintenir les cellules dans un état indifférencié et proliférant (Wang et al., 1998) alors que sa sous-expression favorise la différenciation et la myélinisation (Genoud et al., 2002; Givogri et al., 2002).

*Notch et astrocytomes*

Dans diverses lignées d'astrocytomes, les expressions de Notch1, de Dll1 et de Jagged1 sont assez contrastées (Purow et al., 2005). Les variations vont de 1 à 3 pour Notch1 à 1 à 20 pour

Dll1. Par exemple, pour la lignée U373, Notch1 est exprimé à 55% du taux trouvé dans le cerveau, Dll1 l'est à 40% environ et Jagged à 300%. Ces variations suggèrent que pour certaines lignées la voie Notch pourrait jouer un rôle dans leur transformation, alors que pour d'autres elle ne serait pas impliquée. Pour la lignée U251, la voie Notch est inhibée, avec des taux d'expression de 30% pour l'ARNm de Notch1 (cerveau=100%). On peut donc supposer que dans ces cellules la voie Notch est impliquée dans le mécanisme de tumorigénèse. 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 il constitue une cible thérapeutique.

### *Notch et glioblastomes*

Dans les glioblastomes primaires, le taux de Notch1 est un peu plus élevé que dans le cerveau, mais plus bas que dans tous les autres types de gliomes, et il n'est pas localisé dans les noyaux, Dll1 est proche du niveau du cerveau et Jagged est en moyenne 3 fois plus élevé, mais avec une très grande variabilité (Purow et al., 2005). Globalement, on peut considérer que dans ces cellules la voie Notch est plutôt inactivée. Ceci est cohérent avec le fait que la voie Notch induit la différenciation astrocytaire dans les cellules normales.

### *Applications potentielles de la régulation de Notch1*

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de la modulation de Notch1 dans les lignées tumorales, il est nécessaire d'analyser les effets de Notch1 et de STAT3 dans les lignées tumorales nerveuses par des études de perte et de gain de fonction pour ces deux gènes d'intérêt.

Il ressort de cette étude que l'inhibition pharmacologique de la voie Notch pourrait avoir une réelle efficacité thérapeutique pour réduire la progression tumorale dans certains de nos modèles, aussi bien in vitro qu'in vivo (Chapitre 2). Cependant, et comme c'était prévisible, cette action positive ne concerne que certains types de tumeurs, celles ayant des caractères neuronaux ou oligodendrogliaux. Pour les autres types de tumeurs gliales, glioblastomes et astrocytomes, les plus fréquents et les plus graves, l'inhibition de la voie Notch aurait un effet aggravant. La situation est encore plus compliquée dans la réalité puisque certaines tumeurs sont mixtes, composées de cellules astrocytaires et oligodendrocytaires (oligo-astrocytomes) ou de cellules astrocytaires et neuronales, voire des trois types cellulaires.

Si cette approche thérapeutique devait être utilisée, il faudrait auparavant avoir précisément déterminé le type de tumeur auquel on a affaire. L'imagerie le permet dans une certaine mesure. Si le traitement doit être post-opératoire, alors l'identification anatomopathologique et biochimique sur les échantillons prélevés pourrait avoir la précision requise.

Enfin, la voie Notch présente un autre intérêt dans un cadre de thérapie contre le cancer (voir chapitre 3 et 4) qui s'inscrirait dans la modulation combinée des effets de la voie Notch sur la différenciation des cellules constituant les tumeurs et sur la néovascularisation de ces dernières. Une stratégie anti-angiogénique plus efficace contre le cancer pourrait être élaborée par exemple en inhibant simultanément Notch1 (par exemple par le tCFA15) et Notch4 (par exemple par le 5mIFA).

---

## Méthodes expérimentales

---

---

# MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

---



---

## 1. CULTURES CELLULAIRES

---

### 1.1. ANIMAUX ET PRINCIPAUX PRODUITS UTILISES

#### 1.1.1. Animaux et animaleries

Les animaux utilisés dans le cadre de cette thèse 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 souris transgéniques, mutantes pour le gène *Dll1*, nous ont été fournies par Martin Hrabé de Angelis (GSF, Institute for Mammalian Genetics, Allemagne). Des souris SWISS (Charles River) ont été utilisées pour la préparation des cultures primaires de neurones, oligodendrocytes et astrocytes. Les expériences sur les souris athymiques « nues » nu *-/-* (Charles River) ont été réalisées à l'animalerie du laboratoire INSERM - U682 (Strasbourg, Hautepierre).

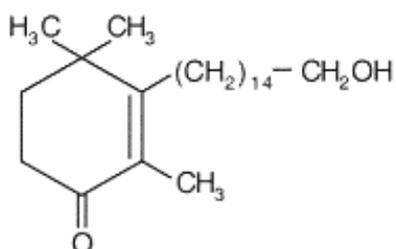
#### 1.1.2. Origine des principaux produits utilisés pour la culture cellulaire

Les produits utilisés pour les cultures cellulaires sont décrits dans le tableau ci-dessous.

COMPOSES	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

## 1.2. PRODUITS UTILISÉS POUR TRAITER LES CELLULES

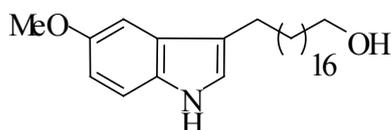
### 1.2.2. Le tCFA15 et le 5mIFA18



**Figure 47A. Structure du tCFA15**  
2,4,4-triméthyl-3-(15-hydroxy-  
pentadécyl)-2-cyclohexène-1-one

Le tCFA15 est une molécule synthétisée par le groupe du Dr Bang LUU, de l'UMR 7123 (CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg) (Girlanda-Junges et al., 2000) (Figure 47A). Il est soluble dans l'éthanol. Une solution de tCFA15 est préparée en dissolvant 3,6 mg de tCFA15 (PM 364) dans 1 ml d'éthanol afin d'obtenir une solution mère à  $10^{-3}$  M. Cette solution peut-être conservée 10 jours à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans des piluliers en verre, sans perte d'activité. Juste avant utilisation, elle est

diluée dans le milieu 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 (volume pour volume) est utilisée dans les conditions témoin.



**Figure 47B. Structure du 5mIFA18**  
3-(18-Hydroxyoctadécyl)-5-  
méthoxy-1/H/-indole (PM = 416)

Le 5mIFA18 est une molécule synthétisée par le Dr Coowar, de l'UMR 7123 (CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg) (Figure 47B). Il est soluble dans l'éthanol. De façon analogue aux traitements au tCFA15, une solution stock de 5mIFA à  $10^{-3}$  M est préparée dans 1 ml d'éthanol et lors des traitements des cellules au 5mIFA18 le milieu de culture est

généralement renouvelé chaque jour. Le 5mIFA18 étant solubilisé dans l'éthanol, la même quantité d'éthanol (v : v) est utilisée dans les conditions témoin.

