



HAL
open science

Contribution des cellules souches de glioblastome à l'hétérogénéité tumorale : aspect thérapeutique et développement d'un système d'expression mosaïque fluorescent

Lionel Meyer

► To cite this version:

Lionel Meyer. Contribution des cellules souches de glioblastome à l'hétérogénéité tumorale : aspect thérapeutique et développement d'un système d'expression mosaïque fluorescent. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ109 . tel-02003526

HAL Id: tel-02003526

<https://theses.hal.science/tel-02003526>

Submitted on 1 Feb 2019

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

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

UNIVERSITE DE STRASBOURG
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Unité INSERM U1109

THESE
Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire
Spécialité : Neurosciences

Par
Lionel Meyer

**Contribution des cellules souches de glioblastome à
l'hétérogénéité tumorale : aspect thérapeutique et
développement d'un système d'expression mosaïque fluorescent**

Soutenue publiquement le 14 octobre 2016

Membres du jury

Directeur de thèse : Dr. **Dominique Bagnard**, INSERM, Strasbourg
Rapporteur externe : Pr. **Marc Sanson**, ICM, Paris
Rapporteur externe : Pr. **Hervé Chneiweiss**, IBPS, Inserm, Paris
Examineur interne : Pr. **Vincent Lelièvre**, INCI, CNRS, Strasbourg

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. »

— Aristote

Remerciements

Avant d'entrer dans le vif du sujet, je tiens à remercier tout particulièrement les membres du jury pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse. Merci aux Professeurs Hervé Chneiweiss, Marc Sanson et Vincent Lelièvre d'apporter vos critiques, corrections et jugements ainsi que vos visions de spécialistes adaptés à mon projet de recherche.

Je remercie le Dr. Gertraud Orend, directrice du laboratoire MN3T pour son accueil et pour les nombreux commentaires en réunion et présentations internes, notamment lors de ma préparation au concours des contrats doctoraux.

Je veux remercier le Dr. Dominique Bagnard, mon directeur de thèse, d'ailleurs c'est plus qu'un remerciement, c'est de la reconnaissance. Tu as très bien compris mon fonctionnement à la motivation et au challenge, me permettant de me surpasser. Tu m'as toujours laissé faire mes choix pour enseigner durant la thèse et tu m'as même trouvé des petits « extras » pour les TP de neuro. Je prends avec recul la fameuse présentation de février 2013 qui a été une épreuve pour moi, mais également un vrai déclic. Merci de m'avoir supporté avec mes centaines de questions et mes envolées lyriques. Tu m'as accordé ta confiance pour mener à bien ces projets sur les cellules souches. On parlait d'un projet qu'on trouvait « sexy » sur le papier pour enfin le toucher du doigt presque cinq ans plus tard. Oui, cinq ans depuis le premier stage. Cinq ans de moments conviviaux avec l'équipe, ou en privé avec nos vacances sur l'autre continent, avec plein de souvenirs : Zizi Cheng (very goood !), les homards de Boston, les soldes à Vancouver, la méduse pochée... Mais aussi des sorties dans les patelins alsaciens, des repas chez toi, chez moi, avec du vin naturellement ! Il est certain que je vais bien devoir voler de mes propres ailes et je m'en réjouis, mais je regrette déjà de devoir quitter l'équipe et mon premier mentor scientifique. Non, je ne dirai pas que je veux être comme toi quand je serai plus grand, mais presque...

Un grand merci à l'équipe MN3T pour leur aide et leur soutien dans bien des domaines et l'entente du groupe lors des retraites.

Je commence par le Dr. Olivier Lefebvre, merci pour ton importante collaboration sur le projet iMESYS. Tout ce que je peux savoir de la bio mol, ça vient de toi. Ton Padawan a presque fini par prendre goût à travailler avec de l'ADN ou de l'ARN, du moment qu'ils viennent de cellules souches neurales, ou à la limite de lentivirus. Tu as investi beaucoup de temps et d'énergie, toujours partant pour lancer une nouvelle construction avec une nouvelle protéine fluo ou un autre antibiotique de sélection. Je connais presque tout le tableau des enzymes de restrictions de chez NEB. Te souviens-tu de notre course de la mini-prep ? Je ne dévoilerai pas le vainqueur pour ne froisser personne... Merci pour les TRES nombreuses discussions, les critiques et les commentaires, mais surtout pour ton regard bienveillant sur mes travaux.

Merci à Annick Klein, pour ta bonne humeur permanente, tes nombreuses manips de génotypage des Lama1 monde ! Bon courage pour ta fin de carrière ! Merci à Christiane Arnold pour tes tuyaux en histologie, les cellules HEK293T ou pour m'avoir montré tes petites cachettes de matériel, je te souhaite de bien profiter de ta retraite !

Au tour de la DB team. Un immense merci à vous tous, anciens et actuels ! Vous m'avez permis de trouver la motivation de venir les matins dans les moments difficiles, ou alors de s'éclater simplement dans les périodes plus fastes.

Aurore, dite « Petit l'œil », je t'ai vu beaucoup changer depuis ton arrivée. Réservee, mais diablement attentionnée envers tout le monde, tu veux toujours notre bien. Merci pour tes manip FACS sur les lignées GS horribles et merci de gérer maintenant une bonne partie du labo. Ton accent provençal pleing' de Lava'nde et de chevaux fougueux galopant dans les marais salants de Camargue vont me manquer. Je te souhaite le meilleur dans ta carrière de duolinkeuse invétérée !

Merci à Marie pour ton aide sur les coupes cryostat de cerveau, surtout quand je n'avais plus le temps à la fin ! Tu es toujours disponible et partante pour aider ou rendre service. Félicitations pour avoir supporté les conditions de travail à l'animalerie, particulièrement pendant les travaux ! Je te souhaite de bien finir ta thèse, courage, tu parles tellement bien le français après si peu de temps, ça va le faire !

Merci à Coralie, nouvellement baptisée « micromaniaque », pour les bons moments partagés avec toi et pour avoir fait le gardiennage des cellules souches pendant mes absences du labo, même si une partie d'entre elles ne s'en sont jamais remises, hein ! J'espère que tout se passera bien pour ta thèse, que tu arriveras un jour à faire fonctionner un « viro-peptide » et ouvrir la nouvelle aire de la médecine par les virus de plantes !

Merci à Caroline, « Caro » ou « Fraulin Spenly » pour apporter tes connaissances dans tellement de domaines et ta capacité de troublesolving, sûrement due à ton grand âge... scientifique. Tous tes cheveux blonds n'ont donc pas encore eu raison de ta logique et de ta spontanéité ! J'ai beaucoup aimé travailler avec toi et partager des problèmes de manips ou manigancer des montages de vidéos pour les collègues...

Merci à Michael, dit « Mika » ou « Vandahay'n » pour tout le Van Der Lifestyle au final ! Mon collègue de bureau le plus bruyant (presque autant que moi, c'est pour dire) mais sûrement le plus adorable et le plus attentionné ! Derrière ton T-shirt noir à motif noir, surpiqué de noir, se cache un Vanderou tout tendre qui va me manquer. Je suis heureux d'avoir pu bosser avec toi, mais aussi et surtout fait tout ce qu'on a pu faire à côté : des barbecues, péter des saignées dans le béton indestructible de ta (enfin) maison, jouer avec ta splendide et symétrique fille Ambre, tester de nouveaux canons à azote ou encore échanger de l'amiante contre du caoutchouc...

Merci à Gérard Crémel, comme la Crème avec un -L-, dit « Gégé » pour toutes les discussions, débats, contradictions, jeux de mots, fourche-langues et autres calculs théoriques de répartition d'hélices alpha dans les membranes. Je crois que les mots me manquent pour qualifier le Gégé. A mi-chemin entre Le Che et Ferré, tu es le syndicaliste le plus capitaliste de Peptimimesis ! J'ai adoré nos si longs échanges sur le LDS, les peptides, les histoires de l'Université, les choses de la vie... Tu auras été plus qu'un collègue et pair (presque grand pair d'ailleurs) et même si mon impertinence avec toi était devenue un jeu que tu ne te privais pas de me retourner, elle ne faisait que cacher ma profonde amitié que j'ai pour toi. La bise à Nadjette.

Merci à Tristan, dit « Ruppestre », l'homme dont les talents d'analyse de l'angiogénèse sur substrat de ténascine-C (mmh yeah yeah goud goud) n'ont d'égal que ceux de ta cuisine à la graisse de canard. Même si tu es persuadé que la totalité de la planète a tort, tu as souvent mis les choses à plat et apporté beaucoup dans les débats scientifiques du labo. Et forcément, tu sais mettre l'ambiance en appelant à l'apéro dès 11h le matin ou en dessinant des parties anatomiques masculines équivoques partout. Mes remerciements sont joints pour Claire, cela va de soi. Vous avez toujours été là pour moi. Je vous adore !

Merci à Guy, le retraité le plus hyperactif que je connaisse. Je te remercie de tout ton soutien débordant, de nos échanges concernant les immunos (et le Koehler bordel ! toujours faire le Koehler !) l'enseignement et pour ton légendaire CAFE OUI ! Je t'adresse également un grand merci pour la relecture pointilleuse de mon manuscrit. On a passé de très bons moments en dehors du boulot et je me souviens de nombreuses attentions que tu as pu avoir pour moi ou le reste de l'équipe. Je te souhaite encore de belles années à sillonner la France dans ta demi-maison sur roues ! Bises !

Je remercie particulièrement Nadège, Alexia, Aurore (avec Pulu, assimilé DBTeam, tant tu as été présent au final) et Laurent. Le quatuor de la mort ! Il faudrait dix pages pour dire tout ce que j'ai sur le cœur. Alors je me contenterai de quelques lignes. Vous avez été l'origine ! La source ! On a vécu des moments « oufissimes », à se faire des prises de judo avec Lando dans le bureau, des limaces dans les oreilles avec Ur, des moments de « frachitude » ultimes avec le duo Nadégou-Alexito ! Laurent, tu m'as appris tant de choses à mon arrivée en m'ayant pris sous ton aile. Vous avez été le rayon de soleil du labo et vous voir partir les uns après les autres a été très dur. Vous avez été bien plus que des collègues, j'ai découvert de vrais amis. La distance n'y fait rien, nous continuons à nous voir et à dormir les uns chez les autres et je sais que nous ne perdrons pas ce lien spécial que nous avons tissé ! Je vous embrasse tous.

Merci à tous mes amis, les groupes de la fac, du FEC, de Cernay, de Voiron... ce serait trop long de tous vous citer. Je vous remercie d'avoir su être si patient, compréhensifs face à mon mutisme social de fin de thèse. Vous avez tous été présents malgré tout, pour sortir, boire de nombreux verres, faire la fiesta et tester de nouveaux restaurants ! Je vous embrasse tous !

J'aimerais remercier la famille Fritz et la myriade de cousins, cousines. Merci à vous Christine et Pierre de m'avoir si souvent remonté le moral, par téléphone ou à la maison. Je sais que j'ai toujours une oreille attentive et prête à nous aider et nous soutenir. Merci à Stéphanie et Francesco que je me réjouis de voir à chaque fois, et d'apprécier ensemble des bouffes improvisées les soirs de semaine. Vous m'avez encouragé tout le temps et je vous en suis reconnaissant. Je vous souhaite du bonheur dans la nouvelle maison avec le bébé à venir !

Je veux également remercier ma famille. Merci à mes parents de m'avoir toujours poussé et cru en moi pendant toutes ces années de fac et de doctorat. Vous avez tout fait et donné pour moi, quitte à faire l'aller-retour pour me débloquer les cervicales ! Vous m'avez soutenu coûte que coûte, dans tous les moments, les pires comme les meilleurs. Je vous aime. Merci à mes grands-parents, mon oncle et ma tante, pour votre bienveillance, votre enthousiasme que je ressentais depuis la Moselle. J'ai également une pensée émue pour mes grands-parents maternels qui auraient tant voulu voir ce que je suis devenu.

Merci à Justine, membre de la DB Team, mais pas que... Tu es essentielle pour moi et je passe des moments exceptionnels et indispensables à tes côtés (CLDQ). Tu as su me supporter dans toutes les phases (je ne sais d'ailleurs pas comment tu fais) et m'aider encore dans les dernières semaines à compléter des manips *in extremis*. Quant aux prévisions « rousseliennes » comme tu le dis, si tu te le demandes encore, la réponse est oui.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
RESUME DE THESE	9
INTRODUCTION	11
1. Généralités sur les cellules souches	11
1.1 Essor de la recherche sur les cellules souches	11
1.2 Caractéristiques des cellules souches	13
1.2.1 L'autorenouvellement.....	13
1.2.2 La différenciation	14
1.3 Classification des cellules souches	15
1.3.1 Les cellules souches totipotentes	15
1.3.2 Les cellules souches pluripotentes	16
1.3.3 Les cellules souches multipotentes.....	16
2. Les cellules souches neurales	18
2.1 Composition cellulaire du système nerveux	18
2.2 Neurogenèse embryonnaire	19
2.3 Les cellules souches dans les niches neurogéniques	21
2.3.1 Preuve de l'existence de cellules souches neurales adultes	21
2.3.2 Les niches neurogéniques adultes	21
2.3.3 Régulateurs extrinsèques et maintien des cellules souches neurales.....	26
2.4 Les marqueurs des cellules souches neurales.....	28
2.4.1 Nestine.....	30
2.4.2 CD133 (Prominine-1).....	30
2.4.3 Sox2.....	31
2.4.4 Autres marqueurs	32
2.5 Différenciation des cellules souches neurales.....	34
2.5.1 Les mécanismes de la différenciation dans le temps et l'espace	34
2.5.2 Genèse et marqueurs des cellules différenciées.....	37
3. Glioblastome et cellules souches tumorales.....	41
3.1 Généralités et épidémiologie des glioblastomes.....	41
3.1.1 Les tumeurs du système nerveux.....	41

3.1.2	Epidémiologie du glioblastome	42
3.2	Symptômes, diagnostic.....	42
3.3	Classifications des gliomes.....	43
3.3.1	Classifications histopathologiques et cliniques	43
3.3.2	Les signatures moléculaires des glioblastomes.....	45
3.4	Les cellules souches de glioblastome (CSG).....	46
3.4.1	Définition d'une cellule souche de glioblastome	47
3.5	Régulation des CSG par la niche microenvironnementale.....	57
3.6	Traitements des glioblastomes et thérapies anti CSG	60
3.6.1	Traitements classiques du glioblastome	60
3.6.2	Résistance des CSG aux traitements	61
3.6.3	Thérapies ciblées contre les CSG.....	62
3.6.4	Le cas particulier des peptides inhibiteurs transmembranaires.....	65
4.	Transductions virales et technologies de suivi des cellules souches par fluorescence.....	71
4.1	Transduction de matériel génétique dans les cellules souches.....	72
4.1.1	Transfection d'ADN plasmidique.....	72
4.1.2	Transduction de cellules souches par vecteurs viraux.....	74
4.1.3	Système d'édition du génome CRISPR/Cas9.....	77
4.2	Les modèles de suivi du lignage cellulaire par fluorescence.....	78
4.2.1	Marquage cellulaire par expression de rapporteurs fluorescents contrôlés	79
4.2.2	Marquage cellulaire par rapporteurs multicolores.....	80
	OBJECTIFS DE LA THESE	83
	MATERIELS ET METHODES	85
1.	Animaux.....	85
2.	Culture cellulaire.....	85
2.1	Cellules souches neurales.....	85
2.2	Cellules souches de glioblastome.....	86
2.2.1	Culture de lignée de cellules souches de glioblastome.....	86
2.2.2	Dérivation de cellules souches tumorales à partir de glioblastome	87
2.3	Cultures de cellules neuronales et endothéliales	88
3.	Solubilisation et traitements avec les peptides MTP	88
4.	Tests fonctionnels.....	89
4.1	Test de prolifération par mesure MTS.....	89
4.2	Test de formation de sphères.....	90
4.3	Différenciation des cellules souches sur substrat bidimensionnel.....	90

4.4 Co-culture de tranches organotypiques de cerveau et de cellules souches	91
5. Le système d'expression mosaïque inductible (iMESYS).....	94
5.1 Principe.....	94
5.2 Constructions génétiques.....	95
5.2.1 Vecteur lentiviral de base	95
5.2.2 Construction neuronale MAP2-mCherry hPGK Puromycine	95
5.2.3 Construction astrocytaire GFAP-GFP hPGK Blastidine	96
5.2.4 Construction oligodendrocytaire CNP-CFP hPGK Néomycine	96
5.2.5 Construction endothéliale Tie2-mVenus hPGK Zéocine	97
5.3 Production des particules lentivirales par transfection de cellules HEK293T	97
5.4 Transduction des cellules par les lentivirus.....	99
6. Xénogreffes de cellules souches.....	100
6.1 Greffes hétérotopiques.....	100
6.2 Greffes orthotopiques	101
6.3 Coloration histologique des cerveaux au réactif de Giemsa	101
7. Analyse des marqueurs cellulaires par immunomarquage.....	102
7.1 Préparation des cellules souches sur coupe cryostat.....	102
7.2 Immunocytochimie sur cellules souches différenciées sur lamelles.	103
8. Analyse de l'expression des ARNm par RT-qPCR.....	104
9. Analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose par cytométrie en flux.....	105
10. Acquisition d'images et analyses des données.....	105
11. Tests statistiques	106
RESULTATS	108
PARTIE I : Obtention et caractérisation de cellules souches de glioblastome.....	109
1. Obtention de CSG à partir de cellules de GBM.....	110
2. Les CSG expriment des marqueurs de CS et des marqueurs de différenciation.....	111
3. Les CSG sont enrichies en marqueurs de cellules souches.	116
4. Les CSG sont multipotentes et tumorigéniques.....	119
PARTIE II : Evaluation de l'impact des peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1.....	122
1. Résultats précédents et intérêt de l'étude	122
2. Les récepteurs neuropiline-1 et plexine-A1 sont surexprimés dans les CSG.....	122
3. Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 inhibent la croissance des CSG <i>in vitro</i>	124
4. MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 ont des effets opposés sur la tumorigenèse des CSG.	127
PARTIE III : Développement du système d'expression mosaïque inductible iMESYS.....	131
1. Elaboration et validation des vecteurs plasmidiques et des vecteurs lentiviraux	131

2. Validation de la spécificité d'expression du système iMESYS	133
3. Validation du système iMESYS dans des cellules souches neurales humaines	135
4. Le système iMESYS neural est spécifique dans des CSG	141
5. Suivi de la différenciation de CSG en direct avec le système iMESYS.....	142
6. Le système iMESYS peut s'induire différemment selon les conditions de différenciation.	146
7. Validation du rapporteur iMESYS Tie2-mVenus pour l'analyse de la trans-différenciation..	148
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	152
1. Production et caractérisation des CSG établies.....	152
2. Evaluation de l'effet des peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 sur les CSG.....	157
2.1 Les peptides transmembranaires inhibent la croissance des CSG <i>in vitro</i>	157
2.2 Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 ont des effets opposés sur les CSG <i>in vivo</i>	159
3. Développement du système iMESYS pour le suivi de la différenciation des cellules souches	163
3.1 Choix et critiques du vecteur lentiviral.....	164
3.2 Le système iMESYS est spécifique des types cellulaires qu'il révèle.....	165
3.3 Le système iMESYS révèle une expression mosaïque des marqueurs de différenciation dans les CSG.....	169
3.4 Le système iMESYS est polyvalent et peut être étendu à d'autres applications.....	170
BIBLIOGRAPHIE	173
ANNEXES	201
Annexe 1: Résumé des publications et communications.....	201
Annexe 2 : Publications parues ou soumises.....	203

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Histogramme représentant le nombre de publications par an référencées sur Pubmed	12
Figure 2 : Concepts de division symétrique et asymétrique lors du renouvellement des cellules souches.	14
Figure 3 : Evolution de la capacité de différenciation des cellules souches dans le temps.....	15
Figure 4 : Processus de mise en place des tissus à partir des cellules souches mésenchymateuses (CSM).....	17
Figure 5 : Les cellules souches neurales dans les niches neurogéniques adultes de mammifères. I.....	22
Figure 6 : Illustration des flux de migration neuronaux en provenance de la ZSV chez l'Homme	23
Figure 7 : La niche neurogénique sub-ventriculaire, les types cellulaires et le lignage des CSN	24
Figure 8 : La niche neurogénique sub-granulaire, les types cellulaires et leur lignage	25
Figure 9 : Evolution du phénotype et de l'expression des marqueurs cellulaires des progéniteurs neuraux....	29
Figure 10 : Photographies d'immunomarquage de cellules souches neurales humaines en culture 2D.....	30
Figure 11 : Propriétés fonctionnelles des cellules souches et des progéniteurs neuraux.....	33
Figure 12 : Voies de différenciation classiques des CSN.....	34
Figure 13 : Les progéniteurs neurales suivent un développement séquentiel in vivo et in vitro	36
Figure 14 : Représentation schématique du développement et de la maturation des oligodendrocytes.....	40
Figure 15 : « Heatmap » de relation d'expression de gènes normaux et des gènes des différents GBM.....	46
Figure 16 : Hypothèses sur l'apparition des CSG à partir de cellules neurales	49
Figure 17 : Hypothèse de la contribution conjointe des CSN et des CPO à l'apparition des CSG.....	49
Figure 18 : Illustration des modèles des cellules souches de glioblastome (CSG).....	51
Figure 19 : Caractéristiques des sous-populations cellulaires des GBM.....	53
Figure 20 : Vues schématiques de la niche micro-environnementale et vasculaire des CSN et des CSG.....	58
Figure 21 : Représentation de la résistance des CSG aux traitements	61
Figure 22 : Plateformes de signalisation des récepteurs neuropiline-1, plexines et VEGFRs	67
Figure 23 : Représentation de la structure en hélice du domaine transmembranaire (TMD) de NRP1.....	68
Figure 24 : Schéma de la transfection par des polyéthylèneimines (PEI)	74
Figure 25 : Schéma du fonctionnement de l'infection par des vecteurs viraux.....	75
Figure 26 : Représentation schématique de la structure d'un rétrovirus (comprenant les lentivirus).....	76
Figure 27 : Concept de la technologie MADM appliqué à l'étude des gliomes	81
Figure 28 : Divisions des cellules initiales de CSG cultivées en condition de neurosphères.....	87
Figure 29 : Stratégie de synthèse des peptides thérapeutiques	89
Figure 30 : Principe de fonctionnement du système iMESYS.	94
Figure 31 : Carte du plasmide portant les séquences codantes de vecteur lentiviral.....	95
Figure 32 : Cartes des plasmides d'emballage pour la production de vecteurs lentiviraux.....	98
Figure 33 : Protocole de greffe hétérotopique de CSG en sous-cutané.....	100
Figure 34 : Caractérisation des cellules U 118 et établissement de leurs CSG dérivées.....	112
Figure 35 : Caractérisation des cellules U 373 et établissement de leurs CSG dérivées.....	113
Figure 36 : Caractérisation des cellules HB 14 et établissement de leurs CSG dérivées.....	114
Figure 37 : Caractérisation des cellules HB 30 et établissement de leurs CSG dérivées	115
Figure 38 : Caractérisation de la lignée de CSG NCH644.	116
Figure 39 : Analyse de l'expression des marqueurs dans les lignées de GBM et dans leurs CSG.....	117
Figure 40 : Analyse par RT-qPCR des niveaux d'expression relative des gènes des cellules souches et des gènes de différenciation.....	118
Figure 41 : Expression des marqueurs de différenciation dans les CSG nch644 et GSHB 30 cultivées en présence de sérum et sans facteurs de croissance.	120
Figure 42 : Mise en évidence de la tumorigénicité des cellules NCH644 et GSHB30.....	121
Figure 43 : Expression des récepteurs neuropiline-1 et plexine-A1 dans les CSG et les CSN.....	123
Figure 44 : Les récepteurs NRP-1 et plexine-A1 sont surexprimés dans la lignée de CSG NCH644	124
Figure 45 : Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 ont un effet anti-prolifératif spécifique des CSG mais pas des CSN.....	125

Figure 46 : Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 inhibent la formation de gliomasphères.....	126
Figure 47 : Le peptide MTP-NRP1 inhibe la croissance des tumeurs sous-cutanées de CSG	127
Figure 48 : Le peptide MTP-NRP1 inhibe la croissance des tumeurs intracérébrales issues de CSG.....	128
Figure 49 : Le peptide MTP-PlexA1 bloque l'initiation des tumeurs sous-cutanées de CSG.....	129
Figure 50 : Génération des constructions plasmidiques d'ADN du système iMESYS	132
Figure 51 : Validation par contrôle négatif du système de vecteurs lentiviraux iMESYS dans des cellules COS-7	133
Figure 52 : Les cellules neuronales SHS-Y5Y expriment uniquement le rapporteur fluorescent iMESYS MAP2-mCherry	135
Figure 53 : Caractérisation d'expression des marqueurs de cellules souches dans des cellules souches neurales humaines maintenues en culture indifférenciée	136
Figure 54 : Comparaison de l'expression des marqueurs de différenciation avec l'activation des rapporteurs fluorescents iMESYS dans des cellules souches neurales humaines.....	137
Figure 55 : Les CSN humaines expriment la construction GFAP-GFP dans des conditions de différenciation	139
Figure 56 : Les CSN humaines expriment la construction MAP2-mCherry dans des conditions de différenciation.....	140
Figure 57 : L'expression des marqueurs fluorescents iMESYS est spécifique des types cellulaires.	141
Figure 58 : Suivi de la différenciation de CSG avec le système iMESYS triple.....	143
Figure 59 : Les CSG expriment une mosaïque de rapporteurs iMESYS après 5 jours de différenciation.	145
Figure 60 : Cinétique d'expression des rapporteurs iMESYS pendant la différenciation forcée des CSG.....	146
Figure 61 : Induction des rapporteurs iMESYS dans un modèle de co-culture de CSG sur des tranches de cerveau.....	147
Figure 62 : Les cellules endothéliales humaines HUVEC expriment uniquement le rapporteur fluorescent iMESYS Tie2-mVenus.....	149
Figure 63 : Les cellules NCH644-Tie2-mCherry se transdifférencient et expriment le rapporteur fluorescent mVenus dans le matrigel après 7 jours.	150
Tableau 1 : Marqueurs courants utilisés dans l'identification des cellules souches neurales.....	32
Tableau 2 : Tableau présentant les différents milieux de culture utilisés in vitro	93
Tableau 3 : Liste des vecteurs lentiviraux produits et utilisés pour transduire les cellules iMESYS.....	99
Tableau 4 : Tableau des coordonnées d'injection stéréotaxiques pour la greffe intra-striatale de cellules chez la souris adulte.....	101
Tableau 5 : Tableau des anticorps primaires utilisés en immunocytochimie.	103
Tableau 6 : Tableau des anticorps secondaires.....	104
Tableau 7 : Liste de la provenance des lignées de CSG utilisées dans cette étude	109
Tableau 8 : Synthèse de la caractérisation des lignées parentales et des CSG dérivées.	110
Tableau 9 : Détail des pourcentages de cellules exprimant les marqueurs de cellules souches et de différenciation dans les lignées	117

LISTE DES ABREVIATIONS

ADAM (A desintegrin and metalloprotease) Métalloprotéinase et désintégrine de la matrice
AR : Acide rétinoïque
ATRA (All Trans Retinoic Acid) : Acide rétinoïque tout trans
bFGF (basic fibroblast growth factor) : Facteur de croissance de fibroblaste basique
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BMP : (Basic Myelin Protein) protéines basiques de la myéline
CFP (Cerulean Fluorescent Protein) : Protéine fluorescente céruléan
CMRA (Cell Tracker) : Chlorométhyl-rhodol-acétate, sonde cellulaire cytoplasmique.
CNP : 2'-3'-cyclic-nucléotide-3'-phosphodiesterase
CPO : Cellule précurseur d'oligodendrocyte
CSC : Cellule souche cancéreuse
CSG : Cellule souche de glioblastome
CSM : Cellule souche mésenchymateuse
CSN : Cellule souche neurale
GFP (Green Fluorescent Protein) : Protéine fluorescente verte
DAPI : 4',6' diamidino-2-phényl indole, marqueur intercalent de l'ADN.
DCX : Doublecortine
EGF (Epidermal Growth factor) : Facteur de croissance épidermal
EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) : Récepteur au facteur de croissance épidermal
EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse
ES : Cellule souche embryonnaire
FBS (Fœtal Bovine Serum) : Sérum de veau fœtal
GBM: glioblastome (astrocytome de grade IV)
GBSS : Gey's balanced salt solution
GFAP (Glial fibrillary acid protein): Protéine acide gliofibrillaire
HBSS : Hank's balanced salt solution
HGFR (Hepatocyte growth factor receptor) : Récepteur au facteur de croissance hépatocytaire
iPSC (induced Pluripotent Stem Cell) : Cellule souche pluripotente induite
LDS : Lithium dodécyl sulfate
MAP2 (Microtubule associated protein 2) : Protéine associée aux microtubules de type 2, spécifique de la voie neuronale.
MMP (Matrix metalloprotease) : Métallo-protéinase de la matrice
MTP : Peptide thérapeutique ciblant le domaine transmembranaire
NFL : Neurofilament
NG2 : Antigène neuro/glial 2
NRP1 : Neuropiline-1
NRP2 : Neuropiline-2
NS : Neurosphère
O4 : Ganglioside membranaire spécifique des oligodendrocytes
PBS (Phosphate Buffered Saline) : Tampon phosphate salin

PlexA1 : Plexine-A1

PLL : Poly-L-lysine

PLO : Poly-L-ornithine

PRG : Progéniteur

Sema : Sémaphorines

SHH : Sonic Hedgehog

TIMP : Inhibiteur de MMP

TNC : Ténascine-C

VEGF (Vascular endothelial growth factor) : Facteur de croissance endothélial vasculaire

VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) : Famille des récepteurs au VEGF

vWF (von Willebrand factor) : Facteur de von Willebrand

ZSV : Zone sub-ventriculaire

ZV : Zone ventriculaire

RESUME DE THESE

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus grave et la plus agressive comportant une sous-population de cellules souches tumorales (CSG). Ces dernières sont capables d'auto-renouvellement, de prolifération, de différenciation en cellules exprimant les marqueurs neuraux, et certaines CSG peuvent se transdifférencier en cellules vasculaires. Dans ce contexte, mes travaux ont consisté dans un premier temps à dériver et caractériser plusieurs lignées de CSG à partir de biopsies de patients afin de constituer une banque de lignées avec des propriétés différentes. Le deuxième axe de l'étude a porté sur l'évaluation de l'impact de peptides thérapeutiques transmembranaires développés au laboratoire, visant les plateformes de récepteurs de neuropiline-1 et de plexine-A1 surexprimées dans les CSG. Cette partie du projet montre que les deux peptides participent à diminuer la croissance des CSG *in vitro* et *in vivo*. Finalement, j'ai développé un outil génétique inductible multicolore (iMESYS) permettant de suivre la différenciation des cellules souches sur cellules vivantes au cours du temps. Basé sur l'expression de quatre rapporteurs fluorescents contrôlés par des promoteurs spécifiques des types cellulaires, il permet d'identifier le destin des CSG et d'analyser l'hétérogénéité et la plasticité de ces cellules.

Mots clefs : glioblastome, cellules souches tumorales, peptide thérapeutique transmembranaire, hétérogénéité, outil multicolore de suivi de la différenciation, transdifférenciation.

INTRODUCTION

1. Généralités sur les cellules souches

1.1 Essor de la recherche sur les cellules souches

La biologie des cellules souches a pris de plus en plus d'ampleur depuis les deux dernières décades. Cela s'explique par l'intérêt de ce type cellulaire dans la compréhension de mécanismes fondamentaux et thérapeutiques. Elles présentent l'avantage de pouvoir revenir à l'origine embryonnaire d'un individu avec tous ses mécanismes cellulaires associés : l'autorenouvellement, les divisions symétriques et asymétriques, la migration et la différenciation. Ces cellules souches sont aussi utilisées comme source de cellules somatiques matures produites en grande quantité, notamment pour l'industrie pharmaceutique, grande consommatrice de matériel biologique dans les études de « drug screening » à grande échelle sur tous les types de cellules potentiellement pathologiques.

De grandes avancées technologiques ont été faites depuis la découverte des cellules souches, plusieurs fois récompensées par des prix Nobel. C'est à Leroy Stevens et Barry Pierce, à partir d'une étude débutée en 1954 qu'est attribuée la première mise en évidence de cellules souches de tératocarcinome embryonnaire. Ces travaux pionniers ont permis à Sir Martin Evans en 1981 la découverte de cellules souches embryonnaires (cellules ES) de souris (Evans and Kaufman, 1981) pour laquelle il fut récompensé du prix Nobel de physiologie ou médecine en 2007. Seulement quatre ans plus tard, en 2011, Shinya Yamanaka et John Gurdon sont co-récepteurs du prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour avoir développé les cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Il est désormais possible de reprogrammer n'importe quelle cellule somatique en iPSC (Takahashi et al., 2007). Cet engouement autour des cellules souches a notablement augmenté depuis leur première mise en évidence puisque le nombre de publications référencées par PubMed-NCBI est passé de 879 en 1980 à plus de 26.500 en 2015 (**figure 1**) parmi lesquelles, 2319 publications concernent le mot clef « cellule souche neurale » et 7016 le terme « cellule souche cancéreuse » (Source Pubmed).

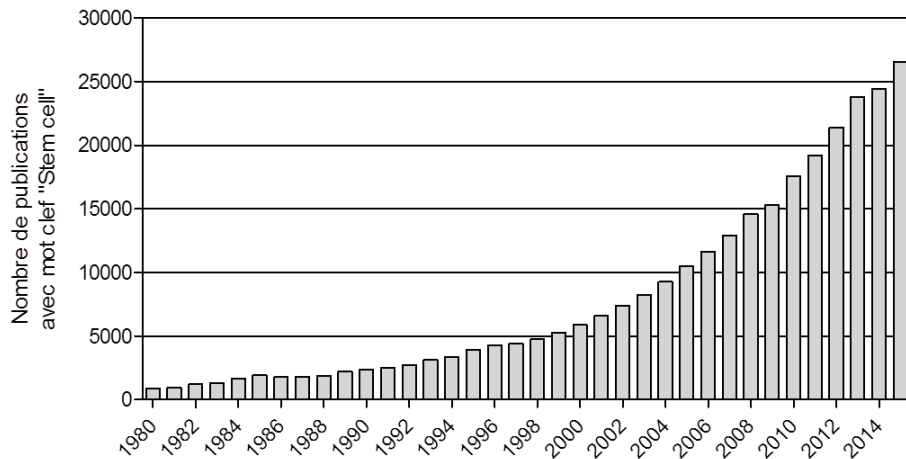


Figure 1 : Histogramme représentant le nombre de publications par an référencées sur Pubmed NCBI avec le mot-clé « stem cell », entre 1980 et 2015.

(Source: www.nlm.nih.gov/pubmed)

Parallèlement à ces découvertes *princeps*, les cellules souches de nombreux organes et tissus ont été décrites. Parmi elles, les cellules souches neurales (CSN) ont été indirectement découvertes par Joseph Altman en 1965 en décrivant la neurogenèse dans le cerveau de mammifères adultes, à partir de nouveaux critères morphologiques alors inconnus (Altman and Das, 1965). Les pairs d'Altman ne reconnurent pas cette découverte qui allait à l'encontre du paradigme du cerveau adulte définitivement figé. Au début des années 1990, les cellules souches neurales d'embryons pouvant donner naissance à l'ensemble des cellules d'un cerveau ont été décrites (Reynolds et al., 1992; Temple, 1989), juste avant de voir apparaître plusieurs études montrant l'apparition de nouveaux neurones dans les circuits hippocampiques et dans le bulbe olfactif, à partir de cellules souches neurales adultes (Eriksson et al., 1998; Lois and Alvarez-Buylla, 1993).

Les mécanismes physiologiques du développement embryonnaire et de l'entretien des tissus adultes passent par la prolifération des cellules souches. Malheureusement dans certaines pathologies comme les cancers, il y a une réactivation anarchique de ces mécanismes menant à des masses prolifératives, invasives et parfois métastatiques. L'origine de cette réactivation a pendant longtemps été ignorée. Une voie a été ouverte en 1997 avec la mise en cause de cellules souches hématopoïétiques cancéreuses dans la leucémie myéloïde aigüe chez l'Homme (Lapidot et al., 1994). Des cellules souches cancéreuses (CSC) aux propriétés similaires aux CSN ont été démasquées et font depuis l'objet de plus en plus de publications dans tous les domaines de la cancérologie. Par

exemple, des CSC ont été caractérisées pour la première fois dans des tumeurs du cerveau humain par l'équipe de Steindler en 2002 (Ignatova et al., 2002). S'en sont suivies de nombreuses études spécifiquement dans les gliomes et les glioblastomes (Singh et al., 2003; Galli et al., 2004), une tumeur cérébrale fréquente et très agressive, à l'issue systématiquement fatale.

Cela montre que la recherche sur les cellules souches et particulièrement sur les CSC, est un domaine relativement nouveau et dont de nombreux concepts, classifications ou nomenclatures sont en perpétuels remaniements.

1.2 Caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches sont les briques originelles de tout individu et regroupent un grand nombre de sous catégories de cellules indifférenciées ayant en commun deux mécanismes : l'autorenouvellement théoriquement infini dans des conditions de culture *in vitro* et la différenciation en cellules matures et fonctionnelles. Il a par exemple été montré que des cellules souches hématopoïétiques étaient capables de régénérer un système immunitaire compétent chez la souris en formant des colonies clonales (Till et al., 1964) capables de se spécialiser en lymphocytes matures (Weissman, 1994).

1.2.1 L'autorenouvellement

Ce phénomène désigne la capacité d'une cellule à se répliquer par mitose en générant deux cellules filles. Ce mécanisme très intense durant l'ontogenèse permet de générer de la masse cellulaire afin de donner à l'embryon un pool de cellules suffisant pour sa croissance. A l'âge adulte en revanche, les niches de cellules souches sont restreintes à quelques zones et maintenues dans un état moins prolifératif, appelé état de quiescence (Li and Bhatia, 2011). Ces cellules souches adultes peuvent quitter la quiescence et reprendre le cycle cellulaire lors d'un stress comme en cas de lésion pour régénérer le tissu (Cummings et al., 2005).

La division des cellules souches peut se faire de deux façons différentes en répondant aux facteurs de la niche dans laquelle elles se trouvent.

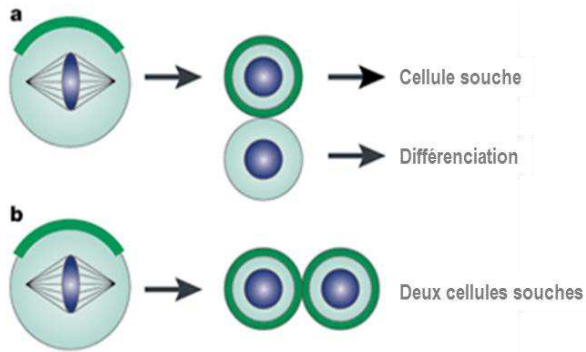


Figure 2 : Concepts de division symétrique et asymétrique lors du renouvellement des cellules souches.

(a) Division asymétrique donnant une cellule fille identique à la cellule mère, et une autre qui s'engagera dans une voie de différenciation. **(b)** Division symétrique donnant naissance à deux cellules filles identiques. Adapté de Knoblich, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001.

La division symétrique génère deux cellules filles identiques à la cellule mère, conservant les mêmes capacités de renouvellement (**figure 2a**). La division asymétrique quant à elle, donne une cellule fille identique à la mère pour conserver le pool de cellules souches (**figure 2b**), et une autre qui va ouvrir une voie de différenciation afin de se spécialiser dans les fonctions du tissu considéré (Knoblich, 2008). Le choix d'effectuer un des deux types de division est orchestré à la fois par les signaux exogènes comme les facteurs sonic hedgehog (SHH), bone morphogenic protein (BMP), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), jagged 1 (Jag-1), etc (Götz and Huttner, 2005; Temple, 2001) et par une organisation subcellulaire précise comme entre autres l'orientation des nucléoles lors de la mitose, la répartition membranaire inégale de Numb/Notch (Knoblich, 2008) ou la ségrégation mitochondriale entre les deux cellules filles (Katajisto et al., 2015).

1.2.2 La différenciation

Dans le cas des divisions asymétriques, une des deux cellules filles va entrer dans une voie de différenciation. Toutes les cellules souches en sont théoriquement capables et s'engagent dans ces voies pour fabriquer la diversité des cellules qui composent les différents organes. L'environnement cellulaire, à savoir les composants de la matrice extracellulaire et les sécrétions paracrines participent de concert à guider la différenciation terminale des cellules. Pour aboutir à une cellule fonctionnelle, la voie de différenciation comprend souvent plusieurs étapes de maturation régulées par une synchronisation spatio-temporelle de facteurs spécifiques à chaque zone fonctionnelle des organes (Temple, 2001; Weissman, 1994; White et al., 2001).

Néanmoins, la capacité de différenciation d'une cellule souche est intimement liée au stade de développement de l'individu et décline au fur et à mesure de la maturation et du vieillissement de son organisme.

1.3 Classification des cellules souches

Les cellules primordiales apparaissant après la fécondation sont capables de générer tout un organisme. Elles ont une capacité de différenciation supérieure aux cellules souches de l'adulte, dont le but principal est la régénération et la réparation des organes. On classe ainsi trois sous-catégories de cellules souches indifférenciées en fonction du stade de développement de l'organisme (**figure 3**) :

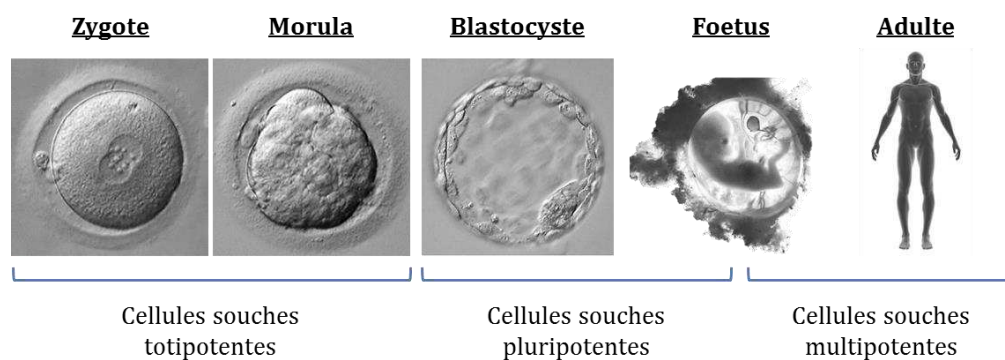


Figure 3: Evolution de la capacité de différenciation des cellules souches dans le temps. Au fur et à mesure que l'individu se développe à partir du stade de zygote jusqu'à l'âge adulte, le potentiel de différenciation des cellules souches se restreint.

1.3.1 Les cellules souches totipotentes

Ces cellules, au sommet de la hiérarchie, ne se retrouvent qu'aux stades extrêmement précoces du développement embryonnaire. Lorsque l'ovocyte est fécondé par le spermatozoïde, on obtient la première cellule du futur organisme, le zygote. Cette cellule totipotente est capable de donner naissance à la totalité des tissus de l'embryon ainsi que toutes les annexes nécessaires à son développement, comme par exemple le placenta (Bongso and Richards, 2004; Morgani et al., 2013). La totipotence est conservée pendant les premières divisions du jeune embryon jusqu'au stade morula de 16 cellules.

1.3.2 Les cellules souches pluripotentes

Le développement de l'embryon se poursuit avec la perte de totipotence et l'apparition de cellules pluripotentes présentes dans la masse interne du blastocyste, appelées cellules souches embryonnaires (ES). Elles peuvent théoriquement donner n'importe quel tissu de l'organisme en se différenciant sous forme des trois feuilletts primordiaux : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme (Evans and Kaufman, 1981; Morgani et al., 2013).

Si l'étude des cellules ES murines a permis de nombreuses avancées appliquées à la recherche thérapeutique et fondamentale, ces cellules ES humaines fait l'objet d'un véritable débat en matière d'éthique. Leur obtention était conditionnée à récupérer une cellule du blastocyste jusqu'à la découverte révolutionnaire par le groupe du japonais Shinia Yamanaka (Takahashi et al., 2007) en 2006 des cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes dermiques d'adultes. Cette découverte nobélisée a vu le jour en prélevant une biopsie de peau d'un sujet adulte dont les fibroblastes ont été infectés avec des rétrovirus contenant les séquences d'expression de quatre facteurs de transcription spécifiques des cellules pluripotentes : KLF4, OCT4, c-Myc et Sox2 (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Le caryotype, le phénotype, les marqueurs cellulaires, la pluripotence et la formation de tératocarcinome, l'autorenouvellement et finalement la capacité à former des chimères viables et fertiles après injection dans un blastocyste sont autant de points communs entre les cellules iPSC et les cellules ES.

1.3.3 Les cellules souches multipotentes

Ce type de cellules souches est retrouvée dans les phases de développement les plus tardives de l'embryon, le fœtus et l'organisme adulte. Il s'agit de cellules au potentiel de différenciation réduit à un tissu ou un organe et dont les niches de résidence sont extrêmement localisées. Elles permettent notamment de former les organes du fœtus, par prolifération et différenciation en cellules spécialisées et fonctionnelles, sous l'action de gradients de facteurs de croissance locaux tels que : bFGF, EGF, BMP, VEGF, Wnt, SHH ...

Lorsqu'elle entre dans un processus de différenciation, la cellule multipotente passe par des stades préalables de précurseur. C'est-à-dire que la cellule a entamé sa différenciation vers une cellule spécialisée mais n'est pas encore fonctionnelle. Par exemple, le processus de maturation des cellules souches mésenchymateuses (**figure 4**) contient

plusieurs étapes avant d'aboutir à une cellule totalement mature (Firth and Yuan, 2012). A chaque stade de différenciation supplémentaire, la cellule perd un peu plus son potentiel de prolifération, tout en migrant à travers le tissu, recevant de nouveaux signaux qui vont terminer le processus de spécialisation. C'est également le cas dans le SNC, par exemple pour les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (CPO) qui peuvent proliférer pour se différencier en pré-oligodendrocytes donnant finalement des oligodendrocytes responsables de la myélinisation¹ (Fogal et al., 2010).

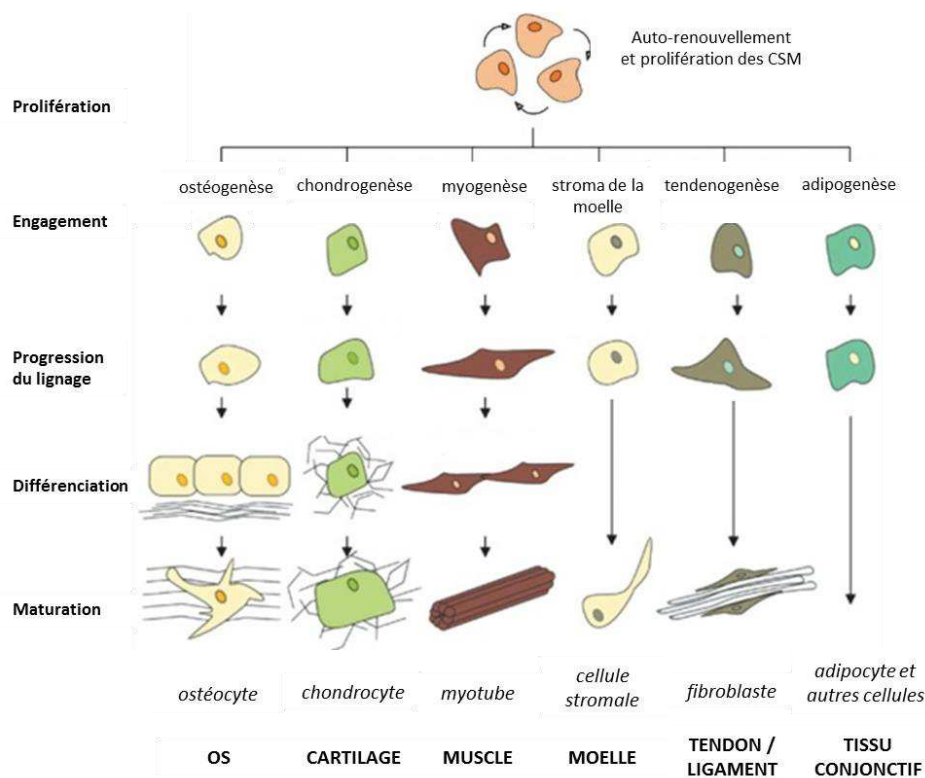


Figure 4 : Processus de mise en place des tissus à partir des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

Les CSM s'autorenouvellent et prolifèrent puis s'engagent dans des voies de différenciation en migrant et se positionnant dans le tissu final. Adapté de Firth et Yuan, *Pulm. Circ.*, 2012.

Dans le cas particulier des cellules souches neurales, elles peuvent donner naissance à des cellules différenciées comme les neurones, astrocytes et oligodendrocytes² (Ravin et al., 2008a; Temple, 2001). De même, ces cellules multipotentes sont retrouvées chez l'adulte

¹ La myélinisation est une étape cruciale dans la maturation finale du cerveau. Elle permet de mettre en place des gaines de myéline autour de certains axones et ainsi de définir différentes vitesses de transduction du signal électrique. Cette composante fait l'objet de nombreuses pathologies parmi lesquelles le syndrome de Guillain-Barré et la sclérose en plaque...

² Les types cellulaires gliaux et neuronaux provenant de la différenciation des cellules souches neurales ne sont néanmoins pas les seuls que l'on retrouve dans le système nerveux. Il comprend d'autres cellules de soutien ou de l'immunité comme les cellules épendymaires et la microglie par exemple.

dans des niches vasculaires. Des facteurs de signalisation les y maintiennent en phase de quiescence (Doetsch, 2003), tout en régulant leur activité mitotique (Morrison and Scadden, 2014).

2. Les cellules souches neurales

2.1 Composition cellulaire du système nerveux

Le système nerveux est composé de plusieurs types de cellules parmi lesquelles les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes forment les cellules fonctionnelles du tissu nerveux, dérivant toutes des CSN (Quiñones-Hinojosa et al., 2006; Temple, 2001).

Les neurones, véritables unités fonctionnelles excitables du système nerveux représentent environ 50 % (80 à 100 milliards de cellules) des cellules totales du système nerveux humain (Azevedo et al., 2009). Ils sont connectés entre eux par des synapses formant un réseau complexe subdivisé en noyaux, régions ou aires. Il existe une grande diversité de morphologies et de fonctions qui font ressortir trois classes : les neurones sensoriels, les interneurons et les neurones effecteurs.

Les astrocytes sont des cellules multifonctionnelles de la glie qui participent activement au maintien de la barrière hémato-encéphalique³ (BHE), jouant un rôle clef dans la protection du cerveau face à son environnement. Ils sont aussi impliqués dans la gestion des échanges synaptiques, l'apport de nutriments aux neurones et leur guidage durant l'embryogenèse (Barres, 2008; Haydon, 2001). Ils communiquent également en réseau afin de synchroniser l'activité cérébrale.

Les oligodendrocytes qui font également partie des cellules gliales sont spécialisés dans la myélinisation des neurones du système nerveux central. Tandis que le système nerveux périphérique est myélinisé par les cellules de Schwann dérivant des CSN issues des crêtes neurales. Dans tous les cas, l'enroulement des prolongements cytoplasmiques de ces cellules myélinisantes autour de l'axone formant la gaine de myéline permet d'augmenter la célérité de l'influx nerveux.

³ La barrière hémato-encéphalique (BHE) est le résultat de la coopération des pieds astrocytaires et des cellules vasculaires générant un obstacle semi-perméable aux molécules apportées par le sang et imperméable aux cellules circulantes. Cela fait du cerveau un organe immuno-privilégié, c'est-à-dire qu'aucune cellule immunitaire systémique ne peut pénétrer le parenchyme cérébral en condition physiologique normale. Dans le cas des glioblastomes, la BHE peut être partiellement rompue.

Le cerveau est également composé d'autres cellules d'origine embryonnaire non neurales. Parmi elles, les cellules de la microglie, aux fonctions très antagonistes ⁴, forment l'immunité propre de système nerveux central et sont assimilées à des macrophages (Li and Graeber, 2012).

Les épendymocytes tapissent les ventricules et assurent la jonction entre le liquide céphalorachidien (LCR) et le parenchyme cérébral. Ils ont pour origine le tube neural et conservent un phénotype épithélial munis de cils vibratiles permettant le brassage du LCR autour du système nerveux. Ces cellules sont directement en lien avec la niche neurogénique contenant les CSN en délimitant la partie basale de la zone subventriculaire (SVZ) (Mu et al., 2010).

Bien que ne faisant pas directement partie du parenchyme cérébral, les cellules vasculaires comprennent les cellules qui forment les vaisseaux sanguins, à savoir les cellules endothéliales et les péricytes. Ces structures permettent l'apport sanguin au système nerveux et sont une composante essentielle dans la BHE. De plus, les vaisseaux sanguins forment des niches vasculaires essentielles au maintien de la quiescence à long terme des CSN (Ottone et al., 2014; Shen et al., 2008).

Au sommet de la hiérarchie des cellules neurales se trouvent les CSN multipotentes. Ces cellules, initialement majoritaires dans les étapes précoces de l'ontogenèse voient leur nombre diminuer avec l'avancée du développement. Elles se cantonnent dans les niches neurogéniques de la SVZ et de la zone sub-granulaire (ZSG). La SVG permet de générer des neuroblastes qui migrent dans le bulbe olfactif via le flux rostral migratoire et terminent leur différenciation en interneurones. Tandis que les CSN de la ZSG génèrent de nouveaux neurones glutamatergiques peuplant le gyrus denté de l'hippocampe. (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Ma et al., 2009; Zhao et al., 2008).

2.2 Neurogenèse embryonnaire

Le système nerveux des mammifères se met en place durant la vie embryonnaire et termine sa maturation après la naissance. Ce phénomène débute lors de l'apparition de la plaque neurale sur le feuillet neuro-ectodermique de l'embryon triblastique durant la neurulation. Chez le rat, au 8^{ème} jour de développement, le tube neural formé à partir de

⁴ La microglie a des fonctions ambiguës dans la neuroprotection, en particulier dans le cas des tumeurs cérébrales, où elle peut être pro-tumorale ou anti-tumorale.

l'invagination de la plaque neurale qui donnera naissance à l'encéphale et à la moelle épinière, comporte 50 % de cellules souches neuro-épithéliales (Kalyani et al., 1997)(Kalyani et al., 1997; Temple, 2001). Il s'agit des premières cellules neurales mises en place formant la future zone ventriculaire et qui donneront naissance à l'ensemble des structures nerveuses. Néanmoins la quantité de ces cellules baisse très vite lors de l'ontogenèse.

L'organisation spatio-temporelle est dépendante de gradients de facteurs de croissance tels que les couples antagonistes BMP-SHH pour l'organisation dorso-ventrale et FGF-RA pour la répartition antéro-postérieure des cellules souches neuro-épithéliales (Altmann and Brivanlou, 2001; Temple, 2001). Ces mécanismes permettent la genèse du tube neural, où BMP est majoritaire en position dorsale, sécrété par la plaque neurale, tandis que SHH est majoritairement retrouvé dans la zone ventrale, sécrété par la notochorde. FGF, sécrété principalement à partir de la partie caudale de l'embryon, permet de maintenir les cellules souches dans un état prolifératif, tandis que l'AR sécrété par la partie antérieure de l'embryon promeut la différenciation et la ségrégation des cellules de l'ectoderme neural et du mésoderme somitique en neurones (Dorey and Amaya, 2010).

Les gradients conditionnent donc immédiatement le bon développement du système nerveux par l'adressage correct des cellules souches. Ainsi, à terme, les mécanismes trophiques permettent de former les 5 vésicules neurales : le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale, ainsi que la moelle épinière allongée et caudale.

Durant cette mise en place, apparaît la zone ventriculaire (ZV), ancien neuroectoderme, composée de cellules souches neuroépithéliales. Une fois positionnées, ces cellules au contact à la fois de la surface piale et de la surface ventriculaire, subissent des divisions symétriques permettant d'augmenter la masse cellulaire.

Par la suite, dès le 12^{ème} jour de l'ontogenèse des souris, les cellules souches neurales vont entrer dans un cycle de divisions asymétriques afin de débiter la première vague de différenciation et de neurogenèse (Barnes and Polleux, 2009). Une région neurogénique supplémentaire apparaît accolée à la ZV qui commence à disparaître : la ZSV (Kriegstein and Alvarez Buylla, 2009). Elle sera alors conservée durant toute la vie aux abords des ventricules latéraux pour servir de réserve neurogénique à l'âge adulte.

2.3 Les cellules souches dans les niches neurogéniques

2.3.1 Preuve de l'existence de cellules souches neurales adultes

Les CSN sont caractérisées (comme vue dans le paragraphe 1.3.3) par leur capacité à s'autorenouveler, en formant des sphères *in vitro*, et à se différencier en neurone, astrocyte ou oligodendrocyte.