### 1.2.3. Modulation de la voie Notch

#### 1.2.3.1. Oligonucléotides antisens dirigés contre Notch1

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'-TACATCAGCAGACTACACGAGTC. 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.

#### 1.2.3.2. 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 de 0,1%).

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

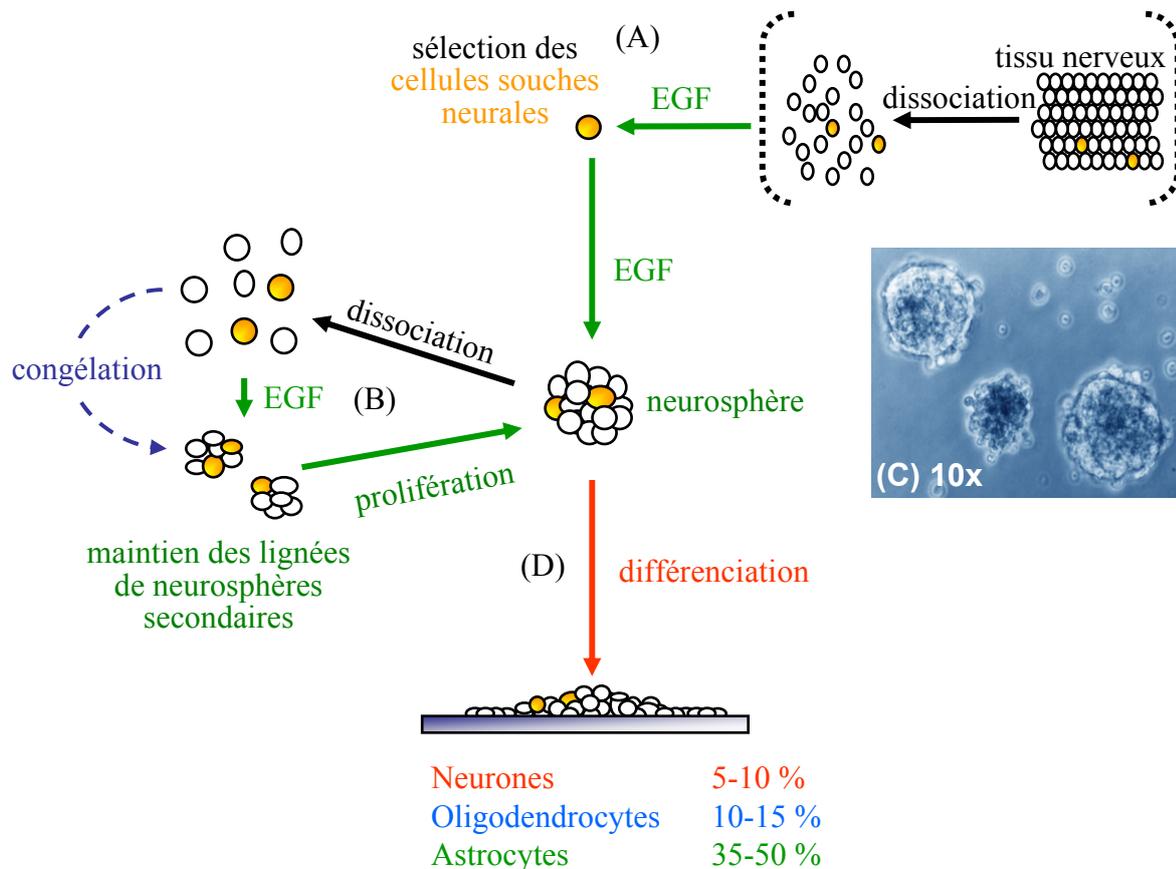
La plasmide pcDNA3-ICN1 codant la partie intracellulaire du récepteur NOTCH1 humain a été gracieusement fourni par le Dr Aster (Aster et al., 1997). L'ADN plasmidique a été purifié selon le protocole du Kit QIAGEN (QIAGEN Plasmid maxi kit, réf. 12163).

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). Dans un tube de polystyrène stérile est placé un mélange contenant 10 µg d'ADN, 62,5 µl de CaCl<sub>2</sub> 2 M, et de l'eau pour compléter à un volume de 500 µl. Après une incubation à température ambiante de 10 mn, 500 µl d'HBS 2X (50 mM HEPES ; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 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. Le milieu est changé 12 heures après transfection.

### **1.2.4. Modulation de l'activité de STAT3**

#### 1.2.4.1. 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 protéine gp130. Lorsqu'elle est activée, gp130 active JAK qui



### Figure 48. Protocole d'obtention et de maintien des lignées de neurosphères

(A) Le tissu cérébral embryonnaire est dissocié mécaniquement et mis en culture dans un milieu défini en présence d'EGF. La plupart des cellules meurent ou se différencient. 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, objectif 10x.

(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 cérébral. De même, le nombre de neurosphères secondaires obtenues reflète la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches présentes dans les neurosphères primaires.

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.

#### 1.2.4.2. Peptide bloquant de la dimérisation de STAT3

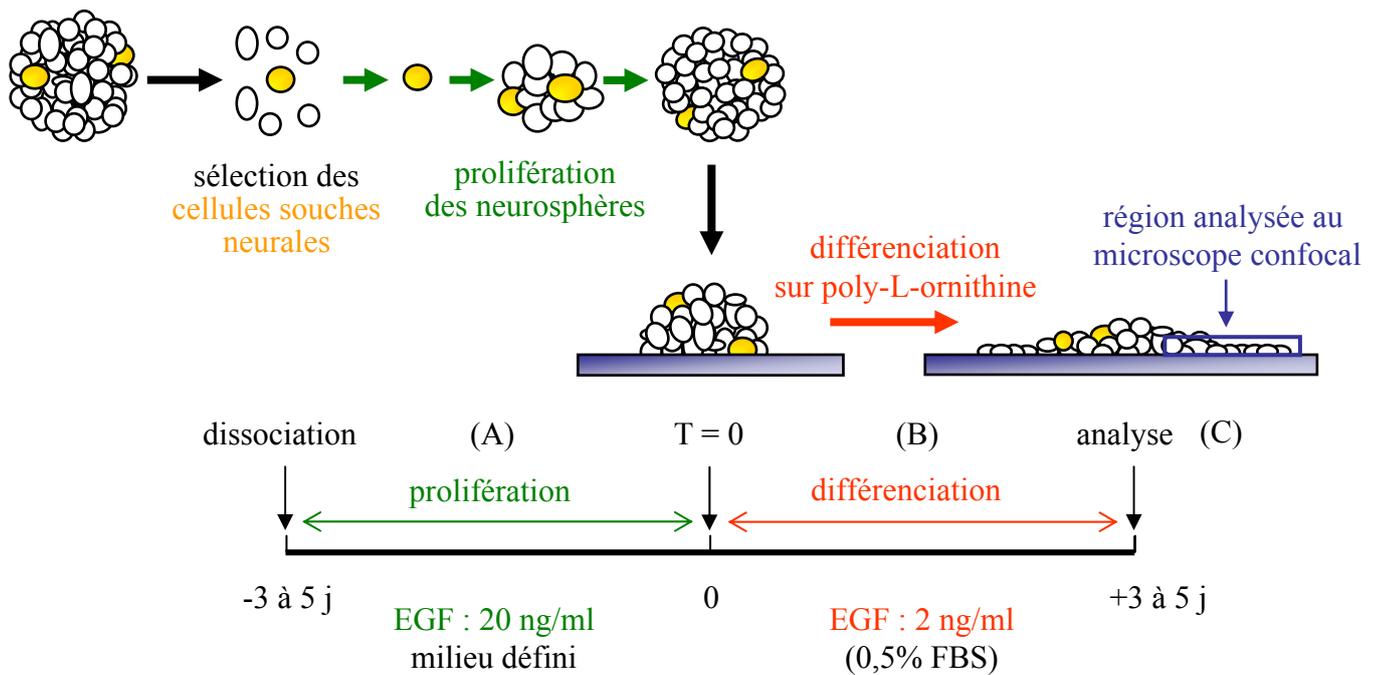
Le peptide utilisé a été décrit par Turkson (Turkson et al., 2001) pour inhiber l'activité de STAT3 en se complexant au domaine SH2 de la protéine, empêchant ainsi la formation des homodimères actifs. Le peptide bloquant l'activation de STAT3 a pour séquence PpYLKTK (appelé STAT3 bp pour STAT3 « blocking peptide ») 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 de 2 mM.

### **1.3. CULTURE DE NEUROSPHERES DERIVANT DES CELLULES SOUCHES NEURALES**

#### **1.3.1. Obtention de neurosphères primaires**

Nous utilisons la méthode décrite par Reynolds et al. (Reynolds et Weiss, 1992), avec quelques modifications (Figure 48). Le cerveau de chaque embryon (E14,5 ou E10,5 pour les embryons mutants pour Dll1) est isolé 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 :

COMPOSES	REFERENCES (SIGMA)	CONCENTRATION FINALES
Bicarbonate de sodium	/	3 mM
Glutamine	/	2 mM
D-glucose	G-7528	6 g/l
Insuline bovine	I-5500	25 µg/ml
Transferrine bovine	T-1283	100 µg/ml
Progestérone	P-0130	20 nM
Putrescine	P-7505	60 µM
Sélénite de sodium	S-5261	30 nM
Pénicilline G	P-3032	60 µg/ml
Streptomycine	S-9137	50 µg/ml
EGF	E-9644	20 ng/ml



### Figure 49. Protocole de différenciation des neurosphères

(A) Les neurosphères secondaires sont dissociées et mises en culture à faible concentration ( $15-30 \cdot 10^3$  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 est 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.

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

Après 8 jours de culture en incubateur (37°C, 95% H<sub>2</sub>O, 5% CO<sub>2</sub>), la plupart des cellules sont mortes ou se sont différenciées. Seules quelques cellules (<<1% des cellules dissociées), les cellules souches qui répondent à l'EGF (EGF responsive 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 (500 rpm, 5 mn), 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 cm<sup>2</sup> (Falcon), dans 20 ml de milieu de culture de neurosphères, en présence d'EGF 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-méthacrylate ; Sigma) pour empêcher l'adhésion des cellules. En effet, les neurosphères mutantes homozygotes *Dll1*<sup>-/-</sup> sont décrites comme adhérant 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<sup>e</sup> et le 20<sup>e</sup> passage).

### 1.3.3. Différenciation des neurosphères

(Figure 49) 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 ». Des lamelles de verre (Marienfeld) sont dégraissées et recouvertes de poly-L-ornithine (30 µg/ml, dans l'H<sub>2</sub>O) 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 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.

## **1.4. CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES, ASTROCYTES ET OLIGODENDROCYTES**

### **1.4.1. Culture primaire de neurones corticaux**

Des embryons de souris (E14, 14<sup>e</sup> jour de gestation) sont disséqués dans une boîte de Pétri contenant du PBS stérile complémenté avec un mélange de pénicilline (50 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 l'H<sub>2</sub>O) dans du PBS pendant 1 heure à 37°C et rincés 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 CO<sub>2</sub>.

### **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-nés. Les cerveaux sont prélevés après ouverture de la boîte crânienne et placées dans une boîte de Pétri contenant du PBS. Les hémisphères sont séparés et les méninges détachées à l'aide de pinces très fines. 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 ajusté 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. 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 la microglie (macrophages du système nerveux central) et les 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 O-2A.

#### 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 mises en suspension 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 de type 1, 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 précurseurs O-2A. 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 souris (cellules C11 et cellules DTU), 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 boîtes sont dissociées à la trypsine et remise 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 complété 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, complété 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) complétement 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 complétement 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<sup>e</sup> couche) est changé délicatement deux fois par semaine par du milieu frais (DMEM complétement avec 5% de FBS dans lequel le produit à tester est ajouté).

Les boîtes sont ensuite conservées dans l'incubateur (5% CO<sub>2</sub>, 95% H<sub>2</sub>O) 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.

### **1.5.2. Souris athymiques et modèles de tumeurs**

Toutes les études effectuées ont été faites en suivant les règles éthiques et lois françaises. Les souris swisses 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  $5 \times 10^6$  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 ( $H_2O + 0.9\% NaCl_2$ ). 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 PROLIFERATION ET DE MORTALITE 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 dans des plaques de 96 puits (Nunc) contenant 200  $\mu$ l de milieu à une concentration de 10 000 cellules/ml. Le test de toxicité n'est effectué que lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance. Après trois jours de traitement, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans sérum ni indicateur de pH, contenant 50  $\mu$ g/ml de MTT (Sigma). Les plaques sont ensuite incubées pendant 1 heure 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  $\mu$ l 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 sur 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 qui marque les cellules ayant une activité estérase intracellulaire et l'éthidium homodimère (EthD-1) qui 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 fois 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 n'affectant pas ces paramètres cellulaires peuvent ne pas être adaptés à l'utilisation de cette méthode.

Les cellules sontensemencées dans des plaques de 24 puits (Nunc) sur des lamelles traitées à la poly-L-lysine avec 1 ml de milieu à une concentration de 10 000 cellules/puits. 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 de 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 (Aquamont, Polysciences). Les lamelles peuvent ensuite être observées en microscopie à fluorescence ou confocale pour quantifier le nombre de cellules marquées à la Calcéine AM hydrolysée (vertes, vivantes) et à l'EthD-1 (rouges, mortes).

### 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 sous la forme de bromodésoxyuridine elle 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 au cours de 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  $\mu$ M, 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% 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 Triton X100 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 par une solution de 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 ("DeadEnd<sup>TM</sup> 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 traitées et fixées au PFA 4%. Après perméabilisation (Triton X100 0,5%, 5 mn) et pré-équilibration des cellules à l'aide d'un tampon d'équilibration, la réaction enzymatique est effectuée une heure à 37°C en mettant les cellules en présence d'une solution contenant le tampon d'équilibration, l'enzyme TdT et les nucléotides marqués. La réaction est arrêtée en rinçant les lamelles avec une solution SSC 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 types 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 également être effectué en traitant les cellules fixées à la DNase I (10 unités/ml, 5 mn à température ambiante).