Samuel Weiss et Brent Reynolds ont ainsi été les premiers en 1992 à démontrer l'existence de CSN persistantes à l'âge adulte chez des souris âgées de 3 à 18 mois. Les cerveaux ont été broyés, et les cellules dissociées ont été remises en culture dans un milieu dépourvu de sérum enrichi en EGF et/ou bFGF. Après quelques jours, la plupart des cellules meurent, sauf environ 15% d'entre elles capables de se diviser et de former des édifices flottants : les neurosphères (Reynolds and Weiss, 1992). Les cellules formant les neurosphères restent indifférenciées après plusieurs passages et continuent à former de nouvelles sphères à partir de cellules isolées, c'est le principe d'autorenouvellement. Les auteurs y montrent l'expression d'un filament intermédiaire de classe VI, la nestine, marqueur des cellules souches neuro-épithéliales.

De plus, une fois mises sur un substrat adhérent de poly-L-ornithine et dans des conditions de différenciation avec sérum, les CSN s'engagent spontanément dans les voies de différenciation neuronale ou astrogliale respectivement positives pour les marqueurs Neuron Specific Enolase (NSE) et Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) ⁵.

De nombreux travaux ont par la suite permis d'affiner les protocoles de culture et de montrer que les cultures de CSN contenaient des progéniteurs neuraux et gliaux, capables également de se diviser (Chojnacki and Weiss, 2008; Marshall et al., 2007; Tropepe et al., 1999; Weiss et al., 1996).

2.3.2 Les niches neurogéniques adultes

Comme décrit dans les paragraphes précédents, deux niches neurogéniques émergent durant l'embryogenèse et perdurent à l'âge adulte. Il s'agit de la ZSV, reliquat de la

⁵ NSE et GFAP sont deux protéines exprimées respectivement par les neurones et les astrocytes. Il existe néanmoins de nombreux autres marqueurs plus ou moins exclusifs à chaque type cellulaire, selon leur niveau de différenciation. Tous les détails de choix des marqueurs seront expliqués dans le paragraphe 2.4.

ZV mise en place lors de la corticogenèse d'une part, et de la zone sub-granulaire (SGZ) située dans l'hippocampe d'autre part (**figure 5**).

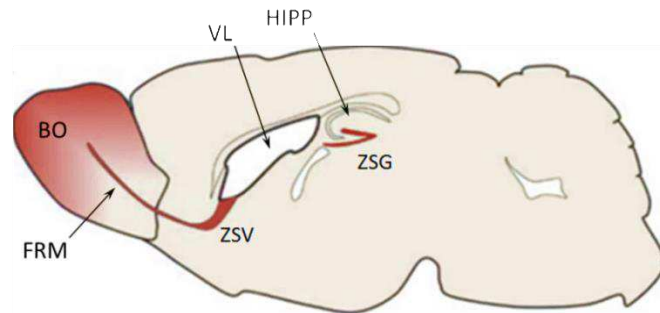


Figure 5 : Les cellules souches neurales dans les niches neurogéniques adultes de mammifères. Illustration schématique d'une coupe sagittale médiale d'un cerveau de souris adulte. Les CSN se trouvent dans la zone sub-ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux (VL) et dans la zone sub-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe (HIPP). Les cellules de la ZSG se destinent essentiellement à remplacer les cellules hippocampiques. Les cellules de la ZSV se différencient en neuroblastes et migrent majoritairement, via le flux rostral migratoire (FRM), dans le bulbe olfactif (BO). Adapté de Dengke K. MA et al., *Cell Research*, 2009.

Ces deux zones neurogéniques contiennent des CSN se distinguant par leurs phénotypes et leurs capacités de différenciation (Zhao et al., 2008). En revanche, les deux zones partagent des éléments en commun : 1- un rapport intime avec les vaisseaux sanguins, de plus en plus décrit comme jouant un rôle prépondérant dans le maintien de ces niches (Suh et al., 2007), 2- une membrane basale permettant l'ancrage cellulaire, 3- une matrice extracellulaire, modulant les capacités d'adhérence et de signalisation des molécules environnantes. Cette architecture microscopique est la clef de la compréhension des mécanismes de plasticité, de prolifération, de réparation et de différenciation des cellules souches et progénitrices résidentes. Ces niches sont particulièrement bien décrites chez les rongeurs.

Cependant, peu de travaux décrivent ces zones chez l'Humain. Les quelques études sur des tissus humains issus de résections chirurgicales, comme par exemple celles menées par l'équipe d'Arturo Alvarez-Buylla, décrivent des niches avec des CSN positives pour le marqueur GFAP (appelées fréquemment astrocytes de la ZSV), dont la stratification et les relations avec les épendymocytes diffèrent de celles retrouvées chez les rongeurs (Arias-Carrión, 2008; Quiñones-Hinojosa et al., 2006).

De même, l'utilité du maintien des CSN dans les niches neurogéniques adultes a longtemps été la source de nombreux questionnements. Certaines réponses ont été apportées dans des modèles de pathologies cérébrales, décrivant un rôle de stock de cellules de réparation pour les zones cérébrales lésées. Les CSN s'activent par exemple en cas d'AVC

ou de sclérose en plaque, afin de générer respectivement de nouveaux neurones et de nouveaux oligodendrocytes qui migrent vers les aires endommagées pour se réintégrer dans le circuit et les réparer en partie (Chamberlain et al., 2015; Otero-Ortega et al., 2015).

Dans le domaine de l'anatomie et de la physiologie normale, peu de travaux sont disponibles sur l'Humain, en raison de la difficulté à se procurer des cerveaux entiers. Dans une étude menée sur des cerveaux prélevés post-mortem, les indices sur la morphologie de certains progéniteurs neuraux à proximité de la ZSV laissent présumer à une migration isolée de certains neuroblastes DCX+ / PSA-NCAM+ vers des zones non déterminées du cerveau, probablement dans un but de renouvellement (Quiñones-Hinojosa et al., 2006). En 2011, la même équipe décrit pour la première fois chez l'Homme la présence d'un flux rostral migratoire, ayant pour origine la ZSV et pour destination le bulbe olfactif. Une seconde chaîne de migration associée y est décrite : le flux médian migratoire (**figure 6**). Ce dernier semble propre à l'espèce humaine, n'étant connu chez aucun autre mammifère et relie la ZSV au cortex préfrontal ventro-médial afin d'y renouveler la population neuronale. Cette étude effectuée sur un panel post-mortem de sujets âgés de 0 à 84 ans a néanmoins démontré que les corridors migratoires de neuroblastes, très important pendant les 18 premiers mois de la vie, déclinent rapidement pour devenir quasiment indétectable après l'âge de 7 ans (Sanai et al., 2011).

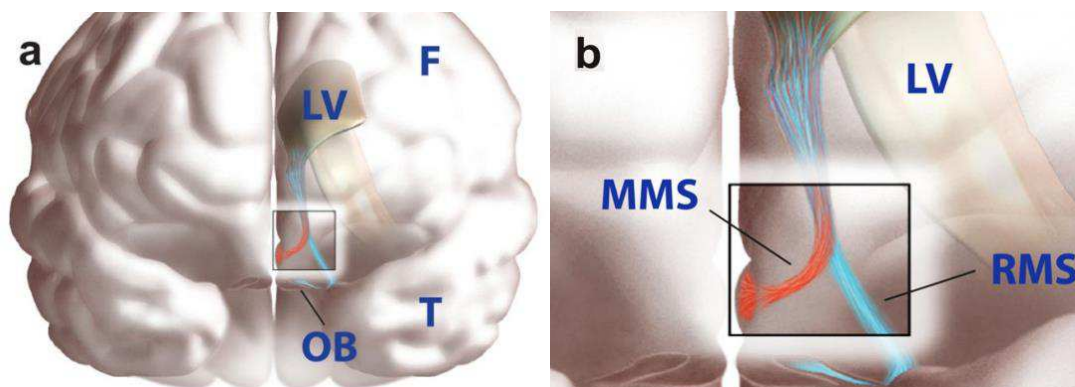


Figure 6 : Illustration schématique des flux de migration neuronaux en provenance de la ZSV chez l'Homme. Les CSN provenant des murs du ventricule latéral (LV) génèrent deux flux : le flux rostral migratoire (RMS) en turquoise et le flux médian migratoire (MMS) en rouge. F = lobe frontal, T = lobe temporal, OB = bulbe olfactif. **(a)** Vue de face du cerveau. **(b)** Grossissement de la jonction des flux antérieurs. Sanai et al., Nature, 2011.

2.3.2.1 La zone sub-ventriculaire

La SVZ est une couche de cellules qui s'étend le long du bord latéral des deux ventricules latéraux (**figure 7**). Elle a pour but de générer de nouveaux interneurons qui migrent vers le bulbe olfactif tout au long de la vie des rongeurs. Ainsi, cette zone est composée de quatre types cellulaires, dont trois types neuraux : les neuroblastes (cellules de type A), les CSN (ou astrocytes de la SVZ, cellules de type B), les cellules à prolifération transitoire (cellules de type C) et les épendymocytes (Doetsch et al., 1999; Suh et al., 2009).

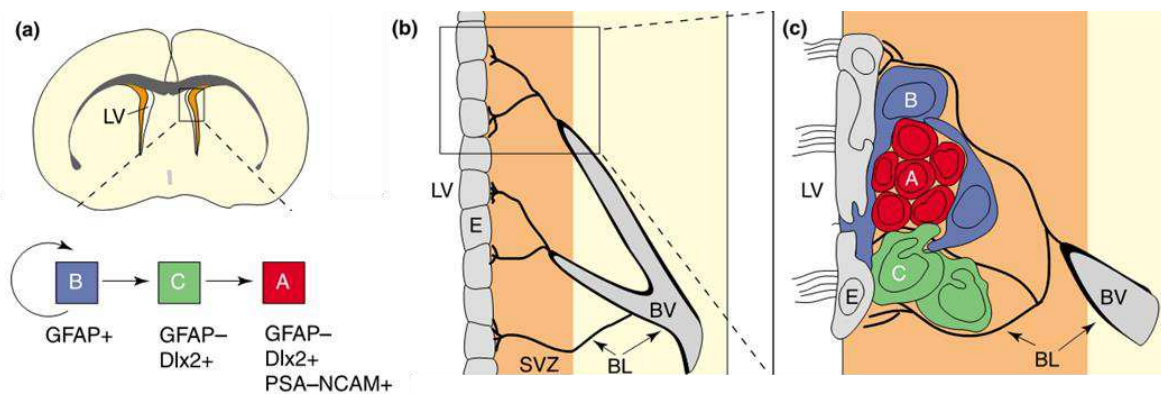


Figure 7 : La niche neurogénique sub-ventriculaire, les types cellulaires et le lignage des CSN. (a) Coupe frontale représentant la localisation de la zone sub-ventriculaire (ZSV) le long des ventricules latéraux (LV). Les cellules de type B s'autorenouvellent et se divisent en cellules de type C à prolifération rapide. Les neuroblastes de type A naissent des cellules C. (b) Grossissement de A montrant l'entrée des vaisseaux sanguins (BV) dans la ZSV. (c) Grossissement de B. La niche neurogénique regroupe les cellules B, C et A incluses entre les terminaisons des capillaires sanguins recouverts d'une lame basale (BL) riche en laminine et les épendymocytes (E) du mur ventriculaire. Adapté de Doetsch F., *Current Opinion in Genetics and Development*, 2003.

Les épendymocytes jouent un rôle de barrière entre la cavité ventriculaire et la niche de cellules (**figure 7b, c**). Les CSN (type B) qui expriment la GFAP ont un cycle cellulaire assez lent. Elles peuvent occasionnellement évoluer vers des cellules à prolifération rapide (type C), perdant alors leur expression de GFAP. Ces cellules se différencient alors en cellules de type A (les neuroblastes) Dlx2+/PSA-NCAM+ qui vont continuer à se diviser, tout en migrant vers le bulbe olfactif en suivant dans un premier temps un tunnel de guidage formé par les cellules B le long de la SVZ. Elles finissent par gagner flux rostral migratoire. Fiona Doetsch et Arturo Alvarez-Buylla ont démontré la présence de neurones différenciés et actifs dans le bulbe olfactif. Des rétrovirus codant pour l'expression de GFP ont été injectés dans les ventricules. Seules les cellules en mitose de la ZSV ont intégré le transgène

permettant l'expression de la GFP. Une étude histologique du bulbe olfactif a ensuite permis de montrer la présence de neurones ramifiés GFP+ dans le bulbe olfactif (Doetsch et al., 1999; Ma et al., 2009). Néanmoins, des études récentes apportent de nouvelles précisions, comme l'existence de plusieurs intermédiaires cellulaires au sein des cellules B (de type 1, 2 et 3) et des cellules C (cellule à amplification rapide précoce puis tardive). Dans ces populations, l'expression de marqueurs très spécifiques (comme par exemple GFAP, EGFR, Hes5, BLBP, Ascl1 et Dcx2) semble plus étagée dans le temps (Giachino et al., 2014).

Toute la SVZ partage également un rapport privilégié avec les vaisseaux sanguins (annotés BV, dans la **figure 7 b, c**), formant une vraie niche mécanique, mais également biochimique, par la libération de nombreux facteurs régulant le comportement des CSN (Shen et al., 2008; Suh et al., 2009).

2.3.2.1 La zone sub-granulaire

Cette zone neurogénique, située dans le gyrus denté de l'hippocampe est incluse dans l'environnement neuronal qui la régule. En effet, c'est l'activité des neurones de l'environnement direct qui régule dans l'espace et le temps le fonctionnement de la ZSG. Cette dernière est composée de CSN de type B positives pour le marqueur GFAP, de cellules de type D à division rapide et de précurseurs neuronaux de type G (**figure 8**).

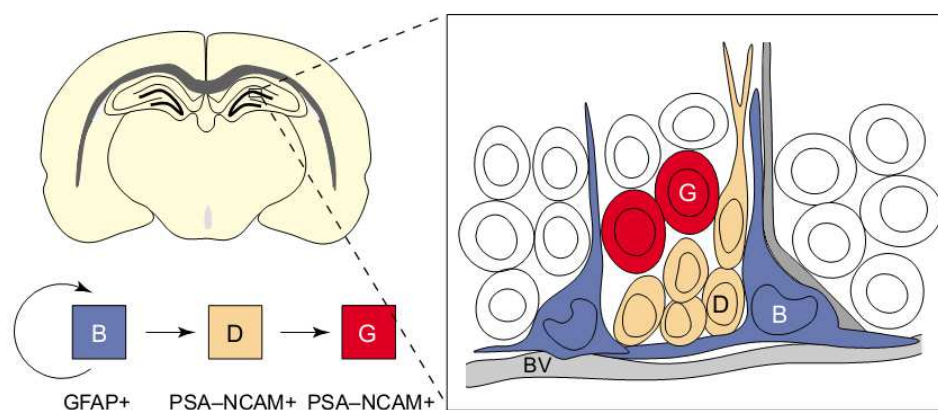


Figure 8 : La niche neurogénique sub-granulaire, les types cellulaires et leur lignage. (A) Coupe frontale représentant la localisation de la zone sub-granulaire (ZSG) dans l'hippocampe. Les cellules de type B s'autorenouvellent et se divisent en cellules de type D qui donnent elles-mêmes des neurones granulaires de type G. **(B)** Grossissement montrant le rapport privilégié des cellules B avec les vaisseaux sanguins (BV). Adapté de Doetsch F., *Current Opinion in Genetics and Development*, 2003.

Ici, les neurones du gyrus denté sont générés afin d'être intégrés localement dans l'hippocampe, contrairement à la ZSV, dont les neuroblastes migrent à distance. La neurogenèse se fait à partir d'inclusions de groupes de CSN qui encadrent les cellules plus différenciées qui en découlent. Les CSN de type B prolifèrent sous le contrôle de l'activité neuronale d'une part et de facteurs sécrétés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins juxtaposés. Elles donnent les cellules de type D qui sont des cellules intermédiaires dont la capacité de prolifération est inférieure aux cellules de type C de la ZSV. Elles sont également plus avancées dans le processus de différenciation afin de donner des pré-neurones de type G positifs pour PSA-NCAM (Altman and Das, 1965; Doetsch, 2003; Eriksson et al., 1998).

Au vu de ces descriptions, le terme de « niche » n'est pas anodin. Même si les CSN sont théoriquement tripotentes, leur comportement est largement restreint et guidé par la niche dans laquelle elles évoluent. C'est une balance fine qui détermine le dessein des CSN, entre leurs prédispositions intrinsèques et les messages extrinsèques perçus.

2.3.3 Régulateurs extrinsèques et maintien des cellules souches neurales

Les contacts entre les cellules représentent un moyen important de régulation du maintien, de la différenciation et du mode de division des CSN. Ces dernières sont perçues à la fois comme senseurs de l'environnement et comme régulateurs de la niche neurogénique. Elles peuvent en effet intégrer les signaux provenant de la niche elle-même et du tissu neural par leurs jonctions gap avec les autres CSN, par leurs contacts avec : les vaisseaux sanguins (Ottone et al., 2014), la lame basale, les autres neurones, les astrocytes et les épendymocytes (Doetsch, 2003). Cela leur permet alors de réguler leur comportement d'autorenouvellement, de différenciation et de sécrétion de facteurs neurogéniques (Song et al., 2002; Lim and Alvarez-Buylla, 1999).

Les jonctions adhérentes impliquent les cadhérines qui activent les voies de signalisation de β -caténine, dont l'activation (également médiée par la voie Wnt) promeut l'autorenouvellement des cellules souches. En conditions de culture *in vitro*, les cellules souches expriment également les cadhérines qui favorisent les contacts entre les CSN pour promouvoir leur propre croissance (Lobo et al., 2003). Les cellules épendymaires produisent Noggin, un antagoniste de BMP induisant normalement la différenciation des

CSN en astroglie. Un effet collaboratif de CXCR4-SDF-1 et SHH a également été décrit dans la régulation des CSN médiée par les épendymocytes, sans que les mécanismes précis ne soient pour le moment compris (Lim et al., 2000).

Les facteurs de croissance jouent aussi un rôle prépondérant dans le maintien des CSN de la niche. Ils proviennent des cellules de la niche elles-mêmes, des cellules endothéliales, des cellules neurales environnantes et se retrouvent capturées par la matrice extracellulaire. Il est actuellement admis que les CSN astrocytaires de type B sont relativement quiescentes et que les cellules C à forte prolifération sont réceptives à l'EGF, via l'EGFR. En effet, l'infusion *in vivo* d'EGF dans les ventricules latéraux, entraîne un arrêt de la différenciation des cellules de type C en neuroblastes et une forte augmentation de leur prolifération. Cette différence de capacité à répondre à l'EGF est telle que la majorité des neurosphères obtenues *in vitro* proviendraient des cellules à prolifération rapide de type C plutôt que des cellules B, tandis que le bFGF maintiendrait préférentiellement les CSN de type B (Doetsch et al., 2002; Marshall et al., 2007; Wan et al., 2010). L'EGF n'est par contre pas le seul facteur engagé puisque la prolifération est régulée tout le long des zones germinales par bFGF, IGF1, TGF- α , VEGF, Ephrin, SHH et CNTF... (Kirby et al., 2015; Komada, 2012; Lai et al., 2003; Chojnacki et al., 2003; Jin et al., 2002; Conover et al., 2000).

La niche vasculaire environnante fait partie intégrante de la niche neurogénique. Elle sécrète des molécules libérées par les cellules endothéliales et les péricytes. Elle sépare le cerveau de la circulation sanguine par une lame basale riche en laminine sur laquelle les cellules de type B viennent littéralement prendre pied via des intégrines $\alpha 1\beta 6$ (Lathia et al., 2007; Shen et al., 2008). Cette collaboration semble tout à fait primordiale d'autant que les phénomènes d'angiogenèse et de neurogenèse semblent être régulés par les mêmes facteurs de croissance tels que le VEGF, le bFGF, l'IGF-1 et le TGF- α (Kirby et al., 2015; Palmer et al., 2000). De plus, en présence de ces signaux, les cellules endothéliales sécrètent alors des mitogènes et molécules de survie et de différenciation des neurones tels que bFGF, VEGF, PDGF, IL-8 ou encore BDNF (Hayon et al., 2012; Doetsch, 2003; Jin et al., 2002). Une des démonstrations les plus fascinantes a été menée sur le cerveau de canaris chanteurs. La testostérone entraîne un pic de libération de VEGF et de ses récepteurs sur les cellules endothéliales des centres supérieurs de la vocalise. En réponse, les cellules endothéliales sécrètent du BDNF, augmentant drastiquement la production de nouveaux neurones, permettant aux oiseaux d'apprendre tout au long de leur vie de nouvelles syllabes de chants (Louissaint Jr. et al., 2002; Cao et al., 2004).

Toutes les cellules de la niche baignent dans la matrice extracellulaire (MEC) permettant de réguler la distribution des molécules solubles aux cellules, mais également de donner directement, via ses composants, des signaux trophiques aux cellules. De nombreux ligands sécrétés dans la MEC sont capturés, parfois clivés par des enzymes (désintégrines (ADAM), métallo-protéases de la matrice (MMP), inhibiteurs de MMP (TIMP) puis redistribués dans le temps et dans l'espace aux cellules de l'environnement. La ZSV adulte est ainsi riche en ténascine-C (TNC), en collagène I, en protéoglycane (héparane sulfate et chondroïtine sulfate) et en intégrines (von Holst, 2008; von Holst et al., 2007). L'héparane sulfate protéoglycane est justement un grand séquestreur des molécules de la MEC comme la TNC et les laminines, des mitogènes BMP, SHH et Wnt mais également des facteurs de croissance majeurs des NSC tels que EGF, bFGF, PDGF-AA et VEGF (Bernfield et al., 1999; Lai et al., 2003; Lim et al., 2000).

La complexité de la niche est telle que ces conditions ne peuvent pas être exactement reproduites en culture *in vitro*. Pour cette raison, tout mode de culture des CSN est critiquable. Que les cellules soient cultivées sous forme de sphères ou sous forme de monocouche adhérente, les milieux utilisés apportent les facteurs reconnus comme essentiels au maintien des cellules multipotentes. Ainsi les conditions les plus répandues sont dépourvues de sérum (dont la composition provoque la perte de multipotence des cellules) et comprennent nécessairement de l'EGF et du bFGF (Gritti et al., 1999; Reynolds et al., 1992), le supplément B27 (Brewer et al., 1993) et plus particulièrement pour les CSN humaines : de l'insuline ou de l'héparine (Glaser et al., 2007; Pollard et al., 2009).

La combinaison de ce cocktail de molécules dans la niche neurogénique permet d'activer les cascades de signalisation Notch-TF, Wnt- β cat, SHH-Gli1, BMP-SMAD et ainsi que des voies de signalisation : RAS/ERK et PI3K/AKT/mTOR (Llaguno et al., 2009). *In fine*, ces cascades permettent d'activer les facteurs de transcription de la régulation de prolifération / différenciation, dont nombre d'entre eux sont également des marqueurs spécifiques des CSN.

2.4 Les marqueurs des cellules souches neurales

La caractérisation des sous populations cellulaires est une étape clef dans l'étude des cellules souches et de leur potentiel de différenciation. De nombreux marqueurs ont été

référéncés afin de distinguer une CSN d'une autre cellule souche ou d'autres cellules neurales plus différenciées. Pourtant, il est difficile d'identifier avec certitude une cellule avec un seul marqueur. C'est pourquoi, la recherche tente de faire la liste exhaustive des molécules exprimées par chaque type cellulaire.

Certaines études ne se basent que sur un seul marqueur des CSN. Or il semblerait que leur identification soit plus efficace en combinant des marqueurs de différentes natures (facteur de transcription, cytosquelette, protéine membranaire...) au comportement en culture *in vitro* (formation de sphères...). En effet, selon le niveau de maturation ou d'activation des CSN considérées, des marqueurs différents peuvent être exprimés seuls ou co-exprimés, rendant difficile l'identification du véritable statut des cellules (**figure 9**).

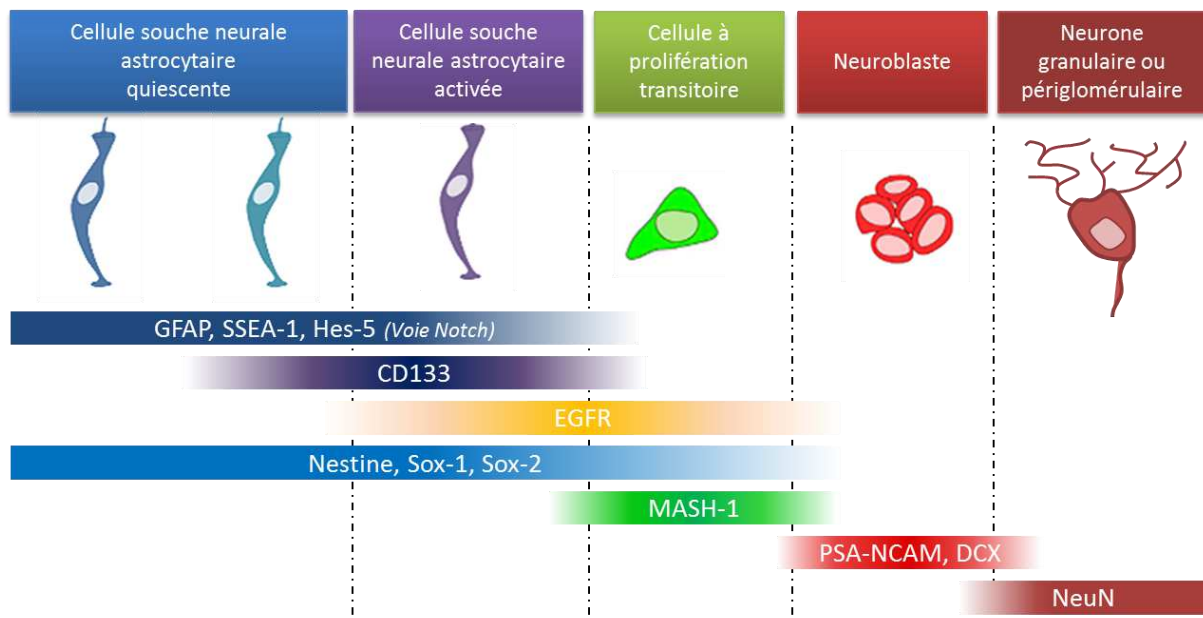


Figure 9 : Evolution du phénotype et de l'expression des marqueurs cellulaires des progéniteurs neuraux. Les cellules souches neurales à l'origine expriment des marqueurs « souche » qui sont petit à petit perdus au profit de marqueurs de cellules neuronales plus différenciées. Adapté de Codega et al., *Neuron*, 2014 / Imayoshi et al., *Front. Neurosci.*, 2011 / Lazarov et al., *Trends in Neurosci.*, 2007.

Dans ce travail de thèse, les trois marqueurs principaux des CSN utilisés, notamment en immunocytochimie sont la nestine, CD133 et Sox2. Ils marquent chacun un compartiment différent des cellules (**figure 10**), comme expliqué ci-dessous.

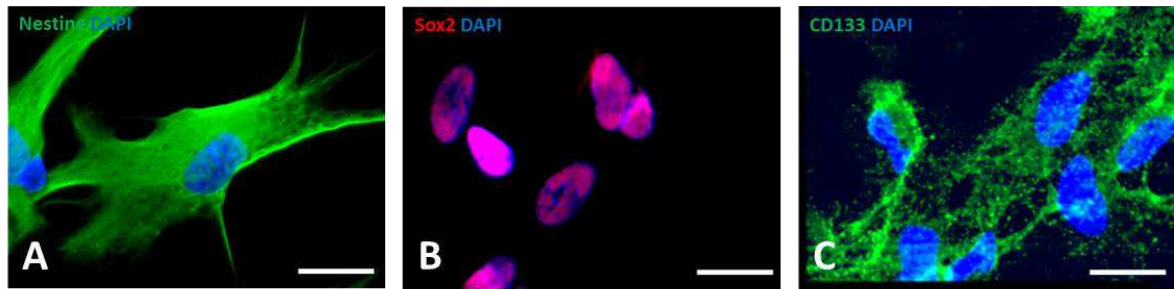


Figure 10 : Photographies d'immunomarquage de cellules souches neurales humaines en culture sur substrat de poly-L-ornithine/laminine. Représentation de 3 marqueurs spécifiques des cellules souches, grossissement 400x. **(A)** Nestine (vert). **(B)** Sox2 (rouge). **(C)** CD133 (vert). Barre d'échelle = 20 μ m.

2.4.1 Nestine

La nestine est un des marqueurs les plus utilisés pour caractériser les CSN. C'est un des constituants du cytosquelette appartenant aux filaments intermédiaires de classe IV (**figure 10A**). Cette protéine est exprimée de façon sélective par les CSN neuroépithéliales lors du développement cérébral et persiste jusqu'au début de la différenciation. Elle est petit à petit remplacée par des filaments intermédiaires spécialisés pour chaque type cellulaire. (Lendahl et al., 1990). Néanmoins, si ce marqueur reste tout à fait spécifique des CSN dans le tissu neural, il a été montré qu'il était également exprimé dans d'autres tissus comme dans les cellules endothéliales en prolifération (Suzuki et al., 2010). Dans les pathologies tumorales, les cellules de glioblastome expriment fortement la nestine qui est probablement dérégulée. Les cellules souches de glioblastome expriment également à un niveau très élevé ce marqueur, qui participe à réguler la migration, l'invasion et la croissance des glioblastomes (Jin et al., 2013; Naito, 2011).

2.4.2 CD133 (Prominine-1)

Le marqueur CD133 (également appelé prominine-1) est une glycoprotéine à cinq domaines transmembranaires majoritairement retrouvée dans les protrusions et les irrégularités de la membrane (**figure 10C**). Connue depuis 1997 (Weigmann et al., 1997), ses fonctions demeurent aujourd'hui encore assez floues, même si on lui prête un rôle d'organisation membranaire au sein de radeaux de cholestérol. CD133 est communément utilisé pour purifier les populations de cellules souches hématopoïétiques et les CSN, notamment en immunocytochimie ou en cytométrie en flux (Corti et al., 2007; Uchida et al.,

2000). Souvent, les cellules positives pour CD133 expriment d'autres marqueurs des CSN comme : Sox2, musashi-1 ou nestine. De plus, c'est également un marqueur des cellules souches de glioblastome, inconstant, mais permettant d'y mettre en avant des sous-populations agressives capables de régénérer une tumeur lors de greffes (Ding et al., 2013; Zeppernick et al., 2008).

Néanmoins, CD133 semble revêtir d'autres fonctions puisque de plus en plus de travaux le détectent dans des cellules différenciées d'autres organes, les mélanomes ou même la salive (Adini et al., 2013). En fait, cette protéine a plusieurs niveaux de glycosylation répartis sur plusieurs sites extracellulaires. Ils représentent une limitation de l'usage de CD133 car ces différences de glycosylation impacteraient directement la capacité de reconnaissance de la protéine par les différents clones d'anticorps utilisés, sous estimant alors l'étendue réelle de son expression dans les tissus (Bauer et al., 2008; Campos and Herold-Mende, 2010).

2.4.3 Sox2

Les gènes SOX représentent une famille de 20 facteurs de transcription se liant au petit sillon de l'ADN chez l'humain et la souris (**figure 10B**). Parmi eux, Sox2 est très bien connu pour discriminer les CSN des niches neurogéniques de la ZSV et de la ZSG (Suh et al., 2007; Venere et al., 2012). Ce facteur de transcription est impliqué dans le maintien actif de tripotence des CSN, collaborant activement avec d'autres protéines telles qu'OCT4 et NANOG, deux autres marqueurs des cellules souches. Il permet en outre de promouvoir l'autorenouvellement des CSN par divisions symétriques et asymétriques. C'est un des gènes capable de reprogrammer les cellules en iPSC, comme précédemment expliqué (Takahashi and Yamanaka, 2006). D'après les travaux de Fred Gage, les cellules exprimant Sox2 dans la ZSV peuvent donner des neurones, des astrocytes ou de nouvelles cellules Sox2+. En culture *in vitro*, elles peuvent donner en plus de cela des oligodendrocytes en fonction des conditions de différenciation et les facteurs apportés aux cellules (Brazel et al., 2005; Suh et al., 2007). Dans les études sur les CSN *in vitro*, Sox2 marque principalement le noyau, possiblement associé à un marquage cytoplasmique plus faible. En général, les cellules positives pour Sox2 sont également positives pour Sox1, nestine, vimentine et parfois CD133 et GFAP (Glaser et al., 2007; Pollard et al., 2009; Venere et al., 2012).

Sox2 est aussi couramment utilisé dans la caractérisation des cellules souches de glioblastome dans lesquelles il est souvent surexprimé. Sa présence est en faveur d'une forte agressivité tumorale. Il s'illustre en donnant une capacité de conversion en cellules différenciées/indifférenciées aux cellules souches de glioblastome (Berezovsky et al., 2014).

2.4.4 Autres marqueurs

Plusieurs autres marqueurs peuvent être utilisés afin de caractériser les CSN, en fonction de l'étude réalisée (**tableau 1**). De nombreux facteurs de transcriptions spécifiques des cellules indifférenciées (multipotentes ou pluripotentes) sont impliqués dans leur maintien, tels que : OCT4, Nanog et Pax-6. Un élément du cytosquelette intermédiaire, la vimentine est également un marqueur des cellules souches, sans toutefois en être un marqueur exclusif puisqu'il signe par exemple la transition épithélio-mésenchymateuse des tumeurs (Mendez et al., 2010). D'autres éléments caractéristiques des cellules souches comme le carbohydrate SSEA-1, la protéine chaperonne de l'ARNm musashi-1 ou la protéine polycomb BMI-1 permettent de caractériser les CSN.

Marqueur	Fonction	Localisation	Remarque
Oct-4	Facteur de transcription : maintien de la pluripotence	Nucléaire	La plupart des CSN expriment ces marqueurs, mais ils n'en sont pas exclusifs. Souvent, les marqueurs sont retrouvés dans les cellules embryonnaires ou les cellules progénitrices d'autres organes.
Nanog	Facteur de transcription : maintien de la pluripotence	Nucléaire	
SSEA-1	Carbohydate : implication dans l'adhésion et la migration des cellules souches	Membranaire	Dans tous les cas, un seul marqueur pris séparément n'est pas suffisant pour caractériser une CSN. GFAP a un statut très particulier. Il caractérise à la fois les CSN astrocytaires ainsi que des cellules extrêmement spécialisées et différenciées telles que les astrocytes et les épendymocytes
Vimentine	Filament intermédiaire de classe III : ancrage des organites dans le cytoplasme	Cytoplasmique	
Musashi-1	Protéine de liaison à l'ARN : régulateur post-transcriptionnel	Nucléaire / cytoplasmique	
Pax-6	Facteur de transcription : coordinateur de l'auto-renouvellement et de la différenciation	Nucléaire	
BMI-1	Protéine de la famille Polycomb : promoteur de la prolifération	Nucléaire	
GFAP	Filament intermédiaire de classe III : structure du cytosquelette	Cytoplasmique	

Tableau 1 : Marqueurs courants utilisés dans l'identification des cellules souches neurales.

Le marqueur GFAP identifie les CSN d'une part et les cellules différenciées d'autre part comme la glie radiaire, les progéniteurs gliaux et les astrocytes. Il est particulièrement utilisé dans la caractérisation des CSN de type B dans la SVZ ou de type 1 dans la ZSG, associé à d'autres marqueurs (**figure 9**). Maintenues en culture *in vitro*, les CSN humaines sont par exemple connues pour exprimer de façon très hétérogène et faible le marqueur GFAP, concomitamment aux marqueurs plus exclusifs des cellules souches, à savoir la nestine, CD133 ou Sox2 (Glaser et al., 2007; Sun et al., 2008).

Cela démontre bien que l'identification d'une CSN ne peut pas se limiter à l'expression d'une simple combinaison de marqueurs. De plus, la recherche de ces marqueurs se fait le plus souvent à un temps donné sur des cellules fixées, privant l'étude d'une analyse en temps réel, plus représentative de la plasticité véritable de ces cellules. Jusqu'à présent, les CSN ont toujours été caractérisées en associant les marquages immunocytochimiques à des tests fonctionnels *in vitro* recherchant deux des caractéristiques des CS (**figure 11**) :

- L'autorenouvellement, par des tests de formation de sphères ou de colonies,
- La différenciation, afin de vérifier la capacité des cellules à donner naissance à des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes.

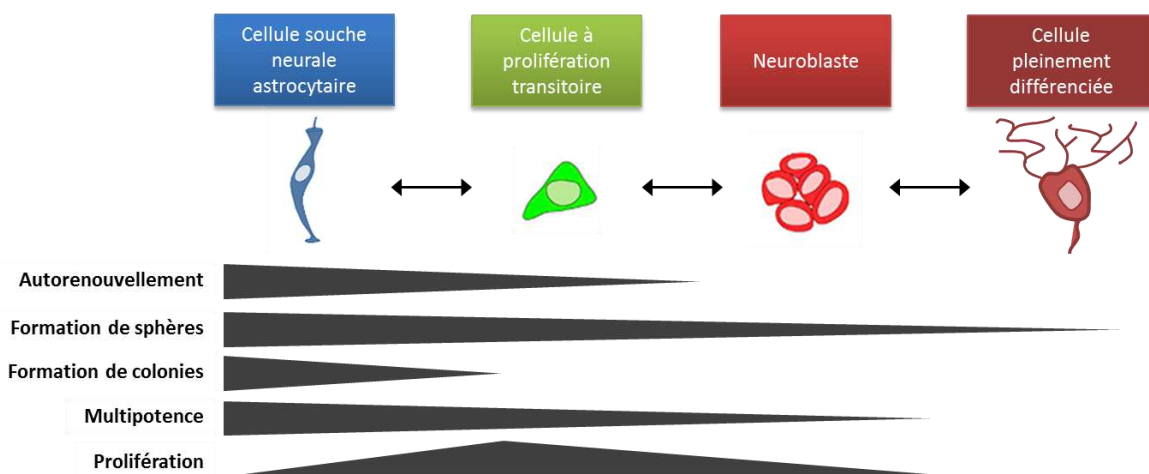


Figure 11 : Propriétés fonctionnelles des cellules souches et des progéniteurs neuraux. Les propriétés des cellules souches sont testables *in vitro*. Maintenues en culture, le statut réversible est matérialisé par les flèches à double sens. *Adapté de Deleyrolle et al., Adult stem cells: biology and methods of analysis, 2011.*

2.5 Différenciation des cellules souches neurales

2.5.1 Les mécanismes de la différenciation dans le temps et l'espace

Les CSN sont capables de former des neurosphères *in vitro* en condition de culture et de potentiellement pouvoir se différencier en l'une des trois lignées cellulaires fonctionnelles du système nerveux (**figure 12**), lorsqu'elles sont mises en conditions adhérentes avec sérum. Une CSN peut ainsi s'insérer dans deux voies de différenciation :

1. La voie neuronale permettant de donner des neurones.
2. La voie gliale qui permet de générer par des maturations distinctes, les deux types de cellules de la glie, à savoir les oligodendrocytes et les astrocytes.

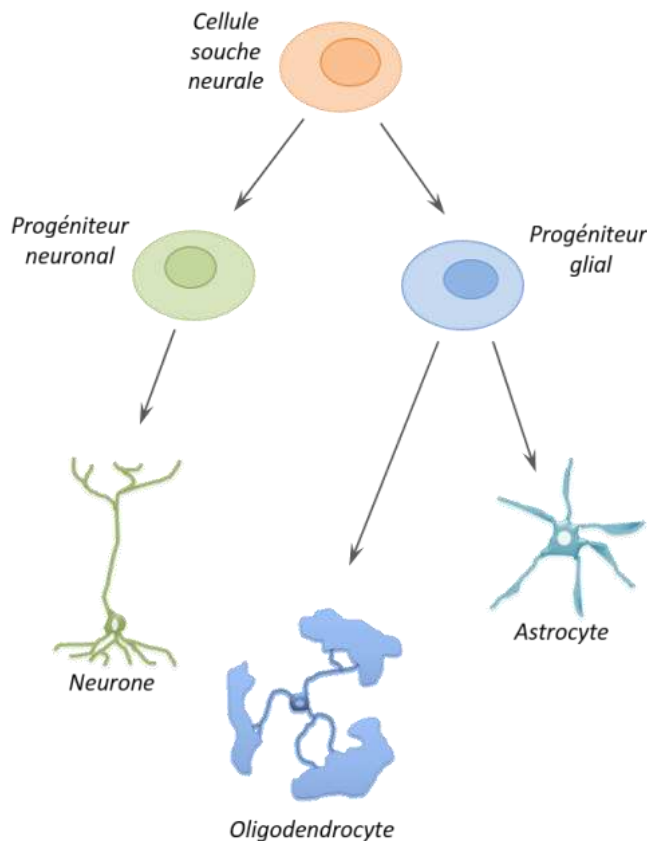


Figure 12 : Voies de différenciation classiques des CSN.

Les CSN s'autorenouvellent et peuvent donner naissance aux trois types neuraux. En s'engageant dans la voie neuronale, elles donnent des progéniteurs neuronaux qui donneront naissance aux neurones. En choisissant la voie gliale, elles génèrent des progéniteurs gliaux se transformant finalement soit en astrocyte, soit en oligodendrocyte. Les étapes intermédiaires de maturation des cellules ne sont pas représentées.

La littérature dans le domaine de la différenciation *in vitro* et *in vivo* des cellules souches neurales est très riche. Les grands principes des vagues de différenciation successives ont été majoritairement décrits dans des modèles cellulaires murins, tandis que les avancées des dix dernières années se font de plus en plus dans des modèles humains, notamment grâce à l'accès de CSN primaires ou de CSN dérivées d'iPSC.

Les nombreuses études visant à différencier des cellules souches de souris, de rat ou d'humain, convergent vers une même conclusion : la seule composition du milieu de culture peut pousser les CSN à se différencier de façon très inégale. Néanmoins, des standards existent. Parmi eux, il est possible de diminuer la concentration en facteurs de croissance (EGF et bFGF), voire de les supprimer totalement sans ajouter d'autres molécules favorisant la différenciation. Dans ce cas, les CSN sortent de leur cycle cellulaire, cessant de proliférer pour générer neurones, astrocytes et oligodendrocytes de manière complémentaire en suivant le destin intrinsèque de chaque CSN. Ce protocole peut être complété avec du sérum de veau fœtal (SVF) ⁶, dont la concentration ajoutée au milieu, habituellement située entre 0,1 % et 10 % impacte drastiquement l'orientation de la différenciation des CSN (Sauvageot and Stiles, 2002; Scully et al., 2012). D'autres protocoles de différenciation des cellules souches neurales ou de gliome permettent quant à eux d'orienter la différenciation en jouant sur l'ajout et/ou le retrait séquentiel de facteurs de croissances, vitamines et cytokines normalement impliquées dans les processus physiologiques (**figure 13c**). Les CNTF, BDNF, acide rétinolique, forskoline, acide ascorbique, BMP4 ou bFGF... sont par exemple impliqués à des stades spécifiques du développement dans l'induction ou la maturation des cellules neurales (Glaser et al., 2007; Pollard et al., 2009; Ravin et al., 2008; Sun et al., 2008)

En conditions physiologiques, la libération régulée dans le temps et l'espace de ses informations extrinsèques contrôlent le comportement des CSN.

Lors de la corticogénèse, les trois types cellulaires apparaissent successivement.

Chez le rat, le neurogénèse débute à E12 et se termine durant la vie embryonnaire. L'astrocytogenèse, débutant un peu plus tard vers E14, est périnatale et se terminera après la naissance, tandis que l'oligodendrogenèse débute dans les tous derniers jours de vie prénatale, autour de E18-E20, pour se terminer plusieurs semaines après la naissance (**figure 13a**) (Qian et al., 2000; Sauvageot and Stiles, 2002; Temple, 2001).

En prélevant des CSN de cerveaux E10-E12, avant le début des vagues de différenciation, il est possible de reproduire exactement *in vitro*, les phénomènes

⁶ Le sérum de veau fœtal (SVF) est largement employé en culture cellulaire car il représente un apport de facteurs de croissances, d'hormones, de lipides, de vitamines et de molécules favorisant la croissance, la survie et l'adhérence des cellules, même si sa composition précise reste inconnue. La culture de cellules souches fait néanmoins exception en la matière, étant donné que la plupart des milieux de prolifération et d'expansion utilisés en sont dépourvus. Le SVF peut faire partie des suppléments de milieu de différenciation des cellules souches, apportant des facteurs de croissances et cytokines tels que EGF, FGF, NGF, PDGF, IGF, TGF... à des concentrations variées, favorisant l'activation de cascades de signalisation impliquées dans le choix du destin cellulaire (Brunner et al., 2010).

physiologiques de différenciation observés *in vivo* (**figure 13b**). Pour cela, les CSN sont mises en condition de différenciation en retirant les facteurs de croissance EGF et bFGF, faisant apparaître spontanément et chronologiquement, des neurones (positifs pour le marqueur Tuj-1), puis des astrocytes (positifs pour le marquage GFAP) et finalement des oligodendrocytes (révélés par marquage du ganglioside O4) (Qian et al., 2000; Sauvageot and Stiles, 2002).

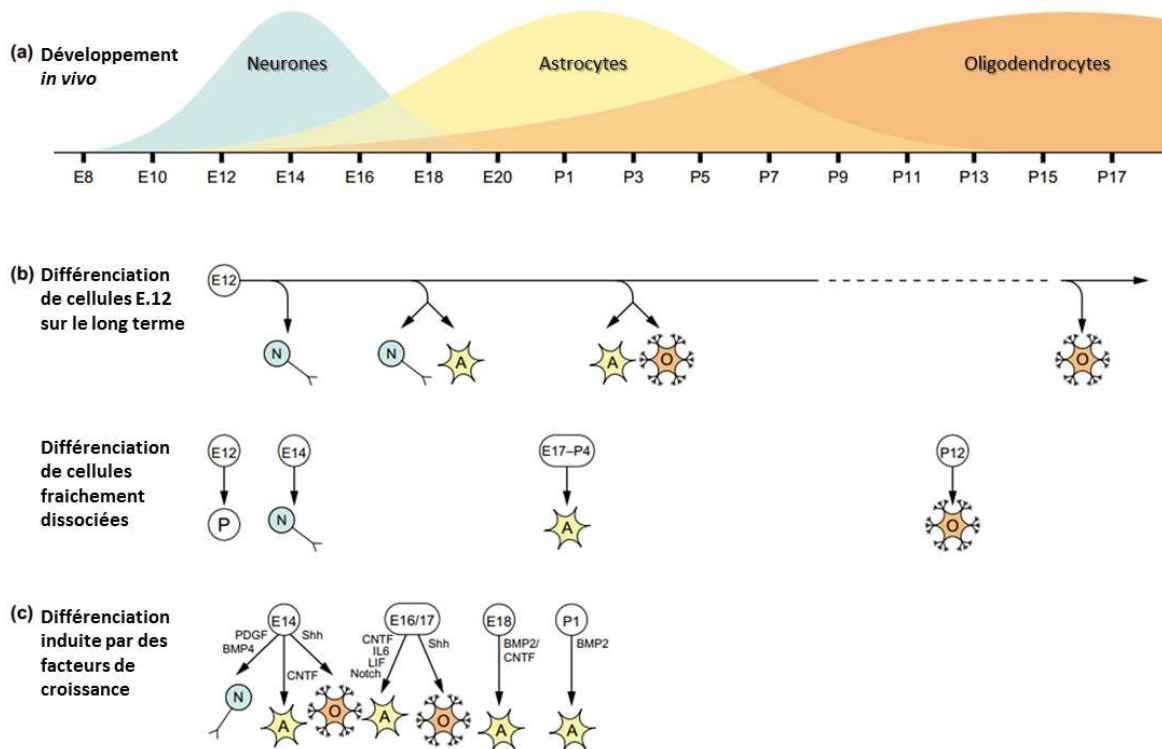


Figure 13 : Les progéniteurs neuraux suivent un développement séquentiel *in vivo* et *in vitro*. (a) La genèse des trois types cellulaires intervient chronologiquement dans le cortex cérébral. Chez le rat, il y a un pic de neurogenèse à E14, d'astrocytogenèse vers E21-P2 et d'oligodendrogenèse entre P15 et P17. (b) La culture *in vitro* mime la différenciation vue *in vivo*. Les cellules extraites à E12 donnent successivement des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes. Les cerveaux dissociés et mis en culture à différents temps de gestation donnent des cellules reflétant les phénomènes développementaux se déroulant au moment de la dissection. (c) La différenciation peut être induite par des facteurs de croissance. Néanmoins, la sensibilité aux facteurs change en fonction de l'âge de prélèvement des cellules. E = jour de vie embryonnaire post-conception ; P = jour de vie extra-utérine ; N = neurone ; A = astrocyte ; O = oligodendrocyte. Adapté de Sauvageot et al., *Current opinion in Neurobiology*, 2002.

Plus les CSN sont prélevées tardivement dans l'embryogenèse et plus elles perdent leur triple potentiel de différenciation en se restreignant dans les voies astrogliales puis oligodendrogiales (**figure 13b**). Il est donc indiqué d'utiliser des CSN les plus précoces,

lorsqu'elles possèdent encore la capacité de répondre à tous les messages les engageant dans les trois voies cellulaires, si l'on souhaite conserver au maximum cette multipotence.

2.5.2 Genèse et marqueurs des cellules différenciées

Le phénomène de différenciation est complexe et tous les éléments le régulant ne sont pas encore connus. Le processus permettant à une CSN de devenir une cellule spécialisée pleinement différenciée est long et peut prendre, pour les oligodendrocytes humains par exemple plusieurs semaines, voire mois, dans les modèles expérimentaux disponibles.

La notion de différenciation elle-même est facilement galvaudée. Une cellule engagée dans une voie n'est pas pour autant une cellule différenciée. Il faut distinguer une cellule impliquée dans une voie gliale ou neuronale par exemple, d'une cellule ayant acquis l'ensemble des marqueurs moléculaires, phénotypiques et fonctionnels d'un astrocyte, d'un oligodendrocyte ou d'un neurone. De même, une cellule totalement mature et fonctionnelle, peut selon les cas se dédifférencier et générer un autre type cellulaire. Ce phénomène, appelé transdifférenciation est connu depuis longtemps lors de l'ontogenèse corticale. Les cellules de la glie radiaire, caractérisées entre autres par des marqueurs des astrocytes, se transdifférencient après avoir servi de guide à la migration des jeunes neurones, en neurones eux-mêmes (Barnes and Polleux, 2009; Rakic, 1971). Il a été récemment montré dans un modèle de démyélinisation que des neurones peuvent faire preuve de plasticité en se réorientant dans une voie gliale pour pallier à la disparition des oligodendrocytes dans le corps calleux. Des neuroblastes ainsi que des neurones exprimant la GAD65, un marqueur de la spécialisation des neurones GABAergiques inhibiteurs, se transdifférencient et migrent dans le corps calleux pour générer des oligodendrocytes (Jablonska et al., 2010).

L'expression des marqueurs doit donc être analysée en tenant compte du lieu, du niveau de maturation de la cellule et de son microenvironnement.

Pour les paragraphes ci-dessous, les CSN murines et humaines présentées sont à peu près sensibles aux mêmes facteurs inducteurs, si ce n'est que la différenciation des cellules humaines demande des étapes de maturation plus longues.

2.5.2.1 Les neurones

En conditions physiologiques, les neurones sont les premières cellules neurales qui se forment à partir des CSN et de la glie radiaire, comme vu précédemment. *In vitro*, il est possible de différencier les CSN en neurones en retirant les facteurs de croissance bFGF et EGF responsables de maintien des cellules souches. Ces dernières peuvent alors spontanément se différencier en neurones grâce à une partie de programmation intrinsèque (Barnes and Polleux, 2009; Temple, 2001). Une partie des CSN peut être forcée à se différencier en neurones en ajoutant dans les milieux de culture des facteurs solubles comme le BDNF ou de l'acide rétinoïque. Dans un premier temps les CSN vont générer des neuroblastes, puis des neurones immatures et finalement des neurones spécialisés exprimant notamment des neurotransmetteurs spécifiques de chaque neurone (Qian et al., 2000).

Les neuroblastes, ou progéniteurs neuronaux peuvent être reconnus par le marquage de la doublecortine (DCX) dont l'expression s'estompe avec la différenciation future (Magavi and Macklis, 2008). Puis les neuroblastes se différencient en neurones post-mitotiques immatures et se mettent à exprimer entre autres : la tubuline β -3 (encore appelée Tuj1), ainsi que la protéine associée aux microtubules de type 2 (MAP2). L'expression de ces deux marqueurs pan-neuronaux augmente au fur et à mesure que le neurone prend sa véritable identité (Keung et al., 2013). Finalement, le neurone acquiert ses derniers marqueurs tardifs tels que NeuN ou Fox-3 qui peuvent être associés à des protéines spécifiques des familles de neurones excitateurs ou inhibiteurs.

2.5.2.2 Les astrocytes

Apparaissent ensuite les astrocytes, cellules à la fois très différenciées, primordiales à l'homéostasie du tissu cérébral, et forment également la population de maintien des CSN des niches neurogéniques adultes.

La CSN se différencie en progéniteur glial, dont la sélection, notamment basée sur des techniques de tri cellulaire dans l'étude de l'équipe de Han et collaborateurs, se base sur un phénotype A2B5+/PSA-NCAM-. En effet ces cellules sont ensuite capables de générer des astrocytes matures exprimant la protéine GFAP (Mendes et al., 2015; Glaser et al., 2007;

Zhang, 2001), le ganglioside de série-C A2B5 (Han et al., 2013) ainsi que l'aldéhyde déshydrogenase ALDH-1 non exclusive (Rowitch and Kriegstein, 2010) . Les astrocytes pleinement différenciés exprimant GFAP, co-expriment en général des protéines spécifiques de transport du glutamate et de l'aspartate comme GLT-1, GLAST et les transporteurs EAAT (Yang et al., 2011; Perego et al., 2000).

In vitro, de la même manière que pour obtenir des neurones, les CSN peuvent spontanément donner des astrocytes en retirant les facteurs mitogènes. Selon les lignées cellulaires, les quantités d'astrocytes peuvent changer mais restent toujours élevées, entre 50 et 90 % des cellules différenciées sont positives à GFAP. L'ajout dans le milieu de SVF, de BMP-4, de CNTF permet de forcer les cellules à présenter un phénotype astrocytaire, ou à le faire apparaître plus précocement (Lim et al., 2000; Pollard et al., 2009; Ravin et al., 2008; Sun et al., 2008).

2.5.2.3 Les oligodendrocytes

Ce sont les dernières cellules issues des CSN à apparaître dans le SNC. Comme vu précédemment, l'oligodendrogenèse débute à la toute fin de la vie fœtale pour se développer et se terminer durant la vie post-natale. Le processus de maturation est long et se découpe en 4 étapes intermédiaires avant d'obtenir un oligodendrocyte myélinisant ramifié (**figure 14**). Il a été établi qu'une CSN donnant un progéniteur glial aux propriétés décrites dans le paragraphe précédent peut se différencier en cellule précurseur d'oligodendrocyte (OPC). Elle est reconnue par son expression simultanée de NG2 et A2B5. Comme ces marqueurs ne sont pas exclusifs de ce type cellulaire, il est possible de rechercher la présence du récepteur PDGFR- α , de la protéine homéobox Nkx2.2 (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Aguirre and Gallo, 2004; Fu et al., 2002) tout à fait caractéristiques ainsi que des facteurs de transcription Sox10 et Olig-2 promouvant l'expression des gènes oligodendrocytaires (Rowitch and Kriegstein, 2010). La cellule est alors sensible aux signaux de SHH et du PDGF-A, lui permettant d'évoluer vers le stade suivant de pré-oligodendrocyte. Lors de cette étape, l'OPC bipolaire se ramifie, va petit à petit perdre l'expression des marqueurs précédents pour exprimer la protéine 2'-3' cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNPase, ou CNP), dont le gène correspondant est le plus précoce dans la myélinisation et dont l'expression perdure toute la vie de l'oligodendrocyte (Yu et al., 1994). Un autre marqueur de ganglioside très utilisé est O4, dont la date d'apparition prête encore aujourd'hui à controverse à ce stade. Il est en revanche certain que son expression se stabilise à l'état de différenciation suivant

d'oligodendrocyte immature, très ramifié mais non myélinisant. Des gènes impliqués dans la fabrication de la myéline s'activent alors tels que l'enzyme GalC et le galactocérébroside O1. Enfin, l'étape de différenciation en oligodendrocyte mature myélinisant marque le bout du processus de maturation, avec notamment la présence de molécules constitutives de la myéline telles que MBP, PLP, MOG (Peyron et al., 1997). Généralement ces cellules très différenciées sont également positives pour les marqueurs des stades précédents : CNP, O1, O4 et GalC (Jakovcevski et al., 2009; Glaser et al., 2007; Baumann and Pham-Dinh, 2001).