## 2. IMMUNOCYTOCHIMIE

Pour les études immunocytochimiques les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre (Marienfeld) préalablement recouvertes de poly-L-lysine (20 µg/ml, dans l'H<sub>2</sub>O) pour les cultures primaires et les lignées tumorales, ou de poly-L-ornithine (30 µg/ml, dans l'H<sub>2</sub>O) pour les neurosphères. Il est possible de révéler deux 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.

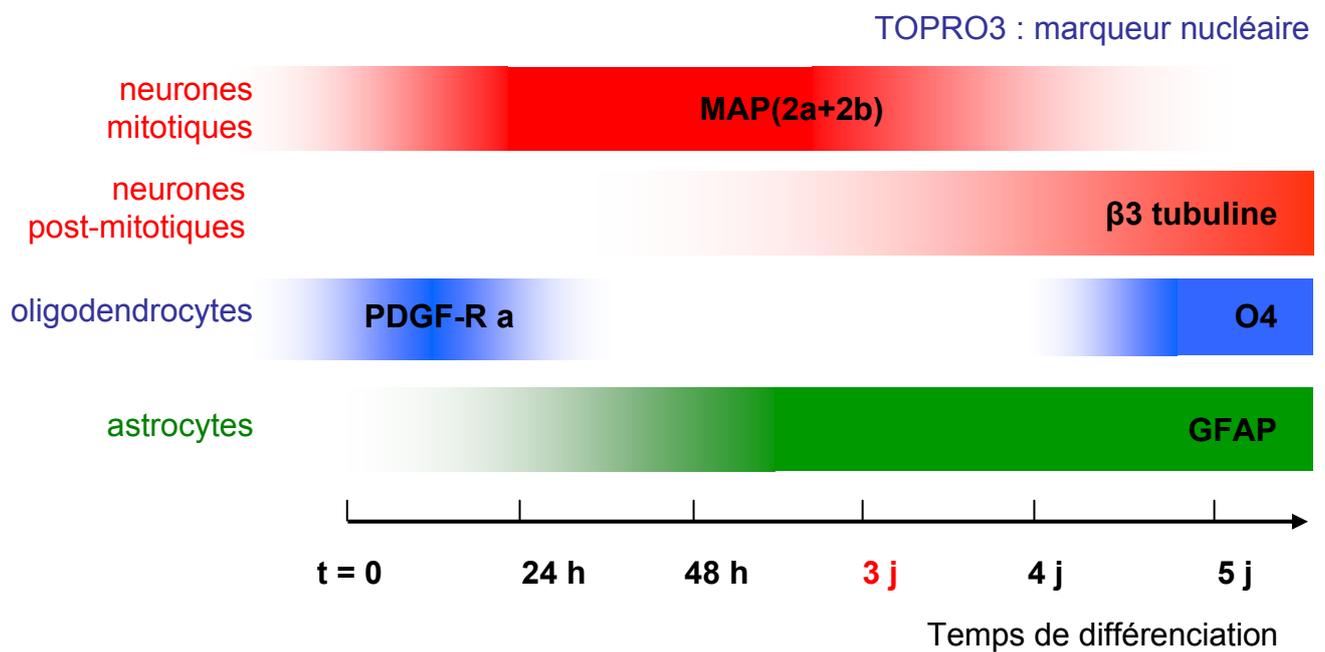
Les anticorps primaires utilisés sont présentés dans le tableau suivant :

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 différencié	Lapin	P (IgG)	300	Covance
β3-tubuline	TUJ1	neurone différencié	Souris	M (IgG)	300	Covance
Gangliosides #	A2B5	précuseurs de neurones et d'astrocytes	Souris	M (IgG)	20	Clone, Dr. Raff MC
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

Les réactifs 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)



**Figure 50. Cinétique d'apparition des antigènes reconnus par les principaux anticorps utilisés dans le système des neurosphères**

La cinétique d'apparition des principaux marqueurs utilisés pour caractériser la différenciation des neurosphères est indiquée dans la Figure 50.

## **2.1. FIXATION ET PERMEABILISATION 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 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 : immunodetection 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, l'incubation avec le premier anticorps peut être effectuée sur les cellules vivantes. Le premier anticorps est alors dilué dans du milieu de culture. L'anticorps est laissé au contact des cellules pendant 15 mn à l'incubateur et les cellules sont ensuite rapidement rincées dans du PBS puis elles sont fixées dans du paraformaldéhyde à 4% (dilué 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.

## **2.2. SATURATION DES SITES ASPECIFIQUES ET INCUBATION AVEC LES ANTICORPS PRIMAIRES.**

Les sites aspécifiques sont saturés à l'aide de BSA 3% (dans 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 1. Les cellules fixées, perméabilisées puis saturées sont incubées en présence des 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.

### **2.3. INCUBATION AVEC LES REACTIFS SECONDAIRES/TERTIAIRES**

Les complexes antigènes-anticorps sont révélés en incubant pendant 1 heure à température ambiante un second anticorps dirigé contre les immunoglobulines (Ig) du premier. 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 en présence de 3% de BSA pour éviter les liaisons aspécifiques. Après incubation les cellules sont rincées (3x5 mn) dans du PBS. Si besoin (épitope 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 réactif tertiaire couplé à la streptavidine et à un fluorochrome (Alexa 488 ou Alexa 555, Molecular Probes).

### **2.4. 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. 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 cellules perméabilisées ou non et les cellules marquées sont soumises à 2 rinçages d'au moins 5 mn au PBS.

### **2.5. 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 disposons du matériel biologique nécessaire (ex : lignées U373 pour détecter la nestine humaine).

### **2.6. QUANTIFICATION DES RESULTATS 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'un histogramme. 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-Krammer. 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 ET DE BIOCHIMIE

---

### 3.1. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEES AUX ARN

#### 3.1.1. Extraction des ARN totaux (Chomczynski et Sacchi, 1987)

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). Après la lyse, les ARN sont extraits par ajout de 1/9 du volume d'acétate de sodium 2 M, pH 4, 1,1 volume de phénol saturé d'eau et 0,55 volume de chloroforme/isoamylalcool 49:1. Puis les ARN de la phase aqueuse sont précipités à -20°C après addition d'un volume d'isopropanol. Après centrifugation à 13000 g pendant 20 mn à 4°C, ils 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 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 (MOPS 25 mM, EDTA, 1 mM, acétate de sodium 0,5 mM pH 7).

#### 3.1.2. Reverse transcription

La réaction de reverse transcription 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 MgCl<sub>2</sub>. 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.