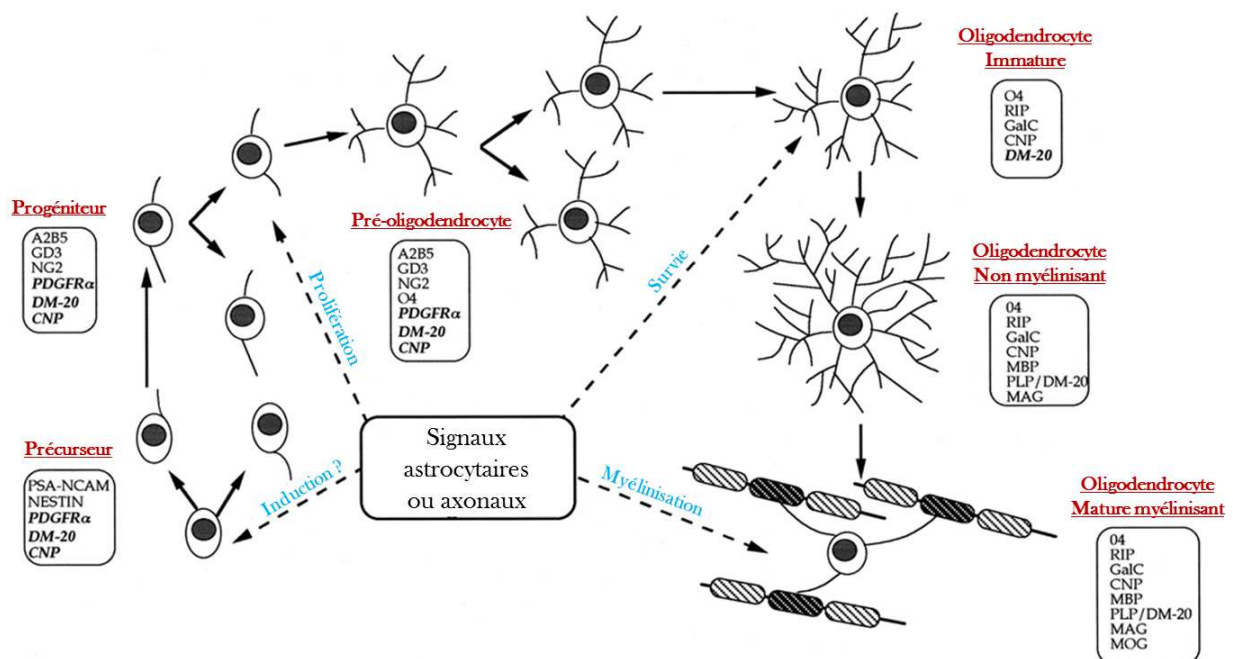


Figure 14 : Représentation schématique du développement et de la maturation des oligodendrocytes. La progression depuis les cellules précurseurs jusqu'aux oligodendrocytes myélinisants passe par une évolution des marqueurs antigéniques. Certains marqueurs sont propres à chaque étape tandis que d'autres sont partagés le long du lignage cellulaire. Baumann et Pham-Dinh., *Physiological reviews*, 2001.

La culture *in vitro* d'oligodendrocytes ou du moins la différenciation de CSN dans cette voie nécessite la mise en place d'un protocole long, faisant se succéder des facteurs de stimulation des différents stades de maturation. Le PDGF-A et le bFGF entrent en jeu dans les premiers stades promouvant la prolifération des CPO et des pré-oligodendrocytes, tandis que l'ajout progressif de tri-iodothyronine (T3) et/ou d'acide ascorbique permettent d'enfoncer la cellule dans la voie oligodendrocytaire vers l'état de différenciation final⁷ (Glaser et al., 2007; Qian et al., 2000).

⁷ Il faut noter que la différenciation des oligodendrocytes à partir de CSN murines est particulièrement rapide (environ 5-8 jours), comparativement au processus identifié chez l'Humain (de 28 à 38 jours).

3. Glioblastome et cellules souches tumorales

Zena Werb de l'Université de Californie à San Francisco décrit la tumeur comme une entité à part entière, assimilée à un organe dans l'organe (Egeblad et al., 2010). La tumeur y est dépeinte comme un ensemble complexe de cellules entourées de ses éléments matriciels d'une part et de toutes les cellules et facteurs apportés et sécrétés par l'hôte d'autre part. Dans de nombreux types de tumeurs, l'hétérogénéité cellulaire est très marquée avec plusieurs types de cellules participant à créer des sous-zones internes à la tumeur, comme par exemple les niches vasculaires composées de cellules endothéliales, de péricytes, de cellules immunitaires, de cellules tumorales ou encore de cellules souches tumorales. Contrairement à un organe sain, la tumeur est en perpétuelle évolution et croît de manière incontrôlée, ce qui tend à remanier régulièrement l'architecture cellulaire de la matrice extracellulaire associée.

Le glioblastome est très souvent considéré comme la tumeur solide la plus hétérogène.

3.1 Généralités et épidémiologie des glioblastomes

3.1.1 Les tumeurs du système nerveux

Partant du principe que n'importe quel type de cellule est capable de muter suite à des événements environnementaux et génétiques, chaque cellule de chaque organe est potentiellement à la source d'une tumeur, bénigne ou maligne. Dans le domaine des tumeurs du système nerveux central, il existe donc plusieurs types de cancers, siégeant dans l'encéphale, la moelle épinière et dans les enveloppes méningées ou épendymaires.

Parmi elles, se distinguent les tumeurs primaires, dont l'origine provient de l'organe lui-même et les tumeurs secondaires, fruits de métastases d'autres tumeurs primitives situées à distance dans l'organe ou provenant d'organes différents. Le cancer du poumon est la première source de métastases cérébrales (35 %) suivi par le cancer du sein (30 %), mais les cancers du rein, de la prostate, du côlon et les mélanomes peuvent également y métastaser (Sperduto, 2003).

Les tumeurs primaires quant à elles représentent près de 50% des tumeurs intracrâniennes diagnostiquées chez l'adulte.

3.1.2 Epidémiologie du glioblastome

Les gliomes sont des tumeurs dérivant de cellules gliales et représentent à eux seuls 50% des cancers primitifs du système nerveux central. Parmi eux, le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente (50 % des gliomes) et la plus agressive chez l'adulte. La médiane de survie est de 12,9 mois, étendue à 14,6 mois avec le traitement actuel de référence (radio-chimiothérapie concomitante), tandis que la survie globale à 5 ans n'excède pas 3 %, laissant une issue systématiquement fatale (Stupp et al., 2009).

En France, 5000 nouveaux cas de GBM sont diagnostiqués par an, soit une incidence de 5,2/100 000 habitants. L'âge et le sexe sont deux facteurs importants pour cette tumeur apparaissant préférentiellement entre 45 et 70 ans avec une incidence en augmentation jusqu'à 70 ans et touchant environ 60 % d'hommes pour 40 % de femmes (Belot et al., 2008; Brandes et al., 2008). L'incidence du GBM tend à augmenter de 1 % par an dans les pays industrialisés, cela s'expliquerait en partie par le vieillissement de la population ainsi que des progrès des moyens de diagnostic.

3.2 Symptômes, diagnostic

Les tumeurs cérébrales sont découvertes en général par l'apparition de symptômes neurologiques. Ils peuvent être nombreux et variés, plus ou moins marqués en fonction de la zone cérébrale dans laquelle se développe la tumeur (Omuro A and DeAngelis LM, 2013). On retrouve de manière non exhaustive :

- Troubles moteurs : paralysies temporaires, perte d'équilibre ou de la coordination,
- Troubles de la parole,
- Troubles mnésiques,
- Désordres du comportement et de l'humeur,
- Maux de tête accompagnés de nausées et vomissement (très fréquemment),
- Augmentation de la pression intracrânienne causant des crises d'épilepsie, sans antécédent.

A l'apparition de ces symptômes, un examen d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) avec ou sans contraste sera prescrite afin d'apprécier la localisation de la tumeur, sa gravité et son opérabilité. Dans tous les cas, l'IRM ne permet pas de juger du type de tumeur,

mais uniquement de sa taille, son infiltration et d'obtenir avec des technologies multimodales des informations sur la perfusion ou le métabolisme de la masse cellulaire (Galanaud et al., 2006). Afin de préciser le type et le grade exacts de la tumeur (comme par exemple un GBM), une biopsie suivie d'une analyse histologique sont nécessaires.

3.3 Classifications des gliomes

3.3.1 Classifications histopathologiques et cliniques

Actuellement deux grands types de classifications existent.

- La classification de l'OMS, basée sur une analyse purement histologique et sur l'identification de marqueurs cellulaires précis. Il s'agit du standard de référence international.
- La classification de Sainte Anne, particulièrement développée en France a été proposée par le Professeur Daumas-Duport de l'hôpital Sainte-Anne (Paris). Ce mode de classement intègre en plus de celui de l'OMS, des données d'examen cliniques et d'imagerie RMN et scanner (Daumas-Duport et al., 2000).

La classification de l'OMS provient d'une première stratification des tumeurs effectuée en 1979 à partir des travaux de Bailey et Cushing en 1926 ainsi que de Kernohan et Mabon en 1949. Après de nombreuses modifications et précisions apportées par les nouvelles technologies d'analyses histologiques, génétiques et de biologie moléculaire, l'OMS publie en 2007 sa quatrième version de la classification des tumeurs du système nerveux central (Louis et al., 2007).

Ce mode de représentation consiste premièrement à déterminer le type histologique de la tumeur en retraçant son origine cellulaire. Pour cela, une comparaison morphologique avec des cellules saines permet d'orienter le classement vers une ou plusieurs cellules gliales, tels que par exemple pour les plus courants :

- Les épendymomes, dérivant des épendymocytes,
- Les astrocytomes, provenant des astrocytes,
- Les oligodendrogliomes, provenant des oligodendrocytes,
- Les oligo-astrocytomes, à l'origine mixte entre astrocytes et oligodendrocytes.

Chaque type de tumeur est ensuite stratifié en grades (du grade I au grade IV) selon leur agressivité, d'après cinq critères d'anaplasie⁸ : l'index mitotique, la nécrose, la néovascularisation, l'atypie cellulaire et la densité de noyaux. Une tumeur peut apparaître spontanément avec une anaplasie déterminée (apparaissant immédiatement à un grade élevé), ou bien présenter une anaplasie évolutive, et donc une malignité associée croissante, passant d'un grade au grade supérieur.

Les gliomes de grade I sont aussi rares que bénins chez l'adulte, avec une encapsulation de la tumeur bien délimitée et une faible prolifération. Ils ne remplissent aucun des critères présentés ci-dessus et leur pronostic après exérèse est très bon.

Les astrocytomes de grade II représentent environ 15 % des tumeurs astrocytaires chez l'adulte jeune entre 30 et 40 ans avec une médiane de survie de 7 ans. Bien que caractérisés comme bénins par leur faible prolifération et atypie nucléaire, 50 % des astrocytomes de grade II évoluent vers les grades supérieurs III et IV (Walker et al., 2011).

L'astrocytome de grade III est le premier des astrocytomes malins, à la médiane de survie de 3 ans, à fort index mitotique (proche de 20 %) avec des critères de densité cellulaire et d'atypie nucléaire assez élevés. Ces tumeurs infiltrantes peuvent se développer *de novo* ou provenir d'un grade inférieur, mais peuvent également évoluer en grade IV. Leur récurrence post-chirurgicale est fréquente.

L'astrocytome le plus grave est de grade IV. Il s'agit du glioblastome multiforme, pour lequel tous les critères d'anaplasie sont remplis, dont un index mitotique de plus de 30 %. C'est également le seul astrocytome présentant une prolifération endothéliocapillaire et des zones de nécrose ischémique dues à la très forte prolifération entraînant des difficultés pour la tumeur à générer suffisamment de vaisseaux sanguins pour se nourrir. Des cellules pseudo-palisadiques entourent communément les zones nécrotiques qui sécrètent des facteurs pro-angiogéniques amenant à la prolifération capillaire. L'agressivité du GBM est dramatique laissant une médiane de survie d'un an, il récidive systématiquement après ablation chirurgicale pour une issue létale de tous les patients. C'est également une tumeur extrêmement infiltrante et très fortement hétérogène, laissant apparaître plusieurs types de sous-populations aux caractéristiques phénotypiques et génétiques différentes. C'est d'ailleurs une des causes d'échec des traitements actuels, puissent-ils être ciblés ou personnalisés. Il est en effet peu aisé de cibler l'ensemble des sous-types de populations, comme par exemple les cellules souches de glioblastomes (CSG) qui, en plus de leur très

⁸ L'anaplasie désigne la perte de l'état différencié et des critères propres d'une cellule menant souvent à un changement partiel ou total de sa structure et de son phénotype.

grande hétérogénéité génétique (Touat et al., 2015; Brennan et al., 2013), ont la capacité à rester en dormance et à résister de façon remarquable à la plupart des traitements (Brat and Van Meir, 2004; Louis et al., 2007; Walker et al., 2011).

3.3.2 Les signatures moléculaires des glioblastomes

La très grande hétérogénéité régnant au sein des GBM a poussé les études vers de nouvelles méthodes de stratification de ces tumeurs. En effet, grâce à l'avancée des analyses génomiques à très haut débit, le « Cancer Genome Atlas Network » a répertorié des aberrations génomiques récurrentes sur un échantillon de 206 GBM (McLendon et al., 2008). Dans cette étude portant sur tout le génome tumoral, apparaissent quelques gènes particulièrement mutés, méthylés, sous- ou sur-exprimés tels que : NF1, EGFR1, PTEN, P53, PDGFR α , IDH1 ou encore MGMT. L'analyse de 1740 gènes a notamment permis de mettre en relief des types de signatures aux profils suffisamment différents les uns des autres pour établir 4 sous-types de GBM : pro-neural, neural, classique et mésenchymal (**figure 15**). L'analyse montre justement que chaque sous-type peut être caractérisé au minimum par un ou plusieurs gènes ayant subi une modification majeure. On retrouve ainsi dans le type pro-neural, une sur-expression de PDGFR α et la mutation dans 40 % des cas du gène de l'isocitrate-déshydrogénase (IDH1), associé à des délétions dans les chromosomes 1 et 19 (Sanson, 2016). De manière générale, la mutation IDH1 représente un facteur robuste de prédiction de la survie des patients (Ducray et al., 2011). Le sous-type neural est associé quant à lui, à l'expression de marqueurs neuronaux tels que les neurofilaments (NFL) ou des récepteurs au GABA (GABRA1). Dans la signature mésenchymale, la délétion fréquente du locus 17q11.2 entraîne alternativement une diminution de la transcription du gène NF1 ou une mutation, s'accompagnant dans la moitié des cas de la perte de fonction de PTEN. Finalement, dans le sous-type classique, ce sont l'amplification du chromosome 7 et la perte du chromosome 10 qui sont constatées dans 100 % des cas, entraînant une amplification presque systématique d'EGFR, dont l'expression est dérégulée dans presque 50 % des GBM (Verhaak et al., 2010). De façon intéressante, les auteurs ont montré, à la manière d'une « heatmap » que ces 4 sous-types avaient des similitudes avec le profil d'expression des gènes normaux des types cellulaires retrouvés dans le cerveau murin sain (**figure 15**).

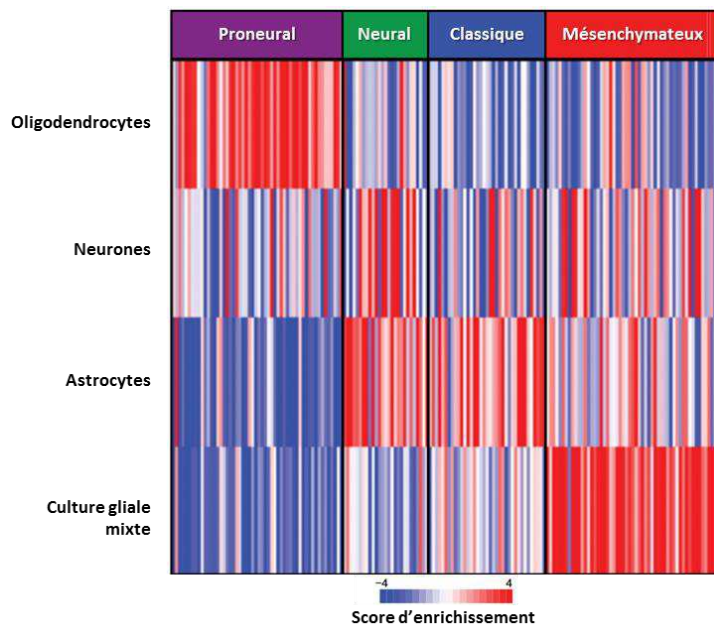


Figure 15: « Heatmap » de relation d'expression de gènes normaux et des gènes des différents GBM.

Les 4 groupes de gènes définissant les sous-types de GBM (proneural, neural, classique et mésenchymateux) sont comparés aux signatures d'expressions géniques des oligodendrocytes, astrocytes, neurones et culture de glie mixte. Un enrichissement positif (rouge) indique une corrélation entre les panels de gènes. L'enrichissement négatif (bleu) montre le contraire. Adapté de Verhaak et al., *Cancer Cell*, 2010.

La classe proneurale est ainsi enrichie avec la signature génétique des oligodendrocytes et le type classique est comparable à la signature astrocytaire. Le sous type neural quant à lui, montre de fortes corrélations avec les signatures astrocytaire et neuronale et plus modérées pour les oligodendrocytes. Enfin la version mésenchymale regroupe des gènes exprimés par la glie tels que la microglie et les astrocytes, tout en tenant la comparaison avec les neurones sains (Verhaak et al., 2010).

Tout cela démontre la forte hétérogénéité d'expression de gènes dans les GBM, causant en partie les différences importantes d'efficacité des traitements cliniques. Cela entraîne aussi une grande confusion en recherche translationnelle pour déterminer des biomarqueurs de ces tumeurs qui sont capables d'exprimer finalement selon leur sous-type, de nombreux gènes différents et parfois contradictoires. La sous population des cellules souches tumorales retrouvée dans les GBM joue d'ailleurs un rôle prépondérant. Elle est capable de maintenir l'hétérogénéité, de reformer des tumeurs à l'identique de la tumeur primaire et d'exprimer plusieurs biomarqueurs normalement réservés à des lignées cellulaires spécifiques.

3.4 Les cellules souches de glioblastome (CSG)

La présence de cellules souches dans les tumeurs a été décrite en 1994 par Ted Lapidot dans la leucémie myéloïde aigüe. Ce sont ensuite des travaux successifs sur les gliomes pédiatriques et adultes, puis spécifiquement sur les glioblastomes qui ont

clairement démontrés l'existence de cellules de tumeurs cérébrales ayant des propriétés comparables aux CSN (Galli et al., 2004; Singh et al., 2003; Hemmati et al., 2003; Ignatova et al., 2002). Néanmoins, leur caractérisation pose toujours problème et clive fortement la communauté scientifique. A l'heure actuelle aucun marqueur ne permet, seul, d'identifier une CSG. Il suffit de s'intéresser aux multiples nomenclatures pour s'apercevoir que chaque équipe de recherche utilise une dénomination peu ou prou différente, basée sur la manière d'identifier les cellules, mais regroupant *in fine* toujours les mêmes propriétés cellulaires.

3.4.1 Définition d'une cellule souche de glioblastome

Comme énoncé dans le paragraphe précédent, la définition d'une CSG prête largement à confusion lorsque l'on se réfère à la littérature. Cependant, il est admis qu'une CSG partage les comportements d'autorenouvellement, de formation de sphères en culture *in vitro*, de prolifération à long terme et expriment des marqueurs des cellules souches neurales (cités dans le paragraphe 2.4) (Lathia et al., 2015; Schonberg et al., 2014). Elles sont normalement au moins pluripotentes, parfois multipotentes, capables de se différencier et de générer des cellules exprimant des marqueurs de cellules neuronales ou gliales. Greffées dans leur environnement cérébral, elles sont également capables de générer une tumeur récapitulant l'hétérogénéité de la tumeur initiale dont elles sont issues (Singh et al., 2004).

3.4.1.1 Origine et apparition des CSG

Le sujet de l'origine des GBM et en particulier de l'apparition des CSG divise une nouvelle fois le monde scientifique. Trois théories s'affrontent, chacune étayée par plusieurs études (Goffart et al., 2013). Dans tous les cas, la survenue de mutations génétiques sur des gènes suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes est nécessaire, ces phénomènes arrivant en séries au sein de mêmes cellules.

La première théorie défend la dédifférenciation de cellules gliales matures telles que les astrocytes. En effet, la perte de fonction des suppresseurs de tumeurs INK4a/ARF couplé à l'activation de l'oncogène K-Ras entrainerait une formation de tumeurs au phénotype comparable au GBM (Uhrbom et al., 2002). De même, des astrocytes perdant p53 et sur-exprimant AKT et c-Myc, sont capables de quitter leur phénotype glial pour exhiber des

marqueurs des cellules souches (CD133 et Olig2) tout en devenant tumorigénique une fois greffés dans le cerveau de souris (Radke et al., 2013).

Une seconde théorie prône les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (CPO) comme origine, exprimant notamment les marqueurs PDGFR α et NG2 (Lindberg et al., 2009). Une étude remarquable utilisant l'outil d'analyse mosaïque à double marqueur (MADM) a permis de mettre cette population cellulaire en avant. Les cellules souches neurales de souris subissent une mutation des deux allèles de NF1 et p53. De manière intéressante, les auteurs décrivent que seuls les CPO découlant de ces CSN mutées se mettent à proliférer de manière anarchique en arborant un phénotype tumoral. Les CPO seraient selon cette théorie à l'origine de l'expansion tumorale, tandis que les CSN auraient accumulées les mutations génétiques en amont.

La dernière théorie est probablement la plus documentée. Elle place la CSN directement comme cellule d'origine des GBM. Les études portant cette théorie se basent sur des modèles de mutations et de perte de fonction des gènes PTEN, Ink4A/Arf, p53, NF1, AKT, EGFR, Ras ou encore RB, tous impliqués dans la régulation de l'autorenouvellement ou la prolifération des CSN. Par exemple, le knockout conditionnel des suppresseurs de tumeurs p53, NF1 et/ou PTEN dans des souris génère des astrocytomes de haut grade avec une pénétrance de 100 %, où les lésions initiales proviennent des CSN de la ZSV (Alcantara Llaguno et al., 2009; Wang et al., 2009; Kwon et al., 2008). Pour être plus précis, l'équipe d'Alvarez-Buylla a établi que la stimulation des cellules de type B de la ZSV par le PDGF-AA, contribue à développer une hyperplasie massive comparable au phénotype du glioblastome (Jackson et al., 2006). De même, les cellules de type C à prolifération transitoire seraient en cause dans l'accumulation des mutations (avec p53 en tête) précoces des gliomes (Wang et al., 2009).

Dans ce contexte, nous pouvons raisonnablement penser que l'origine des CSG est partagée entre différents types cellulaires sains qui accumulent des mutations, se différencient ou se transforment. L'apparition des CSG serait donc due à la contribution des trois hypothèses, renforçant encore plus la notion d'hétérogénéité présente dans les glioblastomes (**figure 16**).

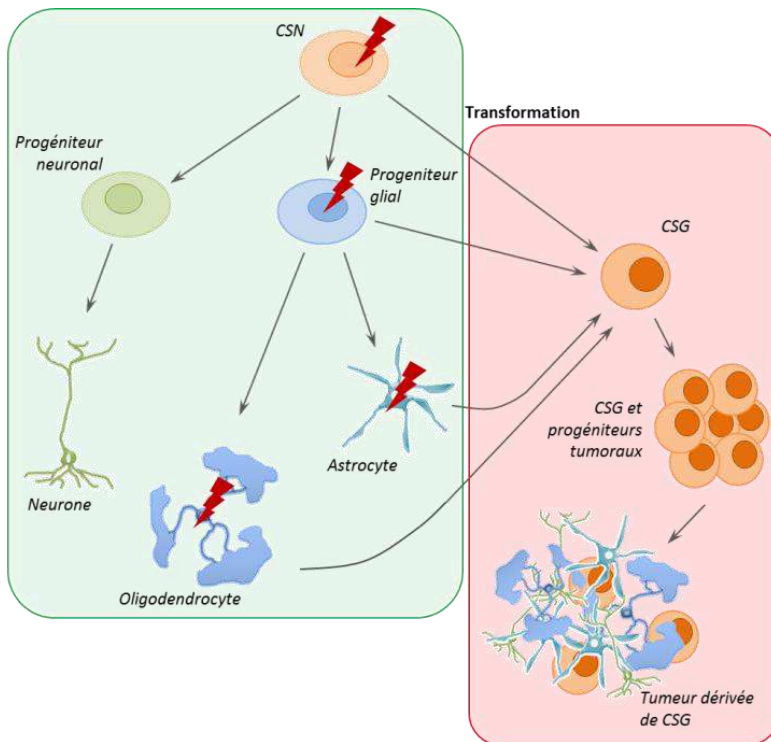


Figure 16 : Hypothèses sur l'apparition des CSG à partir de cellules neurales.

Les CSG apparaissent à partir de la transformation (éclairs rouges) de CSN, de progéniteurs gliaux ou plus rarement de cellules pleinement différenciées, menant à la formation de glioblastome.

Une des dernières publications du laboratoire de Luis Parada (Alcantara Llaguno et al., 2015) suggère justement que pour des mêmes mutations (PTEN, NF1 et p53), deux types différents de cellules du SNC, les CSN et les CPO peuvent initier deux GBM identiques pathologiquement, mais différents moléculairement (**figure 17**).

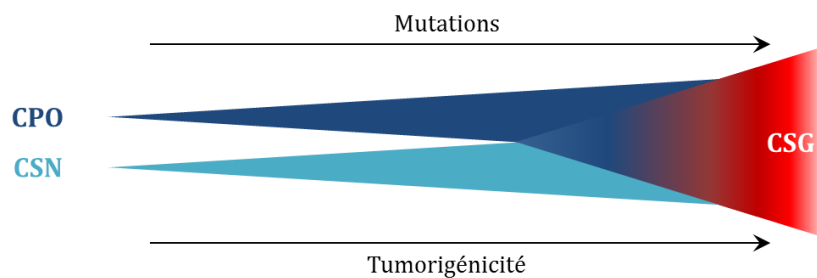


Figure 17 : Hypothèse de la contribution conjointe des CSN et des CPO à l'apparition des CSG. Les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (CPO) et/ou les cellules souches neurales (CSN) accumulent des mutations. Leur potentiel tumorigénique augmente en conséquence jusqu'à atteindre un seuil entraînant leur transformation en CSG.

3.4.1.2 Identification et caractérisation des CSG

De nombreuses méthodes d'identification, d'analyse et d'enrichissement ont été mises au point pour les GSC. Ces cellules qui correspondent à des sous populations noyées

dans la masse du GBM ne représentent en général pas plus de 1 à 2 % des cellules tumorales. Leur identification n'est donc pas aisée, d'autant plus qu'à l'heure actuelle, il n'existe aucun marqueur formel et exclusif des CSG. Cependant, cette contrainte est également vraie pour les cellules souches normales pourtant mieux caractérisées.

L'identification des sous-populations de CSG repose sur plusieurs critères, comparables en certains points à ceux utilisés pour détecter les CSN. Comme énoncé précédemment, les CSG sont pluripotentes, s'autorenouvellent, prolifèrent et peuvent donner naissance à des cellules différenciées exprimant des marqueurs des neurones, des astrocytes, des oligodendrocytes, et dans une certaine mesure, expriment des marqueurs de cellules endothéliales ou péricytaires. C'est pourquoi la plupart des marqueurs ou des tests *in vitro* pour les CSG sont empruntés à la biologie des CSN (Lathia et al., 2015). Ainsi les marqueurs de cellules souches neurales, tels que nestine, Sox2, CD133 (exposés dans le paragraphe 2.4), mais aussi musashi-1, BMI1, Nanog, SSEA1 ou CD44 (Suvà et al., 2014; Ishiwata et al., 2011; Campos and Herold-Mende, 2010; Pollard et al., 2009; Liu et al., 2006; Hemmati et al., 2003) sont les molécules les plus couramment recherchées pour caractériser les CSG d'un point de vue moléculaire.

Le marqueur CD133 (prominine-1) est historiquement le marqueur le plus ancien pour détecter des CSG au sein d'une tumeur. La population CD133+ purifiée est capable de reformer des tumeurs *in vivo* aux caractéristiques proches de la tumeur parentale dont elle est issue (Singh et al., 2004). Elles forment également des sphères en tous points comparables aux neurosphères : les gliomasphères. Ces cellules CD133+ sont alors décrites comme des cellules initiatrices de tumeurs, à l'inverse des cellules CD133- qui ne génèrent pas de GBM. Par la suite, le grand nombre d'études utilisant entre autres un marquage CD133 donne des résultats très contradictoires, au point de devoir mettre au point plusieurs théories sur l'expression et la régulation très complexes de cette protéine (Campos et al., 2011). Des problèmes récurrents liés à la reconnaissance de l'épitope glycosylé par les anticorps de CD133 seraient probablement la cause de toutes ces controverses.

En effet, des cellules négatives pour ce marqueur expriment d'autres marqueurs des cellules souches comme nestine et Sox2 (Yuan et al., 2004), mais sont également capables de former des gliomasphères *in vitro* (Joo et al., 2008) et des tumeurs *in vivo* de manière équivalente à la population CD133+. De plus, des cellules CD133 négatives semblent pouvoir

donner des tumeurs avec des cellules exprimant CD133 (**figure 18**) et inversement (Wang et al., 2008; Beier et al., 2007).

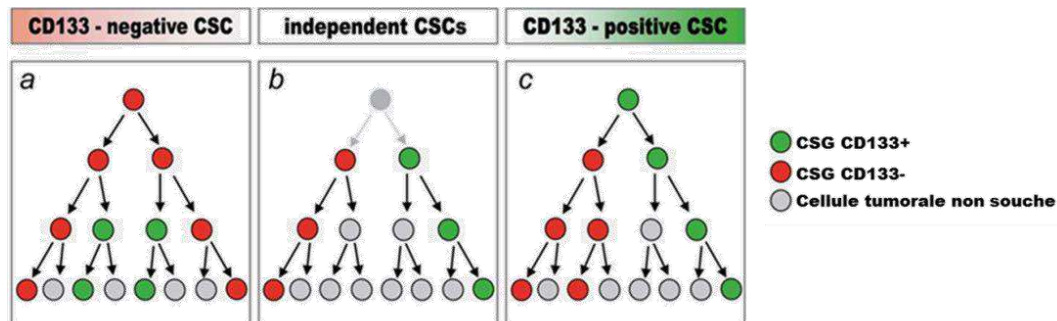


Figure 18 : Illustration des modèles des cellules souches de glioblastome (CSG) basées sur le marqueur CD133. (a) Des CSG négatives pour CD133 peuvent donner naissance à des cellules négatives et positives pour CD133. **(b)** Des cellules de glioblastome indépendantes peuvent se diviser en cellules CD133+ ou CD133-. Elles-mêmes régénèrent des cellules hétérogènes. **(c)** Des CSG CD133- et des cellules tumorales non souches sont dérivées de CSG CD133+. Adapté de Campos et al., *International journal of cancer*, 2011.

Effectivement, une des méthodes permettant de mettre une population de CSG en avant est d'utiliser sa capacité de clonogénicité dans le test de formation de sphères. En mettant des cellules tumorales de GBM dans un milieu favorisant la prolifération des cellules souches, sans sérum et avec les facteurs de croissance EGF et bFGF, une sélection naturelle s'opère. Les cellules non réceptives aux facteurs de croissance meurent tandis que les CSG et les progéniteurs survivent, prolifèrent et forment des édifices flottants : les gliomasphères. Cette technique, basée sur la technique des neurosphères (Reynolds and Weiss, 1992), permet de déposer par dilution limite entre une et quelques dizaines, voire centaines de cellules (selon les protocoles) par puits de plaques 96 puits, puis de compter le nombre de sphères formées. Entre 1 % et 15 % des cellules isolées parviennent à reformer une gliomasphère (Singh et al., 2004). Ces sphères, dont la fréquence augmente dans une population de CSG positives pour CD133 restent néanmoins hétérogènes, certaines cellules étant parfois des progéniteurs plus avancés dans la différenciation qui expriment GFAP, Tuj-1 ou GalC (Beier et al., 2007; Singh et al., 2004).

Face à la difficulté à identifier les CSG, une méthode alternative caractérisant la capacité de ces cellules à détoxifier leur cytoplasme par l'activité élevée de canaux MDR

(Multi Drug Resistance) ⁹ notamment par le rejet expérimental de Hoechst 33342 (Bleau et al., 2009). Cette technique, appelée « identification de side population » se révèle néanmoins être insuffisante pour identifier formellement les CSG, mais elle participe à caractériser un de leurs aspects : la détoxification du cytoplasme (Broadley et al., 2011).

Une donnée très intéressante, pourtant très rare dans la littérature, est la documentation de l'expression de marqueurs de cellules différenciées au sein même des CSG. En effet, malgré tout le soin apporté à conserver les conditions de non-différenciation, les CSG maintenues en culture *in vitro* contiennent souvent une composante non négligeable de cellules exprimant des marqueurs de cellules neurales différenciées (astrocytes, neurones ou oligodendrocytes) ¹⁰ simultanément ou pas au marqueur CD133. Il est possible ainsi de trouver dans les gliomasphères les marqueurs des trois types cellulaires (Beier et al., 2007; Yuan et al., 2004). Ce mode de culture sous forme de sphères permet aux CSG de faire des divisions asymétriques et de conserver en culture des cellules plus avancées dans les processus de différenciation (Wan et al., 2010), mais qui continuent pourtant à exprimer les marqueurs des cellules souches.

Il est important de noter que dans des lignées de GBM non souches humaines (U87, LI, U373) et murine (C6), les marqueurs de cellules souches peuvent être retrouvés en quantités variables parmi les cellules exprimant déjà ou non des marqueurs de cellules différenciées (Iacopino et al., 2014; Prestegarden et al., 2010; Sandberg et al.; Zheng et al., 2007). Parmi eux, nestine et Sox2 sont les marqueurs les plus fréquemment exprimés, conférant une certaine plasticité de différenciation et de dédifférenciation aux cellules. D'après les mêmes études, une grande partie de ces cellules de ces lignées correspondraient en fait à une population de CSG dormante, ayant la capacité de faire des sphères et d'adopter toutes les caractéristiques des CSG une fois mises en milieu de culture « souche ».

La **figure 19** résume les différents aspects des sous-populations et des caractéristiques des CSG au sein d'une tumeur.

⁹ La famille des canaux MDR est très étendue. Ici, le canal ABC-G2 est responsable en particulier de l'exclusion de la sonde fluorescente Hoechst33342.

¹⁰ Cette affirmation est néanmoins à relativiser, chaque lignée étant issue d'une tumeur différente dont la composition cellulaire varie. Il est donc possible d'avoir des lignées de CSG n'exprimant parfois aucun, un ou plusieurs des marqueurs de différenciation, en des proportions, elles aussi variables.

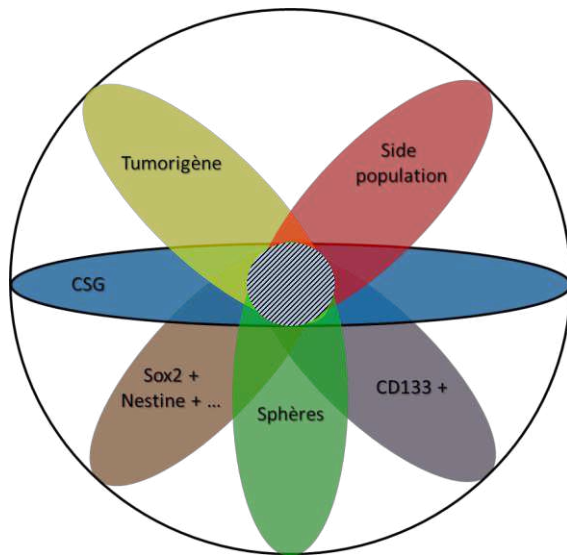


Figure 19 : Caractéristiques des sous-populations cellulaires des GBM.

Le cercle noir représente la totalité de la tumeur. Chaque ellipse de couleur représente les traits d'une sous-population et ne constituent qu'une faible proportion des cellules cancéreuses totales. Les cellules tumorigènes sont représentées en jaune, les cellules « side population » en rouge, les cellules CD133+ en gris, celles formant des sphères en culture sont en vert et les celles positives pour des marqueurs de Sox2 ou nestine sont en marron. Seule une fraction des CSG rassemble l'ensemble des critères (cercle blanc rayé de noir) et représente probablement moins de 1% des cellules totales. Adapté de Wan P. et al., *Brain Pathology*, 2010.

3.4.1.3 Différenciation et transdifférenciation des CSG

Placées dans un environnement spécifique *in vitro*, ou greffées dans un cerveau de souris, les CSG sont capables de se différencier ou de se transdifférencier, redonnant l'hétérogénéité tumorale et participant à l'angiogenèse tumorale directement ou indirectement.

a. La différenciation

De manière analogue aux CSN, le retrait des facteurs de croissance et/ou l'ajout de sérum entraîne la différenciation des CSG en suivant la voie neurale et donnent des cellules qui expriment des marqueurs normalement associés aux neurones, astrocytes et oligodendrocytes, sans devenir strictement ces types cellulaires. En effet, bien que tumorales, certaines cellules de glioblastome sont capables de répondre au kainate/AMPA via des récepteurs au glutamate, produire un courant potassique, suivi de signalisation calcique intracellulaire (Labrakakis et al., 1998). Or, il a été récemment démontré que le calcium intracellulaire favorise à plusieurs niveaux la propagation des cellules de GBM (Leclerc et al., 2016). D'autres auteurs ont même démontré l'existence de potentiels d'actions générés par les canaux ioniques K^+ et Na^+ (Molenaar, 2011) dans les cellules tumorales après les avoir stimulées (Labrakakis et al., 1997). Au sein des GBM, les cellules initiateurs de tumeurs sont connues pour sur-exprimer des canaux calcium glutamate-

sensibles, générant des courants électriques intracellulaires (Oh et al., 2012). Or, il semblerait que le profil électrophysiologique soit très différent des cellules de gliome elles-mêmes, en arborant des différences de conductivité membranaire proches de celles retrouvées sur des cellules radiaires NG2+ normales (Barrantes-Freer et al., 2013). Malgré tout, les cellules de glioblastome, puissent-elles être des CSG ne sont pas capables de générer des réseaux cohérents de signalisation électrique. Donc, bien que les cellules de gliome exhibent certains aspects des cellules neurales normales, elles n'en n'ont pas véritablement la fonction.

Dans la première étude descriptive de CSG, Singh et collaborateurs proposent en 2004 que des cellules CD133+ préalablement triées puis injectées dans le striatum de souris se différencient et expriment les marqueurs GFAP et MAP2 (ou Tuj-1) de façon comparable à la tumeur initiale du patient. De même une grande partie de ces cellules continuent à exprimer le marqueur nestine (Singh et al., 2004). Plusieurs travaux démontrent également un comportement de différenciation propre à presque chaque lignée dérivée de CSG. Par exemple, la comparaison de trois de ces lignées placées dans un milieu sans facteurs de croissance induit l'expression d'O4 dans une des lignées, celle de l'expression de Tuj-1 dans la seconde, mais aucun marqueur de différenciation dans la troisième. L'ajout de BMP-4 pendant une semaine dans le milieu de culture promeut l'expression majoritaire de GFAP dans les trois lignées ainsi qu'une très faible activation du marqueur doublecortine (Pollard et al., 2009). D'autres travaux récents montrent des effets similaires avec GFAP et le marqueur neuronal Tuj-1 accompagné de la baisse de l'expression de CD133 ou de musashi-1, preuve de la perte de l'état souche. En effet, les cellules différenciées présentent une baisse de la prolifération *in vitro* (observée par cytométrie en flux ou par test de formation de sphères) et une baisse de la tumorigénicité *in vivo* (Fessler et al., 2015; Campos et al., 2010).

Le phénomène de différenciation des CSG est encore plus complexe, car les cellules sont en fait capables d'exprimer les marqueurs de différenciation de plusieurs types cellulaires simultanément. Dans un milieu de différenciation privé de facteurs de croissance et avec ajout de sérum, les CSG peuvent donner naissance aux trois lignées neurales, validées par l'expression de GFAP, Tuj-1 (ou MAP2) et GalC (ou O4 ou CNP) (Iacopino et al., 2014; Lemke et al., 2014; Lathia et al., 2010; Yuan et al., 2004). Une fois de plus, chaque lignée de CSG présente ses propres répartitions de cellules différenciées, mais l'ajout de sérum (traditionnellement entre 1% et 10%) ne favorise aucun lignage particulier en générant entre 40 % et 50 % de chacun des types cellulaires neuraux. Parmi ces cellules, 70

% expriment au moins deux marqueurs différents simultanément (GFAP/Tuj-1 et GFAP/GalC), montrant la grande plasticité d'expression des CSG durant le processus de différenciation (Scully et al., 2012).

b. La transdifférenciation

Ce phénomène désigne la capacité d'une cellule à perdre ses caractères phénotypiques pour en arborer de nouveaux, associés à de nouvelles fonctions. Le mécanisme est de plus en plus étudié dans le domaine des CSG car il représente un enjeu majeur dans la compréhension de l'échappement aux thérapeutiques anti-angiogéniques (Hardee and Zagzag, 2012).

Ce mécanisme existe dans certains cas pour des cellules différenciées normales qui se convertissent en autres cellules spécialisées. Par exemple, les cellules de la glie radiaire se transdifférencient en neurones corticaux lors de l'ontogenèse du système nerveux (Götz and Huttner, 2005; Malatesta et al., 2000). Mais ces cas physiologiques sont rares et la transdifférenciation est le plus souvent déclenchée par une altération du tissu environnant. Par exemple, le TGF- α sécrété par les gliomes précoces peut induire la conversion d'astrocytes sains environnant en CSN et en progéniteurs neuraux (Sharif et al., 2007). En revanche, même si ces CSN *de novo* ont des propriétés d'autorenouvellement et de différenciation similaires aux CSN originelles, elles sont plus sensibles aux agents mutagènes et enclines à former facilement des gliomes de haut-grade (Dufour et al., 2009).

Cet événement de conversion cellulaire existe également pour les cellules souches. Dans ce cas, la cellule souche génère une cellule spécialisée différente de son lignage normal. Par exemple, les CSN sont capables de transdifférenciation. En effet, il a été démontré que des CSN mises en co-culture avec des cellules endothéliales peuvent se mettre à exprimer le marqueur endothélial CD146 et former un réseau capillaire *in vitro* (Wurmser et al., 2004). De même dans une étude de 2012, des CSN fluorescentes GFP sont greffées dans des cerveaux lésés de souris ayant subi 20 gray d'irradiations répartis sur 11 jours. Il peut être attendu que les CSN se différencient en astrocytes, oligodendrocytes et neurones pour réparer les zones détruites par le rayonnement ionisant. Ce qui est surprenant, c'est que certaines structures vasculaires marquées en immunohistochimie (CD31, vWF...) sont co-localisées avec la GFP, suggérant la transdifférenciation de certaines CSN en cellules endothéliales (Joo et al., 2012).

Les CSG sont donc capables d'accomplir la transdifférenciation. Il est d'ailleurs tentant de spéculer qu'elles auraient hérité de cette capacité des CSN, mais de manière dérégulée et bien plus plastique. Dans les GBM, ce phénomène permet à la tumeur de fabriquer son propre réseau vasculaire afin de supporter la croissance trop rapide (Carmeliet and Jain, 2011). De nombreuses études parues au cours des 6 dernières années prêtent aux CSG de manières parfois contradictoires ou complémentaires, la capacité de mimer le réseau vasculaire et la capacité de générer des péricytes et/ou des cellules endothéliales (Hardee and Zagzag, 2012).

Les travaux de l'équipe de M. Sanson démontrent en 2010 pour la première fois que les CSG de certains GBM sont capables de générer des tubes vasculaires *in vitro* dans le matrigel. Bien qu'aucun marqueur spécifique des cellules endothéliales ne soit observé, les cellules présentent un phénotype péricytaire *in vitro* (étalé) et *in vivo* (entourant les vaisseaux sanguins), confirmé par l'expression des marqueurs α -SMA et Desmine (El Hallani et al., 2010). Il a également démontré que la stimulation de la voie Notch1 sur deux lignées de CSG induit leur transdifférenciation en cellules péricytaires (NG2+ et α -SMA+). *In vivo*, ces péricytes tumoraux entourent des cellules endothéliales CD31+ uniquement d'origine murine (Cheng et al., 2013; Guichet et al., 2014). Même si la formation de péricytes à partir de CSG a également été décrite dans d'autres travaux, leur plasticité et l'expression de marqueurs neuraux et endothéliaux sont plus contrastées. Selon le milieu de culture *in vitro* utilisé, les facteurs de croissance apportés et la quantité de sérum ajouté, les CSG CD133+ seraient en fait capables de co-exprimer les marqueurs neuraux (MAP2, GFAP, GalC) et les marqueurs péricytaires (NG2 et α -SMA). Dans une moindre mesure (moins de 1,5 %), les CSG pourraient également générer des cellules endothéliales marquées avec CD31, Tie1, Tie2, VEGFR2, mais pas avec les marqueurs neuraux aux cellules péricytaires (Scully et al., 2012).

D'autres théories avaient été avancées sur la conversion finale des CSG exclusivement en cellules endothéliales ou en cellules tumorales vasculaires. Environ 60 % des cellules endothéliales retrouvées dans les GBM, analysées par technique de FISH portent les mêmes altérations génétiques que le GBM lui-même, suggérant une origine en partie néoplasique des vaisseaux. Les CSG y sont capables de se transdifférencier en cellules tout d'abord vasculaires progénitrices puis en endothélium mature, en exprimant respectivement les marqueurs CD146, puis CD31, Tie2 et vWF (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). *In vitro*, elles nécessitent une stimulation par des facteurs pro-

angiogéniques comme le VEGFA et l'activation de VEGFR2 pour accomplir cette conversion. Placées dans du matrigel, elles perdent petit à petit l'expression des marqueurs « souche » comme CD133 et gagnent ceux des cellules endothéliales en formant des tubes d'angiogenèse (Francescone et al., 2012). Ces mêmes cellules greffées dans le cerveau de souris immunodéficientes donnent naissance à des cellules positives pour CD31 et Tie2, majoritairement dans le cœur des tumeurs ischémiques et peu dans la périphérie davantage perfusée, comme le montrent l'utilisation de constructions fluorescentes couplées à des marquages histochimiques (Ricci-Vitiani et al., 2010). L'hypoxie engendrée par la croissance anarchique des GBM¹¹ ainsi que les échanges de facteurs pro-angiogéniques avec les vaisseaux préexistants seraient en partie responsables du mécanisme de transdifférenciation des GSC en cellules endothéliales (Hardee and Zagzag, 2012; Soda et al., 2011). Une nouvelle alternative à l'acquisition du phénotype vasculaire a été décrite récemment en démontrant la fusion de CSG fluorescentes avec des cellules endothéliales générant des hybrides binucléés fluorescents exprimant CD31, CD144 et vWF ... (El Hallani et al., 2014).

3.5 Régulation des CSG par la niche microenvironnementale

Les GBM sont des tumeurs infiltrantes et à forte prolifération, ce qui les fait rencontrer en permanence de nouveaux environnements au sein de la tumeur d'une part et dans le parenchyme cérébral d'autre part. Schonberg et collaborateurs décrivent la relation entre les CSG et leur microenvironnement comme symbiotique (Schonberg et al., 2014). La niche périvasculaire est un lieu privilégié pour le maintien des CSG, tout comme le sont les vaisseaux sanguins dans la régulation des CSN des niches neurogéniques adultes (**figure 20a**). L'existence de facteurs trophiques communs aux CSN et aux GSC telle que la sécrétion de TGF- β , SHH ou Wnt dans ces zones favoriserait leur implantation (**figure 20**). Néanmoins il n'est pas clair si ce sont les niches qui provoquent la naissance de CSG, ou si ces dernières apparues ailleurs dans le cerveau viennent détourner les niches vasculaires des CSN à leur avantage (Egeblad et al., 2010).

Des arguments ont démontré que les CSG positives pour CD133 et nestine sont capables d'orchestrer la mise en place de cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* en

¹¹ L'hypoxie entraîne l'activation de la voie de HIF1, entraînant des boucles autocrines et paracrines de facteurs angiogéniques tels que VEGFA et PDGF (Bertout et al., 2008).

interagissant physiquement avec elles. En retour, les cellules vasculaires sécrètent VEGF et EGF, favorisant l'autorenouveau et la prolifération des CSG (**figure 20b**). Il a d'ailleurs été démontré que les mitogènes sécrétés par les cellules endothéliales maintiennent les CSG dans un état prolifératif et que le retrait de ces facteurs entraîne leur apoptose (Galan-Moya et al., 2014). De manière intéressante, greffer des cellules endothéliales avec des CSG dans le cerveau de souris augmente drastiquement la population des CSG intra-tumorales. Inversement, bloquer la croissance des cellules endothéliales (avec des anticorps anti-VEGF, notamment le bevacizumab) diminue le ratio de prises de tumeurs à partir de CSG (Calabrese et al., 2007; Lathia et al., 2015; Schonberg et al., 2014).

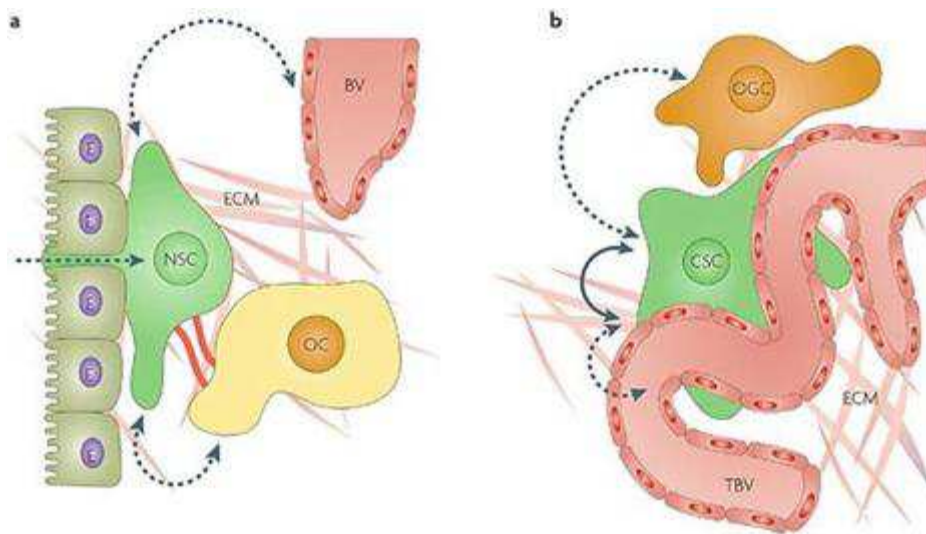


Figure 20 : Vues schématiques de la niche micro-environnementale et vasculaire des CSN et des CSG. (a) Les cellules souches neurales (NSC ou CSN) interagissent directement avec les épendymocytes (E), les cellules des vaisseaux (BV), les cellules de support (OC) et la matrice extracellulaire (ECM). **(b)** Les cellules souches de glioblastome (CSC ou CSG) sont au contact de vaisseaux sanguins aberrants (TBV), de l'ECM et des autres cellules cancéreuses (OGC). Flèches pointillées = échange de facteurs solubles et diffusibles ; flèches pleines = signaux d'autorenouveau aberrants ; lignes pleines oranges = contact cellule-cellule. Adapté de Gilbertson R. et Rich J, *Nature Reviews Cancer*, 2007.

Soumises aux contraintes de culture *in vitro*, les CSG forment des gliomasphères sécrétant leur propre matrice extracellulaire en 3 dimensions, comme par exemple de la laminine nécessaire à la survie des cellules (Lathia et al., 2010). Certaines études spéculent que les CSG tentent de reproduire leur microenvironnement natif, chaque sphère étant alors comparée à une mini-tumeur. Parmi les molécules formant la matrice extracellulaire, la ténascine-C (TNC), reconnue comme particulièrement surexprimée dans les glioblastomes (Nie et al., 2015) et associée à un mauvais pronostic (Shirahata et al., 2007), est sécrétée de manière endogène *in vitro* et *in vivo* dans les tumeurs. Elle y favorise la dispersion des CSG

dans des modèles de migration et de cicatrisation, sans affecter la prolifération. De même, une fois greffées dans le cerveau de souris, l'infiltration des cellules peut être inhibée par le KO de la TNC par shRNA (Hirata et al., 2009). Bien que les métalloprotéinases matricielles de types 2 et 9 (MMP2 et MMP9) soient régulièrement associées au mauvais pronostic des GBM, il semblerait que ce soit ici la collaboration de MMP12 et d'ADAM9 avec la TNC qui augmente l'agressivité et la migration des CSG *in vitro* et *in vivo* (Sarkar et al., 2006, 2015).

Une des interrogations récurrentes dans la culture de cellules souches est son mode d'expansion. Doit-on les cultiver sous forme de sphères fabricant leur propre matrice ou alors faut-il les faire pousser sur un substrat bidimensionnel ? Depuis quelques années se développent également des modes de culture utilisant des gels à base de collagène, de gélatine, de poly-éthylène-glycol ou de membranes de polystyrène microporeux redonnant aux cellules une architecture 3D pour se développer (Fernandez-Fuente et al., 2014; Pedron et al., 2013; Lee et al., 2006). Néanmoins les techniques originelles de neurosphères ou de culture 2D, les plus populaires, permettent de maintenir les CSG en leur donnant différents messages du microenvironnement qui favorisent la prolifération et l'autorenouvellement.

L'expansion de cellules souches sur substrat bidimensionnel utilise un protocole assez standardisé composé de poly-L-ornithine (ou de poly-L-lysine) et de laminine (ou de laminine seule). Les polymères d'ornithine et de lysine permettent de donner une base moléculaire architecturée complexe et d'augmenter les capacités d'adhésion des cellules qui prolifèrent en milieu sans sérum (Ge et al., 2015; Pollard et al., 2009; Sun et al., 2008). En revanche, la laminine, un élément prépondérant de la lame basale des vaisseaux sanguins dans les niches cérébrales (cf. paragraphe 2.3.3), est essentielle à la survie des cellules souches. De manière intéressante, la laminine soluble peut également être ajoutée aux cultures de neurosphères / gliomasphères pour augmenter la viabilité et la prolifération des cellules souches (Hall et al., 2008).

Il serait légitime de s'attendre à une différence de comportement ou de phénotype entre des CSG cultivées en conditions adhérentes et flottantes puisque l'accès à la matrice extracellulaire n'est pas le même. C'est ce que prône l'équipe de Peter Dirks, démontrant une plus grande homogénéité cellulaire dans les modes de cultures utilisant un substrat de poly-L-ornithine + laminine. Les cellules expriment systématiquement les marqueurs de cellules souches : nestine, Sox2, vimentine et CD44, mais entrent moins en apoptose (2,7 % en 2D et 6,5 % en sphères). De même, une proportion plus faible de cellules exprime des marqueurs de différenciation neurale (GFAP, Tuj-1 et O4) comparativement aux populations croissant

en sphères, plus hétérogènes (Pollard et al., 2009). Pourtant, une étude très récente a démontré que les deux techniques présentent des résultats exactement similaires dans l'analyse de l'apoptose, la fréquence de clonogénicité, l'index de prolifération ou l'expression de marqueurs différenciant GFAP et Tuj-1 (Rahman et al., 2015). Les deux techniques ont donc leurs avantages et leurs inconvénients et permettent de maintenir des CSG, tout en sachant que les techniques de culture cellulaire ne reproduisent pas les phénomènes *in vivo*, mais tentent de s'en approcher.

3.6 Traitements des glioblastomes et thérapies anti CSG

3.6.1 Traitements classiques du glioblastome

Le traitement de première ligne du GBM est standardisé. Il fait intervenir trois approches différentes. Dénommé protocole de Stupp (Stupp et al., 2005), il consiste premièrement en une exérèse la plus large possible du tissu tumoral par chirurgie. Ce geste est de plus en plus assisté ou préparé par des techniques d'imagerie (IRM, neuronavigation¹²...) permettant d'augmenter la précision de l'intervention. S'ensuivent un traitement par radiothérapie conformationnelle de 60 Gray maximum, débuté dans les 4 à 6 semaines post-chirurgicales et d'une chimiothérapie concomitante au témozolomide. Une thérapie adjuvante de témozolomide débute 4 semaines plus tard, par cycles de 28 jours (Stupp et al., 2009). Cette procédure améliore de 3 mois la survie des patients mais ne prévient pas la récurrence généralement systématique. Néanmoins, en cas de GBM récidivant, des agents alkylants (témozolomide, nitroso-urées, dérivés de platine...), ou l'anticorps humanisé anti-VEGF (le bevacizumab) peuvent être administrés (Vredenburgh et al., 2007). Cet anticorps monoclonal est l'actuel traitement de seconde ligne du GBM non répondeur ou récidivant, permettant de capturer le VEGF-A et d'inhiber l'angiogenèse tumorale. Le VEGF-A se fixe normalement au VEGFR-2 avec son corécepteur neuropiline-1 sur les cellules endothéliales, mais aussi sur les cellules tumorales (Soker et al., 1998). Les thérapies conventionnelles administrées à des patients récidivants donnent elles aussi des résultats mitigés puisqu'elles n'améliorent que très modestement la survie.

¹² La neuronavigation a été rendue possible durant la dernière quinzaine d'années par les progrès technologiques en imagerie et informatique. Une reproduction 3D du cerveau du patient est générée par IRM ou scanner (Di Donato et al., 2000).

3.6.2 Résistance des CSG aux traitements

Le GBM est trop hétérogène pour répondre convenablement aux thérapies classiques. La population des CSG, au sommet de la hiérarchie cellulaire des GBM, semble être largement en cause dans la résistance des traitements classiques et dans la récurrence.

Leur physiologie très différente des autres cellules tumorales leur permet de détoxifier leur cytoplasme, réparer l'ADN ou de rester en dormance (Beier et al., 2011). Après exérèse chirurgicale, des CSG ayant infiltré le parenchyme cérébral sain régénèrent une nouvelle tumeur hétérogène (**figure 21**).

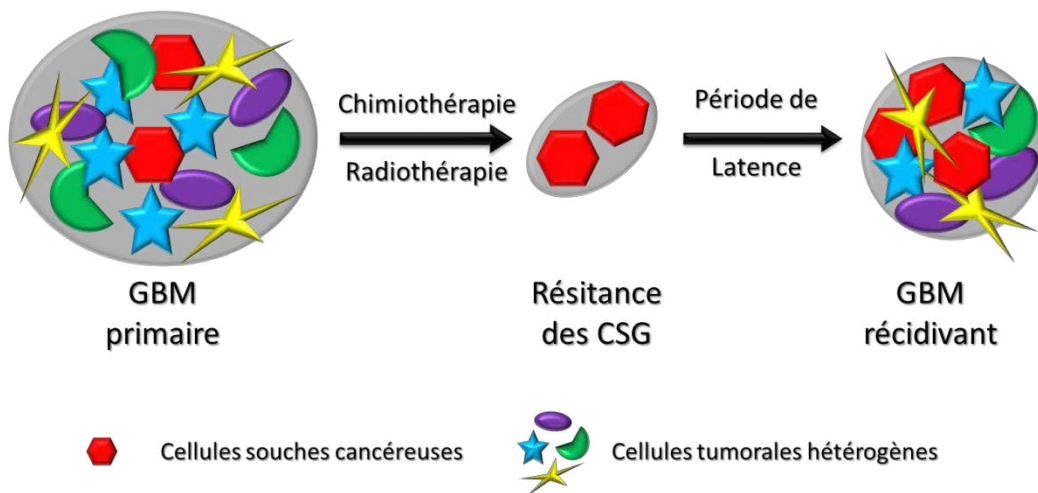


Figure 21 : Représentation de la résistance des CSG aux traitements. Les traitements conventionnels (Radio-chimiothérapies) n'éliminent pas les CSG résistantes qui régénèrent une tumeur hétérogène récidivante.

Tout d'abord, il a été démontré que le traitement par chimiothérapie au TMZ entraîne une conversion des cellules de glioblastome en CSG, avec une expression croissante des marqueurs souches CD133, Sox2, OCT4 et nestine (Auffinger et al., 2014). Ce groupement de nouvelles CSG vient nourrir la population de CSG positive pour CD133 déjà présente ayant résisté au traitement. Ces dernières, dont une partie peut être identifiée comme « side population » (cf. paragraphe 3.4.1.2) par leur capacité à rejeter le Hoechst 33342, utilise le mécanisme des canaux multi drug resistance (MDR, transports à cassette ABC-G2) afin d'expulser les molécules de chimiothérapie hors de leur cytoplasme (Qiu et al., 2014; Salmaggi et al., 2006).

De manière intéressante, l'expression normale des gènes maintenant l'état souche des cellules tels que BMI1 ou encore Notch, augmentent la résistance aux traitements en agissant respectivement sur le recrutement de protéines de réparation des cassures double-brins de l'ADN (Schonberg et al., 2014; Facchino et al., 2010), ainsi qu'en promouvant l'activité de PI3K/AKT (Schonberg et al., 2014; Wang et al., 2010). Une autre raison de l'échec des rayonnements ionisants réside dans la forte activation par les CSG des protéines de la famille PARP (Poly-ADP-Ribose Polymérase), impliquées dans l'adressage des enzymes de réparation monocaténaire de l'ADN.

Les CSG sur-expriment également les gènes anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-XL...) face aux chimiothérapies ainsi que des gènes impliqués dans la réparation des dommages causés à l'ADN par radiothérapie comme : la MGMT ou les Checkpoint Kinase 1 et 2 (Lathia et al., 2015; Liu et al., 2006; Bao et al., 2006). L'équipe de Jérémie Rich a également incriminé la protéine d'adhésion cellulaire L1CAM qui est un corécepteur de neuropiline-1, marqueur pronostic des GBM (Osada et al., 2004). La partie intracellulaire L1-ICD est adressée au noyau en cas de dommages à l'ADN et vient réguler l'activité des Checkpoint Kinases (Cheng et al., 2011), promouvant alors la survie des cellules.

Les mécanismes de résistance décrits ici font l'objet de nombreuses recherches pour le développement de thérapies. Le but est de faire de cette force de résistance des CSG, leur faiblesse en ciblant les mécanismes et les protéines effectrices pour finalement tacler plus efficacement le sommet de la hiérarchie cellulaire des GBM.

3.6.3 Thérapies ciblées contre les CSG

Il s'agit ici d'une des alternatives de thérapies les plus excitantes de la dernière décennie. La mise au point de composés ciblés vise certaines protéines surexprimées dans les sous populations des cancers. Les regards se tournent particulièrement vers les CSG, en les ciblant directement, ou alors indirectement via leur microenvironnement. Le ciblage direct touche généralement les voies de signalisation tumorale impliquées dans la prolifération, l'apoptose, la migration et la différenciation. Le ciblage indirect se tourne plutôt vers la matrice extracellulaire des niches des CSG, les facteurs hypoxiques ou encore les relations entretenues avec les cellules vasculaires (Binello and Germano, 2011). Même si d'autres types cellulaires sains expriment ces cibles potentielles, l'expression plus faible (comparativement à un tissu tumoral anarchique) les préserve davantage des effets secondaires dans le cas des chimiothérapies aux effets toxiques très étendus.

Malheureusement, assez peu de thérapies ciblées existent spécifiquement contre les CSG sans qu'elles n'impactent également les SCN ou d'autres cellules normales (Diehn et al., 2009). Plusieurs cibles potentielles ont été identifiées sur la base des mécanismes de résistance, mais peu d'entre elles connaissent de véritables inhibiteurs (Kalkan, 2015).

Des stratégies ciblées sur la γ -sécrétase impliquée dans la voie de Notch, ont récemment permis de diminuer la tumorigenèse des CSG positives à CD133/nestine/BMI1 *in vivo* et la formation de gliomasphères *in vitro* (Fan et al., 2010; Wang et al., 2010). Plusieurs inhibiteurs en essais cliniques agissant sur STAT3, particulièrement importante dans le maintien des cellules souches tumorales, diminuent leur prolifération et augmentent leur apoptose, marquée par l'apparition de PARP clivée (Mukthavaram et al., 2015; Sherry et al., 2009). Par contre, l'activité de STAT3 demeure vitale au maintien des autres cellules souches normales et dans la réponse immunitaire de l'organisme, son ciblage en devient d'autant plus délicat (Levy and Lee, 2002). Un autre essai clinique sur le veliparib (ABT-888), un inhibiteur des PARP ¹³ a prouvé son efficacité dans les cellules de GBM en général (ce qui inclut non spécifiquement des CSG) lorsqu'il est donné en combinaison de traitements, en augmentant la sensibilité aux radio-chimiothérapies et indépendamment du statut d'expression de la MGMT et de la méthylation de son promoteur (Venere et al., 2014; Barazzuol et al., 2013; Palma et al., 2008). D'autres molécules, ciblant la voie sonic hedgehog sont régulièrement emmenées en tests cliniques et montrent divers effets sur la prolifération, la formation de sphères, l'autorenouvellement ou la croissance des tumeurs (Rimkus et al., 2016). Parmi elles, citons l'Erismodegib® (ou Sonidegib®/Odomzo®), un inhibiteur de Smoothed (SMO) ayant une activité spécifique contre les CSG (décrites dans ce cas précis comme inhibiteur des cellules initiatrices de tumeur). La drogue montre un panel impressionnant d'activités contre les CSG *in vitro*, diminuant la formation de sphères, la viabilité des cellules et atteignant la fin de la voie de transduction de SHH en abaissant l'activité transcriptionnelle de GLI. Parmi les autres effets toxiques pour les CSG, l'Erismodegib® active la voie des caspases qui mène les cellules à l'apoptose. Finalement, cette molécule inhibitrice se montre également capable d'aller frapper directement à la source du maintien de la pluripotence des CSG en inhibant les facteurs de transcription Nanog, OCT4, Sox2 ou encore c-Myc (Fu et al., 2013).

¹³ PARP: poly-ADP-ribose polymerase. Cette enzyme catalyse le transfert de polymères d'ADP-ribose permettant à de nombreuses protéines de réparation de l'ADN monocaténaire d'agir (Venere et al., 2014).

De manière surprenante, il semblerait que certaines drogues ayant déjà l'autorisation de mise sur le marché pour d'autres indications puissent avoir un effet insoupçonné sur les CSG. Par exemple, la prazosine, un anti-adrénergique indiqué dans l'hypertension inhibe sélectivement les cellules initiatrices de GBM et leur descendance différenciée en agissant sur AKT (Assad Kahn et al., 2016). De même, le screening de la banque de drogues Prestwick a permis de mettre en avant le bisacodyl (un agent laxatif indiqué dans les constipations passagères). Cette pro-drogue rapidement métabolisée génère un métabolite actif, le DDPM¹⁴ qui semblerait cibler sélectivement la sous-population quiescente des CSG, normalement très résistante aux traitements (Zeniou et al., 2015). L'effet a pour le moment été démontré par un test *in vitro* de dosage d'ATP sur une lignée de CSG (lignée TG1) caractérisée comme étant quiescentes. Selon les auteurs, le bisacodyl distribué dans le milieu de culture n'agit, via sa forme désacétylée que sur les formes quiescentes de GSC et pas ou très peu sur les cellules en prolifération.

Par ailleurs, le resvératrol, un antioxydant naturel retrouvé notamment dans le vin rouge participerait à bloquer la croissance des CSG sans atteindre les CSN (Sayd et al., 2014). L'effet décrit est double, diminuant la prolifération des CSG d'une part et induisant la nécrose cellulaire à forte dose. L'effet observé sur la prolifération passe en fait par la sirtuine 2 (SIRT2)¹⁵, spécifiquement exprimée par les CSG et dont le resvératrol est un activateur. De manière intéressante, le resvératrol apparaît également comme inhibiteur de la voie des STAT3, normalement régulatrice du maintien des cellules souches (Yang et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs greffent des CSG CD133+ dans le cerveau de souris qui subissent des séances de radiothérapie. Il a été observé que le resvératrol injecté durant ces séances augmente la sensibilité des CSG aux rayonnements ionisants et augmente la survie des animaux.

Une approche thérapeutique astucieuse fut initiée en 2010, avec la différenciation forcée des CSG en les mettant en présence d'acide rétinoïque. Le but était de faire sortir les CSG de leur statut souche, en les dirigeant vers la voie de différenciation neuronale (Campos et al., 2010). Pour aller plus loin, une petite molécule (CG500354) fut développée 4 ans plus tard, ayant pour effet *in vitro* et *in vivo* de différencier les cellules CD133+ en plus d'agir directement et indirectement sur les gènes suppresseurs de tumeur comme : P53, P27, P21

¹⁴ DDPM : 4,4'-dihydroxydiphenyl-2-pyridyl-méthane : Métabolite actif obtenu après lyse du bisacodyl, également connu sous le nom de BHPM.

¹⁵ Les sirtuines font partie de la famille des histones désacétylases de classe III dépendantes du cofacteur NAD+. Elles sont impliquées dans la régulation épigénétique de gènes du métabolisme cellulaire.

et cAMP/CREB, bloquant alors la croissance tumorale (Kang et al., 2014). Par exemple, un des effets montré est une sur-activation de p53. Elle impacte le cycle cellulaire négativement en atteignant les cyclines et kinases associées, ce qui bloque les CSG en phase G0/G1. En agissant sur l'augmentation d'AMP cyclique entre autres, la molécule CG500354 est également capable de baisser le nombre de CSG positives pour nestine et d'induire la différenciation en cellules exprimant Tuj1 et GFAP dans un modèle de greffe sous cutanée de CSG dans des souris NOD/SCID. Néanmoins, les auteurs ne rapportent pas de diminution de la taille de la tumeur ou d'augmentation de la survie des souris.

La difficulté de cibler directement les CSG a donné une opportunité au développement des immunothérapies les visant. Ainsi un très grand nombre de molécules et d'anticorps ont été mis au point afin de stimuler le système immunitaire contre les cellules souches tumorales. Très souvent ces thérapies sont données en combinaison de traitement avec les chimiothérapies déjà disponibles (Esparza et al., 2015) ou en seconde ligne en cas d'échec des traitements de référence ou encore lors de récives.

Lorsque les cellules tumorales sont en souffrance hypoxique, elles activent HIF1 dont la voie de signalisation favorise la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme les protéines de la famille du VEGF, SDF-1 ou CXCR4. Les cellules endothéliales environnantes présentes dans les niches vasculaires dans lesquelles siègent les CSG vont alors réagir en formant des cellules leader, dites « tip cell » et enclencher une nouvelle vague d'angiogenèse (Hardee and Zagzag, 2012b). La tumeur elle-même va mettre en œuvre ses propres moyens de formation de vaisseaux sanguins parmi lesquels le phénomène de transdifférenciation des CSG (cf. paragraphe 3.4.1.3).

3.6.4 Le cas particulier des peptides inhibiteurs transmembranaires

Jusqu'à présent, parmi toutes les thérapies ciblant les récepteurs membranaires, aucune ne s'est jamais intéressée à viser le domaine transmembranaire reconnu surtout pour ses propriétés d'ancrage dans la bicouche lipidique (Nakamura et al., 1998). Ce domaine trop souvent négligé a pourtant un rôle prépondérant dans la dimérisation et l'activation fonctionnelle de nombreux récepteurs.

Le laboratoire d'accueil développe justement depuis une quinzaine d'années des peptides hydrophobes (MTP) longs d'environ 25 à 30 acides-aminés. Ils miment le domaine transmembranaire de récepteurs et de corécepteurs de la plateforme de signalisation de neuropiline-1. Parmi eux, nous développons entre autres des peptides inhibiteurs de

neuropiline-1 lui-même (MTP-NRP1) et de plexine-A1 (MTP-PlexA1). Ils font tous deux l'objet, pour ce travail de thèse, d'une étude focalisée pour leur impact sur les CSG.

3.6.4.1 Cibler le récepteur neuropiline-1

Le récepteur neuropiline-1 (NRP1) est une protéine transmembranaire, corécepteur de nombreux autres partenaires. Initialement, il a été décrit comme ayant un rôle dans le développement du système nerveux en guidant la croissance axonale et la migration des neurones (Bagri and Tessier-Lavigne, 2002; He and Tessier-Lavigne, 1997), puis identifié comme clef de voûte du contrôle des « tip cell » lors de l'angiogenèse (Hong et al., 2007). NRP1 fonctionne sous la forme de complexes de récepteurs, notamment avec des représentants de la famille des plexines (parmi lesquels : Plexine-A1), en réponse à la fixation des sémaphorines ou du VEGF (**figure 22**). NRP1 est partenaire de nombreux autres récepteurs tels que : L1-CAM, TGF- β Rs, c-MET, PDGFR- α , FGFR-1, intégrine α 5 β 1 ou encore de l'oncogène EGFR (Rizzolio et al., 2012; Ball et al., 2010; Glinka and Prud'homme, 2008; Sulpice et al., 2008; West et al., 2005; Castellani et al., 2000; Soker et al., 1998). NRP1 peut également se lier aux VEGFRs en réponse aux isoformes des VEGFs (**figure 22**) (Soker et al., 1998). L'absence de domaine de transduction dans la partie intracellulaire empêche NRP1 de transmettre seul, un signal. C'est pourquoi il nécessite l'oligomérisation avec ses partenaires, contenant tous des domaines d'activation des voies de signalisation jouant sur la prolifération, la migration, l'angiogenèse ou sur la dynamique du cytosquelette.

Dans les glioblastomes, la surexpression fréquente des facteurs de croissance cités ci-dessus, couplée à celle de NRP1, a pour effet d'hyper-activer les voies PI3K et MAPK, favorisant la prolifération et la résistance de ces tumeurs (Law and Lee, 2012).

D'autres modèles montrent l'importance de cibler le complexe formé par NRP1 comme par exemple dans la lignée humaine de médulloblastome DEV. Il s'agit de cellules tumorales neuroectodermiques, mais qui sont également utilisées comme modèle de cellules neurales progénitrices pluripotentes (Giraudon et al., 1993). C'est justement dans ce modèle cellulaire qu'a été démontré que la Sema3A et le VEGF agissent tous deux de manière antagoniste sur le complexe NRP1/VEGFR1 (Bagnard et al., 2001). En effet, la Sema3A ajoutée dans du milieu de culture génère un signal répulsif sur des cellules DEV, quantifié en vidéomicroscopie par le nombre de collapsus induits. Si la présence de Sema3A est maintenue dans le temps, ce mécanisme peut se transformer en signal pro-apoptotique,

puisque le ratio de cellules DEV identifiées en apoptose par cytométrie en flux augmente jusqu'à atteindre pratiquement 100 %. NRP1 a été formellement identifié comme responsable, puisque son blocage par anticorps permet de restaurer l'effet. De même, l'ajout de VEGF permet d'annuler de façon dose-dépendante l'induction de l'apoptose générée par la Sema3A. D'ailleurs, l'ajout de VEGF seul dans le milieu de culture de cellules DEV a un fort rôle trophique, puisque la prolifération ainsi que la migration des cellules s'en voient significativement augmentées. Le couple de récepteurs NRP1/VEGFR1 joue donc ici sur plusieurs tableaux. Lorsqu'ils lient la Sema3A seule, ils induisent la répulsion via l'activation intracellulaire de ERK1/2, ou l'apoptose en mettant en œuvre la voie des MAPK et l'activation de p38 lorsqu'ils lient la Sema3A seule (Bagnard et al., 2004). Ce phénomène est inhibé en présence simultanée de VEGF et peut aller jusqu'à s'inverser, en promouvant la prolifération et la migration attractive en liant le VEGF seul.

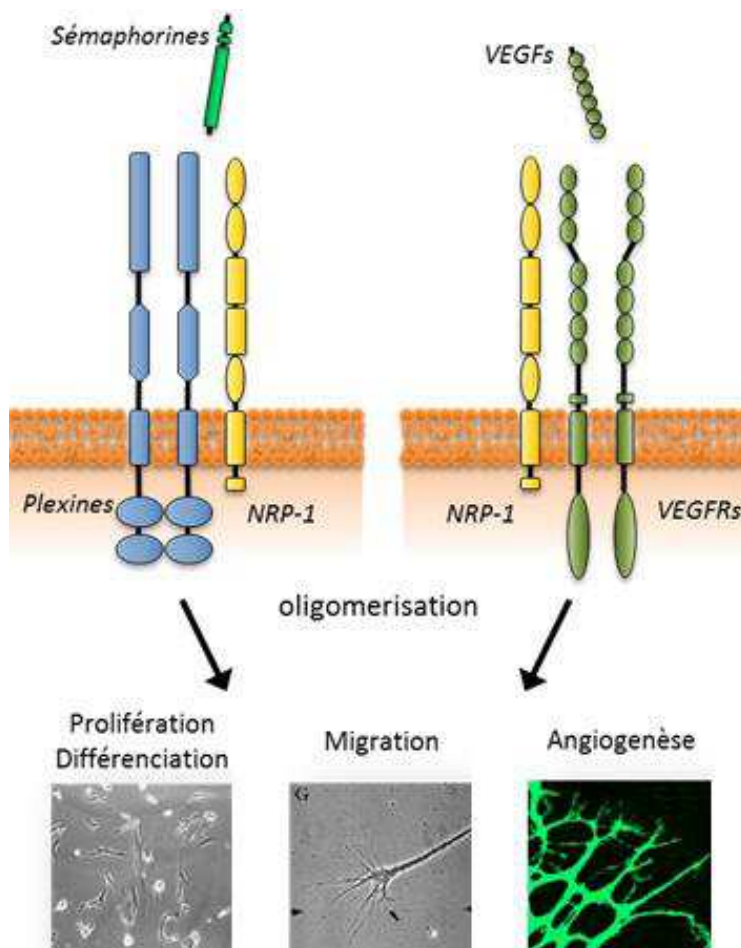


Figure 22: Plateformes de signalisation des récepteurs neuropiline-1 (NRP1), plexines et VEGFRs avec leurs fonctions associées.

Les sémaphorines et les VEGFs permettent d'activer les plateformes NRP1/Plexines et NRP1/VEGFRs, respectivement. Les plexines et VEGFRs permettent de transmettre le message intracellulaire et influent sur la prolifération, la différenciation, la migration et l'angiogenèse.

En fait, NRP1 est à la croisée de nombreux chemins menant à l'entretien et la promotion des tumeurs. S'il est largement accepté que le VEGF est un facteur clef de l'angiogenèse tumorale en agissant sur les vaisseaux sanguins (Jain et al., 2007), son effet s'avère aussi dramatique sur la propagation des CSG. Le laboratoire de Jérémie Rich a par exemple montré que les CSG positives pour CD133 sont capables de sécréter du VEGF de manière autocrine afin d'alimenter leur complexe VEGFR2-NRP1 pour promouvoir leur propre survie (Hamerlik et al., 2012a).

La dimérisation de NRP1 avec ses partenaires s'effectue grâce à ses domaines extracellulaires MAM (Nakamura et al., 1998) et CUB d'une part et via le domaine transmembranaire (TMD) (Aci-Sèche et al., 2014; Roth et al., 2008), d'autre part. La contribution du TMD repose sur la présence d'un motif d'acides aminés composé d'au moins deux glycines espacées de 3 acides aminés aléatoires : appelé motif GxxxG (**figure 23**). Ce type de motif GAS (Hubert et al., 2010) qui permet aux récepteurs d'entrer en contact les uns avec les autres existe sous la forme d'un double motif GxxxGxxxG pour NRP1 (Roth et al., 2008). Cette étude menée dans notre laboratoire avait alors démontré que le peptide synthétique mimant l'intégralité du segment transmembranaire, MTP-NRP1, est capable de rompre la dimérisation et d'inhiber les fonctions biologiques de NRP1. MTP-NRP1 mime la séquence native transmembranaire du récepteur et une fois inséré dans la membrane cytoplasmique, il entre en compétition avec les interactions réalisées par les autres corécepteurs. Le potentiel anti-tumoral de ce peptide vient également d'être démontré dans le contexte des tumeurs du sein métastatiques (Arpel et al., 2016).

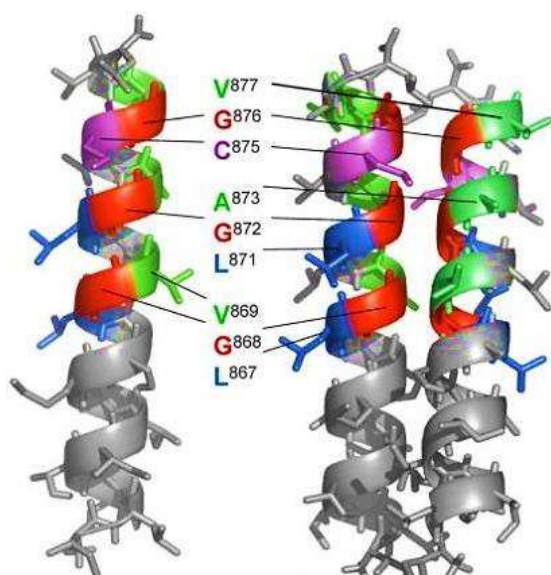


Figure 23 : Représentation de la structure en hélice du domaine transmembranaire (TMD) de NRP1.

A gauche : présentation en hélice de l'interface de dimérisation de la séquence du TMD entre les acides aminés Ile859 et Y880. Les 3 glycines (G) sont annotées en rouge gras, espacées de 3 acides aminés. A droite : structure possible d'un homo-dimère de TMD de NRP1, aligné par leurs interactions entre les résidus glycines. Roth L. et al., Molecular Biology of the Cell, 2008.

De manière intéressante les travaux menés au laboratoire ont démontré que MTP-NRP1 est efficace dans le glioblastome en présentant des effets anti-angiogéniques, anti-prolifératifs et anti-migratoires *in vitro* et *in vivo*. Son action se traduit par la baisse du marquage des vaisseaux sanguins (CD31, isolectin-B4 et CD34) dans la masse tumorale et la réduction du volume tumoral de cellules de GBM humaines U373 et murine C6 (Nasarre et al., 2010). Cet effet anti-tumoral a également été validé dans notre laboratoire sur des modèles de tumeurs du sein métastatiques (Arpel et al., 2014). De nombreux travaux sur la synthèse, l'optimisation, la biodistribution, l'efficacité de MTP-NRP1 en association avec d'autres médicaments sont actuellement en cours dans le cadre d'un partenariat industriel avec la société Peptimimesis Pharma ¹⁶ qui a pour mission le développement clinique de ce composé.

3.6.4.2 Cibler les récepteurs Plexines

Les plexines (Plex) sont réparties en 4 groupes (A à D) et permettent de transduire un signal intracellulaire suite à l'interaction avec une sémaphorine. Les plexines font partie des nombreux partenaires de NRP1 avec lequel il s'associe en cas de fixation des sémaphorines de classe 3 (Tamagnone et al., 1999). Dans ce tandem, NRP1 sert à lier les sémaphorines, tandis que le récepteur plexine transduit le signal (Püschel, 2002). Le couple de récepteurs NRP1/Plexine-A1 est initialement décrit dans la neurogenèse et le guidage axonal en réponse à la sémaphorine 3A (Rohm et al., 2000), puis identifié comme responsable de processus de prolifération et de survie (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). PlexineA1 peut jouer sur plusieurs voies intracellulaires comme les RhoGTPases régulant la polymérisation du cytosquelette d'actine, les CRMPs qui influencent la polymérisation des microtubules, ou encore R-Ras et PI3K/AKT.

Il faut noter que les plexines ont la capacité de s'hétéro- et de s'homodimériser. PlexB1 et PlexA1 dimérisent via leur partie cytoplasmique pour transmettre un signal indépendamment de NRP1 (Usui et al., 2003). Deux exemplaires de PlexA2 peuvent s'associer en liant un dimère de Sema6A, tout comme les plexines de classe A qui peuvent dimériser puis se lier à NRP1 (Janssen et al., 2012).

¹⁶ La société Peptimimesis Pharma a été fondée en 2015 par Dominique Bagnard, Gérard Crémel et Pierre Hubert, à partir des travaux historiques sur les modèles d'inhibition de dimérisation de NRP1 via son TMD

Dans la progression des cancers, le rôle des plexines et des sémaphorines est assez ambigu, car certains travaux utilisent les sémaphorines comme traitements, tandis que d'autres les utilisent comme cibles (Meyer et al, en révision, **annexe 2**; Mishra et al., 2015). Dans un modèle de cellules de GBM U87MG, PlexA4 est par exemple responsable de la progression tumorale et de l'activation angiogénique. Cette action passe par le recrutement des récepteurs à tyrosine kinase VEGFR-2 et FGFR-1 fortement impliqués dans la prolifération (Kigel et al., 2011). Les auteurs ont d'ailleurs montré que la plexine A4 était ici activée par la sécrétion autocrine de Sema6B. Une autre étude incrimine également PlexB2 dans des lignées de gliome de haut grade, où son expression est même corrélée à la survie des patients. En interagissant avec la famille des Sema de classe 4 et en particulier ici la Sema4C, PlexB2 augmente l'activité des GTPases RhoA et Rac1 qui induisent une forte mobilité cellulaire et promeuvent l'infiltration et la migration *in vivo* (Le et al., 2015). L'inhibition de cette plexine par shRNA permet de diminuer tous les facteurs d'agressivité ainsi que la vascularisation tumorale dans les greffes sur des souris. Cela démontre bien l'intérêt thérapeutique que peut avoir l'inhibition de ces plateformes de signalisation.

En s'intéressant de plus près aux sémaphorines de classe 3, on se rend compte qu'elles sont souvent impliquées dans la biologie des glioblastomes, en partenariat avec ses récepteurs : les plexines et les neuropilines (Rieger et al., 2003). Néanmoins, les études sont assez rares dans ce domaine relativement peu exploré. Par exemple, la Sema3A, fortement sécrétée de manière autocrine dans les GBM est connue pour augmenter la progression tumorale et promouvoir la dispersion des cellules dans le parenchyme cérébral (Bagci et al., 2009). Par contre son inhibition par stratégie de shRNA permet de diminuer l'effet délétère en impactant Rac-1 et la plasticité du cytosquelette d'actine. De manière contradictoire, l'équipe de G. Neufeld a démontré que les sémaphorines de classes 3, hormis la C et la F, mais incluant bien la Sema3A, étaient particulièrement indiquées pour inhiber le développement de GBM dans des modèles de greffe intracérébrale. En effet, en faisant sur-exprimer ces molécules par les cellules tumorales elles-mêmes, la prolifération ainsi que l'angiogenèse étaient significativement diminuées (Sabag et al., 2012). Des travaux du laboratoire effectués sur une lignée de GBM (lignée C6 de rat) montre un effet de répulsion induite par la Sema3A. Néanmoins l'effet de Sema3A lié à PlexA1 est versatile et bivalent. En effet, en se liant au dimère NRP1/plexine-A1, elle induit la répulsion des cellules, si bien que l'inhibition sélective de NRP1 ou de PlexA1 inverse l'effet répulsif en effet attractif. De manière surprenante, le blocage de NRP2 interdit la conversion répulsif/attractif, suggérant que ce mécanisme d'attraction soit finalement dépendant de NRP2 (Nasarre et al., 2009).

Il faut par contre se rendre à l'évidence que de très rares études existent concernant l'impact des plexines et de leurs ligands sur la biologie des cellules souches de glioblastome. L'équipe de Jennifer Yu a tout de même publié des travaux brillants démontrant que la Sema3C promouvait directement la survie et l'autorenouvellement des CSG via l'activation des PlexineA2/D1 qui stimulent Rac-1, puis NF- κ B (Man et al., 2014). De plus, cet effet intéressant d'inhibition de Sema3C sur les CSG n'impacte pas la physiologie des CSN. Cela laisse de belles perspectives pour les thérapies anti Sema/plexine ciblant les CSG, sans faire visiblement de dégâts collatéraux sur les CSN.

C'est dans cette ligne de travaux que nous avons poursuivi notre analyse du rôle fonctionnel de PlexA1 dans le GBM. Nos résultats publiés dans la revue *Oncotarget* (Jacob et al., 2016) montrent que PlexA1 est un marqueur pronostique des patients GBM et possède une activité pro-angiogénique spécifique des tumeurs. Nous avons également mis au point un peptide inhibiteur de PlexA1 (MTP-PlexA1) agissant selon le même mécanisme que MTP-NRP1. Comme nous le verrons dans la partie des résultats, j'ai pour ma part démontré l'action inhibitrice de ce peptide sur les CSG dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. Ces travaux translationnels s'inscrivent dans la tendance actuelle très marquée pour le développement de nouveaux médicaments ciblant la plateforme semaphorine / neuropiline / plexine, comme nous le décrivons en détails dans l'article de revue ajouté en **annexe 2** du manuscrit (Meyer et al., en révision).

L'ensemble des connaissances sur les CSG montre qu'il est important d'identifier leur véritable nature masquée par leur capacité de camouflage en d'autres types cellulaires. En effet, comme nous venons de le voir, les cellules expriment selon leur état de différenciation leurs propres marqueurs. Selon leur nature, la capacité à former des tumeurs ainsi que la sensibilité aux thérapies ciblées, sont modifiées. Dans ce contexte, il semble important de pouvoir prendre en compte l'état de différenciation des CSG afin d'augmenter, à terme l'efficacité des traitements.

4. Transductions virales et technologies de suivi des cellules souches par fluorescence

La compréhension de la biologie des CSN et des CSG passe depuis une dizaine d'années de plus en plus par la transduction de systèmes rapporteurs fluorescents

révélateurs du statut de la cellule, de sa prolifération, du suivi de son lignage cellulaire ou encore de sa capacité de différenciation. Les techniques permettant de modifier les cellules sont très nombreuses *in vitro* et *in vivo*. L'efficacité et la pérennité des transductions dépendent fortement des méthodes employées telles que les transfections et les infections virales, dont chacune présente des avantages et des inconvénients.

4.1 Transduction de matériel génétique dans les cellules souches

4.1.1 Transfection d'ADN plasmidique

Cette technique d'insertion de matériel génétique est la technique de base requise pour être soit appliquée en tant que telle, ou pour générer par la suite des virus. Elle permet par un protocole relativement rapide d'insérer de grandes séquences d'ADN, allant jusqu'à 20 kB (Lodish et al., 2000). Cela ne tient pas compte des très grandes constructions d'ADN empaquetés dans des chromosomes artificiels (YAC, BAC, MAC et HAC), qui ne seront pas développés ici (Kang and Hébert, 2012; Kazuki and Oshimura, 2011; Lindenbaum et al., 2004; Lamb and Gearhart, 1995). Néanmoins, la transfection présente un désavantage majeur : l'efficacité d'insertion de matériel génétique est plus faible que dans les techniques virales.

Quel que soit le protocole, le principe demeure le même : insérer de l'ADN (ou de l'ARNm) simple ou double brin, linéaire ou circulaire dans le cytoplasme ou directement dans le noyau des cellules ciblées. Pour ce faire, il existe des méthodes dites physiques ou chimiques (Nowakowski et al., 2013).

a. Les méthodes physiques

Elles impliquent une action mécanique sur les membranes plasmiques des cellules. Les techniques d'électroporation et de nucléofection reposent sur le même principe d'application de champs électriques de forte intensité dans un tampon salin adapté à chaque type cellulaire, déstabilisant les bicouches lipidiques et créant des micropores par lesquels peuvent pénétrer les plasmides (Gehl, 2003). La nucléofection permettrait d'après plusieurs études de faciliter l'adressage direct de matériel génétique dans le noyau pour des cellules particulièrement difficiles à transfecter. Par exemple, dans le but d'utiliser des cellules souches mésenchymateuses (CSM) à des fins thérapeutiques dans les gliomes, Park et

collaborateurs ont inséré un plasmide de surexpression de CXCR4 (impliqué dans le tropisme des cellules souches) par nucléofection avec plus 80 % d'efficacité (Park et al., 2011). Une technique alternative, la microporation est semblable dans le principe, mais se fait à plus petite échelle, avec une pointe de pipette conductrice d'électricité, au lieu de la cuvette métallique d'usage en électroporation. Les auteurs rapportent des résultats de transfection encore supérieurs sur des cellules souches mésenchymateuses (Lim et al., 2010).

Deux autres techniques non électriques existent. La microinjection consiste à insérer de l'ADN directement dans une cellule individuelle à l'aide d'une aiguille fine (200 nm à 1 µm de diamètre). Cette technique contrôlée par de la microscopie à force atomique a été validée sur des CSM et des HEK293 (Han et al., 2008). En recherchant toujours des techniques alternatives, particulièrement pour la thérapie cellulaire, la sonotransfection a été développée. Elle applique les principes de l'électroporation, où le champ électrique est remplacé par un champ ultrasonique ayant pour effet de déstabiliser la membrane et d'endocyter les molécules à sa proximité comme de l'ADN ou des siRNA (Otani et al., 2009).

b. Les méthodes chimiques

La plupart des techniques chimiques de transfection utilisent les propriétés des charges électriques négatives portées par les polymères nucléiques pour les empaqueter et les enfoncer dans la membrane cellulaire. De plus ils présentent l'avantage d'être bon marché et faiblement immunogènes.

La précipitation au phosphate de calcium est probablement une des plus anciennes techniques de transfection. Il existe cependant presque autant de protocoles que d'utilisateurs, avec des efficacités très variées. Les doubles valences des cations calciques précipitent avec l'ADN pour venir entrer en contact avec les cellules adhérentes (Jordan and Wurm, 2004). Plusieurs composés cationiques : des peptides, des complexes lipidiques, des polysaccharides et des polymères ont été développés afin d'offrir un choix plus important de possibilités de transfections (Nowakowski et al., 2013).

Parmi elles, les polymères cationiques sont des molécules extrêmement répandues dans les protocoles de transfection. Leurs charges positives capturent les brins d'acides nucléiques permettant de les délivrer aux cellules. Les polyéthylènimines (PEI) permettent

de libérer très efficacement le matériel génétique une fois endocyté en s'extrayant de la vésicule (**figure 24**). La littérature regorge d'exemples, comme l'insertion de séquence d'ADN dans des CSN et des cellules neurales murines *in vitro*, ce qui n'est pourtant pas aisé et donne des rendements souvent inférieurs à 30 % (Tinsley et al., 2004). Lemkine et collaborateurs ont également réussi à transfecter des CSN et des progéniteurs neuraux par injection stéréotaxique directe de cocktail d'ADN et de PEI (Lemkine et al., 2002).

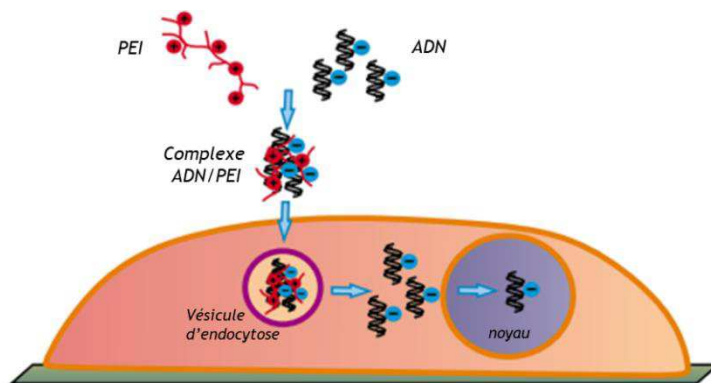


Figure 24 : Schéma de la transfection par des polyéthylènimines (PEI). L'ADN, chargé négativement forme des complexes avec les polymères cationiques de PEI pour pénétrer les membranes cellulaires. L'ADN est libéré dans cellule puis atteint le noyau. Adapté de Nowakowski et al., *Acta Neurobl. Exp.*, 2013.

Comme introduit précédemment, les PEI (comme les autres agents de transfection) sont aussi utilisés pour transfecter transitoirement des cellules afin de produire des virus, servant eux, d'agents de transduction final. Dans ce cas, ce sont généralement des cellules HEK 293T qui sont utilisées et mises en présence de PEI contenant plusieurs plasmides viraux (Chahal et al., 2014; TANG et al., 2015). Ils permettront de produire des virus fonctionnels relâchés dans le milieu de culture et porteurs de la construction génétique d'intérêt.

Malgré toutes les différentes méthodes disponibles, chaque lignée cellulaire a ses propres susceptibilités et caractéristiques. Ainsi pour chaque composé de transfection, l'empirisme reste au cœur de la mise au point des protocoles.

4.1.2 Transduction de cellules souches par vecteurs viraux.

Cette technique se base sur la capacité naturelle des virus à infecter les cellules hôtes, libérer leur matériel génétique pour se reproduire. Leur utilisation comme vecteur a été rendue possible en biologie moléculaire par la neutralisation des séquences codantes

pathogènes ou à forte activité de recombinaison. Pour certains types de virus naturellement très virulents, leur utilisation sous forme de vecteur nécessite de séparer les séquences virales en plusieurs plasmides afin d'éviter les recombinaisons qui les rendraient hors de contrôle. Ces manipulations génétiques ont permis de rendre l'utilisation des vecteurs viraux plutôt sûre, si bien qu'un niveau II de confinement suffit¹⁷. Les vecteurs viraux sont intéressants en particulier pour leur intégration du génome à l'ADN de l'hôte (**figure 25**). L'intégration du matériel génétique lui permet d'être exprimé sur le long terme par une cellule et sa descendance (Nowakowski et al., 2013). Sur ce point, les virus Sendai et les adénovirus sont non intégratifs (**figure 25**), mais très utilisés en thérapie génique (Nakanishi and Otsu, 2012).

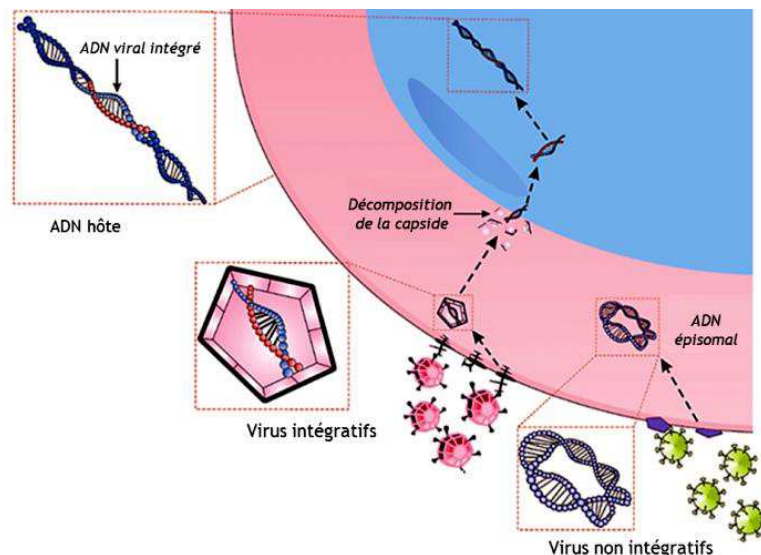


Figure 25 : Schéma du fonctionnement de l'infection par des vecteurs viraux. Les vecteurs viraux sont intégratifs ou non-intégratifs. Après reconnaissance des protéines de surface de la cellule hôte, le virus entre et le contenu de la capside est libéré dans la cellule. Les virus intégratifs adressent leur matériel génétique dans le noyau où il est intégré aléatoirement au génome de l'hôte. Le matériel génétique des virus non-intégratifs reste dans le cytoplasme sous forme épisomale. Adapté de Nowakowski et al., *Acta Neurobiol. Exp.*, 2013.

Parmi les vecteurs viraux intégratifs utilisés, on trouve les rétrovirus, qui comprennent la sous-classe des lentivirus et les virus adéno-associés (AAV, qui ne seront pas développés ici).

¹⁷ Le niveau de confinement L2 ou supérieur est recommandé pour la manipulation de vecteurs viraux de la classe HIV-1, MLV ou SIV... (D'après le cahier de prévention des risques biologiques du CNRS).

Les rétrovirus se composent d'une enveloppe lipidique renfermant une capsidie articulée autour d'un double brin d'ARN viral et d'une transcriptase inverse (**figure 26**). L'ARN libéré dans la cellule est rétro-transcrit en ADN, puis intégré au génome de l'hôte par des intégrases. C'est à la fois un avantage car l'ADN est définitivement inséré, mais aussi un inconvénient puisque cela se fait aléatoirement, créant des mutations potentiellement délétères. L'enveloppe contient des glycoprotéines de fixation aux récepteurs des hôtes, en faisant la clef du tropisme pour les cellules eucaryotes. Par exemple, le HIV-1 reconnaît spécifiquement le récepteur CD4 des cellules immunitaires et ne peut donc qu'infecter ces cellules (Dalglish et al., 1984). Néanmoins, les rétrovirus ne peuvent infecter que les cellules en division quel que soit leur pseudotypage¹⁸. Toutes les cellules neurales post-mitotiques ainsi qu'un grand nombre de cellules souches quiescentes ne peuvent donc pas être infectées (Nowakowski et al., 2013). En revanche, les cellules qui peuvent être infectées le sont très efficacement, mais leur expression sur le long terme demeure labile, due à la méthylation des séquences virales (Challita and Kohn, 1994).

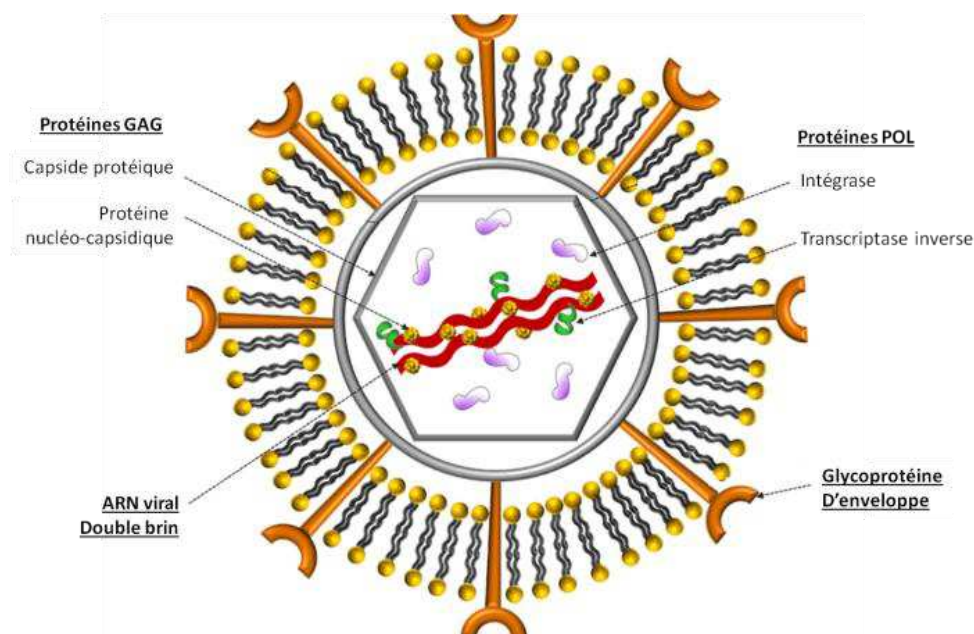


Figure 26 : Représentation schématique de la structure d'un rétrovirus (incluant les lentivirus). La capsidie virale est entourée d'une membrane lipidique. Le matériel génétique est embarqué sous forme d'ARN positif double brin. Le diamètre du virion est compris entre 100 et 200 nm selon la nature du rétrovirus. Adapté de Rodrigues A. et al., *Viral Gene Therapy*, 2011.

¹⁸ Le pseudotypage d'un virus consiste à remplacer ses glycoprotéines de surface par d'autres issues d'autres virus, afin d'augmenter généralement son tropisme (Schambach et al., 2013).

Pour plusieurs de ces raisons, les lentivirus (**figure 26**) ont pris de plus en plus de place dans les protocoles de transduction de matériel génétique. Sa biologie est similaire aux autres rétrovirus, à quelques exceptions près. Il peut non seulement empaqueter environ 1000 paires de bases de plus que les rétrovirus (portant à environ 9 kb l'ARN total) mais également infecter les cellules qui ne sont pas en cours de division (Cai and Mikkelsen, 2016; Canté-Barrett et al., 2016). La taille du génome viral est certes plus élevée que pour les rétrovirus, mais les plus grandes constructions ne peuvent malgré tout pas être prises en charge. En fait, il a été établi que l'efficacité de fabrication des virions ainsi que leur intégration dans les cellules ciblées est en rapport direct avec la taille de l'ARN à empaqueter. Les séquences comprises entre environ 4000 et 6000 paires de bases depuis le 5'LTR jusqu'au 3'LTR sont facilement acceptées et représentent les meilleures efficacités. Tandis que des séquences plus grosses, jusqu'à 9000 paires de bases, entraînent une baisse de production des vecteurs de 16 fois (Canté-Barrett et al., 2016). La plupart des vecteurs lentiviraux ont été pseudotypés avec la glycoprotéine-G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) permettant ainsi d'infecter un très large panel de cellules dont les CSN (Falk et al., 2002) et les CSG (Walker and Hjelmeland, 2014). Une étude intéressante a même démontré qu'il était possible de cibler sélectivement des CSG exprimant CD133 en greffant, sur les protéines de capsides des lentivirus, un anticorps reconnaissant la protéine CD133 (Bayin et al., 2014).

Dans un souci de sécurité biologique, (comme énoncé en introduction de cette partie, et largement précisé dans le paragraphe 4.3 des matériels et méthodes) les séquences nucléotidiques complètes des vecteurs lentiviraux sont réparties en 4 plasmides. Le premier comporte l'ARN viral génomique, tandis que les 3 autres portent respectivement les séquences des protéines d'architecture capsidique (GAG-POL), une séquence d'aide à l'export nucléaire de l'ARN génomique (Rev) et la séquence du pseudotypage d'enveloppe (ici: VSV-G) (Schambach et al., 2013).

4.1.3 Système d'édition du génome CRISPR/Cas9

Le système CRISPR-Cas9 est connu depuis la fin des années 1980 pour être le système immunitaire de certaines bactéries (Jinek et al., 2012). En 2012, il a été détourné à des fins biotechnologiques dans les cellules eucaryotes. C'est donc une technique toute récente qui ne cesse d'évoluer et dont les applications d'édition du génome, d'excisions, de

délétions, de coupures simple ou double brin et d'étiquetage révolutionnent petit à petit les principes et les protocoles (Doudna and Charpentier, 2014).

Le principe se base sur un ARN guide, complémentaire de la séquence d'ADN d'intérêt enchâssé dans une endonucléase (Cas9) agissant au centre de l'ADN reconnu. Cas9 étant une protéine d'origine procaryote, elle nécessite d'être insérée dans les cellules cibles pour agir par la suite. Bien que l'efficacité et la facilité d'action revendiquées par ce système soient plus élevées que toutes les autres techniques existantes, il reste donc conditionné par le succès de la transduction de Cas9 conjointement à celle de l'ARN guide (Gilbert et al., 2013). Cette technique semble cependant très efficace pour la transduction et la modification du génome des CSG (Toledo et al., 2015).

4.2 Les modèles de suivi du lignage cellulaire par fluorescence

Les nombreux modèles décrits dans cette partie font partie du grand concept de traçage du lignage cellulaire initié pour la première fois au XIX^e siècle sur le modèle de nématode *Cenorabditis elegans*. Cela consiste à identifier une cellule, suivre son destin ainsi que celui de toute sa descendance potentielle. Des technologies basées sur la fluorescence (entre autres) permettent aujourd'hui de suivre le lignage d'une cellule unique ou de tissus entiers au sein de souris mutantes. Il existe de nombreuses techniques différentes parmi lesquelles (liste non-exhaustive) :

- L'expression d'un ou plusieurs rapporteurs fluorescents contrôlés par des promoteurs constitutifs ou inductibles. Cela est réalisé par la transduction de cellules ou l'établissement de souris transgéniques.
- L'expression de rapporteurs multicolores (au moins deux couleurs) basée sur l'activité de la recombinaison génétique par Cre/LoxP ou FLP-FRT dans des souris. Ici, l'activation de la recombinaison peut être dirigée ou non, par un promoteur spécifique (Kretzschmar and Watt, 2012).

Ces techniques se basent sur l'expression par les cellules de protéines fluorescentes dérivées de la protéine fluorescente verte (GFP)¹⁹ de la méduse *Aequoria victoria* (Chalfie et al., 1994) et dont le spectre s'étend généralement du bleu profond (environ 400 nm) au rouge (620 nm).

¹⁹ Dans d'autres cas, le rapporteur fluorescent est remplacé par la β -galactosidase d'origine bactérienne. En présence de X-galactose, l'enzyme génère un chromophore bleu non fluorescent.

4.2.1 Marquage cellulaire par expression de rapporteurs fluorescents contrôlés

Les marqueurs génétiques sont apportés dans les cellules par les techniques présentées dans le paragraphe 4.1. Il s'agit probablement d'une des approches les plus largement utilisées dans l'étude du comportement des cellules embryonnaires ou tumorales. Le but est de pouvoir les identifier individuellement dans des modèles *in vitro* ou de greffe *in vivo*, en leur fournissant une séquence d'ADN codant l'expression d'un ou plusieurs gènes rapporteurs fluorescents. Ainsi Fiona Doetsch et Arturo Alvarez-Buylla ont pu identifier les différents sous-types de CSN de la ZSV adulte en utilisant des constructions rétrovirales et adénovirales. Une construction avec le promoteur fort du cytomégalo virus (CMV) guidant l'expression de GFP leur a permis de suivre les CSN *in vitro* dans un premier temps, puis injectées dans le cerveau dans un second temps (Doetsch et al., 1999; Gürsel et al., 2011). D'autre part, les auteurs ont également injecté dans la ZSV des adénovirus portant une construction du promoteur de GFAP contrôlant la GFP. Ceci confère une dépendance d'expression de la GFP et ainsi seules les cellules activant le promoteur GFAP (des cellules de type B dans la ZSV) expriment la GFP (Doetsch et al., 1999).

Des travaux comparables ont permis de caractériser la mise en place régionalisée et la descendance des CSN embryonnaires. L'injection directe de rétrovirus contenant la construction CMV-GFP ou CMV-tdTomato dans la ZSV à différents temps de la vie fœtale (entre E11,5 et E15,5) permet notamment de n'infecter que les cellules en mitose, à savoir les CSN. Il a alors été possible de tracer le devenir de ces cellules toutes positives pour la GFP, se différenciant en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. L'identification des types cellulaires a néanmoins nécessité le marquage par immunocytochimie de GFAP, NeuN, Olig2 entre autres, sur les tranches de cerveau (Fuatealba et al., 2015).

Pour plus de dynamique, il est également possible de générer des constructions composées de protéines fluorescentes contrôlées par un promoteur spécifique d'un type cellulaire ou d'une activité protéique donnée. De cette manière il devient possible d'observer la manière et la chronologie d'activation du ou des promoteurs, révélateur de l'activité de la cellule en temps réel. Prenons l'exemple de trois des marqueurs des cellules neurales : une étude de 2008 a démontré que le potentiel de différenciation spontané des CSN transduites avec la construction inductible GFAP-GFP était en partie remis à zéro après chaque renouvellement cellulaire. L'ajout de CNTF sur ces cellules cultivées *in vitro* induit l'apparition de la fluorescence verte de la GFP, révélatrice de l'activation du promoteur GFAP, reflétant lui-même l'engagement dans la voie de différenciation astrogliale (Ravin et al., 2008).

Dans un modèle de démyélinisation, des souris mutées expriment la protéine GFP sous le contrôle du promoteur CNP typique des oligodendrocytes (Peyron et al., 1997; Yu et al., 1994). Cela permet aux auteurs de suivre le stock d'oligodendrocytes disponibles et fonctionnels positifs pour la GFP dans le cerveau, avant et après la démyélinisation induite. Des marquages par immunocytochimie effectués en plus permettent également de montrer les variations d'expressions d'autres protéines d'intérêt (MBP, NG2, PDGFR α) sur les cellules exprimant la GFP (Millet et al., 2012; Yuan et al., 2002).

L'activité du promoteur MAP2 est typique des neurones dans le système nerveux central. Il est par exemple utilisé pour suivre la conversion de cellules astrocytaires en neurones ou encore la différenciation des CSN en neurones spécialisés (Addis et al., 2011). D'autres études utilisent des souris transgéniques avec la construction Sox2-GFP, exprimée donc par les CSN, afin d'analyser la division asymétrique, produisant à la fois des cellules Sox2- se différenciant en cellules neuronales ou gliales, et Sox2+ pour conserver le stock de cellules souches (Suh et al., 2007).

Un pas supplémentaire fut franchi avec l'infection de cerveaux par injection stéréotaxique distincte de 2 virus adéno-associés portant chacun une GFP sous le contrôle des promoteurs des 2 types cellulaires gliaux : MBP-GFP (oligodendrocytes), GFAP-GFP (astrocytes). Un autre AAV portant un promoteur ubiquitaire CBA-GFP a été ajouté, infectant préférentiellement les neurones et les astrocytes. Cette étude était limitée par sa seule couleur verte, limitant les possibilités de combiner les 3 AAV pour obtenir un cerveau multicolore (von Jonquieres et al., 2013).

4.2.2 Marquage cellulaire par rapporteurs multicolores

Parler de rapporteurs multicolores évoque tout de suite une mosaïque de couleurs. C'est exactement l'observation qui peut être faite dans les deux modèles qui seront présentés ci-dessous. Ils consistent à faire exprimer plusieurs marqueurs fluorescents de manière aléatoire dans des cellules génétiquement modifiées, en utilisant les technologies de recombinaison homologue Cre/LoxP ou FLP-FRT (Meinke et al., 2016).

Le modèle Brainbow développé par Jean Livet représente probablement le mieux cette notion de mosaïque de couleurs. Trois gènes rapporteurs CFP, YFP et RFP sont espacés par des sites de recombinaison LoxP. Dans la version la plus évoluée, la Cre dont l'activité est activable transitoirement par tamoxifène peut aléatoirement inverser, ajouter ou exciser

les segments d'ADN délimités par les sites LoxP. Cela permet d'obtenir avec toutes les possibilités de recombinaisons, 10 nuances de couleurs détectables (Livet et al., 2007; Loulier et al., 2014). Si cette technique permet l'étude du lignage cellulaire et de discriminer des cellules proches les unes des autres, il reste néanmoins figé dans le temps. Elle nécessite malgré tout un marquage par immunochimie afin d'identifier par exemple les types cellulaires précis.