#### 3.1.3. Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

100 ng d'ADNc obtenus par la réaction de RT sont incubés en présence de 1 U de Taq polymérase (Perkin Elmer), 1 µM de chaque amorce, 0,5 mM de chaque dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, dans un tampon contenant 10 mM de Tris-HCl pH 8,3 et 50 mM de KCl.

Les amorces utilisées pour les différents gènes analysés sont décrites dans le tableau 2, ainsi que le nombre de cycles effectués. 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	Taile du fragment (pb)
Notch1 <i>F</i>	5'- TGC CAA ATG CCT GCC AGA AT -3'	630
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
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
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
Notch4 <i>R</i>	5'- GCT GAC ATC AGG GGT GTC AC -3'	
Dll-1 <i>F</i>	5'- GAA AGA CTC ATC AGC CGC CT -3'	480
Dll-1 <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
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
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
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
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
Gapdh <i>R</i>	5'- TGA GCT TCC CGT TCA GCT CT -3'	

**Tableau 2** (*F* : séquence « forward » ; *R* : séquence « reverse »)

Pour *Notch1* humain une nouvelle amorce a été synthétisée (F : 5'- TGC CAA ATG CCT GCC AGA AC -3'; R : 5'- CAT TGA TCT TGT CCA GGC AG -3' ; 630 pb ; 36 cycles pour les lignées cellulaires humaines). 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	C11	DTU	C6	B104
Notch1	30	30	36	36	36	36	34	34
Notch2	30	32	32	32	32	32	34	34
Notch3	32	35	35	35	35	35	34	34
Notch4	34	38	37	34	34	34	36	36
Dll1	32	32	35	35	35	35	36	36
Jagged1	30	30	30	30	30	30	36	36
Jagged2	30	30	30	30	30	30	36	36
Hes1	34	38	38	34	38	38	38	38
Hes5	35	35	38	38	38	38	38	38
Gapdh	23	23	23	23	23	23	23	23

Le nombre de cycles doit être ajusté pour obtenir un signal d'intensité moyenne n'atteignant pas le seuil de saturation, de façon à pouvoir 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 (gène de ménage).

### 3.1.4. Electrophorèse des acides nucléiques

#### 3.1.4.1. 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). Les taux relatifs des ARNm sont représentés sous forme d'histogrammes ( $\pm$  S.E.M.).

#### 3.1.4.2. 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 comme suit : 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  $\mu$ l. Chaque échantillon déposé contient 7 à 10  $\mu$ g 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.

### **3.2. ELECTROPHORESE, ELECTROTRANSFERT ET IMMUNODETECTION DE PROTEINES**

#### **3.2.1. Préparation des échantillons**

Les cellules sont lysées par addition d'un tampon contenant : SDS 3%, Tris HCl 62,5 mM, glycérine 10% et  $\beta$ -mercaptoéthanol 3,3%. Extemporément, un cocktail d'inhibiteurs de protéases, pour éviter la dégradation des protéines, est ajouté à ce tampon de lyse selon les instructions de la fiche technique (Sigma) et 5 mM d'orthovanadate, pour préserver l'état de la phosphorylation des protéines in situ, est ajouté afin d'étudier la phosphorylation de P-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.

### 3.2.2 Séparation par SDS-PAGE

Pour les western blot, 30µg de protéines sont séparés (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.

### 3.2.3 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.

### 3.2.4. 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.

---

## Références bibliographiques

---

---

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS (2002) Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther* 1:466-476.
- Altman J, Das GD (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207:953-956.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287-293.
- Alvarez JV, Frank DA (2004) Genome-wide analysis of STAT target genes: elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis. *Cancer Biol Ther* 3:1045-1050.
- Anderson DJ (2001) Stem cells and pattern formation in the nervous system: the possible versus the actual. *Neuron* 30:19-35.
- Annabi B, Naud E, Lee YT, Eliopoulos N, Galipeau J (2004) Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem* 91:1146-1158.
- Annaert W, De Strooper B (1999) Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci* 22:439-443.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal zintegration in development. *Science* 284:770-776.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.
- Aster JC, Robertson ES, Hasserjian RP, Turner JR, Kieff E, 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* 272:11336-11343.
- Austin CP, Feldman DE, Ida JA, Jr., Cepko CL (1995) Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* 121:3637-3650.
- Axelson H (2004a) The Notch signaling cascade in neuroblastoma: role of the basic helix-loop-helix proteins HASH-1 and HES-1. *Cancer Lett* 204:171-178.
- Axelson H (2004b) Notch signaling and cancer: emerging complexity. *Semin Cancer Biol* 14:317-319.
- Baladron V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Diaz-Guerra MJ, Garcia-Ramirez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J (2005) dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res* 303:343-359.
- Bartoli M, Platt D, Lemtalsi T, Gu X, Brooks SE, Marrero MB, Caldwell RB (2003) VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *Faseb J* 17:1562-1564.
- Bellavia D, Campese AF, Alesse E, Vacca A, Felli MP, Balestri A, Stoppacciaro A, Tiveron C, Tatangelo L, Giovarelli M, Gaetano C, Ruco L, Hoffman ES, Hayday AC, Lendahl U, Frati L, Gulino A, Screpanti I (2000) Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *Embo J* 19:3337-3348.
- Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W (1968) Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161:370-371.
- Berezovska O, McLean P, Knowles R, Frosh M, Lu FM, Lux SE, Hyman BT (1999) Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience* 93:433-439.
- Berger F, Gay E, Pelletier L, Tropel P, Wion D (2004) Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet Oncol* 5:511-514.

- Bicknell R, Harris AL (2004) Novel angiogenic signaling pathways and vascular targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:219-238.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33:2643-2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38:3751-3757.
- Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S (1997) Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes. *Perspect Dev Neurobiol* 4:325-343.
- Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S (1997) Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90:281-291.
- Bongarzone ER, Byravan S, Givogri MI, Schonmann V, Campagnoni AT (2000) Platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor regulate cell proliferation and the expression of notch-1 receptor in a new oligodendrocyte cell line. *J Neurosci Res* 62:319-328.
- Booher J, 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, Luu B (1987) Neurotrophic effect of naturally occurring long-chain fatty alcohols on cultured CNS neurons. *FEBS Lett* 213:406-410.
- Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG (2005) The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncol* 7:122-133.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5:207-216.
- Capobianco AJ, Zagouras P, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S, Bishop JM (1997) Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. *Mol Cell Biol* 17:6265-6273.
- Chan KS, Carbajal S, Kiguchi K, Clifford J, Sano S, DiGiovanni J (2004) Epidermal growth factor receptor-mediated activation of Stat3 during multistage skin carcinogenesis. *Cancer Res* 64:2382-2389.
- Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, Reid H, Roberts IS (2001) Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. *Histopathology* 39:409-415.
- Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, Borges MW, Feder JN, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW (1997) Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5355-5360.
- Chen L, Zhang J, Tang DC, Fibach E, Rodgers GP (2002) Influence of lineage-specific cytokines on commitment and asymmetric cell division of haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* 118:847-857.
- Chi L, Li Y, Stehno-Bittel L, Gao J, Morrison DC, Stechschulte DJ, Dileepan KN (2001) Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 21:231-240.
- Chojnacki A, Shimazaki T, Gregg C, Weinmaster G, Weiss S (2003) Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 23:1730-1741.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Darnell JE (2005) Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med* 11:595-596.
- De-Fraja C, Conti L, Govoni S, Battaini F, Cattaneo E (2000) STAT signalling in the mature and aging brain. *Int J Dev Neurosci* 18:439-446.

- De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12.
- Deo DD, Axelrad TW, Robert EG, Marcheselli V, Bazan NG, Hunt JD (2002) Phosphorylation of STAT-3 in response to basic fibroblast growth factor occurs through a mechanism involving platelet-activating factor, JAK-2, and Src in human umbilical vein endothelial cells. Evidence for a dual kinase mechanism. *J Biol Chem* 277:21237-21245.
- Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13:543-550.
- Eberle K, Oberpichler A, Trantakis C, Krupp W, Knupfer M, Tschesche H, Seifert V (2000) The expression of angiogenin in tissue samples of different brain tumours and cultured glioma cells. *Anticancer Res* 20:1679-1684.
- Egan SE, St-Pierre B, Leow CC (1998) Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 228:273-324.
- Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J (1991) TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66:649-661.
- Farhadi MR, Capelle HH, Erber R, Ullrich A, Vajkoczy P (2005) Combined inhibition of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor signaling: effects on the angiogenesis, microcirculation, and growth of orthotopic malignant gliomas. *J Neurosurg* 102:363-370.
- Faux CH, Turnley AM, Epa R, Cappai R, Bartlett PF (2001) Interactions between fibroblast growth factors and Notch regulate neuronal differentiation. *J Neurosci* 21:5587-5596.
- Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MA, Artavanis-Tsakonas S (1990) Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61:523-534.
- Fleming RJ (1998) Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* 9:599-607.
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
- Fortini ME (2001) Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* 13:627-634.
- Fortini ME (2002) Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:673-684.
- Franklin JL, Berechid BE, Cutting FB, Presente A, Chambers CB, Foltz DR, Ferreira A, Nye JS (1999) Autonomous and non-autonomous regulation of mammalian neurite development by Notch1 and Delta1. *Curr Biol* 9:1448-1457.
- Gallahan D, Callahan R (1997) The mouse mammary tumor associated gene INT3 is a unique member of the NOTCH gene family (NOTCH4). *Oncogene* 14:1883-1890.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64:7011-7021.
- Genoud S, Lappe-Siefke C, Goebbels S, Radtke F, Aguet M, Scherer SS, Suter U, Nave KA, Mantei N (2002) Notch1 control of oligodendrocyte differentiation in the spinal cord. *J Cell Biol* 158:709-718.
- Girlanda-Junges C, Lutz-Bucher B, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP, Luu B (2000) 3-(15-Hydroxypentadecyl)-2,4,4-trimethyl-2-cyclohexen-1-one and its effect on neuropeptide secretion. *Bioorg Med Chem Lett* 10:2537-2539.
- Givogri MI, Costa RM, Schonmann V, Silva AJ, Campagnoni AT, Bongarzone ER (2002) Central nervous system myelination in mice with deficient expression of Notch1 receptor. *J Neurosci Res* 67:309-320.

- Gonzalez de Aguilar JL, Girlanda-Junges C, Coowar D, Duportail G, Loeffler JP, 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, Mohier E (2003) Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* 130:1391-1402.
- Greenwald I (1998) LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev* 12:1751-1762.
- Guidos CJ (2002) Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol* 14:395-404.
- Guren TK, Abrahamsen H, Thoresen GH, Babaie E, Berg T, Christoffersen T (1999) EGF-induced activation of Stat1, Stat3, and Stat5b is unrelated to the stimulation of DNA synthesis in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 258:565-571.
- Hanbali M, Bernard F, Berton C, Gatineau G, Perraut M, Aunis D, Luu B, Bagnard D (2004) Counteraction of axonal growth inhibitory properties of Semaphorin 3A and myelin-associated proteins by a synthetic neurotrophic compound. *J Neurochem* 90:1423-1431.
- Harder F, Kirchhof N, Petrovic S, Wiese S, Muller AM (2004) Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts. *Exp Hematol* 32:673-682.
- Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, 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* 131:5539-5550.
- Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D (2002) Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* 16:846-858.
- Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC (2003) F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 115:163-175.
- Iso T, Hamamori Y, Kedes L (2003a) Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:543-553.
- Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003b) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194:237-255.
- Iwami Y, Masuda H, Asahara T (2004) Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med* 8:488-497.
- Jansen M, de Witt Hamer PC, Witmer AN, Troost D, van Noorden CJ (2004) Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas. *Brain Res Brain Res Rev* 45:143-163.
- Jing N, Tweardy DJ (2005) Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 16:601-607.
- Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y (2004) Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* 6:547-554.
- Kaneta M, Osawa M, Sudo K, Nakauchi H, Farr AG, Takahama Y (2000) A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* 164:256-264.
- Kashima T, Tiu SN, Merrill JE, Vinters HV, Dawson G, Campagnoni AT (1993) Expression of oligodendrocyte-associated genes in cell lines derived from human gliomas and neuroblastomas. *Cancer Res* 53:170-175.
- Kawamata S, Du C, Li K, Lavau C (2002) Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* 21:3855-3863.
- Kiaris H, Politi K, Grimm LM, Szabolcs M, Fisher P, Efstratiadis A, Artavanis-Tsakonas S (2004) Modulation of notch signaling elicits signature tumors and inhibits hras1-induced oncogenesis in the mouse mammary epithelium. *Am J Pathol* 165:695-705.