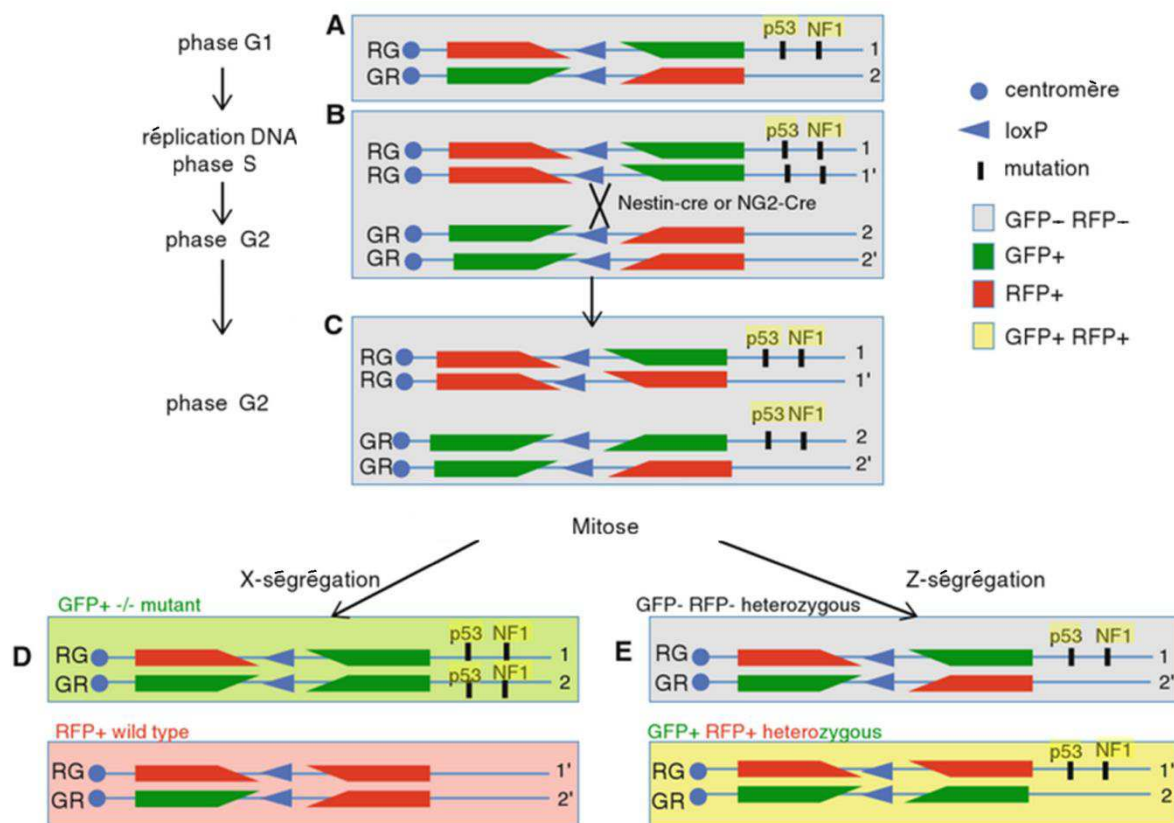


Figure 27 : Concept de la technologie MADM appliqué à l'étude des gliomes. Ordre des cassettes de fluorescence RG = c-term GFP et n-term RFP, GR = c-term RFP et n term GFP. **(A)** Durant la phase G2, les chromosomes homologues sont dupliqués à partir de la cassette RG d'une part et de la cassette GR d'autre part **(B-C)**. Le croisement avec des souris Nestin-Cre ou NG2-Cre permet de recombiner les chromosomes et de brasser les allèles. A la fin de la mitose se déroule aléatoirement une ségrégation X **(D)** ou Z **(E)**. Cela génère alternativement des cellules RFP+ (sauvage), GFP+ (mutant -/-), GFP+RFP+ (jaune, donc hétérozygote), ou GFP- RFP- (incolore, donc hétérozygote). Adapté de Watts C. et al, *Emerging concepts in neuro-oncology*, 2012.

Le modèle d'analyse mosaïque par double marqueurs (MADM) se base sur la recombinaison Cre/LoxP inter-chromosomique de chimères de gènes rapporteurs GFP et RFP (**figure 27**). Chaque chimère placé sur les deux allèles est composée des parties C-ter et N-ter de la GFP et de la RFP (et réciproquement), séparés par un site LoxP (Zong et al.,

2005). Ainsi la Cre peut potentiellement recombinaison les gènes et créer une protéine fluorescente entière. Le modèle MADM a été adapté quelques années plus tard à la biologie des glioblastomes en tentant de rechercher la fameuse cellule d'origine. Cela a nécessité d'étudier les cellules souches. La technique utilise la Cre/LoxP pour générer soit une cellule GFP+ portant une double mutation p53^{-/-} et NF1^{-/-}, une cellule RFP+ sauvage non atteinte et une cellule hétérozygote non colorée ou GFP+/RFP+ (donc jaune). Ceci requiert la mutation des gènes p53 et NF1, très fréquemment mutés dans les GBM (McLendon et al., 2008), dont les loci sont très proches l'un de l'autre sur le chromosome 11. Les deux allèles du locus *Hipp11*, situés sur le même bras du chromosome 11 (Hippenmeyer et al., 2010) ont été modifiés pour insérer la construction MADM présentée ci-dessus. Finalement la Cre a été placée soit sous le contrôle d'un promoteur GFAP (GFAP-Cre) soit sous celui de la nestine (Nestine-Cre), tous deux exprimés par les CSN.

Les résultats ont montré que ce sont bien dans les CSN que surviennent les mutations. Parmi les cellules différenciées qui en découlent, les astrocytes et les neurones apparaissent majoritairement en fluorescence rouge, tandis que les cellules mutantes les plus nombreuses et massivement prolifératives sont les CPO. Les auteurs concluent ici que la CSN est en fait la cellule des mutations, générant un terrain favorable à l'apparition de la cellule d'origine (le précurseur oligodendrocytaire), qui traduit au final les mutations accumulées, en prolifération tumorale anarchique (Liu et al., 2011). Cette analyse fut néanmoins rendue possible que par la collaboration de la technique de suivi du lignage cellulaire MADM et de l'immunofluorescence pour identifier formellement le type cellulaire.

L'identification par rapporteurs fluorescents permet comme nous venons de le voir, de révéler potentiellement plusieurs phénomènes cellulaires. Utilisées séparément, les constructions fluorescentes rendent possible la visualisation en direct de la biologie cellulaire (modèles de promoteur + XFP). L'usage de plusieurs longueurs d'ondes suffisamment distantes les unes des autres autorise l'élaboration de modèles mosaïques permettant de discerner les cellules (comme dans les modèles MADM ou Brainbow). Ces techniques apportent beaucoup à la biologie développementale et en particulier aux neurosciences et à la biologie des cancers. Cependant, à ma connaissance, il n'existe toujours aucun modèle permettant de suivre en direct la totalité des capacités de différenciation des CSN et des CSG. Elles sont pourtant plus que jamais au centre des recherches thérapeutiques innovantes contre les tumeurs et plus spécialement les glioblastomes (Schernberg et al., 2016; Safa et al., 2015).

OBJECTIFS DE LA THESE

Au vu des différents arguments apportés jusqu'ici, il n'y a plus aucun doute sur l'implication des cellules souches cancéreuses dans la progression des glioblastomes. Pourtant, leur comportement reste majoritairement incompris. C'est probablement l'une des raisons de l'échec des thérapies actuelles, ne parvenant pas à prendre en compte les différentes facettes de ces cellules aux capacités spectaculaires de camouflage, de résistance et d'échappement. Percer à jour l'étonnante versatilité d'expression des marqueurs permettrait, peut-être, d'identifier la descendance des CSG davantage sensibles aux thérapies (Kang et al., 2014; Campos et al., 2010).

L'équipe « peptides thérapeutiques » de mon laboratoire d'accueil développe justement depuis plus d'une dizaine d'années des peptides inhibiteurs de la plateforme de signalisation de neuropiline/plexine. Elle est impliquées dans la tumorigenèse et associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de GBM (Hu et al., 2007; Osada et al., 2004). Plusieurs publications ont validé le principe d'action de ces peptides inhibiteurs capables de rompre les dimères de récepteurs et d'en diminuer les effets biologiques (Roth et al., 2008) dans différents modèles de glioblastome et de cancer du sein (Arpel et al., 2016, 2014; Nasarre et al., 2010), auxquels j'ai pour certains, activement participé. Jusqu'à lors, aucun des travaux n'avait montré un effet direct des peptides sur la sous-population des CSG.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a été réparti en deux axes majeurs.

Dans la continuité des travaux menés au laboratoire sur les peptides inhibiteurs, le premier axe a consisté à évaluer l'impact *in vitro* et *in vivo* des peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 directement sur une lignée de CSG. Les travaux effectués sur MTP-PlexA1 ont d'ailleurs contribué à publier un article dans le journal *Oncotarget* (Jacob et al., 2016).

Le second objectif, le plus conséquent, a été un projet au long court. Il a consisté, en partant de rien, à proposer un modèle innovant de suivi et d'analyse de la différenciation des CSN et des CSG en temps réel. Ce modèle, nommé « système d'expression mosaïque inductible (i.M.E.SYS) » se base sur la transduction de cellules souches avec des constructions permettant l'expression multiple de protéines fluorescentes : CFP, GFP, mVenus et mCherry, exprimées sous le contrôle de promoteurs spécifiques neuronal, glial et/ou endothélial.

MATERIELS ET METHODES

1. Animaux

Les expériences présentées ici sont approuvées par le CREMEAS (Comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg)²⁰, enregistrées sous les numéros de saisines AL/63/70/02/13, AL/62/69/02/13 et AL/54/61/02/13, en accord avec la directive européenne²¹ d'éthique pour la recherche animale.

Une partie des expériences a été menée sur des souris de fond génétique C57bl/6J (Laboratoire Charles River). Des embryons âgés de 15 jours servent à produire des cellules souches neurales et les nouveau-nés de 5 à 15 jours sont utilisés afin de générer des tranches organotypiques. Des souris C57bl/6J adultes sont générées et utilisées pour les greffes intracérébrales de CSG. Des souris femelles NMRI-NU Foxn1^{-/-} (Laboratoire Janvier) adultes ont été utilisées dans des modèles de greffes sous-cutanées et intracérébrales de CSG pour l'étude de peptides anti-tumoraux. Les souris NMRI-NU présentent un phénotype secondaire d'absence de kératinisation du follicule pileux, les rendant totalement nues à l'âge adulte.

Tous les animaux ont accès à l'eau et la nourriture ad libitum. Ils sont élevés dans des cages fermées entreposées sur un portoir ventilé autonome (Techniplast) dans une animalerie conventionnelle agréée (n° d'agrément : E67-482-21) par le Ministère de l'agriculture. Le cycle jour nuit est de 10h/14 h et la température est maintenue à 21°C +/- 2°C.

2. Culture cellulaire

2.1 Cellules souches neurales

Une lignée primaire de cellules souches neurales humaines (CSNh) hNSC#5250 a été obtenue grâce à l'aimable collaboration avec le laboratoire de biologie des cellules souches et du développement de Peter Dirks (The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada). Ces cellules sont dérivées à partir du tissu nerveux d'embryons humains âgés entre les stades 19

²⁰ Le CREMEAS est agréé par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et se compose de chercheurs, personnels d'animalerie, vétérinaires, personnels non chercheurs menant des expériences sur animaux et personnes extérieures à la recherche impliquées dans la cause animale.

²¹ Directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil. Ce texte encadre les règlements de protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et son respect est imposé en France par la Loi du 7 février 2013.

et 22 de Carnegie²² récupérés à la suite d'interruption volontaire de grossesse avec consentement éclairé de la mère.

Les cellules hNSC#5250 sont cultivées en 2 dimensions dans un milieu spécifique MC5250 (**tableau 2**) en flacon T25 ou boîte de culture 10 cm Primaria®, recouverte d'une première couche de 10 µg/mL de poly-L-ornithine et d'une seconde couche de 5 µg/mL de laminine. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours et les cellules sont repiquées lorsqu'elles atteignent 80 % de confluence en utilisant de l'acutase (Stem Cell Technologies) pendant 3 minutes. Le milieu est changé le lendemain puis tous les 3 jours.

2.2 Cellules souches de glioblastome

2.2.1 Culture de lignée de cellules souches de glioblastome

Nous avons obtenu en collaboration avec le professeur Christel Herold-Mende (Université de Heidelberg, Heidelberg, Allemagne) deux lignées de cellules souches de glioblastome : NCH644 et NCH421k. Ces dernières présentant un cycle de mitose de plusieurs jours n'ont pas été retenues comme modèle principal car elles ne permettaient pas de générer les grandes quantités de matériel biologique nécessaires à cette étude. La lignée NCH644 quant à elle, décrite précédemment par les chercheurs de l'équipe de Christel Herold-Mende (Campos et al., 2010; Podergajs et al., 2013) a un temps de doublement d'environ 1 jour. C'est pourquoi j'ai opté pour cette lignée comme modèle d'étude principale. Son mode de culture est basé sur la technique de culture des neurosphères décrite par Weiss et Reynolds en 1992 (Reynolds and Weiss, 1992), permettant dans ce cas d'obtenir des gliomasères (**figure 28**). Brièvement les cellules sont cultivées dans des flasques traitées non adhérentes, dans un milieu de culture sans sérum et enrichi en EGF et bFGF (**MCCS**; **tableau 2**). Tous les 3-4 jours, les cellules sont repiquées, en dissociant mécaniquement les sphères à la pipette P200.

Les modèles de xénogreffe de CSG dans les souris exigent de pouvoir visualiser ces cellules à tout moment, c'est pourquoi j'ai également développé des lignées fluorescentes vertes (CMV-GFP) et rouges (CMV-mCherry). Afin d'obtenir une fluorescence constitutive, j'ai inséré par transduction lentivirale (Mission® Lentiviral Control, Sigma, cf. paragraphe 5.2.1) les constructions comprenant les séquences d'ADN des protéines GFP²³ ou

²² Les stades de Carnegie, ou stades de développement embryonnaires sont définis selon la corrélation de l'âge, de la taille et des caractéristiques morphologiques. Les 8 semaines de la période de vie embryonnaire sont ainsi décomposées en 23 stades de Carnegie. Ici, le stade 19 correspond au 46^{ème} jour et stade 22 au 53^{ème} jour de développement embryonnaire.

²³ GFP : Protéine verte fluorescente. Ex = 488 nm / Em = 507 nm.

mCherry²⁴. Ces cellules ont été infectées avec des lentivirus à une M.O.I ²⁵ = 3 pendant 48 heures puis sélectionnées avec 1 µg/mL de puromycine pendant tout leur temps de maintien en culture.

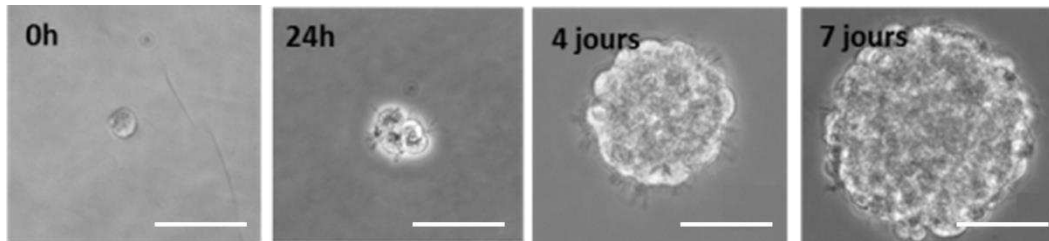


Figure 28 : Divisions des cellules initiales de cellules souches de glioblastome cultivées en condition de neurosphères. Photographies en contraste de phase prises à différents temps de la culture in vitro. Une cellule unique (photo de gauche) génère après 7 jours une neurosphère d'environ 100 µm de diamètre. Barre d'échelle = 50 µm.

2.2.2 Dérivation de cellules souches tumorales à partir de glioblastome

Afin de compléter la collection de CSG, les lignées adhérentes de glioblastome humain U373MG, U87MG, U118MG (ATCC BioServices) ont été dérivées en cultures de cellules souches tumorales en les plaçant dans du MCCS (**tableau 2**) après les avoir détachées avec une solution de trypsine 0,05% + EDTA 1x (Life Technologies) pendant 5 à 10 minutes. Seules les cellules U373MG et U118MG ont pu être dérivées, tandis que les cellules U87MG ne permettent pas de générer de culture de CSG dans ce milieu MCCS.

De même dans le cadre d'un partenariat avec le service de neurochirurgie de l'hôpital de Hautepierre (CHRU de Strasbourg), nous avons obtenu des biopsies de glioblastomes de patients que nous avons également dérivées en lignées cellulaires adhérentes. Ces cellules sont d'abord maintenues pendant cinq passages avant d'être détachées avec une solution de trypsine 0,05% + EDTA 1x (Life Technologies) et placées en MCCS afin de débiter le processus de dérivation en cellules souches. Dans ce cas, le MCCS sans sérum, permet de sélectionner et d'amplifier les seules cellules souches répondeuses à ce cocktail (Tropepe et al., 1999). Néanmoins, la réussite de ce protocole est dépendante de chaque biopsie, de sa zone de prélèvement dans la tumeur et de la faible portion de CSG au sein des glioblastomes qui en est général inférieure à 1% de la masse tumorale globale (Wan et al., 2010a).

²⁴ mCherry : Protéine rouge fluorescente en conformation monomérique. Ex = 587 nm / Em = 610 nm.

²⁵ M.O.I : Multiplicity Of Infection (Multiplicité d'infection) correspond au nombre de vecteurs lentiviraux apportées par cellule. Cette valeur est susceptible de changer en fonction du type de cellules à infecter. Il est néanmoins préférable d'avoir une MOI la plus faible possible pour ne pas déséquilibrer l'expression du génome de la cellule hôte.

2.3 Cultures de cellules neuronales et endothéliales

Les cellules neuronales (SHS-Y5Y) et endothéliales (HUVEC) utilisées dans cette étude ont toutes été cultivées dans des flasques T75 à bouchon ventilé ou dans des boîtes de Petri 10 cm (BD Falcon). Tous les 3-4 jours, le milieu est changé. Une fois par semaine les cellules sont repiquées si elles atteignent 80-90 % de confluence en les détachant avec une solution de trypsine 0,05% + EDTA 1x (Life Technologies). Les cellules SHS-Y5Y sont cultivées dans un milieu adapté MCSH (**tableau 2**) supplémenté en acide rétinoïque à 10 μM , et les cellules HUVEC (PromoCell ; C-12200) dans un kit de milieu de culture des cellules endothéliales (PromoCell ; C-22110).

3. Solubilisation et traitements avec les peptides MTP

Le laboratoire développe depuis plus d'une dizaine d'années des peptides transmembranaires inhibiteurs mimant la séquence du domaine transmembranaire du récepteur neuropiline-1 (Nasarre et al., 2010; Roth et al., 2008). La stratégie a été étendue à d'autres récepteurs comme plexine-A1. J'ai utilisé pour cette étude deux peptides mis au point : l'un ciblant neuropiline-1 et l'autre plexine-A1 : respectivement MTP-NRP1 (27 acides aminés) synthétisé en qualité BPF²⁶ par la société Polypeptide (**figure 29A**) et MTP-PlexA1 (**figure 29B**) (29 acides aminés) synthétisé en qualité recherche (Peptide.DE).

Ces peptides hautement hydrophobes sont solubilisés et maintenus en solution stock à 1 mg/mL (correspondant à une concentration théorique de $3 \cdot 10^{-4}$ M) dans des micelles de détergent anionique de lithium dodécyl sulfate à 72 mM (LDS, BioRad). Ils sont ensuite directement déposés dans le milieu de culture des cellules à des concentrations s'étalant de 10^{-7} à 10^{-9} M.

²⁶BPF : « Bonnes pratiques de fabrication » désigne l'assurance de qualité de fabrication de molécules thérapeutiques à usage humain ou vétérinaire. Cette norme qualitative est réglementée par la Commission européenne sous le sigle EUDRALEX.

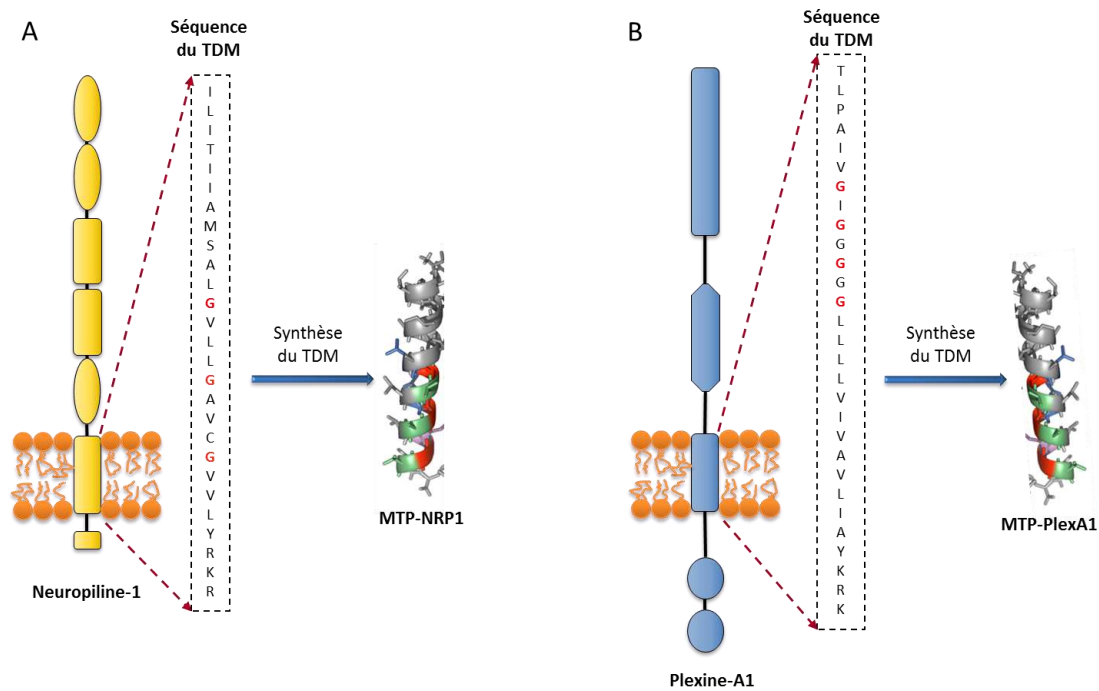


Figure 29 : Stratégie de synthèse des peptides thérapeutiques. (A) La séquence transmembranaire de neuropiline-1 (encadrée en pointillés) est synthétisée sous forme d'un peptide en hélice α . Trois acides aminés (RKR) sont greffés en C-terminal pour augmenter la stabilité dans la membrane. **(B)** La même stratégie est appliquée pour le récepteur plexine-A1. Les acides aminés KKK sont flanqués en C-terminal pour optimiser la stabilité du peptide dans la membrane.

4. Tests fonctionnels

4.1 Test de prolifération par mesure MTS

Il s'agit d'un test colorimétrique se basant sur la capacité des mitochondries des cellules à dégrader le réactif de MTS²⁷ en un produit de formazan soluble avec un pic d'absorption à 595 nm. L'absorbance à cette longueur d'onde est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives.

Les sphères sont dissociées et 5.10^4 cellules souches sont déposées en 5 réplicatas dans des puits de plaque 96 puits contenant 100 μ L de MCCS (**tableau 2**). On ajoute ensuite, le cas échéant les traitements MTP-NRP1 ou MTP-PlexA1 à une concentration finale de 10^{-7} M ou alors une concentration équivalente de contrôle du véhicule LDS. Parallèlement, des concentrations croissantes de cellules sont déposées en triplicata : 2.10^4 , 5.10^4 , 10^5 et 2.10^5 cellules / puits, afin d'établir une gamme étalon de croissance cellulaire. Le tout est placé à l'incubateur pendant 24 heures à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'air. Ensuite, 20 μ L de réactif

²⁷ [3-(4,5-diméthyl-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium : Sel de tétrazolium couplé à de la phénazine méthosulfate.

MTS (CellTiter 96® Aquous One, Promega) est ajouté dans chaque puits. La plaque est alors remise en incubation comme précédemment pendant 2 à 4 heures et la densité optique à 495 nm est lue par lecteur optique automatique (EL-800, Bio-Tek Instruments). La DO_{495} des différentes conditions expérimentales est alors comparée à celle de la gamme étalon et permet de déterminer l'indice de prolifération des cellules.

4.2 Test de formation de sphères

Ce test permet d'évaluer la capacité des cellules souches à former des sphères à partir d'un seul clone par expansion prolongée dans le temps. Il s'agit du test de référence en matière de clonogénicité des cellules souches neurales notamment (Marshall et al., 2007).

Les sphères sont d'abord dissociées puis marquées avec une sonde cytoplasmique fluorescente afin de les suivre sur le long terme. Pour cela, on les incube pendant 15 minutes dans du milieu Neurobasal-A (Gibco) contenant 10 μ M de CellTracker CMRA orange (Molecular Probes, Invitrogen). Après rinçage au PBS 1x pour éliminer le surplus de CellTracker, les cellules sont comptées et déposées dans une boîte 96 puits (BD Falcon) à raison de 30 cellules/puits (concentration théorique) contenant 50 μ l de milieu MCCS.

Les cellules peuvent alors être traitées par les peptides MTP Plex-A1 et MTP-NRP1 à une concentration de 10^{-10} M ou leur condition témoin de LDS.

Le nombre exact de cellules déposées par puits est compté manuellement au microscope inversé à épifluorescence (Zeiss Axiovert 200 M). Après 4 jours, les cellules sont fixées avec 50 μ l de formaldéhyde 4 % dans du PBS par puits et les sphères formées sont dénombrées au microscope à contraste de phase. Le taux de production de sphères (TPS), exprimée en pourcentage est ensuite calculé selon la formule présentée **ci-dessous**. Seules les sphères formées d'au moins 8 cellules sont comptabilisées.

$$TPS = \frac{\text{nbr de sphères formées à } t4}{\text{nbr réel de cellules déposées à } t0} \times 100$$

4.3 Différenciation des cellules souches sur substrat bidimensionnel

Des lamelles de verre (Marienfeld) de 18 mm de diamètre sont dégraissées à l'éthanol absolu bouillant pendant 10 minutes, stérilisées, puis recouvertes d'un substrat de poly-L-ornithine 0,01 % (PLO, Sigma) seule ou aditionnée de laminine à 5 μ g/ml et placées 1

heure à 37° C ou 4 heures à température ambiante. Après un rinçage rapide à l'eau stérile, les lamelles sont déposées dans les puits de boîtes 12 puits (BD Falcon) remplis de 1,5 ml de milieu de différenciation MDCS (**tableau 2**) promouvant l'adhérence et la différenciation des cellules en diminuant ou supprimant les facteurs de croissance et en ajoutant du sérum de veau fœtal (Scully et al., 2012).

Les sphères sont dissociées comme expliqué précédemment (ou les CSN humaines adhérentes sont détachées à l'accutase) et 50.10^4 cellules sont déposées dans les puits contenant les lamelles prétraitées. La préparation est finalement placée à l'incubateur pendant 5, 7, 10, 14 ou 21 jours à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'air, en renouvelant le milieu tous les 3 jours.

Le cas échant, des facteurs de croissance forçant la différenciation peuvent être ajoutés dans un milieu MDCS modifié : sérum-, EGF-, bFGF-. Du BMP4 à 10 ng/ml est ajouté pour induire une différenciation astrocytaire. Le milieu favorisant l'apparition d'oligodendrocytes se compose de PDGFA 10 µg/ml et de forskoline 10 µM la première semaine. Ensuite ces facteurs sont remplacés par de l'hormone T3 à 30 ng/ml et de l'acide ascorbique à 200 µM jusqu'à la fin de l'expérience.

4.4 Co-culture de tranches organotypiques de cerveau et de cellules souches

L'avantage de cette méthode est d'apporter un substrat 3D, mimant la situation in vivo afin de permettre aux cellules de se différencier et d'envahir la matrice extracellulaire.

Le cerveau de souris C57Bl/6J âgés de moins de 3 semaines est récupéré après décapitation et déposé dans une solution saline de Gey's balanced salt solution (GBSS, Gibco)-glucose 6,5 g/L maintenu sur glace puis inclus dans de l'agarose 1,5 % à basse température de fusion (Gibco BRL) liquéfiée sans dépasser 39° C²⁸. Après 15 minutes à 4° C, les blocs d'agarose solidifiés sont finalement collés à la super glue 3 (Loctite) sur une platine de vibratome (VT 1000 S, Leica) avec une orientation permettant d'obtenir des coupes coronales de cerveau de 90 µm d'épaisseur et immergées dans une solution de HBSS (Life Technologies) -glucose 6,5 g/L à 4° C.

Des lamelles de verre rectangulaires 12 x 24 mm (Marienfeld) préalablement recouvertes de 10 µg/mL de poly-L-lysine (PLL) diluée dans du GBSS (Gibco) sont incubées à 37 °C pendant 1 heure, puis lavées à l'eau ultra pure stérile et placées dans des boîtes de

²⁸ Il est important de respecter cette température, sous peine d'endommager le tissu à des températures plus élevées.

culture de 60 mm de diamètre (BD Falcon). Un volume de 750 μ L de milieu de culture MCFE (**tableau 2**) est délicatement déposé sur la lamelle en formant un fin film. Les coupes de cerveau conservées dans le HBSS/glucose 6,5 g/L à 4 °C sont dégagées de l'agarose et déposées sur les lamelles.

Puis, $50 \cdot 10^4$ cellules souches sont déposées par pipetage délicat sur toute la surface des coupes. La préparation est alors placée 1 heure à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'air. Le niveau de milieu de culture enrichi en méthyl-cellulose est ensuite ajusté à 2 ml par boîte. Le tout est placé 5 jours à l'incubateur ou disposé dans la station de vidéomicroscopie (Axiovert 200, Zeiss) à 37 °C, 5 % de CO₂ et 95 % d'air.

Type de milieu	Composition
Milieu de culture de cellules souches (MCCS)	Neurobasal-A (Gibco), 2 % supplément B27 (Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma), 0,5 % pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL (Sigma), 20 ng/mL EGF (Milipore), 20 ng/mL bFGF (Milipore).
Milieu de culture de cellules souches neurales humaines (MC5250)	Neurocult NS-A Basal Media (Stem Cell technologies) 75 µg/mL Albumine bovine (Euromedex) 2 mM L-glutamine (Sigma), 2 % supplément B27 (Gibco) 2 % supplément N2 (Gibco) 20 µg/mL insuline humaine (Pan Biotec) 1 mg/mL héparine (Sigma) 10 ng/mL EGF (Milipore), 10 ng/mL bFGF (Milipore).
Milieu de différenciation de cellules souches (MDCS)	Neurobasal-A (Gibco), 2 % supplément B27 (Gibco), 0,5 % sérum de veau foetal (Gibco) 0,5 % pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL (Sigma), 2 ng/mL EGF (Milipore), 2 ng/mL bFGF (Milipore).
Milieu de culture filtré enrichi pour tranches de cerveau (MCFE)	Neurobasal-A (Gibco), 25% HBSS (Life Technologies), 0,4 % méthyl-cellulose (Sigma), 25 % sérum de veau foetal (Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma), 0,5 % pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL (Sigma), 6,5 % D-glucose (Sigma)
Milieu de culture pour cellules HEK293T (MCHEK)	MEM 4,5 g/L glucose (Gibco), 10 % sérum de veau foetal (Gibco) 1 % HEPES (Sigma), 1 % pyruvate de sodium (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma), 1 % pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL (Sigma)
Milieu de culture pour cellules SHS-Y5Y (MCSH)	MEM 4,5 g/L glucose (Gibco), 10 % sérum de veau foetal (Gibco) 2 mM L-glutamine (Sigma), 1 % pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL (Sigma)

Tableau 2 : Tableau présentant les différents milieux de culture utilisés in vitro.

5. Le système d'expression mosaïque inductible (iMESYS)

5.1 Principe

Le principe de l'iMESYS repose sur l'insertion d'une, deux, trois ou quatre constructions génomiques inductibles dans une même cellule indifférenciée : CSN ou CSG.

Chaque construction comporte la séquence d'une protéine fluorescente dont l'expression est régulée par le promoteur d'une protéine spécifique à chaque état de différenciation que peut potentiellement générer une CSN ou une CSG : le type neuronal (promoteur de MAP2), astrocytaire (promoteur GFAP) ou oligodendrocytaire (promoteur CNP). De plus, il a été montré depuis quelques années que certaines CSG étaient capables de transdifférenciation vers un phénotype vasculaire afin de générer leurs propres vaisseaux sanguins ou structure de soutien des vaisseaux (Chen et al., 2014; Scully et al., 2012; Soda et al., 2011). J'ai donc en plus développé une construction comportant un promoteur spécifique des cellules endothéliales (promoteur Tie-2). Le but est de voir apparaître différentes couleurs de fluorescence en fonction de l'activité des protéines spécifiques reflétant l'état de différenciation des cellules.

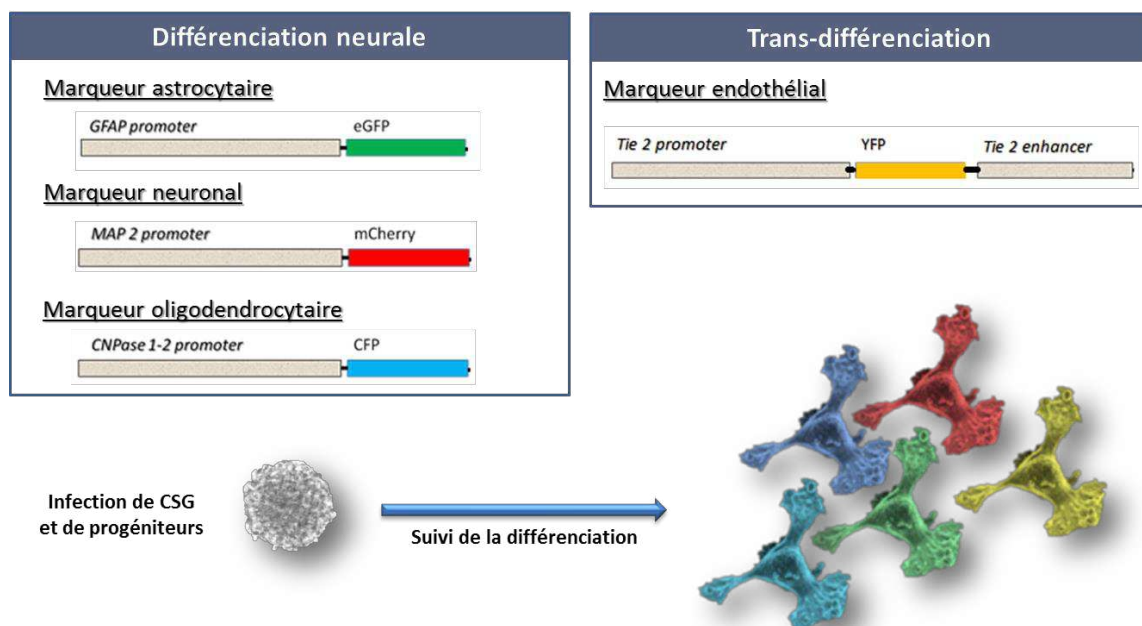


Figure 30 : Principe de fonctionnement du système iMESYS. (Encadré gauche) Trois constructions lentivirales comprennent les promoteurs spécifiques de la différenciation des cellules souches en cellules neurales. **(Encadré droit)** Une construction lentivirale spécifique des cellules vasculaires permet de potentiellement observer des phénomènes de trans-différenciation cellulaire. **(En bas)** Représentation schématique d'une sphère de cellules souches infectées avec les constructions iMESYS. En se différenciant, les cellules expriment différentes combinaisons de couleurs selon la/les voie(s) activée(s).

5.2 Constructions génétiques

5.2.1 Vecteur lentiviral de base

Après avoir testé des modes de transfection avec JetPEI (Polyplus Transfection), TransitX2 (Mirus), électroporation (Amaza kit for stem cells, Lonza), j'ai choisi la transduction par lentivirus (Falk et al., 2002) qui a donné les meilleurs résultats en matière de viabilité cellulaire et d'efficacité de transduction.

Nous avons choisi de travailler à partir du plasmide pLenti CMV GFP Puro (#17448, Addgene) comme base de clonage afin de générer plusieurs constructions inducibles (**figure 31**). Ce vecteur contient après la séquence d'initiation 5'LTR, un promoteur fort du cytomégalovirus (CMV) guidant l'expression d'une GFP suivi de l'élément de régulation post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de Woodchuck (WPRE). Une séquence murine du promoteur ubiquitaire de la phosphoglycérate kinase-1 (mPGK) est flanquée de la cassette de résistance à la puromycine, finalement suivie d'une séquence de terminaison 3'LTR. Les cellules visées étant de nature humaine, nous avons remplacé la cassette mPGK par sa version humaine (hPGK) afin de permettre une expression constitutive du gène de résistance aux antibiotiques de sélection

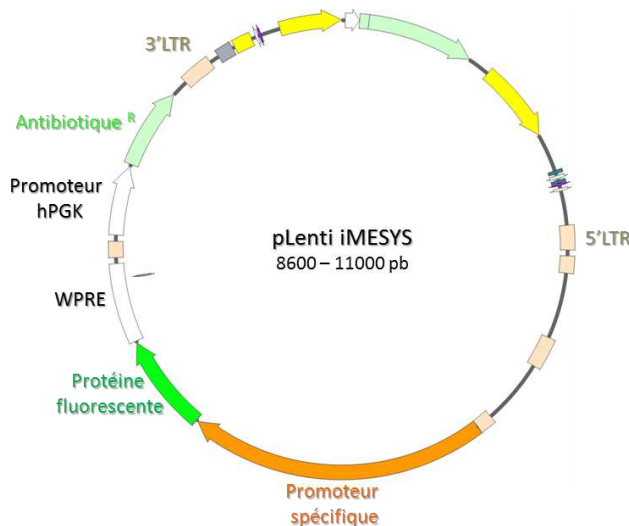


Figure 31 : Carte du plasmide portant les séquences codantes de vecteur lentiviral. Squelette plasmidique initial pLKO.1 modifié, portant les cassettes du système iMESYS.

5.2.2 Construction neuronale MAP2-mCherry hPGK Puromycine

Afin de générer des constructions inducibles spécifiques des cellules neurales, le promoteur humain MAP2 (1,49 Kb) a été extrait et amplifié à partir du plasmide pFU Map2 Gateway (#43915, Addgene) (Addis et al., 2011) avec les primers suivants :

5' ACGCGTCAGCTGGCCTTTTTGGTTCTC 3', 5' ACCGGTTCGGTTAGAGACAAGCTGAAG 3', puis sous-cloné dans le vecteur pCRII-Topo (Life Technologies). Le promoteur MAP2 aux extrémités Mlu1-Age1 a ensuite été inséré avec une ADN Ligase T4 (Life Technologies) entre les sites complémentaires Mlu1-Age1 du plasmide pQCXIP BMMXA-Cherry-hPGK-Puromycine (produit au laboratoire à partir du vecteur pQCXIP (Clontech)). Ce promoteur MAP2-Cherry a été cloné entre les séquences MluI-AgeI du vecteur lentiviral pLenti CMV-GFP-hPGK-Puromycine (dérivé au laboratoire du plasmide pLenti CMV-GFP-mPGK-Puromycine (#17448, Addgene) donné par le docteur Eric Campeau (Campeau et al., 2009) en utilisant l'ADN ligase T4. La GFP a été supprimée du vecteur avec le couple d'enzymes XbaI-Sall, puis le plasmide a été refermé par polymérase T4 (Life Technologies) suivi d'une ligation à l'ADN ligase T4 générant au final le plasmide pLenti hMAP2-mCherry-hPGK-Puromycine.

5.2.3 Construction astrocytaire GFAP-GFP hPGK Blastidicine

Pour une expression spécifique de protéine fluorescente dans les astrocytes, le promoteur humain de la GFAP (2,22 Kb) provenant du plasmide pAAV-GFAP-hChR2(H134R)-eYFP (#27054, Addgene) (Lawlor et al., 2009) donné par le docteur Karl Deisseroth, a été extrait en coupant avec l'enzyme BamHI, rabouté à la polymérase T4 (Life Technologies), coupé avec Mlu1 puis sous-cloné entre les séquences Age1 (rabouté par la polymérase T4 (Life Technologies)) et Mlu1 du plasmide lentiviral pLenti CMV-GFP hPGK puromycine muté pour Mlu1 (construit au laboratoire à partir du vecteur pLenti CMV-GFP mPGK puromycine) à l'aide de ligase T4. Le système de cassette de résistance hPGK-puromycine a été remplacé avec le kit Infusion Cloning (Clontech) par la séquence hPGK-Blasticidine (provenant du plasmide pLK0.1-Blast (#26655, Addgene) (Bryant et al., 2010), donné par le docteur Keith Mostov (Université de Californie à San Francisco, USA) afin de donner le vecteur final pLenti hGFAP-eGFP hPGK Blasticidine.

5.2.4 Construction oligodendrocytaire CNP-CFP hPGK Néomycine

En l'absence de promoteur humain défini, le promoteur murin de la CNPase (4,22 Kb) présentant 85% d'homologie avec la séquence humaine (BLAST) permet l'expression de protéines fluorescentes spécifiques à la lignée oligodendrocytaire (Yuan et al., 2002). Le vecteur pLenti mCNP-CFP hPGK Néomycine (sélection antibiotique à la généticine G418

sulfate) a été construit par Genescript à partir du vecteur pBS-SK mCNP contenant la séquence hybride des deux variantes du promoteur CNP1/2 (donné par le docteur Vittoria Gallo, Washington, USA).

5.2.5 Construction endothéliale Tie2-mVenus hPGK Zéocine

Les CSG ont été identifiées comme capables d'effectuer de la trans-différenciation en exprimant des protéines spécifiques des cellules endothéliales, comme exposé dans le paragraphe 3.4.1.3. Afin de suivre ce phénomène potentiel, nous avons construit un vecteur lentiviral portant le gène de la protéine fluorescente mVenus comprise entre les séquences du promoteur et d'une version tronquée de l'enhancer de Tie-2 (spécifique des cellules endothéliales). Les séquences d'ADN du promoteur (2 Kb) et de l'enhancer (1,7 Kb) de Tie-2 ont été obtenues à partir du plasmide pHSDK-XK (Adgene 35964) donné par le laboratoire du Dr. Thomas Sato (Nara Institute of Science and Technology, Japon). Ainsi le fragment HindIII-HindIII de 2 Kb du gène Tie-2 contenant 1.7 Kb de promoteur et les 300 pb du premier exon a été inséré dans le vecteur pLenti, suivi des 700 bp de la mVenus. Un fragment de 1.6 kb XhoI-KpnI issu du premier intron du gène Tie-2 et contenant une région enhancer spécifique des cellules endothéliales, a été flanqué en aval de la mVenus. Les 500 pb du promoteur humain du gène de la phosphoglycerate kinase 1 dirigent l'expression d'une cassette de sélection à la zéocine ont été placés en aval de la séquence WPRE. Le vecteur lentiviral final pLenti-Tie2-mVenus-hPGK-Zéocine a été assemblé par la société Genescript.

5.3 Production des particules lentivirales par transfection de cellules HEK293T

Des bactéries compétentes E. Coli K-12 XL1-Blue sont transformées afin d'amplifier les plasmides. Après une nuit à 37° C, les bactéries sont lysées puis les plasmides purifiés sur colonne d'affinité (Midi-Bond, Macherey-Nagel) et finalement stockés dans une solution de tampon Tris 10 mM – EDTA 1 mM, pH 7,5 à une concentration de 1 µg / µL.

Afin de répliquer et amplifier les particules virales à partir de leur séquence d'ARN génomique, des cellules HEK 293 T (Collection ATCC) sont cultivées en boîte de 10 cm (BD Falcon) dans un milieu de culture spécifique MCHek (**tableau 2**). Les cellules sont repiquées lorsqu'elles atteignent 80-90 % de confluence en les détachant avec une solution de trypsine 0,05% + EDTA 1x (Life Technologies) pendant 3 à 4 minutes.

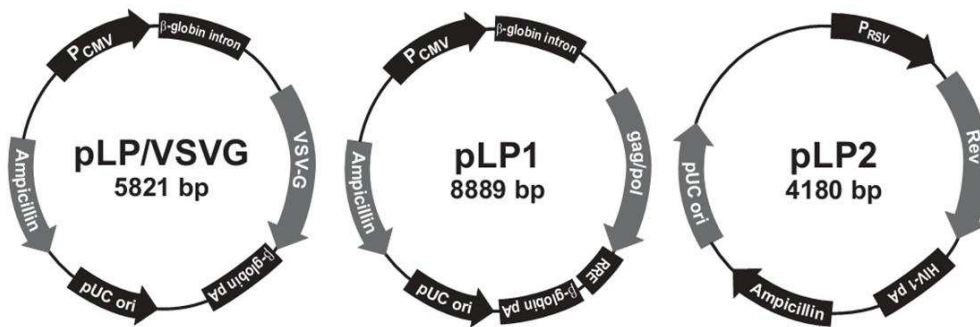


Figure 32 : Cartes des plasmides d'emballage pour la production de vecteurs lentiviraux. *Virapower™ Lentiviral Expression Systems, Invitrogen.*

La veille de la transfection, les cellules sont déposées à raison de 250 000 cellules / puits de boîte 6 puits. Le lendemain, le plasmide d'intérêt est transfecté avec trois plasmides d'emballage des lentivirus (**figure 32**) pLP1, pLP2 et pLP/VSV-G (ViraPower®, Invitrogen) à l'aide de JetPEI (Polyplus Transfection, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Le plasmide pLP1 (8,9 kB) comporte les séquences *gag* et *pol* qui codent respectivement pour une protéine capsidique permettant la formation de la structure lentivirale et une enzyme nécessaire à la réplication et l'intégration du virus (Himathongkham and Luciw, 1996). Le plasmide pLP2 (4,2 kB) quant à lui contient la séquence *rev* régulatrice et promotrice de l'expression des protéines *gag* et *pol* portées par pLP1 également impliquée dans le transport extranucléaire de l'ARN viral. Le plasmide pLP/VSV-G encode pour une glycoprotéine-G de surface du Vesicular Stomatitis Virus (VSV) permettant la reconnaissance membranaire d'un grand nombre de cellules de mammifères différents et donc l'intégration de la particule virale finale (Burns et al., 1993).

Après 48 heures, le milieu de culture contenant les lentivirus est récupéré et filtré à travers un filtre de 0,45 µm. Les particules sont ensuite concentrées avec du LentiX Concentrator (Clontech) et centrifugé à 1500 G pendant 45 minutes à 4 °C. Le culot de lentivirus est récupéré dans 200 µL de PBS 1x et congelé à -80° C. La concentration des particules virales est déterminée par titration RT-qPCR (chimie SYBR® green) de l'ARN génomique des virus avec le kit LentiX Titration (Clontech) en suivant le protocole du fournisseur. Il consiste en bref à titrer la quantité d'acide nucléique viral par RT-qPCR. Les lentivirus sont tout d'abord lysés, l'ARN viral est purifié sur une colonne d'affinité (Macherey Nagel) pour être élué et traité à la DNase 30 minutes à 37° C. Puis, cet ARN est reverse-transcrit et l'ADNc généré est immédiatement amplifié par q-PCR. De l'ARN viral contrôle sert en parallèle à établir une gamme étalon permettant par la suite d'effectuer le

calcul des concentrations de matériel génétique viral (**formule ci-dessous**), donnant la titration finale de vecteurs utilisés dans cette étude (**tableau 3**).

$$[LVP] = \frac{n \times 1000 \times 2 \times 50}{V \times D}$$

Où :

- **LVP** : Concentration de particules virales.
- **n** : Moyenne du nombre de copies d'ARN rétro-calculé à partir de la gamme étalon.
- **1000** : μl \rightarrow Volume rapporté par ml.
- **2** : Dilution de l'échantillon dans la DNase.
- **50** : Volume d'éluât d'ARN purifié.
- **V** : Volume initial de l'échantillon testé.
- **D** : Volume d'échantillon déposé en RT-qPCR.

Nom du vecteur	Séquence du transgène	Concentration (TU/mL)
LVP MAP2-mCh-I	pLenti MAP2 mCherry hPGK Puromycine	9,1.10 ⁸
LVP MAP2-mCh-II	pLenti MAP2 mCherry hPGK Puromycine	1,4.10 ⁹
LVP GFAP-GFP-I	pLenti GFAP GFP hPGK Blastidine	2,9.10 ⁷
LVP GFAP-GFP-II	pLenti GFAP GFP hPGK Blastidine	3,5.10 ⁸
LVP GFAP-GFP-III	pLenti GFAP GFP hPGK Blastidine	5,9.10 ⁷
LVP CNP-CFP-I	pLenti CNP-CFP hPGK Néomycine	6,9.10 ⁷
LVP CNP-CFP-II	pLenti CNP-CFP hPGK Néomycine	5,5.10 ⁸
LVP TIE2-mVenus-I	pLenti TIE2 mVenus hPGK Zéocine	9,9.10 ⁷
LVP CMV-GFP I	pLenti CMV-GFP hPGK Puromycine	4,2.10 ⁸

Tableau 3 : Liste des vecteurs lentiviraux produits et utilisés pour transduire les cellules iMESYS. Ce tableau expose les différents lots de particules virales (LVP) qui ont été synthétisées et titrées par RT-qPCR. TU = unités de transfection ; LVP = particule lentivirale.

5.4 Transduction des cellules par les lentivirus

Les cellules (cellules souches, lignées ou cultures primaires) sont placées dans des puits de boîtes 6 puits dans leurs milieux de cultures spécifiques et infectées avec une, deux ou trois constructions lentivirales simultanément. Chaque virus est délivré à une M.O.I de 3 et laissée en présence des cellules pendant 48 heures avant de remplacer le milieu de culture. Selon les cellules infectées, de l'héxadiméthrinebromide (Polybrene, Sigma) à 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est ajouté concomitamment aux virus afin de favoriser l'infection.

Après 48 heures, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais contenant des antibiotiques de sélection correspondant aux constructions lentivirales (cf. paragraphe 2.1).

Chaque lignée cellulaire transduite est justement mise sous pression de sélection avec des concentrations d'antibiotiques différentes présentées dans le **tableau 3**.

Les cellules sont laissées en sélection antibiotique pendant au moins 2 semaines avant d'être utilisées en tests fonctionnels. Parmi elles, les cellules de neuroblastome SHS-Y5Y, cultivées en milieu MCSH (**tableau 2**), considérées comme lignée immortalisée de progéniteurs neuraux (Devanna et al., 2014), des cellules endothéliales HUVEC (PromoCell) ainsi que des CSN humaines d'origine fœtale (Pollard et al., 2009a) (cédées par le docteur Peter Dirks, Toronto), différenciées en cellules neurales dans le milieu de différenciation MDCS (**tableau 2**) sont utilisées comme contrôle positifs d'expression des rapporteurs fluorescents.

6. Xénogreffes de cellules souches

6.1 Greffes hétérotopiques

La greffe sous-cutanée permet un suivi très facile et précis de la croissance de cellules fluorescentes par imagerie sur animal vivant.

Des CSG à fluorescence rouge constitutive (NCH644-mCherry) sont utilisées afin de servir de modèle d'initiation de tumeur. Pour ce faire, les cellules sont incubées pendant 1 heure avec le peptide MTP-NRP1 ou en condition témoin LDS, à une concentration de 10^{-7} M, avant d'être greffées en sous-cutané 10^6 cellules dans les flancs de 20 souris femelles NMRI-NU Foxn1^{-/-} adultes (présentées dans le paragraphe animaux) selon la méthode présentée dans le schéma ci-dessous (**figure 33**). Cela présente l'avantage d'avoir les cellules témoins et les cellules traitées dans le même animal. Dans ce protocole où chaque souris représente son propre contrôle, la variabilité des résultats est diminuée.

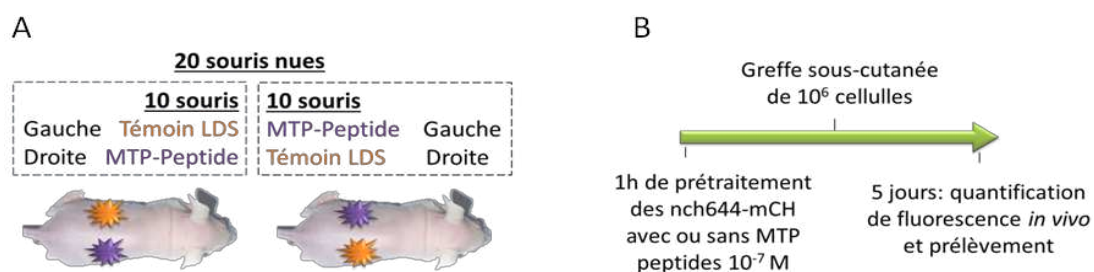


Figure 33 : Protocole de greffe hétérotopique de CSG en sous-cutané. (A) Représentation des sites de greffe des cellules sur les groupes de souris. (B) Chronologie des expérimentations effectuées. MTP peptide désigne les peptides neuropiline-1 ou Plexine-1. Ce protocole a été effectué indépendamment pour chaque peptide.

Après 5 jours, le signal de fluorescence émis par les cellules greffées permettant d'évaluer la croissance de la tumeur est quantifié par système d'imagerie *in vivo* NightOwl (LB983, Berthold Technologies).

Un protocole identique est utilisé pour l'étude de l'impact du peptide MTP-PlexA1. De plus, les tumeurs ayant pu se développer sont prélevées et pesées.

6.2 Greffes orthotopiques

Des souris C57bl/6J ou NMRI-NU Foxn1^{-/-} adultes (n = 4 par groupe) sont anesthésiées avec de l'isoflurane (4 % pour l'induction, puis 2 % pour le maintien) et sous 1 L d'O₂. Puis les animaux sont placés sur un cadre stéréotaxique (Harvard Apparatus). Une incision sagittale médiane met à nu les os pariétaux, frontal et occipital. Le crâne est percé avec une fraise aux coordonnées présentées dans le **tableau 4** et les CSG NCH644 sont injectées dans le striatum à raison de 10⁵ cellules par bolus de 2 µL à une vitesse d'administration de 0,6 µL/minute, avec une micro-seringue (2 µl, Hamilton) montée sur un pousse seringue automatique (Harvard Apparatus). Après administration des cellules, la seringue est laissée 5 minutes *in situ*, puis remontée progressivement à raison de 1 mm/minute. Nous injectons également une dose de kétoprofène en sous-cutané (Ketofen 1 % ; 1,5 mL / Kg) afin de maîtriser la douleur post-opératoire. Enfin, le plan cutané du crâne est suturé avec trois agrafes de Michel de 7,5 mm (A-75, Perfect).

Axes du corps	Coordonnées depuis le bregma
Antéro-postérieur	+ 1 mm
Médio-latéral	- 2 mm
Dorso-ventral	- 3,5 mm

Tableau 4 : Tableau des coordonnées d'injection stéréotaxiques pour la greffe intra-striatale de cellules chez la souris adulte.

6.3 Coloration histologique des cerveaux au réactif de Giemsa

Afin de mettre en évidence la présence de tumeurs formées à partir de CSG greffées dans le striatum de souris immunodéprimées, les cerveaux congelés sont préalablement coupés à une épaisseur de 10 ou 20 µm au cryostat. Les coupes de cerveau sont fixées au

formaldéhyde 4 % dans le PBS pendant 10 minutes, rapidement rincées à l'eau pure puis incubées pendant 2 heures à 37° C dans le colorant de Giemsa (RAL Diagnostics) dilué à 2 % dans l'eau pure. Les préparations sont ensuite rapidement rincées à l'eau pure, immergées dans l'acide acétique à 0,5 % pendant 5 à 10 secondes avant de subir une déshydratation par bains successifs de 30 secondes d'éthanol (50 %, 70 %, 95 %, 100 %) et d'un bain final de toluène. Les coupes sont enfin montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Eukitt (Agar scientific).

7. Analyse des marqueurs cellulaires par immunomarquage

7.1 Préparation des cellules souches sur coupe cryostat

Les cellules souches (CSN ou CSG) sous forme de sphères sont prélevées dans leur boîte de culture à l'aide d'une micropipette P 1000 et directement congelées dans un godet rempli de Tissue-Tek OCT Compound (Sakura) placé dans de la carboglace (- 80 °C). Des coupes de 10 µm sont alors réalisées au cryostat (CM3050S, Leica ; température de la chambre : -18 °C ; température du porte objet -17° C). Les coupes sont conservées à - 80° C jusqu'à l'étape de d'immunomarquage.