- Konnikova L, Kotecki M, Kruger MM, Cochran BH (2003) Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer* 3:23.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T (2000) Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14:1343-1352.
- Labourdette G, Roussel G, Nussbaum JL (1980) Oligodendroglia content of glial cell primary cultures, from newborn rat brain hemispheres, depends on the initial plating density. *Neurosci Lett* 18:203-209.
- Labourdette G, Roussel G, Ghandour MS, Nussbaum JL (1979) Cultures from rat brain hemispheres enriched in oligodendrocyte-like cells. *Brain Res* 179:199-203.
- Lachman LB, Brown DC, Dinarello CA (1987) Growth-promoting effect of recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor for a human astrocytoma cell line. *J Immunol* 138:2913-2916.
- Lafortune L, Nalbantoglu J, Antel JP (1996) Expression of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin 6 (IL-6) mRNA in adult human astrocytes: comparison with adult microglia and fetal astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:515-521.
- Levy OA, Lah JJ, Levey AI (2002) Notch signaling inhibits PC12 cell neurite outgrowth via RBP-J-dependent and -independent mechanisms. *Dev Neurosci* 24:79-88.
- Lewis PD (1968) Mitotic activity in the primate subependymal layer and the genesis of gliomas. *Nature* 217:974-975.
- Lissemore JL, Starmer WT (1999) Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Mol Phylogenet Evol* 11:308-319.
- Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, Fairman RM, Velazquez OC, Herlyn M (2003) Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23:14-25.
- Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC (2005) Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell* 7:575-589.
- Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J (2005) Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* 115:202-213.
- Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A (1998) The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8108-8112.
- Lubman OY, Korolev SV, Kopan R (2004) Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol Cell* 13:619-626.
- Lukashova V, Chen Z, Duhe RJ, Rola-Pleszczynski M, Stankova J (2003) Janus kinase 2 activation by the platelet-activating factor receptor (PAFR): roles of Tyk2 and PAFR C terminus. *J Immunol* 171:3794-3800.
- Lundkvist J, Lendahl U (2001) Notch and the birth of glial cells. *Trends Neurosci* 24:492-494.
- Mailhos C, Lewis J, Ish-Horowicz D, Modlich U, Harris A, Bicknell R (2001) Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* 69:135-144.
- Manuelidis EE (1965) Long-Term Lines of Tissue Cultures of Intracranial Tumors. *J Neurosurg* 22:368-373.
- Manuelidis L, Yu RK, Manuelidis EE (1977) Ganglioside content and pattern in human gliomas in culture. Correlation of morphological changes with altered gangliosides. *Acta Neuropathol (Berl)* 38:129-135.

- Matthay KK, DeSantes K, Hasegawa B, Huberty J, Hattner RS, Ablin A, Reynolds CP, Seeger RC, Weinberg VK, Price D (1998) Phase I dose escalation of <sup>131</sup>I-metaiodobenzylguanidine with autologous bone marrow support in refractory neuroblastoma. *J Clin Oncol* 16:229-236.
- Miyajima H, Osanai M, Chiba H, Nishikiori N, Kojima T, Ohtsuka K, Sawada N (2005) Glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products preferentially induce VEGF expression and reduce GDNF expression in human astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 330:361-366.
- Mokry J, Karbanova J, Filip S (2005) Differentiation potential of murine neural stem cells in vitro and after transplantation. *Transplant Proc* 37:268-272.
- Morrison SJ (2001) Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 13:666-672.
- Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ (2000) Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* 101:499-510.
- Murasawa S, Llevadot J, Silver M, Isner JM, Losordo DW, Asahara T (2002) Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation* 106:1133-1139.
- Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, Kageyama R, Okano H (2000) The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* 20:283-293.
- Nam Y, Aster JC, Blacklow SC (2002) Notch signaling as a therapeutic target. *Curr Opin Chem Biol* 6:501-509.
- Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L (2003) Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 22:6598-6608.
- Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F (2003) Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 33:416-421.
- Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, Karsan A (2004) Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21<sup>Cip1</sup> repression. *Mol Cell Biol* 24:8813-8822.
- Ohsako S, Hyer J, Panganiban G, Oliver I, Caudy M (1994) Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev* 8:2743-2755.
- Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, 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* 276:30467-30474.
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (1999) *Hes1* and *Hes5* as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* 18:2196-2207.
- Oishi K, Uchida MK (2003) [Functional differentiation of neural stem cells into endothelial cells]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122 Suppl:27P-29P.
- Oishi K, Kawakita E, Uchida MK (2002) [Differentiation of neural stem cells into blood vessel cells and their modulators]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 120:51P-53P.
- Oishi K, Kobayashi A, Fujii K, Kanehira D, Ito Y, Uchida MK (2004) Angiogenesis in vitro: vascular tube formation from the differentiation of neural stem cells. *J Pharmacol Sci* 96:208-218.
- Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C (2002) Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *Embo J* 21:5408-5416.
- Oliver TG, Wechsler-Reya RJ (2004) Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron* 42:885-888.

- Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T (1984) Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14:135-144.
- Parati EA, Bez A, Ponti D, de Grazia U, Corsini E, Cova L, Sala S, Colombo A, Alessandri G, Pagano SF (2002) Human neural stem cells express extra-neural markers. *Brain Res* 925:213-221.
- Pettmann B, Labourdette G, Devilliers G, Sensenbrenner M (1981) Effects of brain extracts from chick embryo on the development of astroblasts in culture. *Dev Neurosci* 4:37-45.
- Pitman M, Emery B, Binder M, Wang S, Butzkueven H, Kilpatrick TJ (2004) LIF receptor signaling modulates neural stem cell renewal. *Mol Cell Neurosci* 27:255-266.
- Ponten J, Macintyre EH (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74:465-486.
- Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA (2005) Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 65:2353-2363.
- Radtke F, Raj K (2003) The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3:756-767.
- Rao PK, Dorsch M, Chickering T, Zheng G, Jiang C, Goodearl A, Kadesch T, McCarthy S (2000) Isolation and characterization of the notch ligand delta4. *Exp Cell Res* 260:379-386.
- Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710.
- Reynolds BA, 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.
- Rojas M, Donahue JP, Tan Z, Lin YZ (1998) Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol* 16:370-375.
- Samoto K, Ikezaki K, Ono M, Shono T, Kohno K, Kuwano M, Fukui M (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* 55:1189-1193.
- Schlegel J, Piontek G, Kersting M, Schuermann M, Kappler R, Scherthan H, Weghorst C, Buzard G, Mennel H (1999) The p16/Cdkn2a/Ink4a gene is frequently deleted in nitrosourea-induced rat glial tumors. *Pathobiology* 67:202-206.
- Schubert D, Heinemann S, Carlisle W, Tarikas H, Kimes B, Patrick J, Steinbach JH, Culp W, Brandt BL (1974) Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* 249:224-227.
- Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P (1999) Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 286:741-746.
- Shawber CJ, Kitajewski J (2004) Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays* 26:225-234.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-1340.
- Shi CS, Kehrl JH (2004) Pyk2 amplifies epidermal growth factor and c-Src-induced Stat3 activation. *J Biol Chem* 279:17224-17231.
- Shimazaki T, Shingo T, 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* 21:7642-7653.
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR, Stark KL (2000) Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* 14:1313-1318.