La détection de la protéine CD133 (Prominine-1) nécessite un traitement avec 200 mM de méthyl- α -D-mannopyranoside²⁹. Les cellules sont fixées au formaldéhyde 4 % dans le PBS pendant 10 minutes, lavées (PBS 3 x 5 minutes) puis subissent une étape de saturation des sites aspécifiques au sérum de veau fœtal (SVF 5 % pendant 30 minutes). Les anticorps primaires (**tableau 5**), dilués dans du SVF 5 % sont alors incubés sur les cellules pendant 90 minutes à température ambiante. Après une étape de lavage (PBS 3 x 5 minutes) les anticorps secondaires (**tableau 6**) dilués dans du PBS 1x sont incubés 45 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les lames sont à nouveau lavées 3 x 5 minutes au PBS 1x. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI ³⁰ 0,003 % dilué dans du PBS 1x pendant 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après un dernier lavage au PBS 3 x 5 minutes, les cellules sont plongées en aller-retour dans de l'eau ultra pure filtrée (filtre Millex 0,22µm, Millipore) afin de retirer le tampon avant le montage entre lame et lamelle avec du milieu de montage polymérisant FluorSave Reagent (Calbiochem).

²⁹ Le méthyl- α -D-mannopyranoside inhibe la fixation de lectines sur les épitopes glycoprotéiques de CD133 (prominin-1) pour la détection avec l'anticorps spécifique.

³⁰ Le DAPI (4',6'-diamidino-2-phényl indole) est un agent intercalent fluorescent (Ex = 358 nm ; Em = 461 nm) des bases azotées adénine et thymine de l'ADN et en bien moindre mesure des couples adénine/uracile de l'ARN.

7.2 Immunocytochimie sur cellules souches différenciées sur lamelles.

Après 5 jours de culture, les cellules différenciées sur les lamelles de verre sont progressivement fixées à 37 °C, d'abord avec 1,5 ml de formaldéhyde 2 % dans le PBS pendant 2 minutes, puis remplacé par 1,5 ml de formaldéhyde 4 % dans le PBS pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite lavées (PBS 3 x 5 minutes) et les sites aspécifiques sont saturées au SVF 5 %.

Les anticorps primaires (**tableau 5**) dilués dans du SVF 5 % sont incubés sur les cellules pendant 1h30 à température ambiante. Après 3 étapes de lavage au PBS 1x, les anticorps secondaires (**tableau 6**) sont incubés 45 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. Les lamelles sont à nouveau rincées au PBS 1x et les noyaux sont marqués au DAPI. Le tout est finalement monté sur lame de verre (SuperFrost Plus) au FluorSave (CalbioChem) après avoir été rapidement rincé à l'eau ultra pure.

Antigène reconnu	Hôte	Dilution	Référence
Nestine	Lapin	1/100	Millipore, # AB5922
Nestine	Souris	1/200	Millipore, # MAB353
Sox2	Souris	1/200	R et D systems MAB2018
CD133/1	Souris	1/50	Miltenyi Biotec, # 130-092-395
CD133/2	Souris	1/11	Miltenyi Biotec, # 130-090-423
GFAP	Lapin	1/2000	Dako, # Z0334
MAP2	Poulet	1/1000	Covance, # PCK554P
MAP2	Poulet	1/1000	Millipore, # AB5622
O4	Souris	1/50	Sigma, # O7139
CNP	Souris	1/200	Covance, # SMI91
Neuropiline-1 MAM	Lapin	1/200	Production interne
Plexine-A1	Souris	1/50	R&D, # MAB6536
Tie-2	Chèvre	1/200	R&D, # AF619

Tableau 5 : Tableau des anticorps primaires utilisés en immunocytochimie.

Anticorps	Dilution	Fournisseur
IgG (H+L) âne anti Ig souris couplé alexa 488	1/1000	Interchim
IgG (H+L) chèvre anti Ig lapin couplé alexa 488		Jackson Immunoresearch
IgG (H+L) âne anti Ig poulet couplé alexa 488		Molecular Probes
IgG (H+L) chèvre anti Ig souris couplé cyanine 3		Jackson Immunoresearch
IgG (H+L) âne anti Ig lapin couplé cyanine 3		Jackson Immunoresearch
IgG (H+L) âne anti Ig poulet couplé alexa 568		Molecular Probes
IgG (H+L) âne anti Ig lapin couplé alexa 649		Interchim
IgG (H+L) rat anti Ig souris couplé PE		Becton Dickinson
IgG (H+L) chèvre anti Ig poulet couplé PE		Becton Dickinson
IgG (H+L) âne anti Ig lapin couplé PE		Millipore
IgG (H+L) rat anti Ig souris couplé PerCP		Becton Dickinson
IgG (H+L) chèvre anti Ig lapin couplé cyanine 5	1/200	Jackson Immunoresearch
IgG (H+L) chèvre anti Ig souris couplé cyanine 5		Jackson Immunoresearch

Tableau 6 : Tableau des anticorps secondaires.

8. Analyse de l'expression des ARNm par RT-qPCR

La quantification des ARNm spécifiques des cellules souches ou spécifiques des cellules différenciées a été conduite par analyse RT-qPCR. L'ARN total des cellules tumorales est d'abord extrait avec une solution de Tri Reagent® (Molecular research Center ; RNA/DNA isolation reagent #TR118) en accord avec les recommandations du fournisseur. La concentration des ARNm est mesurée par spectrophotométrie (Thermo Scientific ; Nanodrop 1000), avant de traiter les échantillons à la DNase (Roche). La transcription inverse permet d'obtenir de l'ADNc à partir des ARN messagers avec le kit de transcription inverse à haute capacité (Applied Biosystem #4368814). Finalement, l'étape de PCR quantitative est effectuée avec le system Real Time PCR 7500 (Life Technologies) en diluant les échantillons d'ADNc à une concentration de 1 ng à 100 ng dans 20 µl final de solution de Master Mix TaqMan (APPLIED BIOSYSTEM #4369016). Les niveaux d'expression des gènes ciblés tels que : GFAP (Hs00909233_m1); MAP2 (Hs00258900_m1); CNP (Hs00263981_m1); NES (Hs04187831_g1); FUT4 (Hs01106466_s1); PROM1 (Hs01009250_m1); MSI1 (Hs01045894_m1); POU5F1 (Hs00999632_g1); SOX2 (Hs01053049_s1); NOTCH1 (Hs01062014_m1); NOTCH1 (Hs01062014_m1); EGFR (Hs01076078_m1); PDGFRA (Hs00183486_m1); ITGAV (Hs00233808_m1); KDR

(Hs00911700_m1); TEK (Hs00945155_m1); S100B (Hs00902901_m1); ENO2 (Hs00157360_m1); GALC sont déterminés en utilisant des microplaques 96 puits fabriquées à la demande pour ce projet par Applied Biosystems (APPLIED; Custom TaqMan Array Plates) contenant des primers humains spécifiques TaqMan®. L'analyse des valeurs obtenues est comparée aux niveaux d'expression de 2 gènes de ménage : l'ARNr 18S et le GAPDH : $\Delta ct (\text{gène}) = ct (\text{gène}) - \text{moyenne } ct (\text{gène de ménage})$. La valeur finale $2^{-\Delta ct (\text{gène})}$ correspond à la quantité relative d'ARNm.

9. Analyse du cycle cellulaire et de l'apoptose par cytométrie en flux

Avant de procéder à l'analyse du cycle cellulaire, les cellules adhérentes ou les gliomasphères sont détachées ou dissociées avec une solution de trypsine-EDTA pendant 3 à 5 minutes, puis déposées dans un tube pour FACS à fond conique (BD Falcon). Un nombre minimal de 10^6 cellules est nécessaire pour débiter l'expérience. Ces cellules sont centrifugées à 140 G pendant 5 minutes, puis fixées avec de l'éthanol 70 % à -20°C pendant une heure. Les échantillons sont ensuite incubés dans un tampon phosphate-citrate à pH 8 pendant une heure supplémentaire à 4°C . Après deux lavages au PBS 1x espacés de centrifugation à 260 G pendant 5 minutes, les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C dans une solution à base d'iodure de propidium ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$), de RNase-A ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) et d'EDTA (20mM). Les préparations sont finalement analysées par cytométrie en flux (FACS Calibur, BD Bioscience) et les données obtenues sont obtenues sur le logiciel CELLQuest Pro, puis analysées et avec ModFit LT (Verity Software House), de manière à obtenir les nombres de cellules en apoptose ou engagées dans les différentes phases du cycle cellulaire.

10. Acquisition d'images et analyses des données

L'acquisition d'images de cellules immunomarquées est effectuée avec un microscope droit à épifluorescence (Imager Z2, Zeiss) avec un module de lumière structurée (Apotome, Zeiss) et équipé d'une lampe à vapeur de mercure (HXP 120 Watt).

Les clichés à faible grossissement de tranches de cerveau ont été obtenus avec un microscope à champ large (AxioZoom.V16, Zeiss) équipé d'une lampe HXP 200 W pour les stimulations de fluorescence, d'une lampe à LED produisant de la lumière oblique et d'un système de lumière structurée (Apotome-2, Zeiss).

Le microscope inversé Nikon Eclipse TS100 a permis de prendre des photographies en lumière transmise et en fluorescence sur cellules vivantes. Les photographies et les vidéos de cellules vivantes en fluorescence multi-canaux ont été réalisées avec la station de vidéomicroscopie Zeiss Axiovert 200M équipé d'une chambre d'incubation. Les images obtenues sont analysées avec les logiciels de traitement d'image AxioVision (Zeiss), Zen (Zeiss), MetaVue (MetaMorph, Roper Scientific) et ImageJ-FIJI (NIH / Wayne Rasband).

Les résultats obtenus par cytométrie en flux ont été analysés et mis en forme avec les logiciels CellQuest Pro (Becton Dickinson) et Modfit LT Highlight (Verity Software House).

11. Tests statistiques

Les données sont analysées avec les logiciels Excel 2010 (Microsoft) et Graphpad (Prism 5). La comparaison deux à deux des valeurs non paramétriques est faite en appliquant le test de Mann et Whitney lorsque les échantillons indépendants sont inférieurs à 30 événements, ou en appliquant le test T de Student pour des échantillons indépendants supérieurs à 30 événements après vérification de la normalité de distribution des données. La comparaison des courbes de l'évolution du signal de fluorescence cumulé dans l'expérience de greffe intra-striatale a été effectuée par un algorithme de régression non linéaire. L'analyse statistique de l'évolution d'expression des rapporteurs fluorescents, représentant des mesures répétées ont été traitées par l'ANOVA à deux facteurs avec le test post-hoc de Tukey. Le seuil de significativité pour tous les tests a été fixé à 5 % ($p < 0,05$).

RESULTATS

La présentation des résultats est divisée en trois grandes parties :

La première résume les travaux d'obtention, de culture et de caractérisation de CSG dérivées à partir de biopsies de patients atteints de GBM. Cela a permis d'étudier les caractéristiques entre des lignées de GBM parentales et leurs versions dérivées en culture de CSG (9 lignées en tout).

La seconde partie est dédiée à l'étude de l'effet des peptides transmembranaires ciblant les récepteurs neuropiline-1 et plexine-A1, développés au laboratoire depuis une quinzaine d'années. L'impact de ces deux peptides a été identifié sur les cellules de glioblastome et l'angiogenèse tumorale (Arpel et al., 2016; Jacob et al., 2016; Nasarre et al., 2010; Roth et al., 2008), pourtant leurs effets potentiels sur la sous-population des CSG demeure inconnue.

La dernière partie représente un travail de développement d'un outil de suivi de la différenciation des CSG (et des CSN). Il repose sur l'expression de protéines fluorescentes exprimées sous le contrôle de promoteurs spécifiques des types cellulaires neuraux et endothéliaux.

PARTIE I : Obtention et caractérisation de cellules souches de glioblastome

Durant ce travail de thèse, le laboratoire a établi une collaboration avec le service de neurochirurgie de l'hôpital de Strasbourg Hautepierre, initiée avec le regretté Professeur Pierre Kehrlé. Sur 21 biopsies collectées, 17 ont été diagnostiquées comme GBM primaires et 4 comme récidives. A partir de ces échantillons, des lignées de cellules adhérentes (notées HB) ont été établies. A partir de 11 d'entre elles, j'ai pu générer des cultures de gliomasphères (notées GSHB) sur 6 échantillons (représentant 55 % de succès). Durant ma thèse, j'ai pu plus particulièrement travailler sur 2 d'entre elles (**tableau 7**), les lignées GSHB 14 (dérivée de la lignée HB14) et GSHB 30 (dérivées de la lignée HB 30). Nous voulions caractériser et comparer le comportement de ces cellules à des lignées de GBM déjà disponibles pour la communauté scientifique et pour lesquelles j'ai également dérivé la composante de CSG (**tableau 7**) : les cellules GSU 118 (provenant des U118MG) et les cellules GSU 373 (dérivées des U373MG). Finalement, nous avons mis en place une collaboration avec le Professeur Christel Herold-Mende à Heidelberg (Allemagne) et obtenu la lignée de CSG NCH644 (**tableau 7**) établie dans son laboratoire (Podergajs et al., 2013). Afin de permettre d'utiliser à terme ces lignées de CSG dans différents tests *in vitro* et *in vivo*, nous avons tout d'abord étudié les caractéristiques phénotypiques de ces lignées : leur comportement en culture, leur cycle cellulaire, leur fréquence d'apoptose, l'expression de marqueurs des cellules souches et de marqueurs de différenciation, leur capacité à se différencier ainsi que leur tumorigénicité.

Lignée	Classification	Provenance	CSG associée
HB 14	Glioblastome	Hôpital – Laboratoire INSERM	GSHB 14
HB 30	Glioblastome	Hôpital – Laboratoire INSERM	GSHB 30
U 118	Glioblastome	ATCC	GSU 118
U 373	Glioblastome	ATCC	GSU 373
NCH644	CSG	C. Herold-Mende, Heidelberg	NCH644

Tableau 7 : Liste de la provenance des lignées de CSG utilisées dans cette étude

1. Obtention de CSG à partir de cellules de GBM

Afin d'établir des CSG, les cellules des différentes lignées de GBM présentées dans le **tableau 7** ont été repiquées entre les passages 3 et 8, dans un milieu de culture spécifique de cellules souches sans sérum et avec de l'EGF et du bFGF à 20 ng/ml, dans des boîtes plastiques traitées non adhérentes. Après habituellement 2 à 7 jours, les cellules forment des sphères dont la morphologie est très variable d'une lignée à l'autre (**panel A** des **figures 34, 35, 36, 37 et 38**). En effet, les gliomasphères formées par les cellules GSU 373 (**figure 35**) et GSHB 14 (**figure 36**) sont plus hétérogènes et comportent des cellules formant des prolongements pouvant adhérer, tandis que les autres lignées forment des sphères très compactes et rondes (**figures 34, 37 et 38 ; tableau 8**).

Lignée cellulaire	Morphologie des sphères	Cycle cellulaire	Apoptose
U118		Prolifératives	4 %
GSU 118	Irrégulières	Quiescentes	1 %
U373		Très proliférative	8,5 %
GSU 373	Très Irrégulières	Quiescentes	12 %
HB 14		Prolifératives	19,3 %
GSHB 14	Irrégulières, Semi-adhérentes	Prolifératives	14 %
HB30		prolifératives	2,8 %
GSHB 30	Rondes, homogènes	Très prolifératives	16 %
NCH644	Rondes, homogènes	Prolifératives	8,9 %

Tableau 8 : Synthèse de la caractérisation des lignées parentales et des CSG dérivées.

Nous avons ensuite voulu vérifier si le cycle cellulaire des CSG était différent de celui de leurs cellules parentales de GBM. Pour cela, les cellules ont subi un marquage à l'iode de propidium et ont été analysées par cytométrie en flux. Plus de 50 % des cellules se trouvent systématiquement en phase G0/G1 dans les lignées GBM et les CSG (**panel B** des **figures 34, 35, 36, 37 et 38 ; tableau 8**). En revanche, des disparités plus marquées apparaissent dans les ratios de phases du cycle en particulier dans les lignées GSU 118

(**figure 34B ; tableau 7**) et GSU 373 (**figure 35B ; tableau 8**) qui se retrouvent bloquées en phase G0/G1 et S, résultant en une disparition presque totale de la phase G2/M. Cette caractéristique laisse penser que ces cellules sont les plus quiescentes. L'analyse de l'apoptose dans les différentes lignées (**panel C des figures 34 à 38 ; tableau 8**) montre peu de mort cellulaire dans ces conditions de culture avec des taux dans tous les cas compris entre 1 % (GSU 118) et 16 % (GSU 373) des cellules totales, sauf pour la lignée HB 14 atteignant 19,3 % (**figure 36C ; tableau 8**). Ces valeurs peuvent être placées en regard du taux d'apoptose de 8,9 % dans la lignée de CSG NCH644 servant de lignée de référence (**figure 38C**).

2. Les CSG expriment des marqueurs de cellules souches et des marqueurs de différenciation

L'établissement et la caractérisation des lignées de CSG obtenues passent également par l'analyse de l'expression d'un panel de marqueurs. Nous avons ainsi vérifié par immunocytochimie, l'état d'expression de 3 marqueurs de cellules souches : CD133, nestine, Sox2 et de 3 marqueurs de différenciation neurale : MAP2 (marqueur neuronal), GFAP (marqueur astrocytaire) et O4 (antigène présent dans le lignage oligodendrocytaire). L'analyse a été menée à la fois sur la lignée parentale des GBM (**panels D des figures 34 à 37**) et sur les CSG générées (**panels E des figures 34 à 38**). Concernant les marqueurs de cellules souches, il est intéressant de noter que les cellules adhérentes parentales expriment toutes la nestine mais plus rarement CD133 et Sox2. Signe de la grande hétérogénéité tumorale, les cellules parentales U 118, U 373, HB 14 et HB 30 expriment également à différents niveaux les marqueurs de différenciation MAP2, GFAP ou O4. Les lignées de CSG dérivées et la lignée NCH644 expriment toutes les marqueurs nestine, CD133 et Sox2, et plus faiblement les marqueurs de différenciation neurale (**figures 34 à 38**).

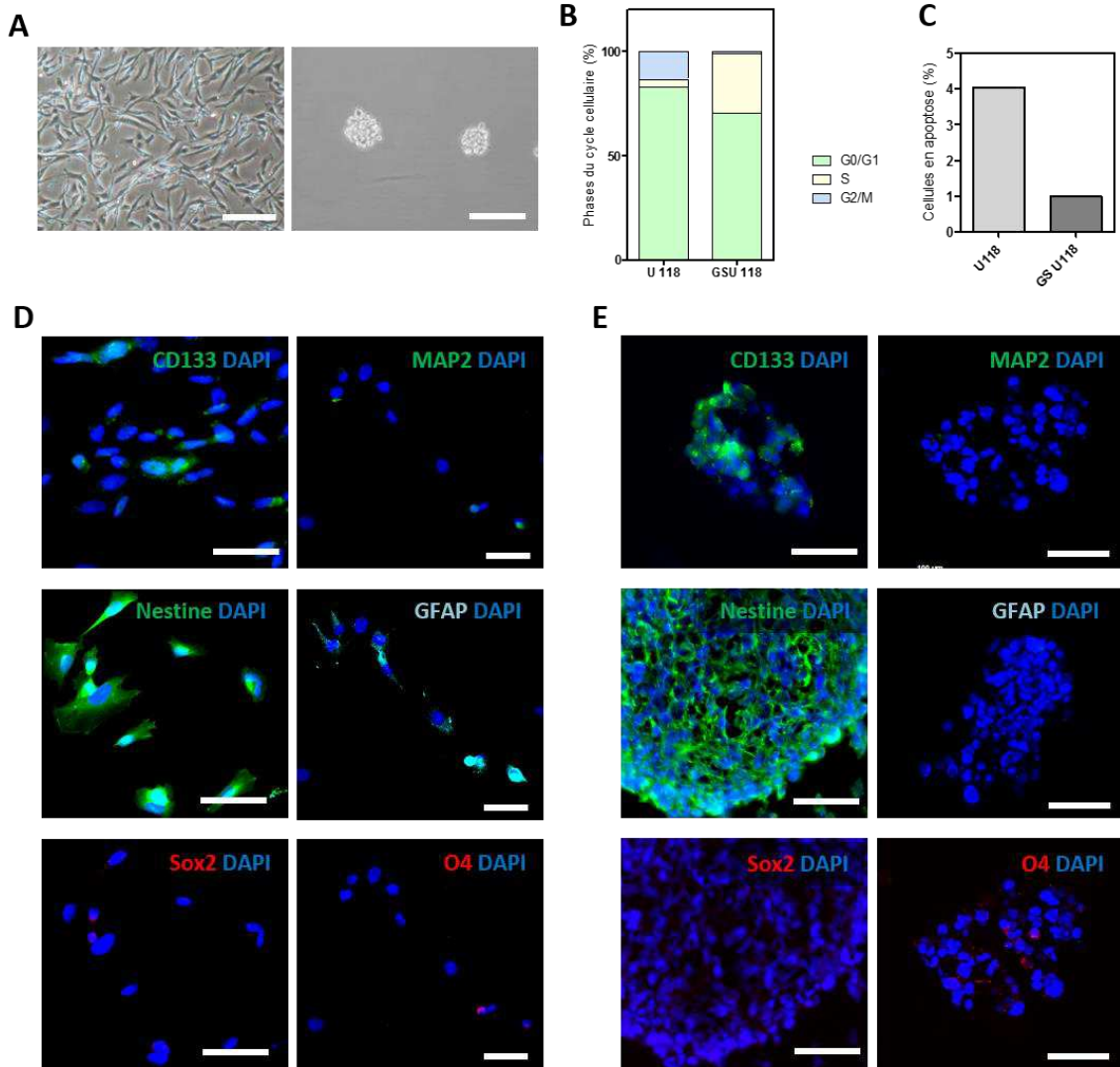


Figure 34 : Caractérisation des cellules U 118 et établissement de leurs CSG dérivées. (A) Photographie en contraste de phase des cellules U 118 parentales (à gauche) et des CSG dérivées GSU 118 (à droite). **(B)** Répartition des phases du cycle cellulaire des deux lignées. **(C)** Quantité de cellules en apoptose dans les lignées U 118 et GSU 118. **(D-E)** Mise en évidence par immunofluorescence de l'expression des marqueurs de cellules souches (CD133, nestine et Sox2) et des marqueurs de différenciation neurale (MAP2, GFAP, O4) dans la lignée U 118 parentale (D), et dans les CSG dérivées GSU 118 (E). Barre d'échelle = 50 μ m.

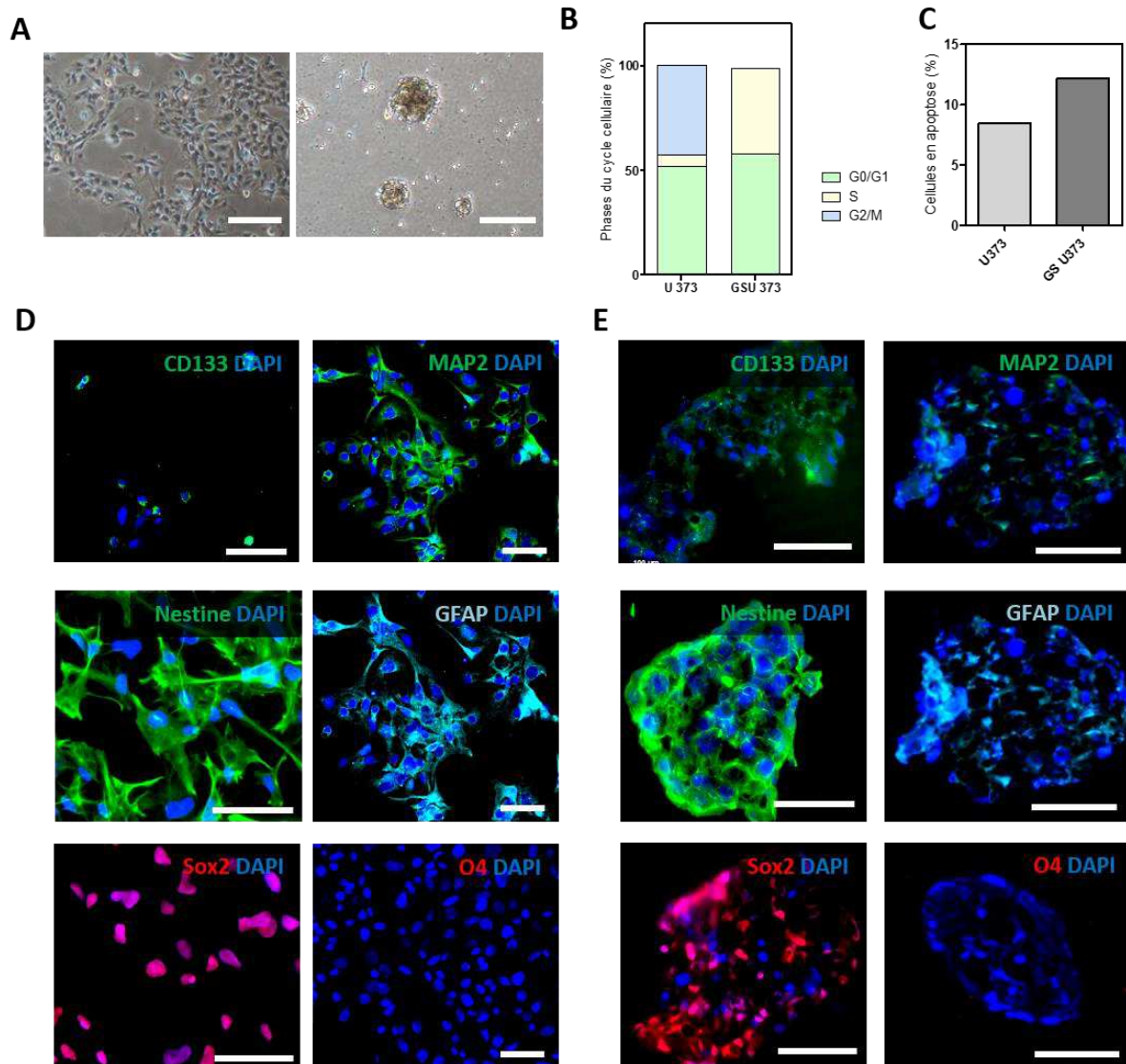


Figure 35 : Caractérisation des cellules U 373 et établissement de leurs CSG dérivées. (A) Photographie en contraste de phase des cellules U 373 parentales (à gauche) et des CSG dérivées GSU 373 (à droite). **(B)** Répartition des phases du cycle cellulaire des deux lignées. **(C)** Quantité de cellules en apoptose dans les lignées U 373 et GSU 373. **(D-E)** Mise en évidence par immunofluorescence de l'expression des marqueurs de cellules souches (CD133, nestine et Sox2) et des marqueurs de différenciation neurale (MAP2, GFAP, O4) dans la lignée U 373 parentale **(D)**, et dans les CSG dérivées GSU 373 **(E)**. Barre d'échelle = 50 μ m.

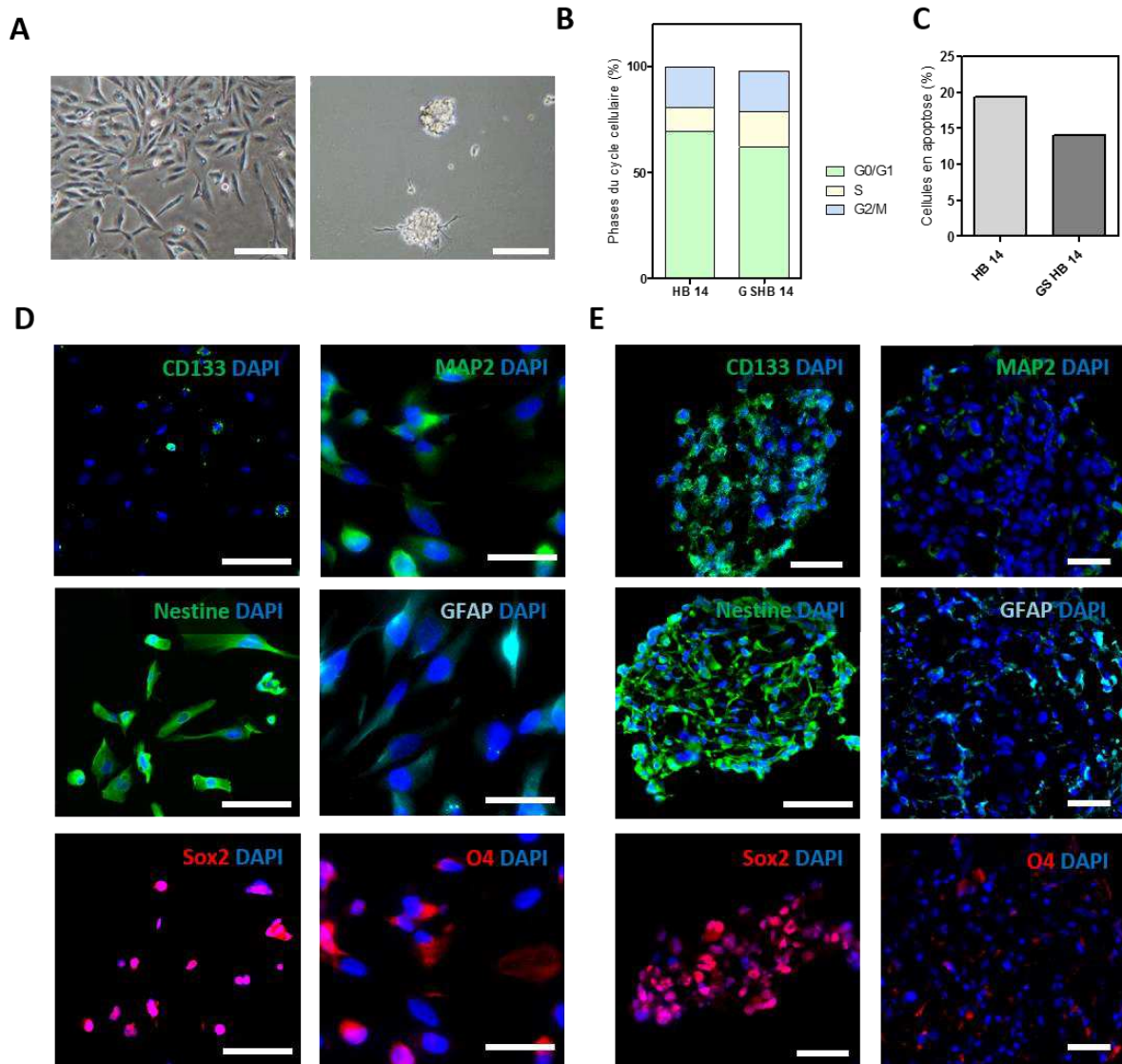


Figure 36 : Caractérisation des cellules HB 14 et établissement de leurs CSG dérivées. (A) Photographie en contraste de phase des cellules HB 14 parentales (à gauche) et des CSG dérivées GSHB 14 (à droite). **(B)** Répartition des phases du cycle cellulaire des deux lignées. **(C)** Quantité de cellules en apoptose dans les lignées HB 14 et GSHB 14. **(D-E)** Mise en évidence par immunofluorescence de l'expression des marqueurs de cellules souches (CD133, nestine et Sox2) et des marqueurs de différenciation neurale (MAP2, GFAP, O4) dans la lignée HB 14 parentale **(D)**, et dans les CSG dérivées GSHB 14 **(E)**. Barre d'échelle = 50 μ m.

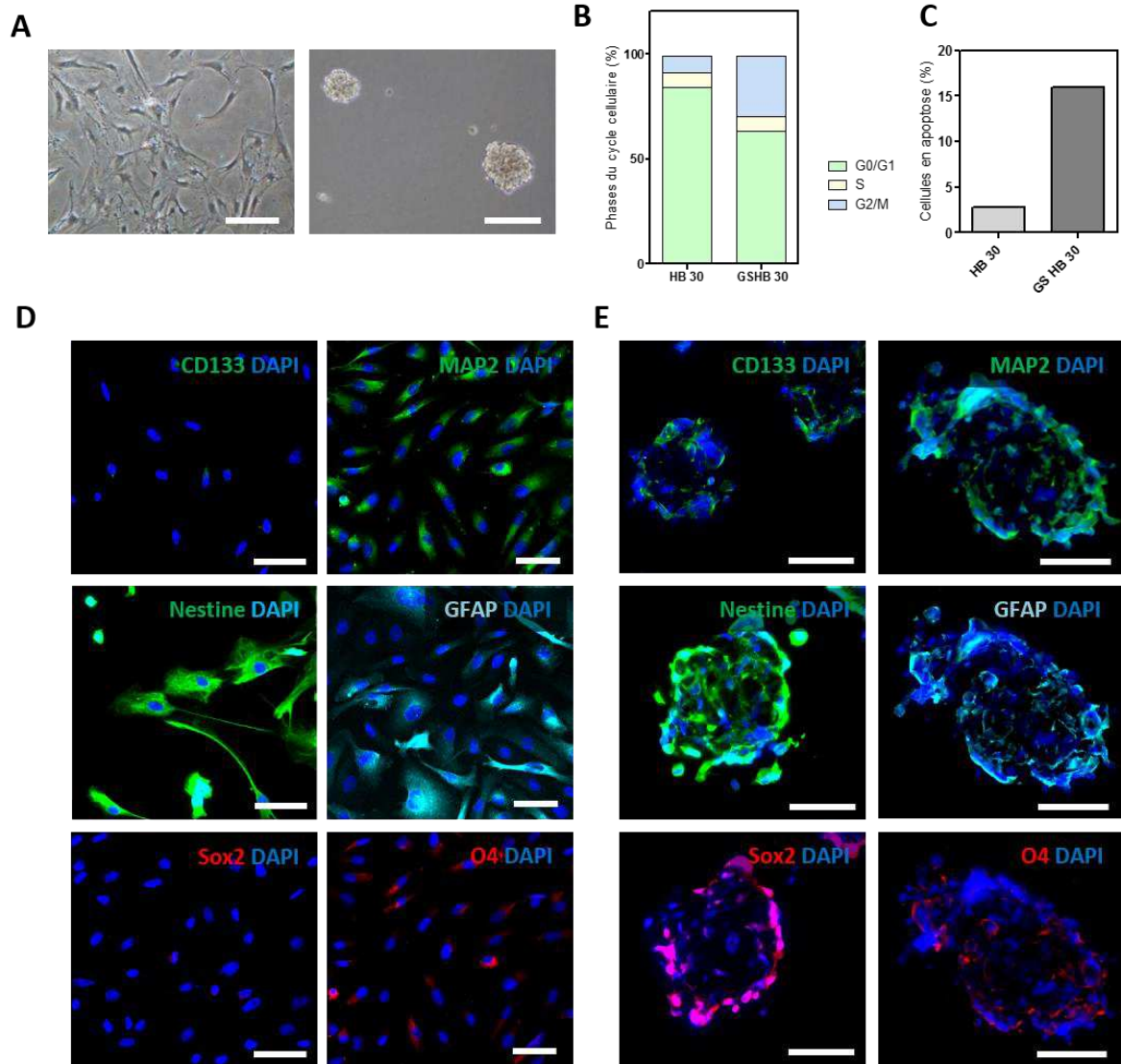


Figure 37 : Caractérisation des cellules HB 30 et établissement de leurs CSG dérivées. (A) Photographie en contraste de phase des cellules HB 30 parentales (à gauche) et des CSG dérivées GSHB 30 (à droite). **(B)** Répartition des phases du cycle cellulaire des deux lignées. **(C)** Quantité de cellules en apoptose dans les lignées HB 30 et GSHB 30. **(D-E)** Mise en évidence par immunofluorescence de l'expression des marqueurs de cellules souches (CD133, nestine et Sox2) et des marqueurs de différenciation neurale (MAP2, GFAP, O4) dans la lignée HB 30 parentale **(D)**, et dans les CSG dérivées GSHB 30 **(E)**. Barre d'échelle = 50 μ m.

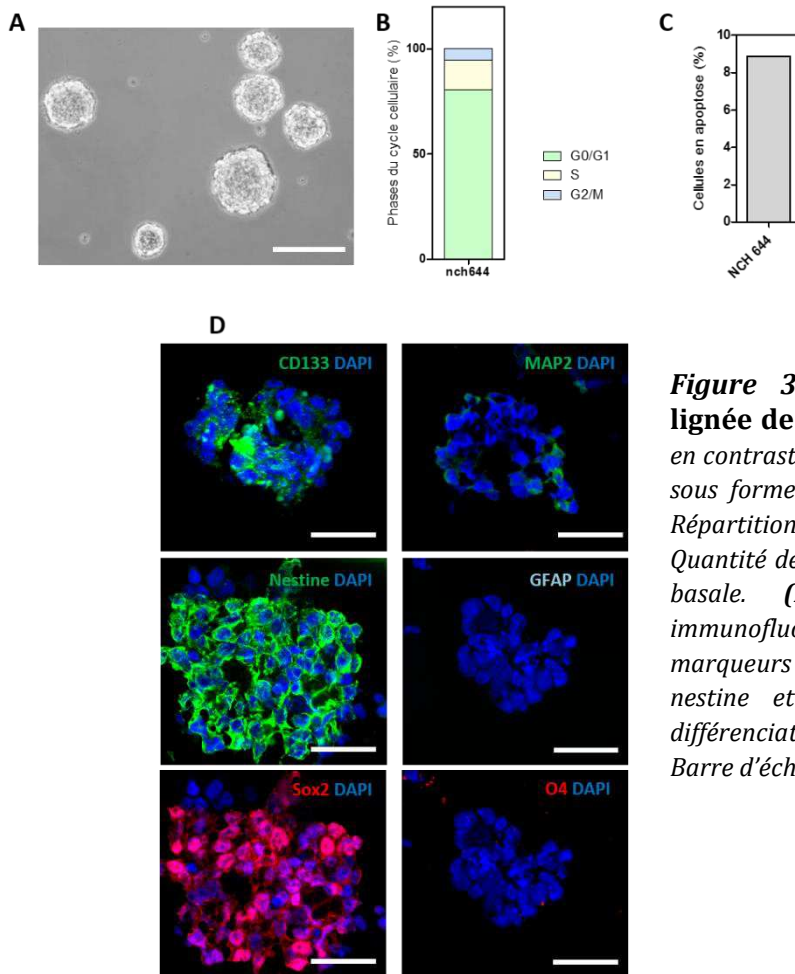
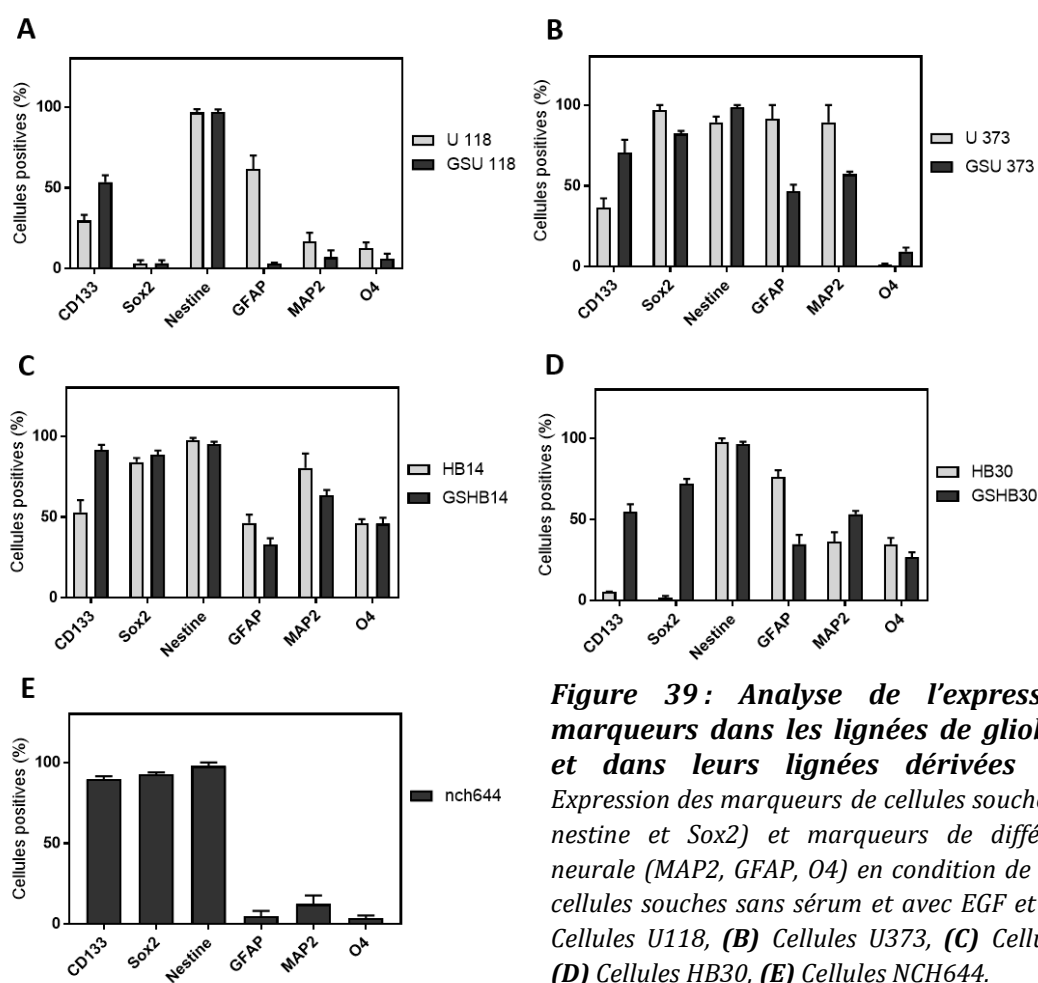


Figure 38 : Caractérisation de la lignée de CSG NCH644. (A) Photographie en contraste de phase des NCH644 en culture, sous forme de gliosphères flottantes, (B) Répartition des phases du cycle cellulaire. (C) Quantité de cellules en apoptose en condition basale. (D) Mise en évidence par immunofluorescence de l'expression des marqueurs de cellules souches (CD133, nestine et Sox2) et des marqueurs de différenciation neurale (MAP2, GFAP, O4). Barre d'échelle = 50 μ m.

3. Les CSG sont enrichies en marqueurs de cellules souches.

Pour aller plus loin dans la caractérisation phénotypique des 5 lignées de CSG, nous avons quantifié les cellules marquées dans ces préparations d'immunocytochimies présentées dans les **figures 34 à 38**. Les quantités relatives de cellules positives ont été dénombrées pour les différents marqueurs (**figures 39**), résumés dans le **tableau 8**. De manière générale, les lignées parentales expriment déjà en quantités variables des marqueurs des cellules souches, correspondant probablement à la composante des cellules souches présentes dans la lignée cellulaire d'un part, et aux cellules de GBM non souches exprimant également ce types de marqueurs d'autre part. Le pourcentage de cellules exprimant les marqueurs des cellules souches est maintenu ou augmenté dans les CSG. Cela se vérifie particulièrement pour le marqueur CD133, passant de 30 % de U 118 positives à 53,6 % de GSU 118 positives (**figure 39A**) ; de 36,5 % de U 373 à 70,5 % dans leur version CSG (**figure 39B**) ; et respectivement de 52,9 % à 91,5 % et de 5,2 % à 54 % pour les cellules

issues de biopsies HB 14 et HB 30 et leurs versions dérivées en CSG (**figure 39D ; tableau 8**).



Lignée cellulaire	Marqueurs cellules souches			Marqueurs de différenciation		
	CD133	Sox2	Nestine	GFAP	MAP2	O4
U118	29,3	3,3	96,5	61,5	16,8	12,5
GSU 118	57,6	3,3	96,9	3,2	7,1	16,1
U373	36,5	96,9	89,2	91,6	89,3	1,1
GSU 373	72,5	82,2	98,5	46,6	57,2	9,4
HB 14	52,9	83,9	97,5	46,4	80,4	46,2
GSHB 14	91,5	88,5	95,2	39	63,3	45,9
HB30	5,3	1,8	98	76,5	36,3	34,7
GSHB 30	70,5	72	97	34,7	53,2	26,7
NCH644	89,5	92,8	98	4,9	12,4	3,8

Tableau 9 : Détail des pourcentages de cellules exprimant les marqueurs de cellules souches et de différenciation dans les lignées. Lignes claires = lignées parentales ; lignes foncées = lignées CSG.

Nous avons également recherché l'expression des marqueurs de différenciation dans les populations de CSG. La **figure 39** et le **tableau 9** montrent que le nombre de cellules positives pour MAP2, GFAP et O4 diminue mais sans disparaître totalement dans toutes les lignées de CSG comparativement à leur lignée parentale (hormis MAP2 dans les GSHB 30 ; **figure 39D**). Néanmoins l'étude plus précise de la lignée de CSG NCH644 (**figure 39E**) montre de manière intéressante une forte expression des marqueurs CD133 (89,5 % ; +/- 2), Sox2 (92,8 % ; +/- 1,1) et nestine (97,9 % ; +/- 2,1), tandis que les marqueurs de différenciation ne représentent que 4,9 % (+/- 3,2) pour MAP2, 12,4 % (+/- 5,2) pour GFAP et 3,2% des cellules (+/- 1,6) pour O4.

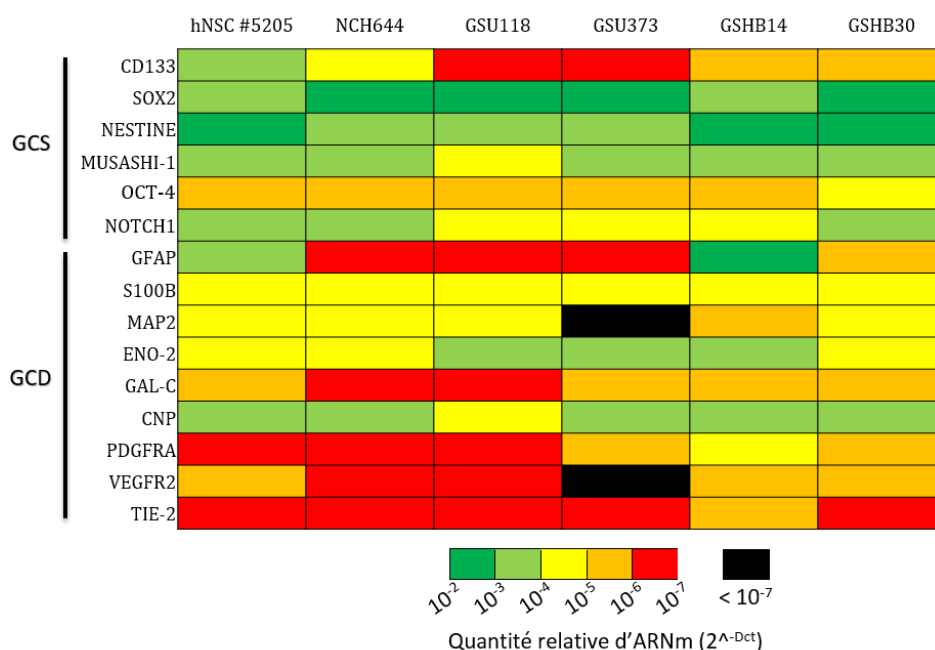


Figure 40: Analyse par RT-qPCR des niveaux d'expression relative des gènes des cellules souches et des gènes de différenciation. L'expression des gènes spécifiques des cellules souches (GCS) et celle des gènes de cellules neurales différenciées (GCD) sont classées par un code couleur (rouge = faible ; vert = élevé ; noir = sous le seuil de détection) représenté sur une échelle de log10.

Afin de connaître le profil d'expression des gènes clefs des cellules souches ou de l'état de différenciation dans les CSG générées, nous avons quantifié par RT-qPCR le niveau d'expression des marqueurs présentés jusqu'ici. Des données sur des CSN hNSC #5205 ont été ajoutées afin de donner un élément de comparaison de l'expression des gènes dans des cellules souches saines (**figure 40, colonne de gauche**). Les marqueurs des cellules souches CD133, Sox2, nestine ont été quantifiés en plus d'autres gènes spécifiques des cellules souches (cf. introduction paragraphe 2.4.4) tels que : musashi-1, OCT4 ou NOTCH1 (**figure 40**). De manière cohérente avec les marquages d'immunocytochimie présentés précédemment, les niveaux d'expression des gènes des cellules souches sont retrouvés

comme les plus fortement exprimés dans la majorité des lignées CSG. L'expression de CD133 plus faible dans les lignées GSU 118 et GSU 373, moyenne dans les autres lignées GSHB14 et GSHB 30, et plus élevée dans les CSN représente bien l'hétérogénéité de ce marqueur, également retrouvée dans la littérature. Quant aux gènes impliqués dans la différenciation, on peut noter que les marqueurs de la différenciation astrocytaire (GFAP et S100B), neuronale (MAP2, l'énolase neuronale spécifique : ENO2) sont moins exprimés par rapport aux gènes des cellules souches. De manière intéressante, l'expression des gènes impliqués dans la différenciation oligodendrocytaire est davantage variable car GalC et PDGFR-A sont faiblement exprimés alors que le marqueur CNP est plus fortement exprimé d'un rapport de 2 à 3 log₁₀. Les récepteurs impliqués dans l'angiogenèse : VEGFR2 et spécifiquement Tie-2 très peu exprimés, tandis que VEGFR2 n'est pas détecté dans les GSU 373.

Les résultats d'immunocytochimie et de quantification de l'expression des ARNm permettent de montrer de concert, que les CSG étudiées présentent une grande hétérogénéité d'expression. Les marqueurs des cellules souches y sont globalement les plus fortement exprimés et nous avons choisi les lignées NCH644 et GSHB 30 dans un premier temps pour poursuivre nos caractérisations.

4. Les CSG sont multipotentes et tumorigéniques.

Les CSG sont identifiées comme relativement indifférenciées et normalement multipotentes. Afin de tester leur capacité à se différencier, les cellules GSHB 30 et NCH644 ont été placées dans un milieu de différenciation à très faible concentration de facteurs de croissances (2 ng/ml bFGF et EGF) et avec 0,5 % de sérum, pendant 5 jours sur un substrat de poly-L-ornithine. Les deux lignées testées ici montrent qu'elles sont capables de générer des cellules exprimant GFAP, MAP et O4 (**figure 41**). Un marquage en immunofluorescence a permis de révéler plusieurs profils d'expression. En effet, dans les deux lignées, les marqueurs peuvent être exprimés seuls ou combinés. Ce sont ainsi 57,6 % (+/- 2,9) de cellules MAP2 +, 58,6 % (+/- 3,1) de cellules GFAP + et 11 % (+/- 1,1) de cellules O4 + dans la lignée NCH644 (**figure 41A**). Dans les lignée GSHB 30, les ratios sont proches des précédents avec 62 % (+/- 6) de cellules exprimant MAP2, 75,7 % (+/- 3,2) des cellules qui expriment GFAP et finalement 17,3 % (+/- 1,7) sont positives pour O4.

La tumorigénicité est une propriété critique des CSG. C'est pourquoi 10^5 cellules NCH644 et GSHB 30 ont été greffées dans le striatum gauche de souris adultes ($n \geq 4$ par groupe). Après 30 jours de croissance, les souris ont été sacrifiées et les cerveaux congelés puis tranchés au cryostat pour subir une coloration au Giemsa, permettant d'apprécier la présence de tumeurs. Les cellules NCH644 entraînent 100% de tumeurs ($n = 10$ animaux) très envahissantes, nettement délimitées du parenchyme sain et dont la croissance s'étend presque systématiquement au corps calleux et au cortex cérébral (**figure 42A**). La lignée GSHB 30 permet de générer 100 % de tumeurs ($n = 4$ animaux) mais de plus petites tailles, moins compactes mais plus infiltrantes et invasives aux bords très irréguliers (**figure 42B**).

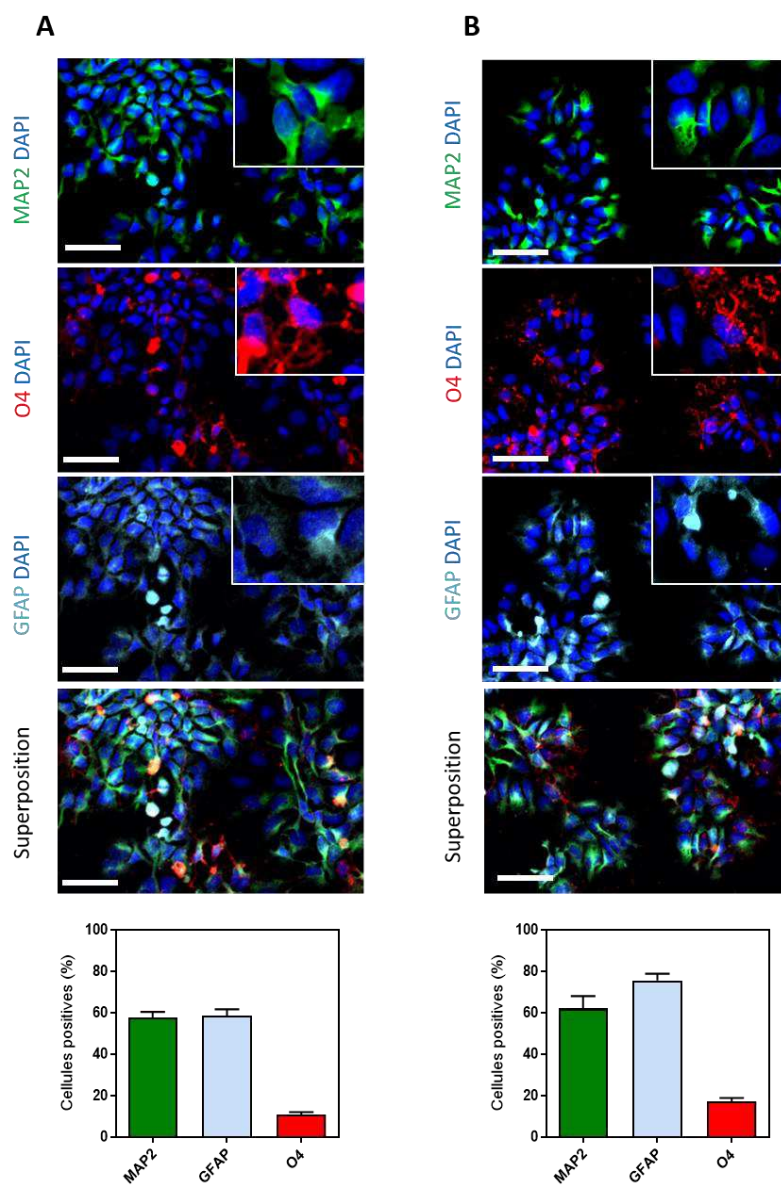


Figure 41: Expression des marqueurs de différenciation dans les CSG NCH644 et GSHB 30 cultivées en présence de sérum et sans facteurs de croissance. Photographies en fluorescence représentatives de l'expression des marqueurs neuronaux (MAP2 : vert), oligodendrocytaire (O4 : rouge) et astrocytaire (GFAP : turquoise). Les histogrammes représentent la quantification des cellules exprimant les différents marqueurs. **(A)** Lignée NCH644. **(B)** Lignée GSHB 30. Barre d'échelle = 50 μ m.

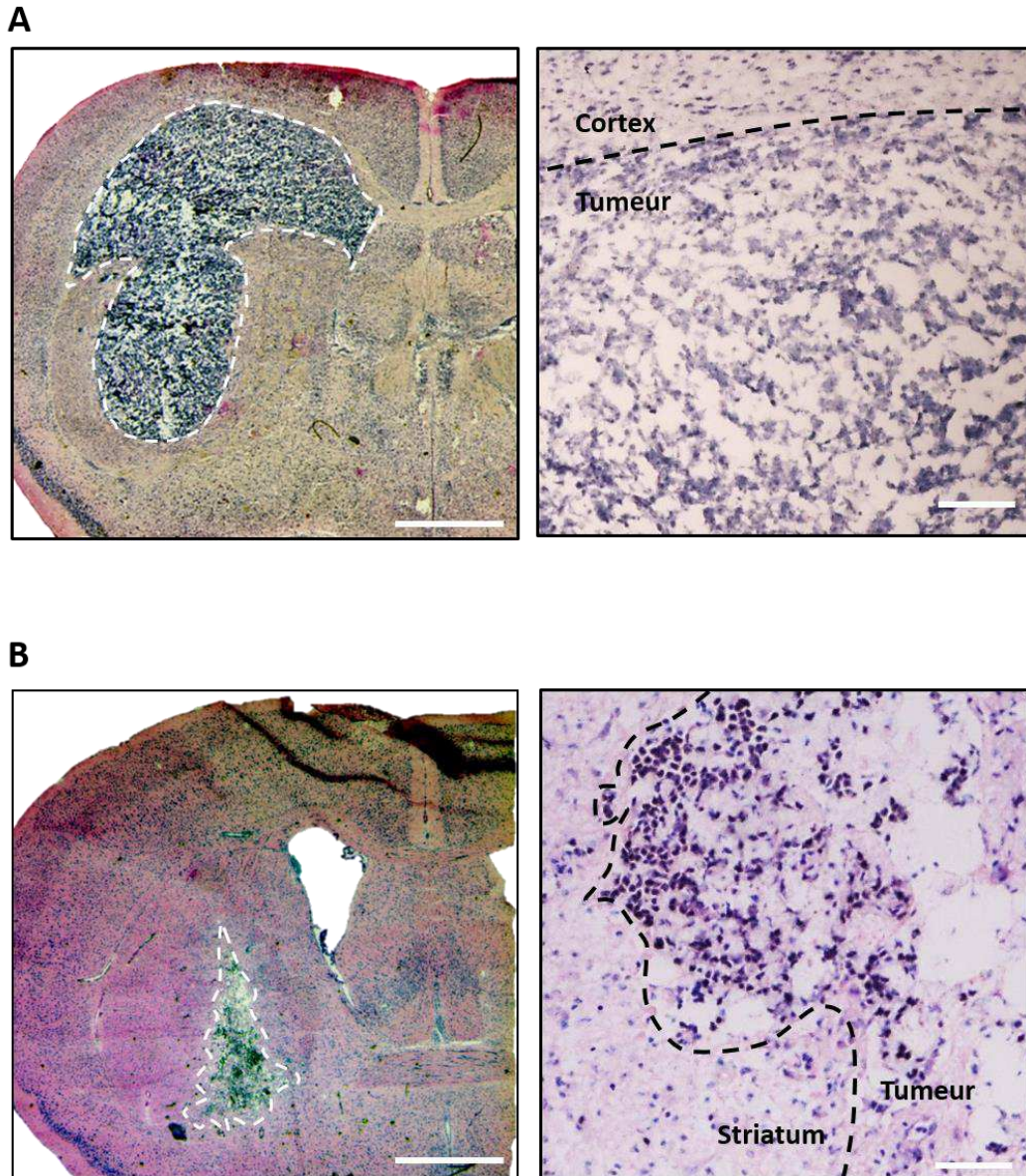


Figure 42 : Mise en évidence de la tumorigénicité des cellules NCH644 et GSHB30. Photographies à faible grossissement (12x, à gauche) et fort grossissement (200x à droite) de greffes intrastriatales de 10^6 cellules après 30 jours, observées par coloration de Giemsa sur coupes cryostat. Les tumeurs sont entourées d'un trait pointillé. **(A)** Lignée NCH644. **(B)** Lignée GSHB30. Barres d'échelle : champ large = 1 mm ; grossissement = 100 μ m.

PARTIE II : Evaluation de l'impact des peptides transmembranaires MTP-NRP1 et MTP-PlexA1

1. Résultats précédents et intérêt de l'étude

Mon laboratoire d'accueil a développé des peptides ciblant les domaines transmembranaires des récepteurs NRP1 et Plexin-A1, comme décrit dans l'introduction. Initialement, l'équipe a recherché l'intérêt du peptide ciblant NRP1 (MTP-NRP1) comme agent thérapeutique appliqué à l'inhibition de la croissance des cellules de glioblastome. Il a été démontré de nombreux effets anti-prolifératif, anti-migratoire et anti-angiogénique de ce peptide sur les GBM (Nasarre et al., 2010). Néanmoins, l'impact potentiel de ces peptides sur la sous-population des CSG n'a pas encore été recherché. Pourtant, nous avons vu que ces cellules sont suspectées d'être fortement impliquées dans la qualité des réponses thérapeutiques. Un des objectifs de thèse était donc de procéder à l'étude *in vitro* et *in vivo* de MTP-NRP1 sur les CSG afin d'apporter des données complémentaires de compréhension de son effet. Comme NRP1 nécessite de dimériser avec ces co-récepteurs afin de transmettre un signal intracellulaire (Püschel, 2002), j'ai également participé à étudier l'effet du peptide MTP-PlexA1 ciblant Plexine-A1 en m'attachant tout particulièrement à l'action sur les CSG. Ces travaux, inclus dans une étude plus large de l'impact de MTP-PlexA1 sur la progression du GBM viennent d'être publiés dans la revue *Oncotarget* (Jacob et al., 2016) placée en **annexe 2** de cette thèse.

2. Les récepteurs neuropiline-1 et plexine-A1 sont surexprimés dans les CSG

Dans le but de savoir si les thérapies basées sur les peptides MTP peuvent être appliquées aux CSG, nous avons voulu savoir si ces cellules expriment les récepteurs ciblés. Pour cela, nous avons utilisé la lignée de CSG NCH644 mise en place par le groupe de C. Hérold-Mende. Cette lignée servira également pour la totalité des études sur les composés thérapeutiques. Puisque les CSG partagent de nombreuses caractéristiques avec les CSN, nous avons effectué les mêmes vérifications d'expression de ces récepteurs afin de déterminer le risque d'effets indésirables liés à un impact sur les cellules souches normales. Pour les CSG, un marquage par immunofluorescence sur des cryosections de gliomasphères de 10 µm d'épaisseur montre que les cellules expriment le marqueur cytoplasmique des

cellules souche nestine, ainsi que les deux récepteurs d'intérêt NRP1 et plexine-A1 (**figure 43A**). De même, les CSN caractérisées à partir d'une culture bidimensionnelle sur un substrat de poly-L-ornithine et de laminine, expriment toutes le marqueur nestine et sont positives pour les marquages de NRP1 et de plexine-A1 (**figure 43B**).

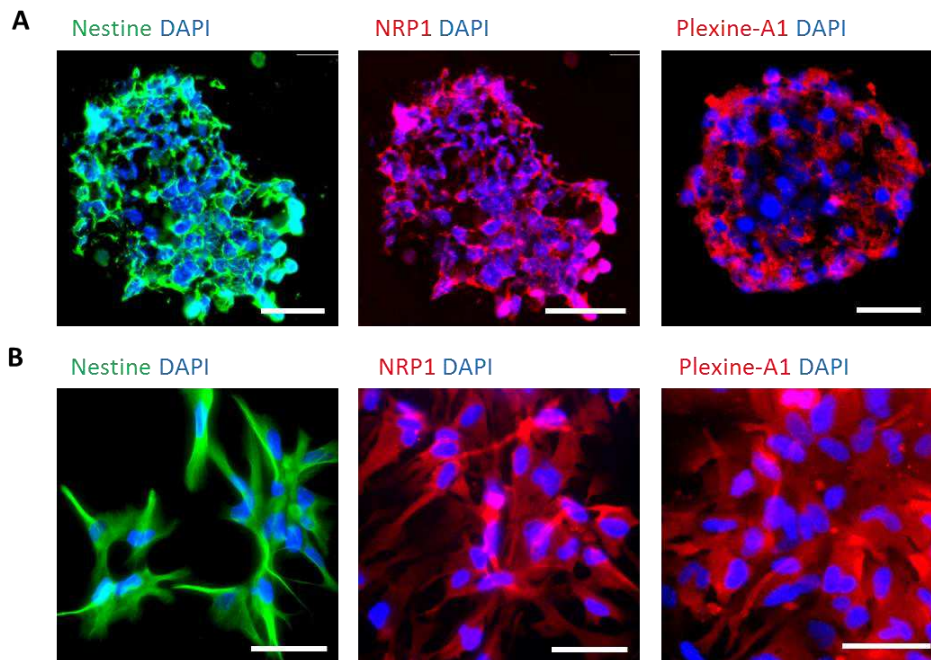


Figure 43 : Expression des récepteurs neuropiline-1 et plexine-A1 dans les CSG et les CSNh. Microphotographies représentatives de l'expression du marqueur cytoplasmique des cellules souches nestine (vert) à gauche et des récepteurs neuropiline-1 (rouge) au milieu et plexine-A1 (rouge) à droite. **(A)** Immunocytochimie sur coupe cryostat de 10 μm d'épaisseur de sphères de NCH644. **(B)** Immunocytochimie sur culture de cellules souches neurales humaines (hNSC5205). Barre d'échelle = 50 μm .

De plus, l'analyse par RT-qPCR de l'expression des transcrits présentée dans la **figure 44** montre que NRP1 et plexine-A1 sont toutes deux fortement surexprimées dans les CSG, comparativement à d'autres tissus ou lignées cellulaires. En effet, NRP1 et plexine-A1 sont respectivement 39,6 fois (**figure 44A**) et 22,5 fois (**figure 44B**) plus exprimées dans les NCH644 que dans un échantillon représentatif de 5 cerveaux sains. NRP1 est également 7,8 fois plus exprimée dans les CSG que dans un échantillon d'astrocytome de grade II, tandis que les niveaux d'expression du récepteur sont équivalents entre les CSG et la moyenne de 17 glioblastomes (**figure 44**). Pour l'ARNm de plexine-A1, on note une surexpression très forte comparativement à l'astrocytome de bas grade (100 fois) ainsi qu'une augmentation de 5,3 fois par rapport à la moyenne des 17 glioblastomes (**figure 44B**). Il est intéressant de

noter que les deux récepteurs NRP1 et PlexA1 sont tous deux surexprimés de respectivement 2,3 fois et 3 fois par rapport aux cellules souches neurales humaines hNSC#5205 (**figure 44A, B**). Ainsi, la surexpression des récepteurs dans les CSG au moins par rapport au cerveau sain et au CSN humaines (et par rapport aux GBM dans le cas de plexine-a1) permet de les valider comme cibles thérapeutiques spécifique de cette sous population.

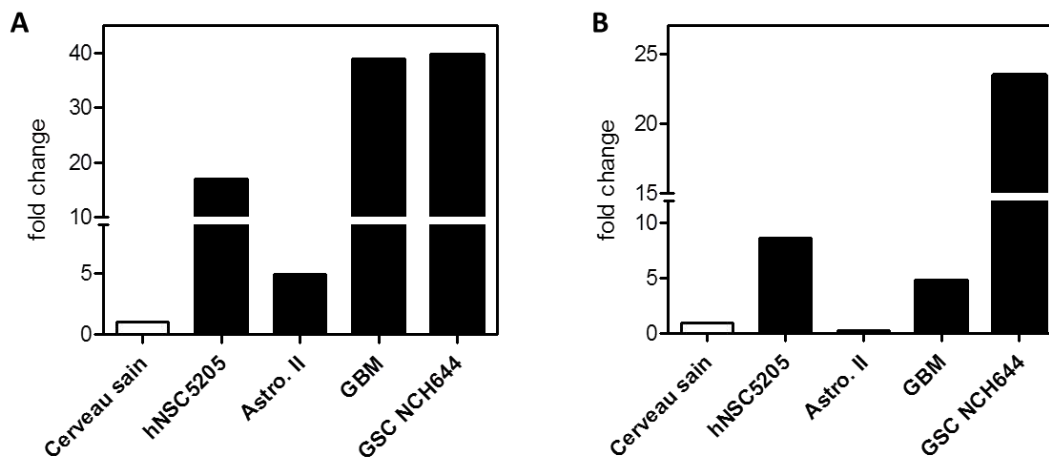


Figure 44 : Les récepteurs neuropiline-1 et plexine-A1 sont surexprimés dans la lignée de CSG nch644. Expression de l'ARNm de neuropiline-1 et de plexine-A1 dans les CSG nch644 par rapport à différents tissus. L'expression obtenue par RT-qPCR est normalisée à 1 par rapport au cerveau sain. **(A)** Différence d'expression du récepteur neuropiline-1. **(B)** Différence d'expression du récepteur plexine-A1. Cerveau sain ; hNSC5205 = cellules souches neurales humaines ; Astro II = astrocytome de grade II ; GBM = moyenne de 17 glioblastomes; CSG = nch644.

3. Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 inhibent sélectivement la croissance des CSG *in vitro*.

Afin de vérifier si les peptides développés au laboratoire sont de bons candidats pour cibler les CSG et épargner les CSN, nous avons effectué un premier test métabolique de prolifération MTS durant 24 heures. Brièvement, $5 \cdot 10^3$ cellules sont déposées dans des puits de plaque 96 puits contenant du milieu de culture avec le peptide MTP-NRP1 à 10^{-7} M, ou avec le peptide MTP-PlexA1 à 10^{-7} M ou avec leur condition contrôle (véhicule LDS). Dans ce contexte, le peptide MTP-NRP1 montre un effet, certes modeste mais significatif de diminution de la prolifération de 6 % (+/- 1 ; $p = 0,0042$) par rapport à la condition traitée avec le LDS (**figure 45A**). De manière semblable et plus intense, le traitement des CSG avec le peptide MTP-PlexA1 induit une baisse de la prolifération de 11 % (+/- 0,9 ; $p < 0,0001$)

par rapport à son témoin (**figure 45C**). Par contre, il apparaît que ces mêmes peptides délivrés dans les mêmes conditions n'impactent pas la prolifération des cellules souches neurales normales hNSC#5205 (**figure 45B, C**). Ceci suggère un effet sélectif des deux peptides sur les CSG sans affecter significativement les CSN.

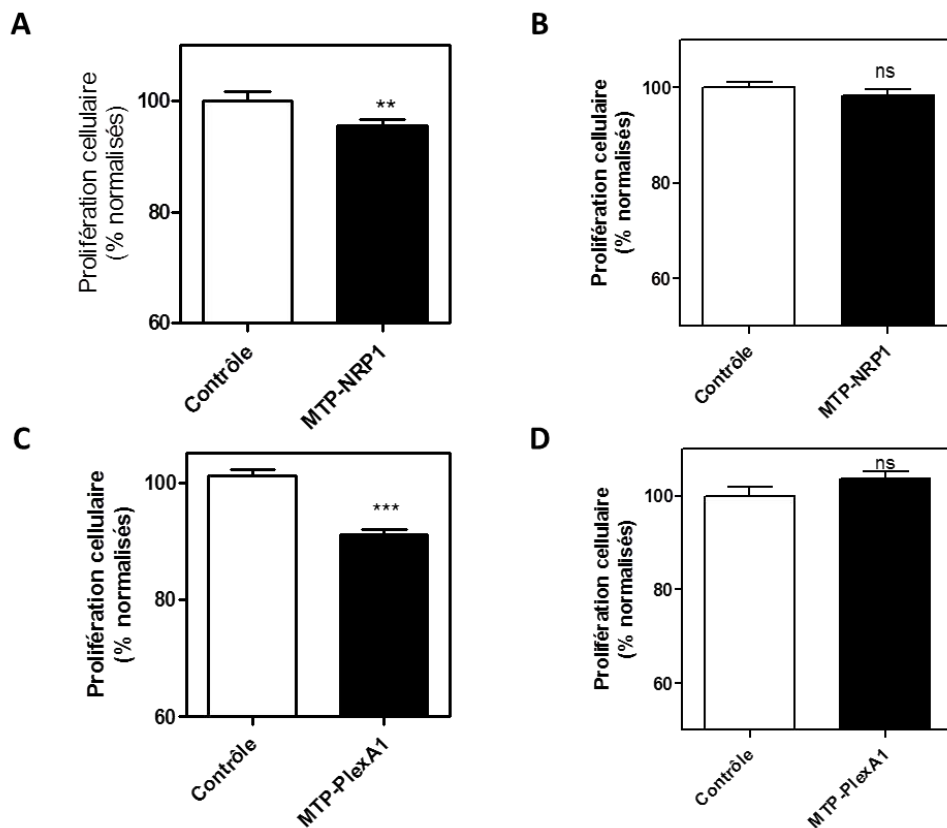


Figure 45: Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 ont un effet anti-prolifératif spécifique des CSG mais pas des CSN. Histogrammes représentant les pourcentages de prolifération des cellules traitées avec MTP-NRP1 (**A, B**) ou MTP-PlexA1 (**C, D**) à $t = 0$ à 10^{-7} M par rapport au contrôle véhicule (LDS 72 μ M). (**A, C**) Cellules CSG nch644. (**B, D**) Cellules hNSC5205. Mann Whitney, ns = non significatif, *** $p < 0,001$. Moyennes +/- SEM.

Pour confirmer cet effet sur les CSG nous avons conduit un test standard des cellules souches : le test de formation de sphères. Ce test permet de mesurer la capacité d'une cellule souche à l'autorenouvellement et la prolifération clonogénique en évaluant le nombre de cellules uniques capables de reformer des sphères après quelques jours dans du milieu de culture (Pastrana et al., 2011). Comme les conditions de ce test exigent un très faible nombre de cellules (30 cellules par puits) déposées dans les puits d'une plaque 96 puits, il a fallu établir une gamme de concentration de traitement avec le peptide MTP-NRP s'étalant

de 10^{-7} à 10^{-12} M (**figure 46A**) et permet de montrer un effet maximal à 10^{-9} M (-33,8 %, +/- 8,9 ; $p < 0,05$).

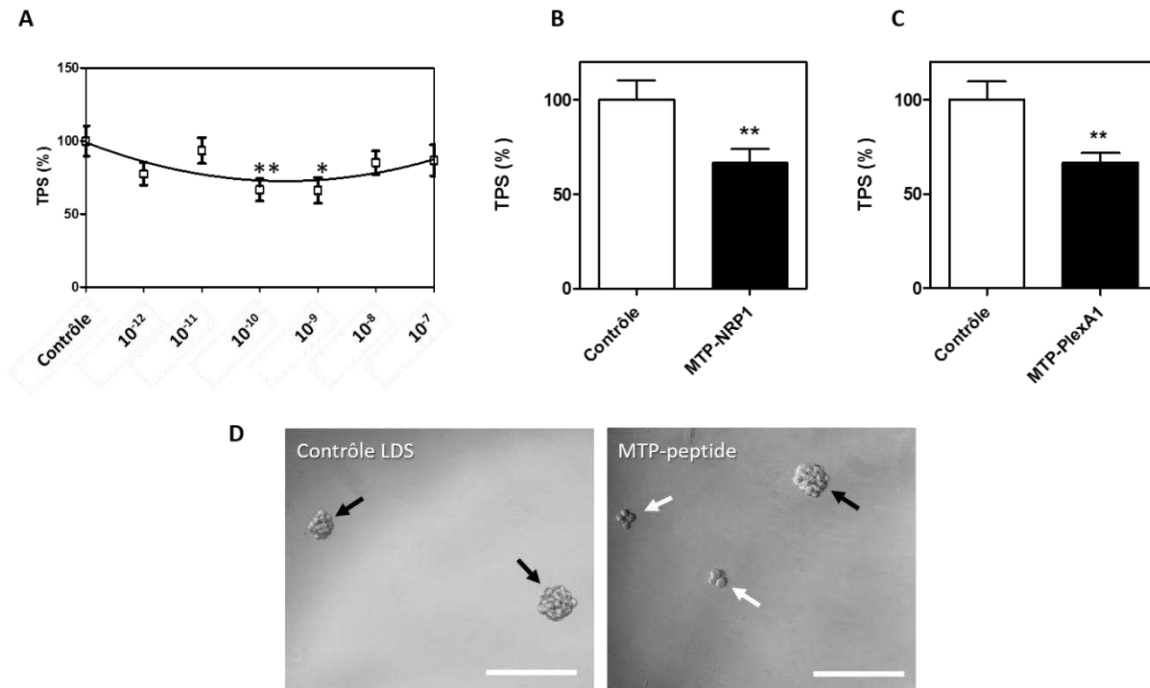


Figure 46 : Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 inhibent la formation de gliosphères. (A) Test de formation de sphère en gamme de concentration de traitements de MTP-PlexA1 sur des CSG, normalisée par rapport au contrôle LDS. (B) Taux de production de sphères (TPS) des CSG nch644 après 4 jours traitées avec MTP-NRP1 à 10^{-9} M ou le contrôle LDS à 720 nM, (C) ou traité avec MTP-PlexA1 contre son contrôle LDS. Mann Whitney, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. +/- SEM (D) Photographies représentatives des sphères après 4 jours dans la condition contrôle (gauche) ou traitée avec les peptides (droite). Flèches noires = édifice > 8 cellules (sphère) ; flèches blanches = édifice < 8 cellules (non sphère). Barre d'échelle = 100 μ m.

Nous avons donc sélectionné la concentration de 10^{-9} M pour traiter les CSG dans le test de formation de sphères. Ainsi après 4 jours de culture, les deux peptides ciblant NRP1 et PlexA1 impactent notablement la clonogénicité des cellules NCH644 en réduisant la formation de sphères de 33,5 % (+/- 7,6 ; $p = 0,0085$) pour MTP-NRP1 (**figure 46B**) et de 33,7 % (+/- 5,2 ; $p = 0,0015$) pour MTP-PlexA1 (**figure 46C**). Cet effet, quantifié par le comptage systématique du nombre de cellules formant les édifices flottants est représenté dans la **figure 46D**. Dans ce test, seuls les édifices cellulaires composés d'au moins 8 cellules sont comptés comme sphères. Les deux peptides montrent une activité comparable de diminution de la croissance des CSG *in vitro* (**figure 46**).

4. MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 ont des effets opposés sur la tumorigénèse des CSG.

Afin d'étudier l'effet des peptides *in vivo*, nous avons greffé les CSG dans des modèles hétérotopiques et orthotopiques dans des souris immunodéprimées. Tout d'abord nous avons voulu exploiter le potentiel de MTP-NRP1 dans un modèle de greffe sous-cutanée avec des CSG constitutivement fluorescentes, afin de suivre la tumorigénèse et l'accroissement des tumeurs. Les CSG NCH644-mCherry ont été greffées en bilatéral dans le flanc de souris de manière à obtenir un côté avec des cellules prétraitées avec le peptide et l'autre côté avec des cellules traitées avec le véhicule seul (contrôle, **figure 47A**). L'acquisition de fluorescence sur les souris vivantes a été faite 5 jours après la greffe, permettant un compromis entre la possibilité de détection de fluorescence (masse tumorale suffisante) et la durée d'activité des peptides (au moins 72 heures (Popot et al., 2011; Nasarre et al., 2010)). Dans ces conditions, toutes les cellules prétraitées et greffées ont généré des tumeurs détectables (**figure 47A, B**) dans les souris.

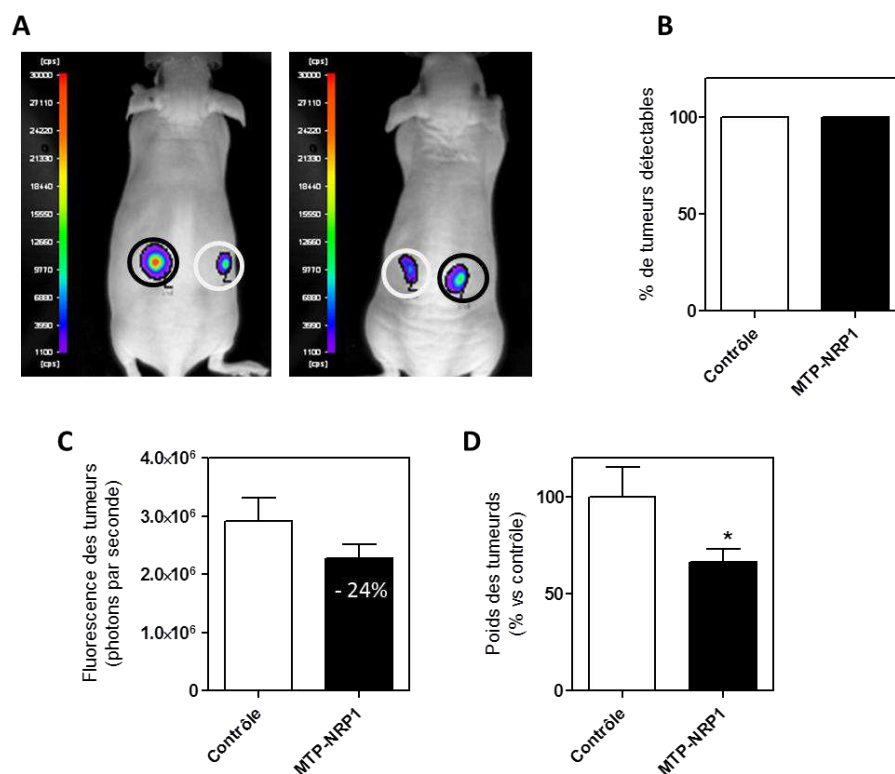


Figure 47 : Le peptide MTP-NRP1 inhibe la croissance des tumeurs sous-cutanées de CSG (A) Photographies de fluorescence représentatives de la croissance des CSG nch644-mCherry après 5 jours. Le cercle blanc désigne la greffe de cellules prétraitées avec MTP-NRP1 et le cercle noir désigne la condition contrôle. **(B)** Nombre de souris portant des tumeurs (exprimé en pourcentage, 10 souris par groupe). **(C)** Quantification de la fluorescence des tumeurs dans chaque groupe, exprimée en photons par seconde. **(D)** Représentation du poids final des tumeurs exprimé en pourcentage de réduction par rapport au contrôle. Test T de Student, * $p < 0,05$. Moyennes +/- SEM.

Cependant, on observe une diminution de l'intensité de fluorescence de - 24 % ($p = 0,22$), passant de $2,9 \cdot 10^6$ coups par seconde (cps, $\pm 2,7 \cdot 10^5$) dans la condition contrôle à $2,3 \cdot 10^6$ cps ($\pm 2,2 \cdot 10^5$) dans la condition traitée (**figure 47C**). Cette différence qui n'atteint pas le seuil statistique de significativité est en revanche associée à une diminution significative du poids des tumeurs (- 34 % ; $p = 0,042$ par rapport aux tumeurs contrôles, **figure 47D**). Nous avons ensuite décidé de greffer des cellules NCH644-mCherry traitées ou non avec le peptide ciblant NRP1, dans le striatum de souris immunodéprimées afin suivre la croissance de la tumeur durant 30 jours. Après 5 jours post-chirurgie, les souris ont fait l'objet de l'administration d'une dose de peptide MTP-NRP1 à $1 \mu\text{g} / \text{Kg}$ ou de contrôle LDS par injection intrapéritonéale, tous les 3 jours pendant 25 jours. A partir du 23^{ème} jour, les tumeurs ont pu être détectées. Durant les 7 derniers jours de l'expérience, comme le montre la **figure 48A**, les CSG du groupe contrôle forment des tumeurs grossissant exponentiellement, tandis que les souris traitées avec MTP-NRP1 ont des tumeurs dont l'accroissement est drastiquement diminué. L'analyse quantitative de fluorescence cumulée montre une forte réduction se traduisant par - 62 % de signal fluorescent moyen au 30^{ème} jour (passant de 9,7 unités arbitraires (UA) dans le groupe contrôle, à 3,7 UA dans le groupe ayant reçu le peptide ; $p = 0,03$) (**figure 48B**).

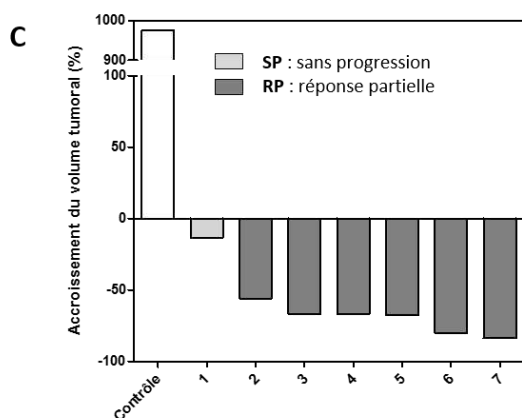
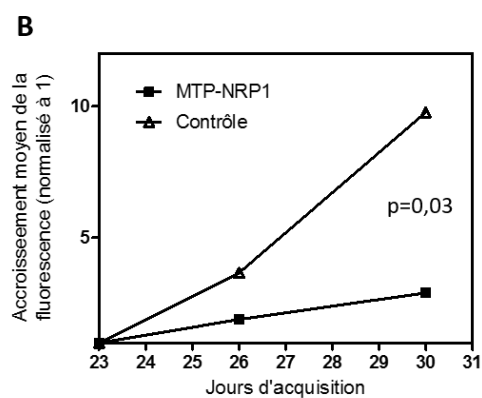
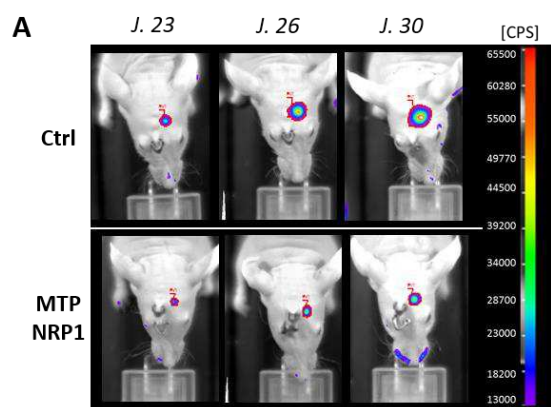


Figure 48 : Le peptide MTP-NRP1 inhibe la croissance des tumeurs intracérébrales issues de CSG (A) Photographies de fluorescence (CPS) de la croissance des nch644-mCherry aux 23^e, 26^e et 30^e jours dans les 2 conditions. (B) Taux d'accroissement cumulé des groupes contrôle et MTP-NRP1 aux J23, 26 et 30. Mann et whitney, $p = 0,03$. (C) Graphique en cascade de la variation de croissance entre le jour 23 et le jour 30 des tumeurs de chaque souris traitée (barres grises) par rapport à la moyenne des contrôles (barre blanche).

Les résultats présentés dans la **figure 48C** montrent le ralentissement de l'accroissement tumoral dans les souris du groupe traité avec le peptide. Ce mode de représentation dit « en cascade » permet d'illustrer la variation de croissance de la masse tumorale de chaque souris traitée (7 animaux ayant une tumeur détectable en fluorescence) entre le 23^e et le 30^e jour, comparativement à la moyenne d'accroissement du groupe contrôle. Il permet notamment de classer les souris en catégories de répondeuses au traitement selon une partie des critères de MacDonald³¹ (Wen et al., 2010 ; Macdonald et al., 1990). Ainsi, 85 % des souris (6/7) sont en réponse partielle (RP - 100 < score < - 50) et 15 % (1/7) se retrouve dans la catégorie sans progression (SP) comprise entre - 50 % et + 25 % (**figure 48C**). La totalité de ces résultats démontrent une franche activité de MTP-NRP1 contre la prolifération des CSG *in vitro* et leur croissance tumorale *in vivo*.

Finalement, j'ai également procédé à l'analyse du peptide MTP-PlexA1 dans les mêmes conditions expérimentales. Pour cela nous avons procédé exactement selon le même protocole de greffes hétérotopiques sous-cutanées présenté précédemment. Ici, les CSG NCH644-mCherry ont été pré-incubées pendant 60 minutes avec du peptide MTP-PlexA1 à 10⁻⁷ M ou avec son contrôle LDS, avant d'être greffées en bilatéral dans des souris immunodéprimées (**figure 49A**).

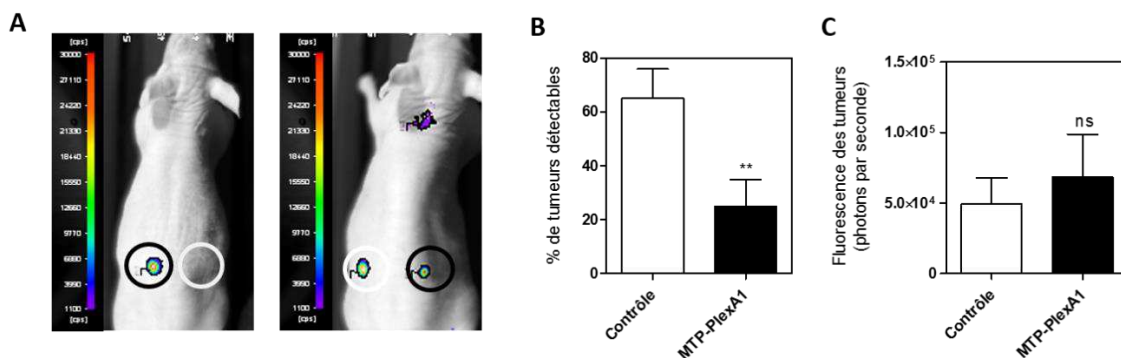


Figure 49 : Le peptide MTP-PlexA1 bloque l'initiation des tumeurs sous-cutanées de CSG (A) Photographies de fluorescence représentatives de la croissance des CSG NCH644-mCherry après 5 jours. Le cercle blanc désigne la greffe de cellules prétraitées avec le peptide et le cercle noir désigne le contrôle. **(B)** Nombre de souris portant des tumeurs en % (10 souris par groupe). **(C)** Quantification de la fluorescence des tumeurs dans chaque groupe, exprimée en photons par seconde. Test T de Student ; ***p* = 0,008. Moyennes +/- SEM.

³¹ Critères de MacDonald : ces critères décrits pour la première fois en 1990 ont été remis à jour en 2010. Normalement basés sur des analyses CT, puis IRM, ils sont utilisés en clinique et maintenant en préclinique afin d'évaluer l'efficacité des traitements dans les tumeurs cérébrales de haut grade. Ils se basent sur la taille en 2 dimensions des lésions et permettent de regrouper les individus en plusieurs classes selon la réponse au traitement. Progression tumorale (PR : score > 25 % ; Sans progression (SP : - 50 % < score < 25 %) ; Réponse partielle (RP : - 100 % < score < - 50 %) ; Réponse complète (RC : score = - 100). Les scores sont associés à l'état clinique du patient (Wen et al., 2010).

Après 5 jours de croissance, l'acquisition des images par fluorescence montre que 65 % des souris (14/20) du groupe contrôle présentent des tumeurs détectables pour seulement 5 souris sur 20 (25 %) dans le groupe traité avec le peptide anti-PlexA1 (**figure 49B**). Ce résultat suggère que MTP-PlexA1 est capable de perturber l'initiation de la croissance tumorale (- 62 %, $p = 0,008$). De manière surprenante, la moyenne du signal de fluorescence émis par les 4 tumeurs ayant pu se développer (**figure 49C**) dans le groupe traité (7.10^4 CPS ; +/- $3,10^4$) est similaire à celle des 14 tumeurs du groupe contrôle (5.10^4 CPS ; +/- $1,8.10^4$) laissant penser qu'une fois la croissance démarrée, l'inhibition de Plexine-A1 n'est pas suffisante pour bloquer la croissance des tumeurs.

PARTIE III : Développement du système d'expression mosaïque inducible iMESYS

1. Elaboration et validation des vecteurs plasmidiques et des vecteurs lentiviraux

De nouvelles thérapies du GBM tentent de s'appuyer sur la composante différenciée des CSG afin d'augmenter la sensibilité des cellules aux traitements. Dans le but de pouvoir suivre l'expression de marqueurs de différenciation en direct dans des cellules vivantes nous avons développé le système inducible d'expression mosaïque (iMESYS).

Il a tout d'abord fallu concevoir un système de 4 vecteurs, compatibles et complémentaires entre eux, pouvant tous être simultanément transduits dans des cellules. Compte tenu du caractère prolifératif de certaines lignées de CSG et de notre volonté de pouvoir étudier ces cellules sur le long terme, nous avons développé des vecteurs intégratifs. Les constructions comprennent (cf. détail des protocoles de construction comme présenté dans la partie matériel et méthodes) 3 séquences neurales et une séquence d'expression endothéliale. Le choix de vecteurs lentiviraux s'est fait après plusieurs tests d'infection et d'expression d'une séquence de la GFP contrôlée par le promoteur du CMV par transfection ou par utilisation de vecteurs rétroviraux. Nous avons sélectionné les vecteurs lentiviraux (squelette plasmidique pLenti), puisqu'ils ont été les seuls à permettre l'expression de la GFP dans les CSG, des cellules particulièrement difficiles à transfecter/infecter dans nos mains. La **figure 50** montre que les 4 constructions sont basées sur le même principe de régulation et de contrôle de l'ADN. Le promoteur spécifique du type cellulaire (MAP2 pour les neurones ; GFAP pour les astrocytes ; CNP pour les oligodendrocytes ; Tie-2 pour les cellules endothéliales) est placé en amont du rapporteur fluorescent dont il contrôle l'expression. La séquence WPRE, un élément de stabilisation des ARNm est placé directement derrière le rapporteur fluorescent pour en favoriser sa transcription. Une séquence indépendante permettant la sélection des cellules transduites est flanquée derrière le WPRE. Elle se compose du promoteur humain de la phosphoglycérate kinase (hPGK) ubiquitaire dans les cellules permettant de faire exprimer des enzymes de résistance aux antibiotiques. Chaque construction comporte ainsi une cassette de sélection différente (puromycine, blasticidine, néomycine et zéocine) afin de sélectionner toutes les cellules ayant reçu le vecteur sans tenir compte de l'état d'expression du rapporteur fluorescent. Les

constructions plasmidiques ont finalement été validées en effectuant des digestions enzymatiques dans les séquences d'intérêt des plasmides (**figure 50B**) et par séquençage. Ainsi la construction MAP2-mCherry a été validée en la digérant avec l'enzyme EcoRI, coupant sur deux sites de restriction pour générer une séquence d'ADN de 2597 pb, confirmée par le gel de migration (**figure 50B**). De manière analogue les séquences GFAP-GFP, CNP-CFP et Tie2-mVenus ont été validées par digestion avec des couples d'enzymes à coupure unique (**figure 50A**) et ayant permis d'extraire des fragments d'ADN de tailles cohérentes avec les valeurs attendues (GFAP-GFP : 3809 pb ; CNP-CFP : 3266 pb ; Tie2-mVenus : 1608 pb, **figure 50B**). Quatre vecteurs lentiviraux indépendants ont pu être synthétisés pour servir par la suite à la transduction des différents lots de cellules présentés dans les travaux.

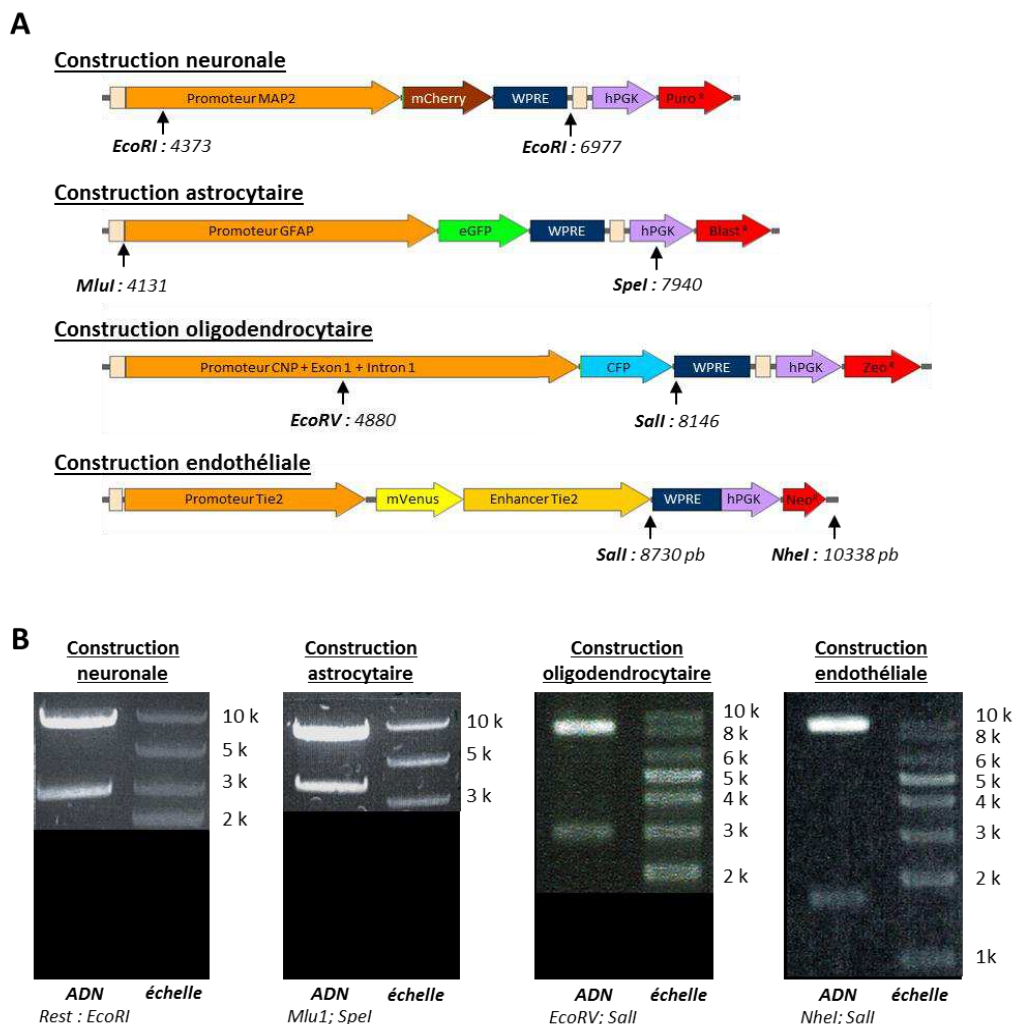


Figure 50 : Génération des constructions plasmidiques d'ADN du système iMESYS. (A) Cartes des séquences plasmidiques des 4 constructions lentivirales. L'ADN est représenté dans le sens de transcription de gauche (5') à droite (3'). Les sites de restriction permettant la validation des séquences sont indiqués par les flèches noires, (B) Gels d'électrophorèse montrant la validation des plasmides coupés avec des enzymes de restriction indiquées.

2. Validation de la spécificité d'expression du système iMESYS

La première étape de validation des constructions iMESYS a été de vérifier la spécificité d'expression des rapporteurs dans des cellules n'exprimant pas les protéines cibles des promoteurs et servant ainsi de témoins négatifs. Pour cela, nous avons sélectionné les cellules COS-7 après avoir effectué des immunomarquages contre les protéines spécifiques des lignages neuraux et endothélial. En effet, les COS-7 n'expriment aucun des marqueurs (MAP2, CNP, GFAP, Tie-2) reliés au système iMESYS (**figure 51A**).

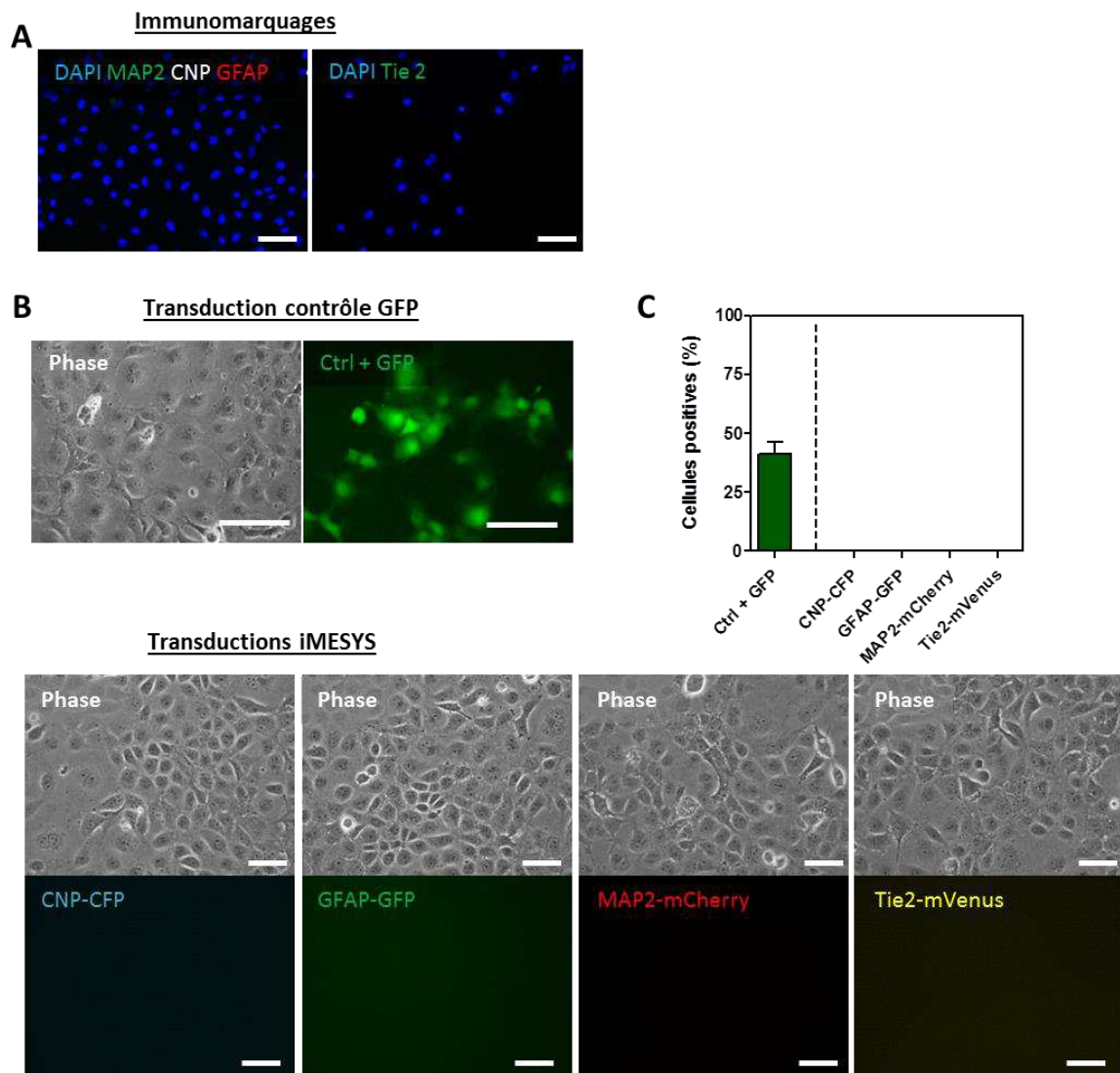


Figure 51 : Validation par contrôle négatif du système de vecteurs lentiviraux iMESYS dans des cellules COS-7. (A) Photos d'immunomarquages montrant l'absence d'expression des marqueurs MAP2, CNP, GFAP et Tie2 dans les COS-7. **(B)** Photographies représentatives de l'infection des cellules avec les lentivirus iMESYS à une MOI = 3, sans sélection antibiotique. Panel du haut : transduction avec le lentivirus contrôle CMV-GFP ; panel du bas : transductions avec les constructions iMESYS. **(C)** Quantification de l'expression des rapporteurs fluorescents. Barres d'échelle = 50 μ m.

Pour s'assurer de la faisabilité de l'infection des cellules COS-7 avec les 4 lentivirus iMESYS, je les ai infectées à une M.O.I =3 avec un vecteur contrôle positif exprimant la GFP de manière constitutive (**figure 51B**). La quantification des cellules effectuée entre 48 et 72 heures après la transduction montre que 41 % (+/- 5,2) des cellules sont bien infectées (**figure 51C**). De manière intéressante, lorsque l'on infecte les cellules avec les 4 constructions iMESYS en respectant la même M.O.I (= 3), aucune expression des rapporteurs fluorescents ne peut être détectée après 72 heures (**figure 51B, C**). De même aucune fluorescence n'était détectable une semaine plus tard (données non montrées) démontrant que le système iMESYS n'est pas activé de manière non spécifique dans des cellules n'exprimant pas les marqueurs protéiques spécifiques.

Dans un second temps, afin de valider la spécificité d'expression des constructions iMESYS dans des cellules neurales, j'ai utilisé la lignée SHS-Y5Y, considérée comme une lignée de cellules neuronales immortalisées peu différenciées, initialement issues d'une métastase de neuroblastome (Biedler et al., 1978). Ces cellules présentent l'avantage d'exprimer les marqueurs neuronaux (tels que MAP2 dans notre cas) et de se différencier en neurones plus matures après traitement avec des facteurs de différenciation tels que l'acide rétinoïque (AR) à 10 μ M (Encinas et al., 2000; Schneider et al., 2011). Les cellules présentées ici sont cultivées en présence d'AR. En accord avec la littérature, l'immunomarquage effectué sur les SHS-Y5Y montre que les cellules expriment MAP2 mais pas GFAP, CNP ou Tie-2 (**figure 52A**). L'efficacité d'infection est déterminée par le nombre de cellules exprimant la GFP contrôle qui atteint 25,7 % (+/- 4,2 ; **figure 52B, C**). Lorsque les cellules sont infectées avec les vecteurs viraux iMESYS, seules les cellules transduites avec la construction MAP2-mCherry produisent le rapporteur fluorescent (rouge, **figure 52B**) à hauteur de 27,2 % (+/- 1,7 ; **figure 52C**). Bien que ces cellules n'aient pas été sélectionnées par antibiotique, la similitude de la quantité de cellules positives pour la GFP contrôle et l'iMESYS MAP2-mCherry, suggère que la totalité des cellules infectées expriment le rapporteur mCherry.

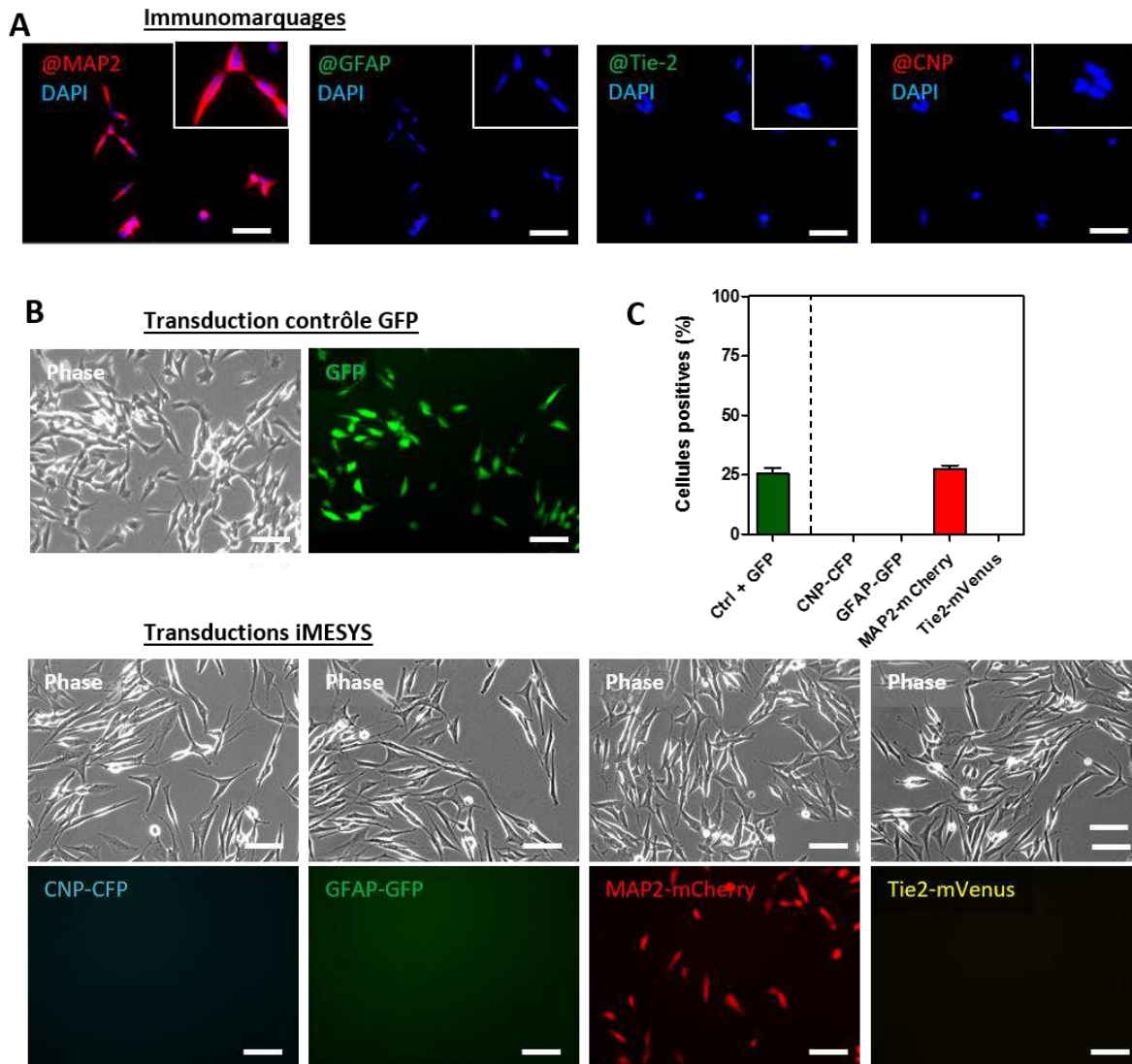
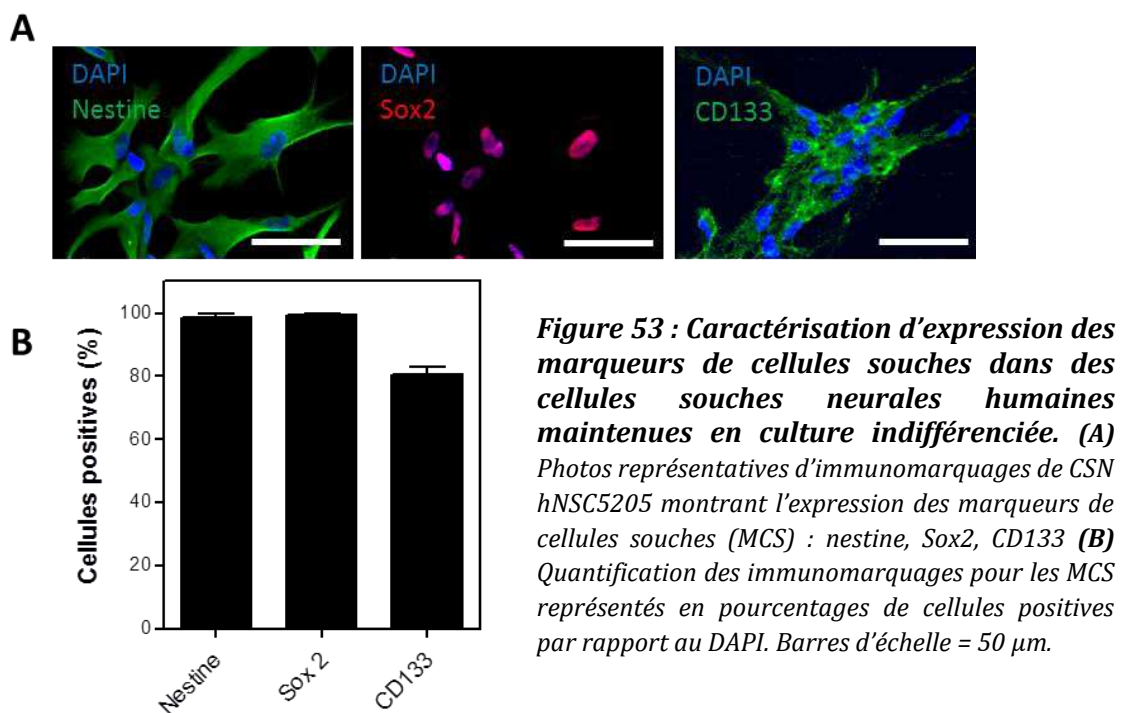


Figure 52 : Les cellules neuronales SHS-Y5Y expriment uniquement le rapporteur fluorescent iMESYS MAP2-mCherry. (A) Photos d'immunomarquages montrant l'expression ubiquitaire de MAP2 mais l'absence des marqueurs CNP, GFAP et Tie2 dans les SHS-Y5Y. **(B)** Photographies représentatives de l'infection des cellules avec les lentivirus iMESYS à une MOI = 3, sans sélection antibiotique. Panel du haut : infection avec le lentivirus contrôle CMV-GFP ; panel du bas : état d'expression des rapporteurs fluorescents iMESYS. **(C)** Quantification du pourcentage de cellules positives pour les différents rapporteurs. Barres d'échelle = 50 μ m.

3. Validation du système iMESYS dans des cellules souches neurales humaines

Les CSN représentent le modèle idéal de validation du système iMESYS puisque ces cellules normalement indifférenciées sont capables de se différencier en neurones exprimant MAP2, en astrocytes positifs pour GFAP et en oligodendrocytes exprimant CNP. Les CSN utilisées ici dans cette étude sont les cellules hNSC#5205 obtenues du laboratoire de P. Dirks à Toronto (Canada). Bien que les caractéristiques de cette lignée précise ne

soient pas publiées, son comportement est comparable aux précédentes lignées obtenues dans les mêmes conditions dans son laboratoire (Pollard et al., 2009a; Sun et al., 2008a). Dans la **figure 53A**, on peut constater que la quasi-totalité des CSN en notre possession expriment les trois marqueurs des cellules souches à des taux très élevés : nestine (98,4 % des cellules +/- 1,2), Sox2 (99,6 % des cellules +/- 0,3) et CD133 (80,6 % des cellules +/- 2,2), confirmant ainsi leur statut de cellules souches (**figure 53B**).



Même si la population de CSN est relativement homogène en cellules indifférenciées comme le prouvent les expressions de la nestine, de Sox2 et de CD133, certaines expriment des marqueurs de différenciation neurale (**figure 54**). Ainsi dans la même culture, on relève la présence du marqueur GFAP dans 31 % (+/- 2,8) des cellules. Cependant, ce taux de GFAP n'est pas surprenant lorsque l'on tient compte de l'origine embryonnaire des CSN, dont une partie exprime le marqueur astrocytaire GFAP (cf. introduction paragraphes 2.2 et 2.3). Une partie des cellules présente un marquage pour MAP2 (6,3 % ; +/- 1,4) mais pratiquement aucune cellule n'est détectée positive pour CNP (0,6 % ; +/- 0,4). Afin de valider le système iMESYS, il semblait important de vérifier s'il était capable de détecter la présence de ces marqueurs de différenciation malgré leur faible expression (**figure 54B, D**).