- Sidell N, Sarafian T, Kelly M, Tsuchida T, Haussler M (1986) Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma: a cell variant system showing two distinct responses. *Exp Cell Biol* 54:287-300.
- Simpson P (1990) Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development* 109:509-519.
- Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23:7267-7273.
- Soignet SL, Benedetti F, Fleischauer A, Parker BA, Truglia JA, Ra Crisp M, Warrell RP, Jr. (1998) Clinical study of 9-cis retinoic acid (LGD1057) in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 12:1518-1521.
- Taichman DB, Loomes KM, Schachtner SK, Guttentag S, Vu C, Williams P, Oakey RJ, Baldwin HS (2002) Notch1 and Jagged1 expression by the developing pulmonary vasculature. *Dev Dyn* 225:166-175.
- Takano S, Kamiyama H, Tsuboi K, Matsumura A (2004) Angiogenesis and antiangiogenic therapy for malignant gliomas. *Brain Tumor Pathol* 21:69-73.
- Talora C, Cialfi S, Segatto O, Morrone S, Kim Choi J, Frati L, Paolo Dotto G, Gulino A, Screpanti I (2005) Constitutively active Notch1 induces growth arrest of HPV-positive cervical cancer cells via separate signaling pathways. *Exp Cell Res* 305:343-354.
- Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T (2001) Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 29:45-55.
- Tsai RYL, McKay RDG (2000) Cell Contact Regulates Fate Choice by Cortical Stem Cells. *J Neurosci* 20:3725-3735.
- Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebt S, Hamilton AD, Jove R (2001) Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 276:45443-45455.
- Uyttendaele H, Closson V, Wu G, Roux F, Weinmaster G, Kitajewski J (2000) Notch4 and Jagged-1 induce microvessel differentiation of rat brain endothelial cells. *Microvasc Res* 60:91-103.
- Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G (2001) Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 108:161-164.
- Virgintino D, Errede M, Robertson D, Girolamo F, Masciandaro A, Bertossi M (2003) VEGF expression is developmentally regulated during human brain angiogenesis. *Histochem Cell Biol* 119:227-232.
- Von der Thusen JH, Kuiper J, Van Berkel TJC, Biessen EAL (2003) Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 55:133-166.
- Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA (2004) Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* 6:838-845.
- Wang F, Li ST, Huang Q, Lan Q (2004) [Expression of Notch1 gene in the differentiation of the human embryonic neural stem cells to neurons]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 20:769-772.
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA (1998) Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21:63-75.
- Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, Osborne BA, Gottipati S, Aster JC, Hahn WC, Rudolf M, Siziopikou K, Kast WM, Miele L (2002) Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* 8:979-986.
- Weinmaster G (1997) The ins and outs of notch signaling. *Mol Cell Neurosci* 9:91-102.

- West H, Richardson WD, Fruttiger M (2005) Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development* 132:1855-1862.
- Wharton KA, Johansen KM, Xu T, 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* 43:567-581.
- White BD, Pozza CH, Davies R, Hanieh A (2002) A case of primary cerebral neuroblastoma in adolescence. *Australas Radiol* 46:60-64.
- Wright LS, Li J, Caldwell MA, Wallace K, Johnson JA, Svendsen CN (2003) Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem* 86:179-195.
- Yaris N, Yavuz MN, Reis A, Yavuz AA, Okten A (2004) Primary cerebral neuroblastoma: a case treated with adjuvant chemotherapy and radiotherapy. *Turk J Pediatr* 46:182-185.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23:9392-9400.
- Zhang X, Li X, Wu JW, Gao DK, Liang JW, Liu XZ (2002) Experiment and observation on invasion of brain glioma in vivo. *J Clin Neurosci* 9:668-671.

## Résumé

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer la production de neurones versus cellules gliales à partir de cellules souches neurales, nous avons étudié le rôle de la voie de signalisation intercellulaire Notch.

En utilisant le modèle *in vitro* des neurosphères qui représentent la descendance clonale des cellules souches neurales, nous avons montré que la voie Notch agissait en deux étapes : (i) la voie Notch favorisait le lignage glial et réprimait le lignage neuronal ; (ii) Notch stimule la différenciation des astrocytes et inhibe celle des neurones et des oligodendrocytes. Nous avons sélectionné une petite molécule non peptidique, le tCFA15 qui favorise la production de neurones aux dépens des cellules gliales dans les neurosphères, un effet qui rappelle celui résultant de l'inactivation de la voie Notch. L'analyse moléculaire a montré que le tCFA15 diminuait spécifiquement l'expression de *Notch1* et par conséquent l'expression de *Hes5* ce qui confirme l'inactivation fonctionnelle de *Notch1*. Nous avons montré que le tCFA15 en plus de son action sur *Notch1*, diminue la phosphorylation de STAT3, suggérant une interaction entre les voies de signalisation Notch et STAT3. Nous avons montré par des expériences d'activation et d'inactivation de ces deux voies que STAT3 était en amont de *Notch1*. L'analyse moléculaire a confirmé que STAT3 contrôlait l'expression de *Notch1*.

Le dysfonctionnement de la voie Notch est à l'origine de nombreuses pathologies qui vont de certaines maladies neurodégénératives à différents types de cancers.

Notch exerce des effets opposés sur la différenciation des neurones, oligodendrocytes et astrocytes. Nous avons cherché à établir un parallèle entre cet effet physiologique et l'effet de la voie Notch sur les lignées tumorales du système nerveux. Nous avons montré que, même si dans tous les cas il provoque une diminution de *Notch1*, le tCFA15 conduit à des résultats opposés en ce qui concerne les neuroblastomes et les oligodendrogliomes d'une part, et les astrocytomes d'autre part.

Les cellules souches neurales sont localisées dans des niches vasculaires. Nous avons étudié le rôle éventuel de la voie Notch dans les interactions réciproques entre les précurseurs des cellules endothéliales et les neurosphères. Nous avons montré que ces interactions existent *in vitro* et qu'elles passent par l'induction de l'expression de *Dll4* dans les précurseurs des cellules endothéliales et dans les cellules des neurosphères.



## Summary

We are interested in the role of the intercellular Notch signaling pathway in the production of neurons versus glia from neural stem cells.

Using the in vitro model system of neurospheres, which consists in the clonal progeny of neural stem cells, our group has shown that Notch signalling was acting in two steps. In a first step, Notch is acting as a switch promoting the glial lineage while it represses the neuronal lineage. In a second step, Notch is acting on the differentiation, and promotes astrocytic differentiation while it inhibits neuronal and oligodendroglial differentiation.

We have selected a small non-peptidic molecule, tCFA15, which promotes neurons at the expense of glial cells in manner reminiscent of the inactivation of Notch. My work consisted first, in elucidating the mechanism of action of tCFA15 at the molecular level. We have shown that tCFA15 specifically 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. Molecular investigations have shown that inhibiting STAT3 results in a decrease in Notch1 expression, thus confirming the gain and loss of functions experiments which placed STAT3 as an upstream regulator of Notch1.

Notch dysfunction is at the origin of numerous pathologies, ranging from neurodegenerative diseases to cancers. We have shown that Notch has opposite effects on the differentiation of neurons, oligodendrocytes and astrocytes. We attempted to establish a parallel between those physiological effects and a putative effect of Notch on various tumour cell lines from the nervous system. Using tCFA15 as a pharmacological tool to modulate Notch function, we have shown that, although it consistently decreases Notch1 in most of all studied cancer cell lines, tCFA15 has an opposite effect on neuroblastoma and oligodendroglioma on the one hand and on astrocytoma, on the other hand.

Neural stem cells are localised in vascular niches. We have examined the role of the Notch pathway in the reciprocal interactions between the endothelial precursors cells and the neurospheres. We have shown that those interactions do exist in vitro and that they are mediated by the reciprocal induction of the expression of Dll4 genes in both the endothelial precursors cells and neurospheres.