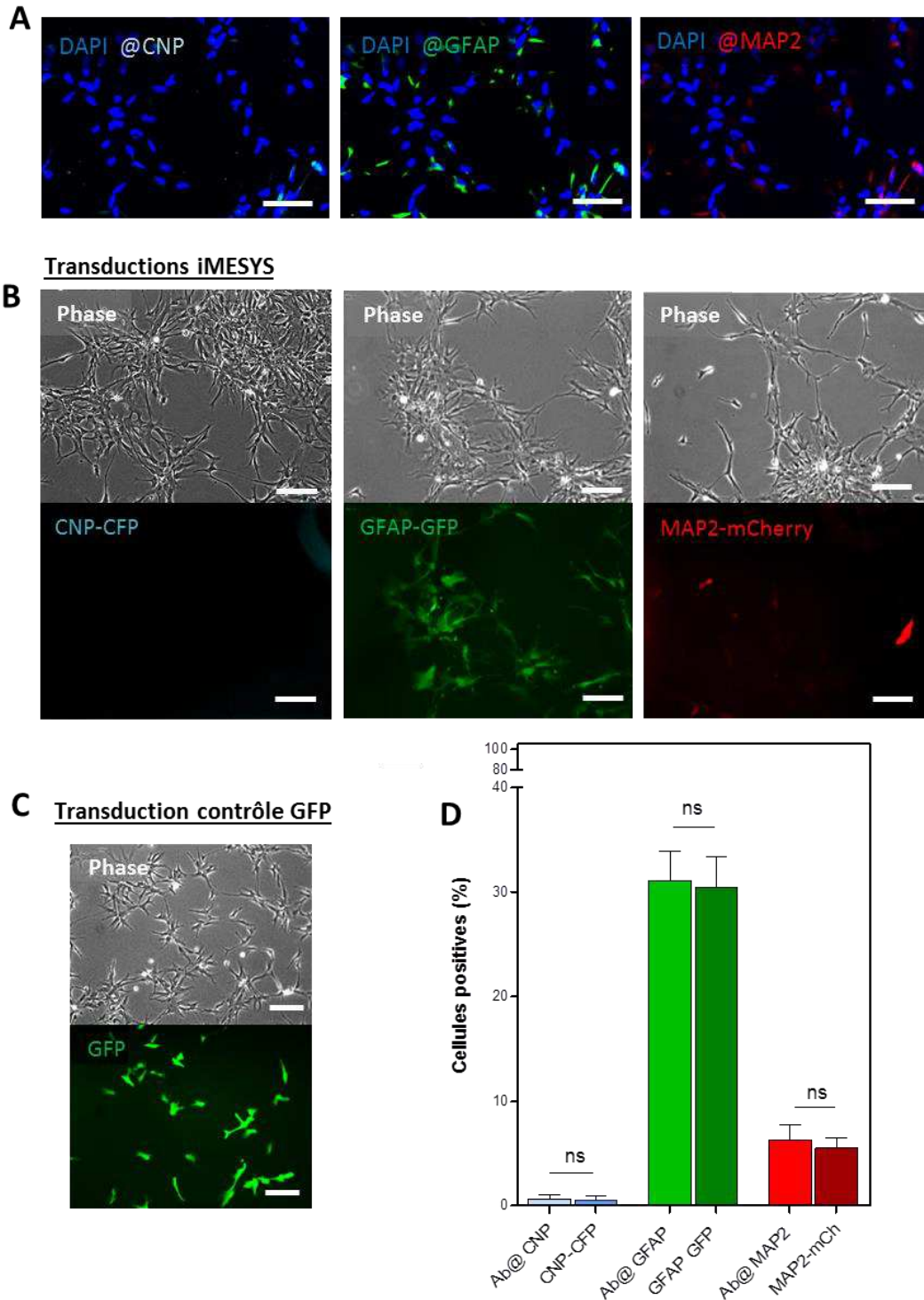
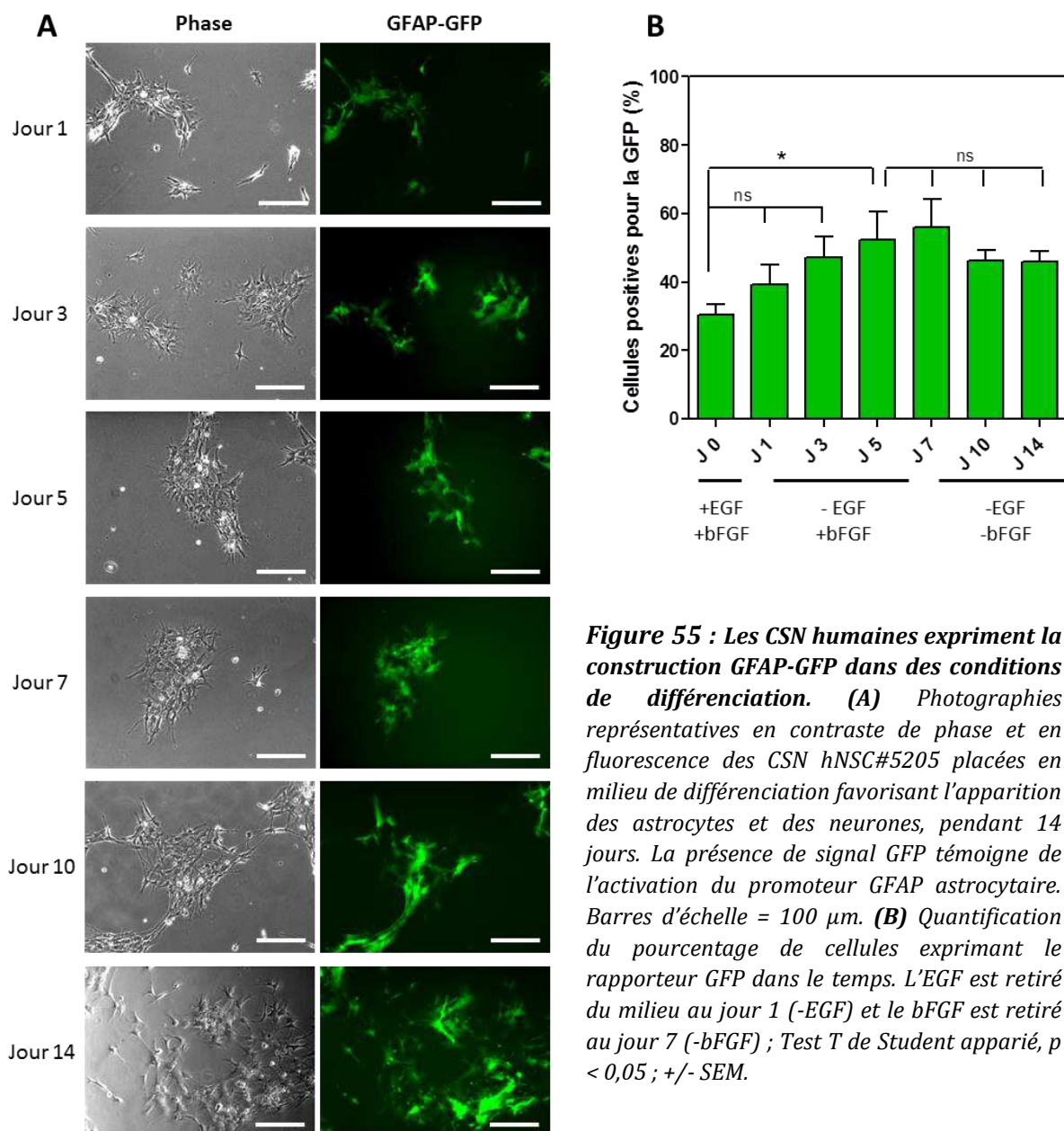


Figure 54 : Comparaison de l'expression des marqueurs de différenciation avec l'activation des rapporteurs fluorescents iMESYS dans des cellules souches neurales humaines. (A) Photos représentatives d'immunomarquages de CSN hNSC #5205 montrant l'expression des marqueurs de cellules neurales différenciées : CNP (turquoise), GFAP (vert) et MAP2 (rouge) (B) Photographies montrant l'expression des rapporteurs fluorescents iMESYS neuraux (CNP-CFP, GFAP-GFP et MAP2-mCherry), suite aux infections individuelles après 2 semaines de sélection antibiotique. (C) Photographies représentatives de l'infection des cellules avec le lentivirus contrôle CMV-GFP à une MOI = 3. (D) Quantification de l'expression des rapporteurs fluorescents comparés aux immunomarquages @CNP, @GFAP et @MAP2 Barres d'échelle = 50 μ m. Test de Mann Whitney ; +/- SEM.

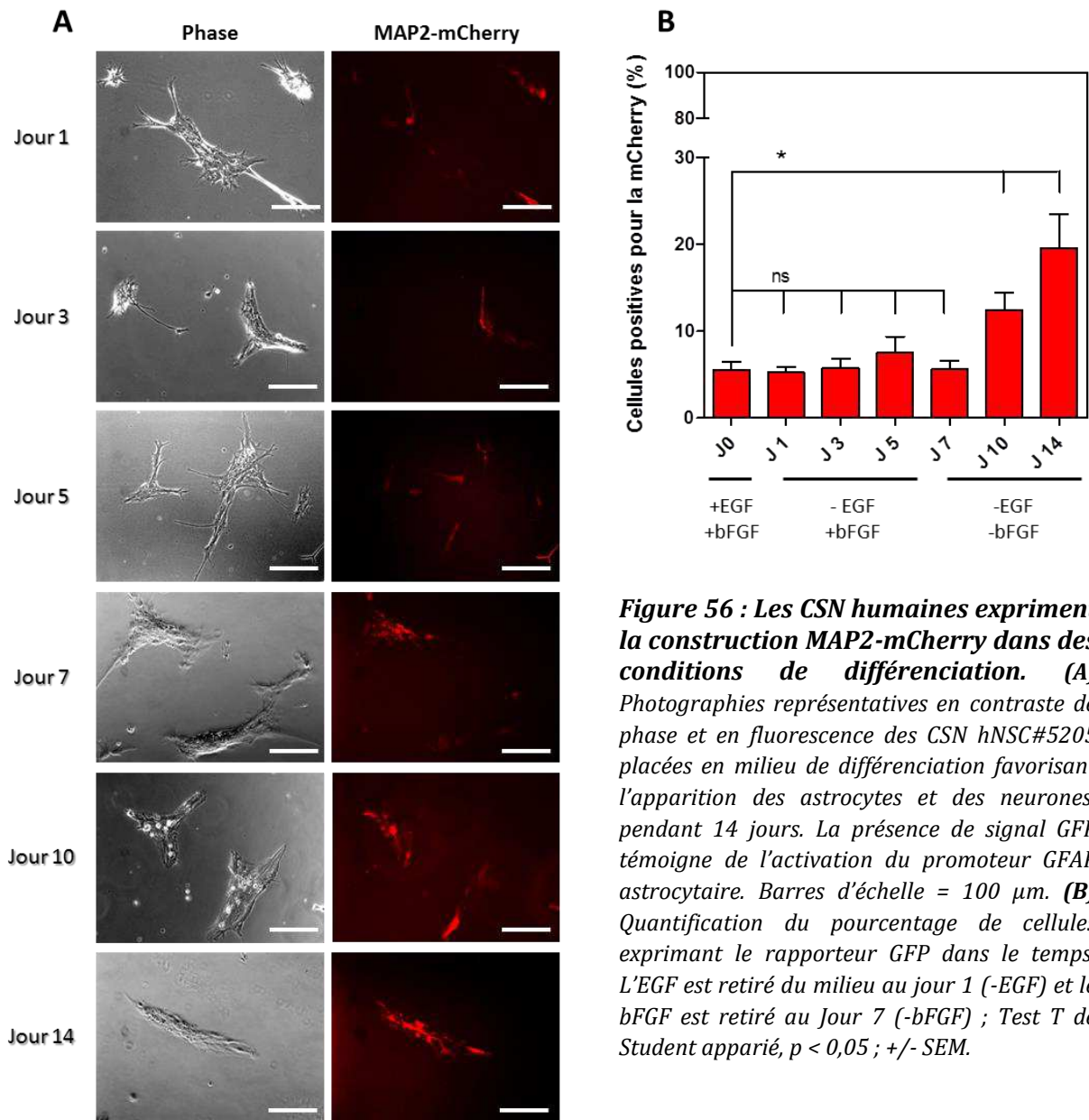
Les CSN ont donc subi une infection avec les lentivirus codant pour les constructions iMESYS ou le vecteur contrôle GFP à une M.O.I = 3 d'abord en simple infection (une seule construction). Le processus d'infection montre que 22,5 % (+/- 1,8) des cellules peuvent être transduites avec le contrôle GFP (**figure 54C**). Après 1 à 2 semaines de sélection avec les antibiotiques spécifiques de chacune des constructions (puromycine pour MAP2-mCherry ; blasticidine pour GFAP-GFP ; généticine G418 pour CNP-CFP), j'ai quantifié le nombre de cellules présentant une expression des gènes rapporteurs du système iMESYS neural. L'analyse quantitative des signaux de fluorescence montre la fidélité du système qui permet l'expression CFP, GFP et mCherry à des taux similaires à ceux relevés en immunofluorescence (**figure 54B, D**). En effet, il n'y a aucune différence entre les nombres de cellules positives pour le marquage GFAP (noté @GFAP) et pour le rapporteur GFP (noté GFAP-GFP) respectivement de 31 % et 30,5 % (+/-2,9 ; $p > 0,7$; **figure 54D**). Il en va de même pour le rapporteur mCherry (noté MAP2-mCherry) et l'immunomarquage anti MAP2 (noté @MAP2) montrant respectivement 5,5 % et 6,3 % (+/- 0,9) de cellules positives (**figures 54D**). La concordance de ces résultats permet de valider la sensibilité du système iMESYS, même sur des cellules exprimant faiblement des éléments de différenciation.

La vocation du système iMESYS étant de pouvoir suivre en direct le comportement de différenciation de cellules vivantes, des cultures stabilisées de CSN portant les constructions GFAP-GFP (**figure 55**) et MAP2-mCherry (**figure 56**) ont été placées dans les conditions d'un test de différenciation pendant 14 jours avec un retrait progressif des facteurs de croissance : d'abord EGF, puis bFGF.

Dans ces conditions, les CSN montrent une augmentation significative du nombre de cellules exprimant la GFP, montrant une activation du promoteur GFAP et donc de l'engagement dans la voie de différenciation astrocytaire (**figure 55**). L'augmentation significative est progressive entre le jour 0 (30,5 %) et le jour 7 (56 % +/- 8 %) pour atteindre une augmentation de 1,8 fois ($p = 0,047$) et se stabiliser à un plateau de 46 % (+/- 2,9 %) durant la deuxième semaine (**figure 55B**). Il est intéressant de noter que le phénotype évolue en même temps que l'apparition du rapporteur GFP. Les cellules se complexifient, étendent des prolongements et prennent une morphologie plus étalée et étoilée, suggérant que le phénotype astrocytaire se développe durant les 14 jours (**figure 55A**) concomitamment à la fluorescence GFP.



Les CSN transduites avec la construction neuronale MAP2-mCherry quant à elles (**figure 56**) expriment le rapporteur rouge mCherry au même état basal (compris entre 5,2 et 7,4 % des cellules) jusqu'au 7^{ème} jour inclus (**figure 56B**). A partir du 10^{ème} jour, la quantité de cellules positives pour mCherry augmente significativement de 2,3 fois ($p = 0,018$), passant de 5,5 % (+/- 0,9) à 12,4 % (+/- 2). A la fin de la seconde semaine de mise en différenciation sans aucun facteur de croissance (-EGF ; -bFGF), la fraction de cellules exprimant le rapporteur fluorescent rouge augmente encore passant à 19,6 % (+/- 4), représentant une augmentation de 3,5 fois ($p = 0,019$) par rapport à la fin de la première semaine (**figure 56B**).



Là encore, outre le pourcentage de cellules positives pour MAP2-mCherry, l'intensité de la fluorescence émise ainsi que la complexité et l'allongement des cellules mCherry + augmentent au fur et à mesure du temps (**figure 56A**).

Il est intéressant de remarquer que l'augmentation du nombre de cellules mCherry + dans les CSN MAP2-mCherry (**figure 56**), intervienne après le 7^{ème} jour, simultanément à la stabilisation de l'expression de la GFP dans les CSN GFAP-GFP (**figure 55**). Ces résultats semblent démontrer une induction de la différenciation de manière chronologique et que le système iMESYS est capable de la détecter.

4. Le système iMESYS neural est spécifique dans des CSG

Dans le but de transférer le système iMESYS dans des CSG, nous avons infecté d'abord individuellement des CSG NCH644 avec chacune des constructions neurales CNP-CFP, GFAP-GFP et MAP2-mCherry, sélectionnées par antibiotiques et stabilisées après au moins 2 à 3 semaines. Ensuite les cellules ont été mises en conditions de différenciation avec sérum pendant 5 jours pour être ensuite fixées et immunomarquées à la recherche des marqueurs protéiques de différenciation. Les NCH644 CNP-CFP ont subi un immunomarquage anti-CNP, les cellules GFAP-GFP un marquage contre la GFAP et les cellules portant l'iMESYS MAP2-mCherry ont été révélées avec un marquage anti-MAP2 (**figure 57**). Cette étape a permis de valider la spécificité d'expression des marqueurs dans des CSG.

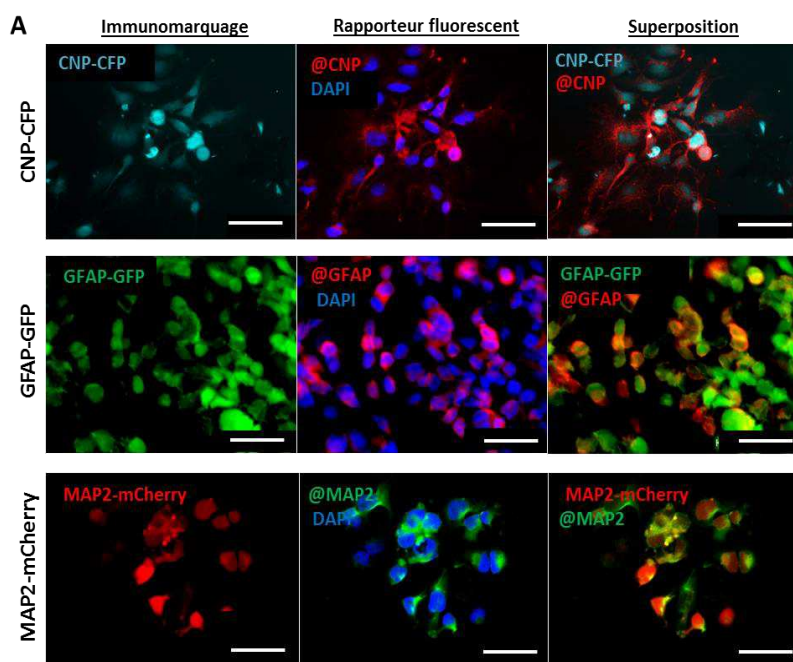


Figure 57 : L'expression des marqueurs fluorescents iMESYS est spécifique des types cellulaires. (A) Photographies représentatives de CSG NCH644 infectées avec les constructions iMESYS neurales, placées pendant 5 jours en condition de différenciation avec sérum. Les cellules expriment les protéines fluorescentes CFP, GFP et m-Cherry sous le contrôle de leurs promoteurs spécifiques respectifs CNP, GFAP et MAP2 (panel gauche) en concordance avec l'expression des marqueurs vérifiés par immunocytochimie @CNP, @GFAP et @MAP2 (panel du milieu). (B) Tableau montrant les pourcentages de cellules exprimant les rapporteurs fluorescents et les marqueurs moléculaires présentés en (A). Barres d'échelle = 50 μ m.

B

Constructions	rapporteur fluo - Immunomarquage +	rapporteur fluo + Immunomarquage -	rapporteur fluo + Immunomarquage +
CNP-CFP	26 %	4 %	74 %
GFAP-GFP	24 %	17 %	75 %
MAP2-mCherry	13 %	16 %	88 %

Comme montré dans la **figure 57**, tous les rapporteurs fluorescents s'activent après 5 jours de différenciation dans les NCH644 (**figure 57A**) suggérant l'activation de voies de

différenciation, ce qui est confirmé par la présence des marqueurs spécifiques de chacune des lignées. En mesurant 3 paramètres à partir de l'expression des rapporteurs fluorescents et de l'immunomarquage, j'ai pu établir les niveaux de fidélité de chacune des constructions (**figure 57B**). Concernant la construction CNP-CFP, mesurée sur une lignée de NCH644 stable, 74 % des cellules co-localisent le marquage @CNP et la fluorescence du rapporteur CFP. A côté de celles-ci, 26 % ne sont que positives pour l'immunomarquage et négatives pour la CFP, tandis que seules 4 % des NCH644 expriment le gène rapporteur sans pouvoir détecter le marqueur oligodendrocytaire. Les deux constructions iMESYS suivantes ont été validées chacune sur 2 lots différents de NCH644 sélectionnées et stabilisées. La construction iMESYS GFAP-GFP présente des valeurs proches de la précédente, car son efficacité, validée par la co-localisation du rapporteur fluorescent GFP et du marquage de GFAP s'élève à 75 %. Ce système GFAP-GFP comporte 17 % des cellules qui activent le rapporteur fluorescent sans pour autant exprimer la protéine GFAP, tandis que près d'un quart des cellules (24 %) expriment la protéine GFAP sans présenter de fluorescence de l'iMESYS (**figure 57B**). Finalement, la construction iMESYS MAP2-mCherry présente les meilleurs ratios d'efficacité. En effet, seules 13 % des cellules sont dans un statut indéterminé (positif pour le marquage anti-MAP2 et négatif pour la fluorescence rapporteur mCherry) et la fuite du système représente 16 %. L'efficacité mesurée par la présence simultanée du marquage de MAP2 et du rapporteur mCherry s'élève à 88 % (82 % dans le premier lot de NCH644 et 94 % dans le second) (**figure 57B**). Ensemble ces résultats montrent une fidélité moyenne de 80 % (comprise entre 74 % et 88 %) du système iMESYS dans les CSG NCH644.

5. Suivi de la différenciation de CSG en direct avec le système iMESYS

Le système iMESYS permet après les infections multiples de suivre la différenciation des CSG NCH644 (clone stable pour l'expression des trois constructions iMESYS neurales) au cours du temps dans un milieu contenant 0,5 % de sérum, sans forcer l'engagement dans aucune des voies de différenciation (**figure 58**). Les CSG montrent très rapidement un comportement de différenciation qui se traduit par l'activation des rapporteurs fluorescents dans le temps. On remarque une augmentation du nombre de cellules positives et de l'intensité de fluorescence des rapporteurs GFP, mCherry et dans une moindre mesure CFP (**figure 58A**). La quantification montre que le pourcentage de cellules exprimant les

protéines fluorescentes augmente dans les 3 conditions au cours du temps. Sur 2 expériences menées indépendamment (n = 2632 cellules), le nombre de cellules CFP+ augmente de près de 2 fois (p < 0,001), passant de 14,1 % de cellules au début à 30,3 % au 5^{ème} jour (**figure 58B**).

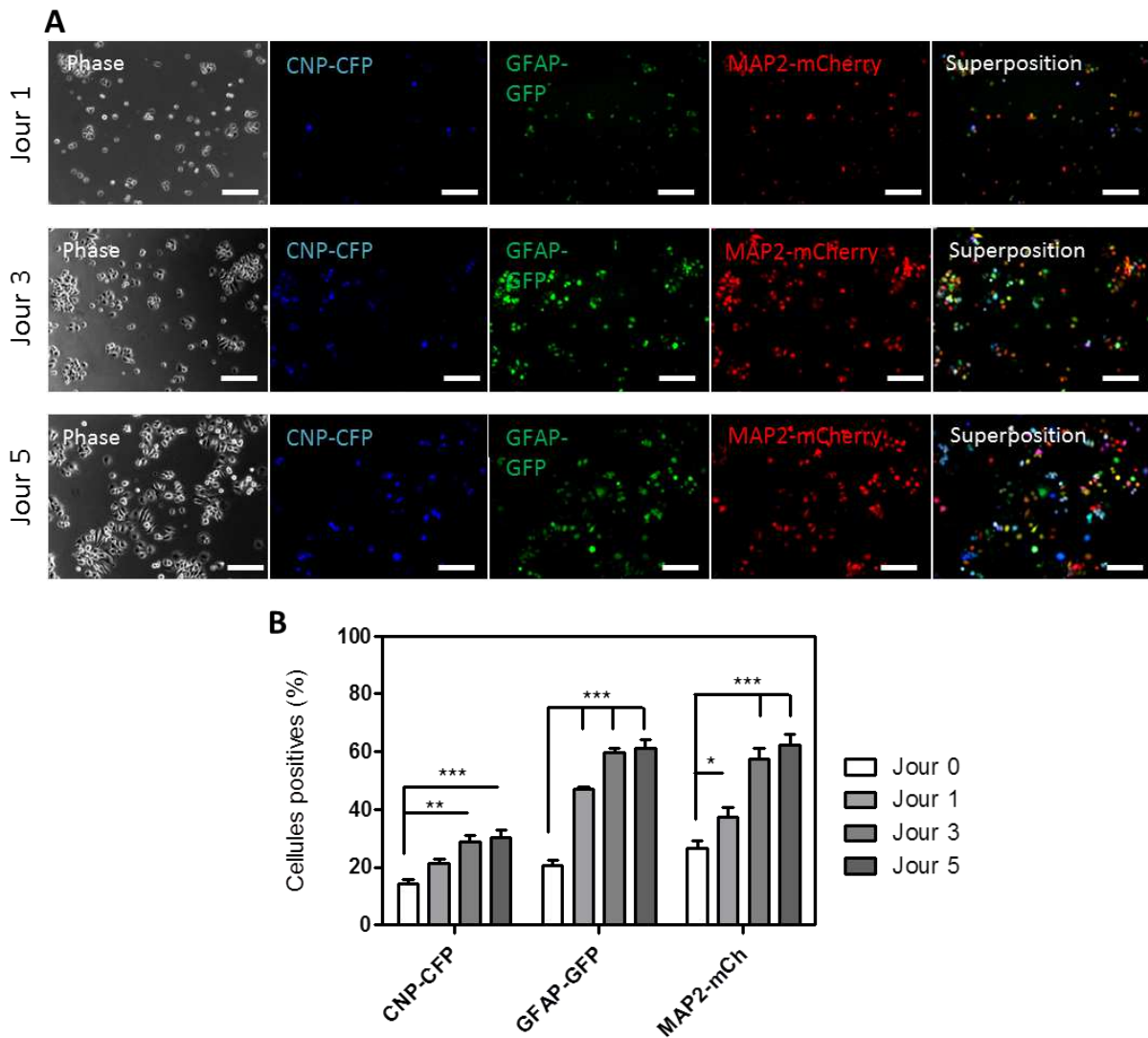


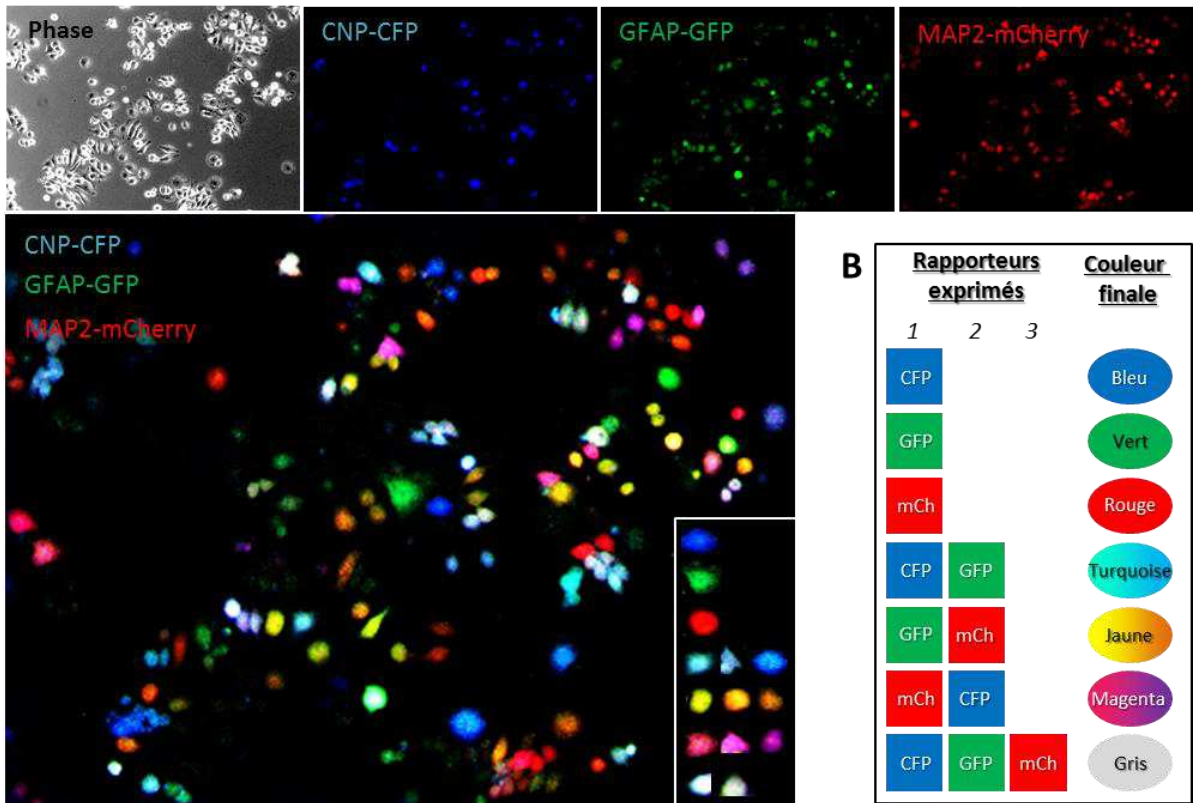
Figure 58 : Suivi de la différenciation de CSG avec le système iMESYS triple. (A) Photographies représentatives de CSG NCH644 portant les 3 constructions iMESYS neurales simultanément, placées pendant 5 jours en condition de différenciation avec sérum. Les jours 1, 3 et 5 sont représentés par ligne de photos montrant la décomposition par canal des signaux de fluorescence iMESYS. Barre d'échelle = 100 μ m. **(B)** Quantification du nombre de cellules totales à chaque jour, exprimant les rapporteurs fluorescents (n = 2632 cellules analysées). ANOVA à deux facteurs, post test de Bonferroni ; *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; +/- SEM.

Les rapporteurs GFP et mCherry, témoignant de l'engagement dans les voies astrocytaire et neuronale respectivement augmentent très rapidement entre le début et la

fin de l'expérience pour atteindre des valeurs proches l'une de l'autre à 3 jours et 5 jours. En effet, le signal GFP est détecté dans 20,8 % des cellules au jour 0 pour augmenter très fortement à 47 % le premier jour, 59 % le jour 3 et finir à 61 % le cinquième jour, soit une augmentation de plus de 3 fois en 5 jours ($p < 0,001$) (**figure 58B**). Le nombre de cellules arborant le rapporteur mCherry augmente de 2,3 fois en 5 jours (jour 0 = 26,5 % ; Jour 5 = 62,1 % ; $p < 0,001$). Ces données montrent que l'on peut suivre l'apparition des différents rapporteurs et donc discriminer le destin des différentes cellules. Néanmoins, au temps final (jour 5) la somme des cellules exprimant les rapporteurs fluorescents est largement supérieure à 100 % (somme = 153,3 % ; CFP = 30,2 ; GFP = 61,1 ; mCherry = 62) suggérant tel que l'on peut le voir sur les photographies de la **figure 58A**, que les cellules expriment plusieurs marqueurs simultanément, signe de la grande hétérogénéité et de la plasticité de différenciation des CSG.

J'ai donc fait une analyse précise de toutes les combinaisons de couleurs possibles générées par le système iMESYS sur des CSG NCH644 différenciées pendant 5 jours dans les mêmes conditions que précédemment. La **figure 59A** montre une véritable mosaïque de couleurs CFP, GFP et mCherry exprimée par les NCH644. En partant du principe théorique que les protéines fluorescentes elles-mêmes représentent 3 couleurs primaires : CFP en bleu, GFP en vert et mCherry en rouge, leur association par deux ou trois peut générer 5 couleurs complémentaires, comme représentées dans la **figure 59B**. La quantification de cette expression mosaïque montre que sur la totalité des cellules dénombrées (2 expériences indépendantes, $n = 1308$ cellules), 72,2 % (+/- 1,9) d'entre elles expriment au moins un rapporteur fluorescent après 5 jours de différenciation (**figure 59B**). Il s'avère que ces CSG expriment toutes les combinaisons de couleurs théoriquement possibles : les rapporteurs seuls, par deux ou par trois. Alors que la répartition des combinaisons est relativement homogène (comprise entre 7,7 % et 10,3 % ; $p > 0,05$), deux conditions se détachent significativement des autres. La construction CNP-CFP seule s'exprime au plus dans 4,1 % des cellules (+/- 0,7 ; $p = 0,0002$), tandis que la combinaison des rapporteurs GFP et mCherry (donnant des cellules aux nuances de jaune/orange) s'élève remarquablement à 23 % (+/- 1,3 ; $p < 0,0001$). Au vu de cette mosaïque de couleurs, il semble que les NCH644 soient capables de s'engager dans plusieurs voies de différenciation, ou du moins d'activer les promoteurs normalement spécifiques des différents types cellulaires.

A



C

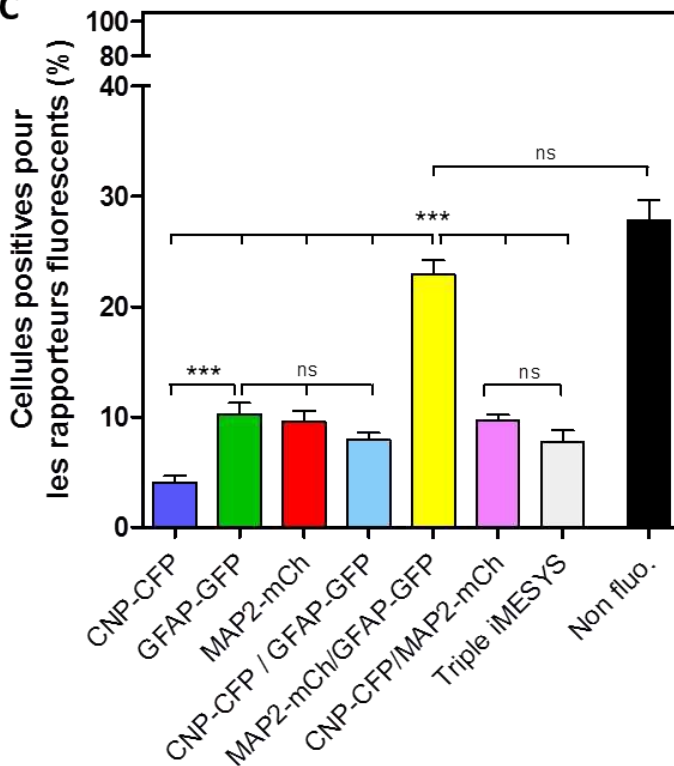


Figure 59 : Les CSG expriment une mosaïque de rapporteurs iMESYS après 5 jours de différenciation. (A) Photographies représentatives de CSG NCH644 portant les 3 constructions iMESYS neurales simultanément, après 5 jours de différenciation. Barre d'échelle = 100 μ m. **(B)** Combinaisons possibles d'expression des protéines fluorescentes (1, 2 ou 3 rapporteurs) associées aux nuances de couleurs résultantes observées dans les cellules. **(C)** Quantification du nombre exclusif de cellules exprimant les rapporteurs fluorescents seuls, par binôme ou par trinôme (triple iMESYS). Les cellules non détectables en fluorescence sont notées non fluo. (2 expériences indépendantes, n = 1308 cellules). Test de Mann Whitney ; *p < ***p < 0,0001 ; +/- SEM.

6. Le système iMESYS peut s'induire différemment selon les conditions de différenciation.

De la même manière que pour les CSN, la différenciation des CSG peut être forcée dans les différentes voies neuronales ou gliales en ajustant les concentrations de facteurs de croissance présents dans le milieu de culture (Kang et al., 2014; Zhang et al., 2013; Glaser et al., 2007). Suite aux résultats précédents, nous avons voulu évaluer dans quelle mesure l'iMESYS triple pouvait répondre à la différenciation forcée de CSG NCH644 pendant 7 jours dans un milieu pro-oligodendrocytes (sérum- ; EGF- ; PDGFA+ ; forskoline+) d'une part et pro-astrocytes (sérum- ; EGF- ; BMP+) d'autre part (**figure 60**).

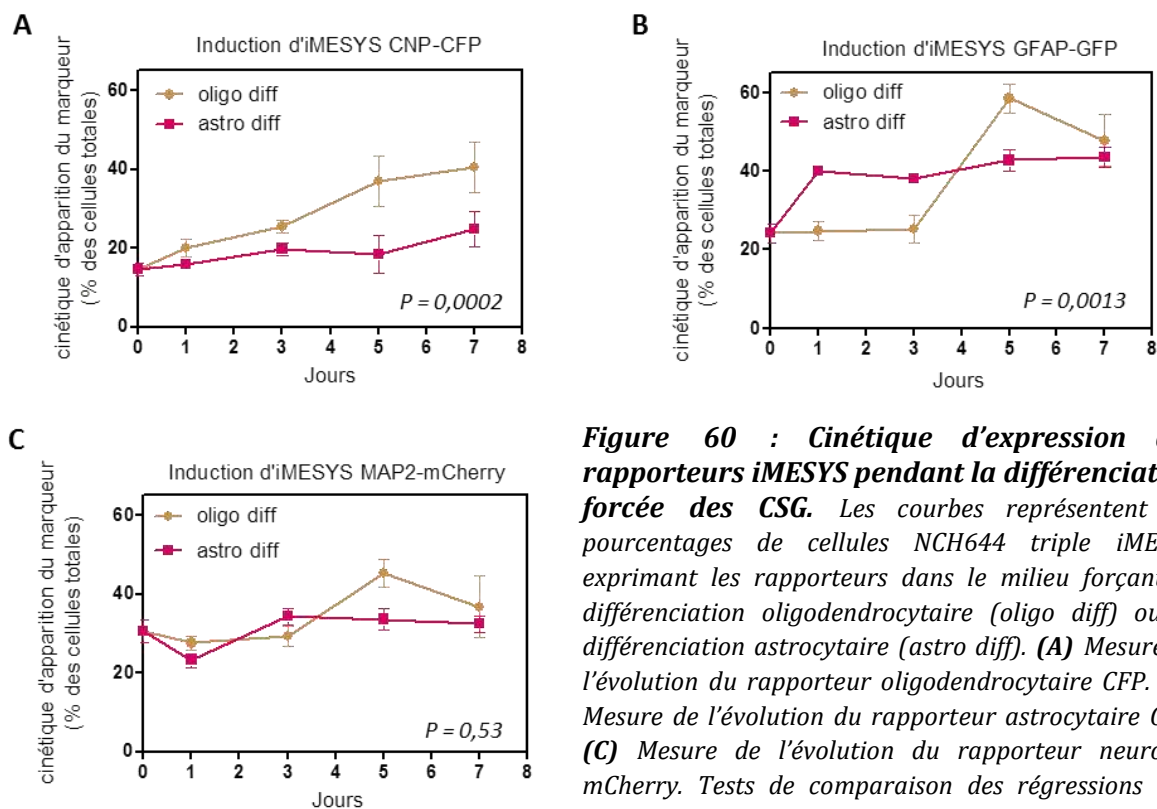
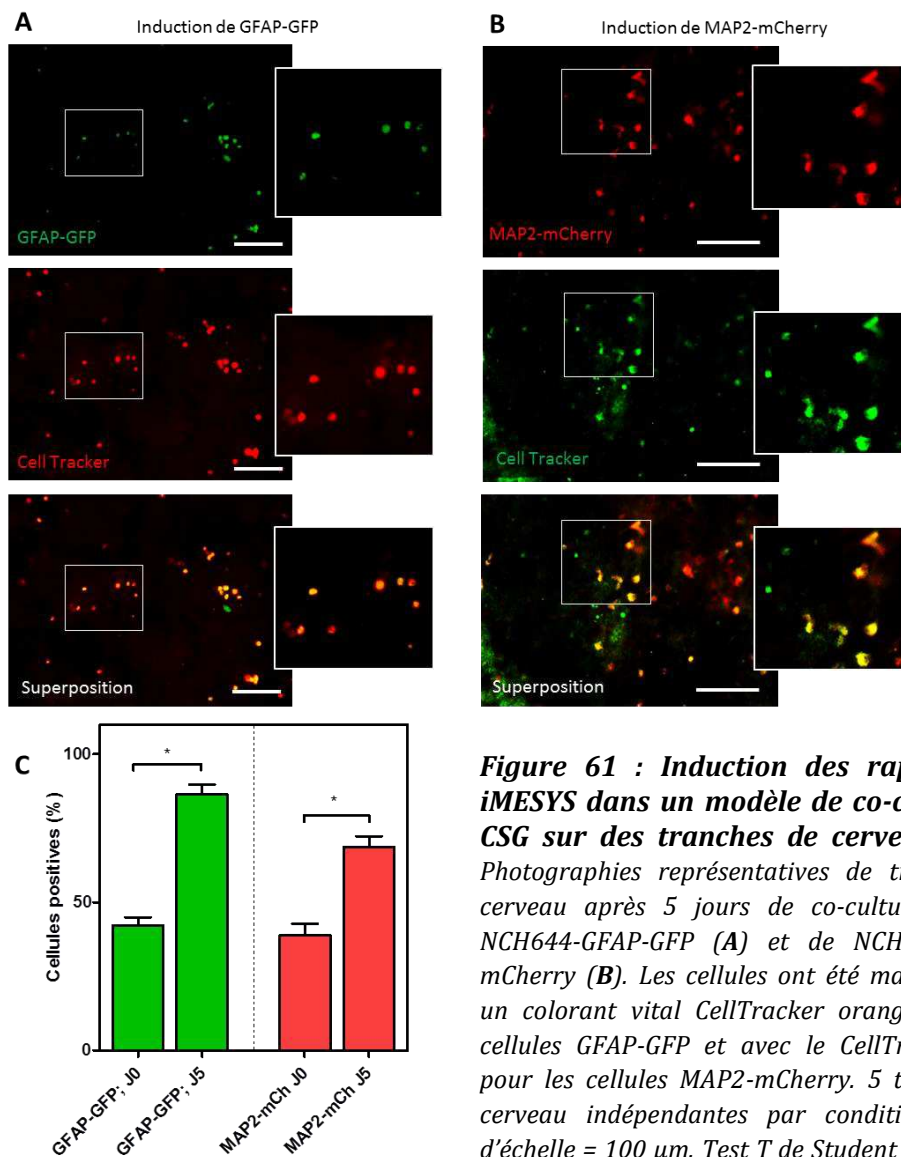


Figure 60 : Cinétique d'expression des rapporteurs iMESYS pendant la différenciation forcée des CSG. Les courbes représentent les pourcentages de cellules NCH644 triple iMESYS exprimant les rapporteurs dans le milieu forçant la différenciation oligodendrocytaire (oligo diff) ou la différenciation astrocytaire (astro diff). **(A)** Mesure de l'évolution du rapporteur oligodendrocytaire CFP. **(B)** Mesure de l'évolution du rapporteur astrocytaire GFP. **(C)** Mesure de l'évolution du rapporteur neuronal mCherry. Tests de comparaison des régressions non linéaires ; +/- SEM.

De manière intéressante, l'induction de la construction CNP-CFP est significativement plus importante dans le milieu promouvant l'apparition des oligodendrocytes (milieu oligo), par rapport au milieu favorisant les astrocytes (milieu astro). L'augmentation est lente et progressive dans le milieu oligo, atteignant 40 % (+/- 6 ; $p = 0,0002$) le 7^{ème} jour, contre 24,8 % (+/- 4,4) dans le milieu astro (**figure 60A**). Avec la

construction GFAP-GFP (**figure 60B**), le rapporteur fluorescent augmente très soudainement pour atteindre un plateau dès la fin du premier jour dans la condition astro diff (jour 0 = 24,6 % ; jour 1 = 40 %), comparativement à la condition oligo diff ($p < 0,0013$) dans laquelle l'expression de GFP reste basale jusqu'au jour 3. Cependant, à partir du 5^{ème} jour l'expression de la GFP dans le milieu oligo diff rejoint celle du milieu astro jusqu'à la fin de l'expérience en miroir de la différenciation astrocytaire observée dans les milieux de référence. L'induction de la construction MAP2-mCherry ne subit aucune différence notable d'induction ($p = 0,53$) dans les milieux oligo et astro tout au long de l'expérience (**figure 60C**). Cette partie de l'étude montre que le système iMESYS permet de traquer des différences fines et sélectives/spécifiques de différenciation en fonction de variation des éléments du microenvironnement cellulaire.



Pour aller plus loin, j'ai testé le système iMESYS dans une expérience fonctionnelle de co-culture de CSG sur des tranches organotypiques de cerveau de jeunes souris (âgées de moins de 3 semaines) pendant 5 jours. Cela permet de donner un substrat plus proche des conditions *in vivo* du développement des tumeurs cérébrales. Cette expérience a été réalisée avec des NCH644 transduites avec des constructions uniques GFAP-GFP ou MAP2-mCherry pour les colorer avec des sondes vitales fluorescentes aux couleurs complémentaires (sonde orange pour GFAP-GFP et sonde verte pour MAP2-mCherry) pour suivre les cellules indépendamment de leur expression des rapporteurs iMESYS (**figure 61**). Malgré une expression basale des rapporteurs mCherry et GFP relativement élevée, on observe une nette augmentation du nombre de cellules fluorescentes iMESYS, détectées par la fluorescence des sondes vitales pour les deux rapporteurs après 5 jours. Ainsi le signal GFP (**figure 61A, C**) augmente de 51,2 % ($p < 0,05$) entre le premier et le 5^{ème} jour, tandis que le signal émis par la mCherry (**figure 61B, C**) augmente de 43 % ($p < 0,05$). Ces résultats laissent penser à une activation forte et significative des promoteurs astrocytaire et neuronal lorsque les CSG se développent dans un milieu complexe reproduisant le microenvironnement cérébral.

7. Validation du rapporteur iMESYS Tie2-mVenus pour l'analyse de la transdifférenciation

Dans des conditions spécifiques exposées précédemment, il a été décrit que certaines CSG sont capables de se transdifférencier en exprimant des marqueurs spécifiques des cellules vasculaires, comme les cellules endothéliales et entre autres le récepteur aux angiopoïétines : Tie-2.

Dans un premier temps, afin de valider la spécificité d'expression de construction iMESYS Tie2-mVenus dans des cellules endothéliales, j'ai utilisé la lignée HUVEC. Les cellules présentées dans la **figure 62** ont subi un immunomarquage à la recherche de l'expression du Tie-2. Comme l'on peut s'y attendre la totalité des cellules sont positives pour le marquage du récepteur qui apparaît nettement ponctiforme (**figure 62A**). Parallèlement, la recherche des marqueurs neuronaux et gliaux (contre MAP2, GFAP et CNP) ne montre aucun signal détectable. Ensuite, les cellules ont été transduites avec le vecteur viral contrôle GFP d'une part et les constructions iMESYS d'autre part, sans subir de sélection antibiotique postérieure. Après au moins 72 heures, l'efficacité d'infection des cellules est évaluée à 42,4

% en comptant le nombre de cellules GFP + (activation constitutive par le promoteur du CMV) par rapport au nombre total de cellules (**figure 62D**). La construction Tie2-mVenus quant à elle, s'exprime dans 26,5 % des cellules infectées, sans qu'aucun autre signal des autres rapporteurs neuraux ne soit détectable. Ceci montre que la construction Tie-2 semble bien s'induire dans des cellules HUVEC exprimant le marqueur protéique relié et que le système iMESYS neural ne s'active pas de manière non spécifique dans ces cellules.

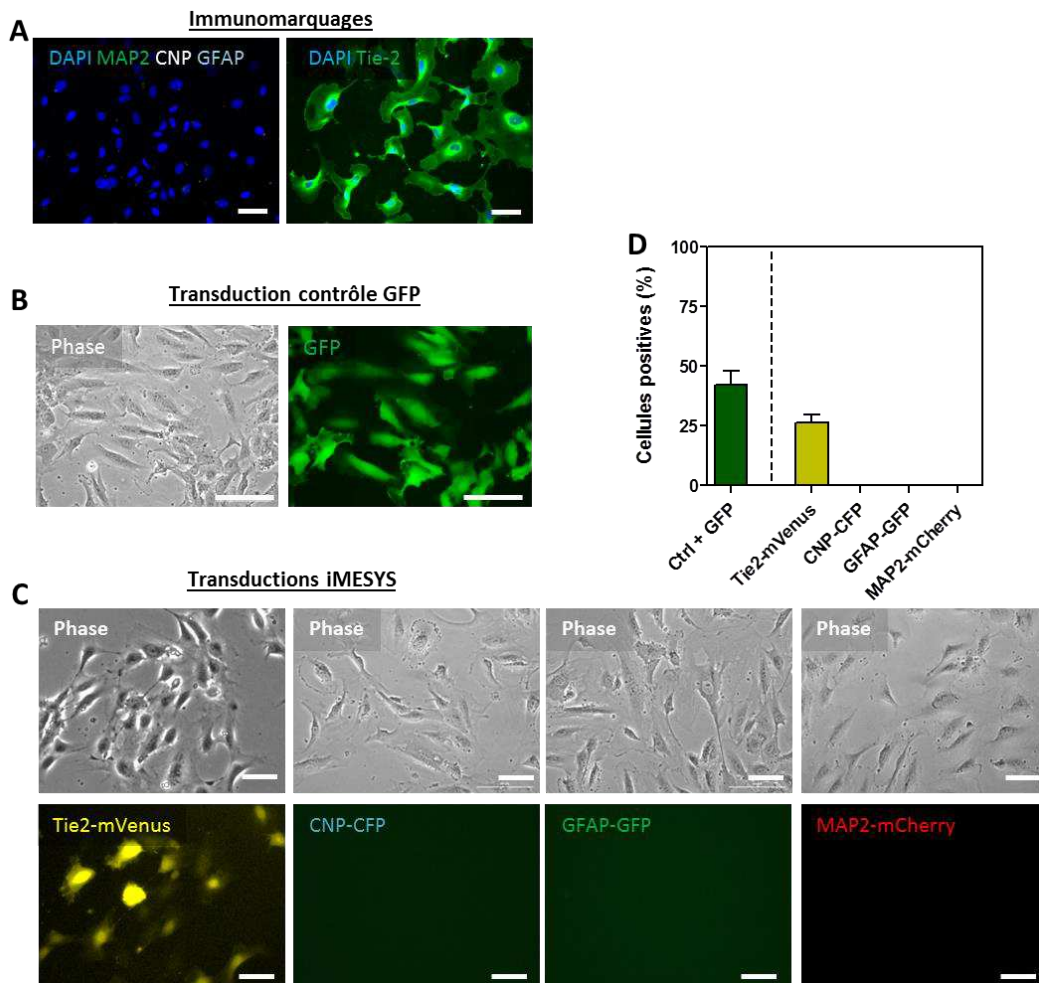


Figure 62 : Les cellules endothéliales humaines HUVEC expriment uniquement le rapporteur fluorescent iMESYS Tie2-mVenus. (A) Photos d'immunomarquages montrant l'expression ubiquitaire du récepteur Tie-2 et l'absence des marqueurs CNP, GFAP et MAP2 dans les HUVEC. (B) Photographies représentatives de l'infection des cellules avec les lentivirus iMESYS à une MOI = 3, sans sélection antibiotique. Panel du haut : infection avec le lentivirus contrôle CMV-GFP. Panel du bas : état d'expression des rapporteurs fluorescents iMESYS. (C) Quantification de l'expression des rapporteurs fluorescents exposés en (B). Barres d'échelle = 50 μ m.

Nous avons ensuite infecté des CSG NCH644 avec la construction Tie2-mVenus à une M.O.I = 3, puis sélectionnées à la zéocine. En se basant sur la capacité des CSG à se transdifférencier grâce à l'induction de facteurs de croissance des cellules endothéliales

comme le VEGF, j'ai placé les NCH644-Tie2-mVenus dans plusieurs conditions de culture ou de différenciation dans le matrigel pendant 7 jours (**figure 63**). La construction Tie2-mVenus ne s'induit pas dans la condition témoin au temps 0 de l'expérience (**figure 63A**). Les cellules ont été placées dans 3 milieux différents. Après 7 jours de croissance, les CSG cultivées dans le milieu de culture d'expansion des CSG sans sérum (**figure 63B**), présentent une fluorescence mVenus extrêmement faible, ce qui est validé par l'absence de marquage anti-Tie2. Par contre, on peut noter une apparition de l'induction de mVenus dans le milieu de différenciation avec 0,5 % de sérum, accompagnée de l'expression du récepteur faiblement détecté par immunocytochimie. L'induction de mVenus est beaucoup plus forte dans le milieu de culture conditionné des cellules endothéliales contenant entre autres 10 % de sérum de veau, du bFGF et du VEGF. Ce résultat est cohérent avec l'expression plus élevée de Tie-2 révélée par immunofluorescence. Finalement la construction Tie2-mVenus paraît s'activer spécifiquement dans les cellules exprimant le récepteur, démontrant une probable transdifférenciation des CSG NCH644 dans des conditions de différenciation avec sérum, qui peut être amplifiée dans un milieu contenant des facteurs pro-angiogéniques.

A

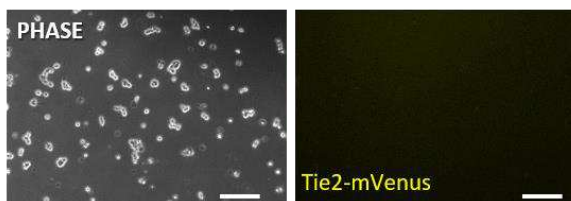


Figure 63 : Les cellules NCH644-Tie2-mCherry se transdifférencient et expriment le rapporteur fluorescent mVenus dans le matrigel après 7 jours.

B

Milieu de culture sans sérum



Milieu de différenciation avec sérum



Milieu de cellules endothéliales



(A) CSG NCH644-Tie2-mCherry déposées dans le matrigel au jour 0 dans du milieu de culture sans sérum. (B) Photos en contraste de phase (gauche), de mVenus en fluorescence (milieu) et des immunomarquages anti Tie-2 (rouge) sur les NCH644 après 7 jours de différenciation dans le matrigel. Panel du haut : matrigel + milieu de culture des cellules souches. Panel du milieu : matrigel + milieu de différenciation avec 0,5 % de sérum. Panel du bas : milieu de culture des cellules HUVEC avec 10 % de sérum, enrichi en bFGF et VEGF. Barres d'échelle = 100 µm.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les glioblastomes représentent aujourd'hui les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes et les plus agressives, soit 25 % de toutes les tumeurs du système nerveux central. Ils sont caractérisés par une très grande hétérogénéité inter-tumorale mais également intra-tumorale, les rendant particulièrement difficiles à contrer. En effet de nombreuses sous-populations cellulaires présentes dans la tumeur ont des profils d'expression moléculaire et des sensibilités aux traitements différents. Parmi ces cellules, les CSG sont très résistantes aux drogues, capables de se différencier et de s'autorenouveler. Le traitement de première ligne actuel, le protocole de Stupp (chirurgie + radio-chimiothérapie) ne permet d'obtenir qu'un gain de survie de 3 mois (Stupp et al., 2005), avec un impact très limité sur les CSG. De plus, le GBM a un fort pouvoir récidivant, généralement dans la cavité chirurgicale ou à sa proximité (Ogura et al., 2013). Il a été montré que les CSG font partie du foyer de la récurrence, capables de se camoufler et de résister aux traitements, elles se réactivent pour générer une nouvelle tumeur. Elles sont relativement indifférenciées et partagent des caractéristiques communes avec les CSN, comme l'autorenouvellement, ou la capacité de différenciation en cellules exprimant les marqueurs classiques des trois lignages neuraux (Vescovi et al., 2006). Par contre, seules les CSG seraient capables de se trans-différencier en cellules de type vasculaire dans certaines conditions (Scully et al., 2012; Ricci-Vitiani et al., 2010) ou d'initier des tumeurs après leur greffe dans des souris.

Dans ce contexte, mes travaux ont consisté : 1) à produire et caractériser des CSG, (2) évaluer l'impact de peptides transmembranaires inhibiteurs des récepteurs neuropiline-1 ou plexin-A1 développés au laboratoire, (3) et mettre au point un système inductible d'expression de rapporteurs fluorescents multiples permettant de suivre le statut de différenciation des CSG.

1. Production et caractérisation des CSG établies

Nos travaux de production de cellules souches à partir de biopsies de patients, de lignées de GBM établies ou de la culture de CSG déjà disponibles avaient pour but de générer des lignées de CSG qui puissent être exploitables dans mes travaux. Prises dans leur

ensemble, les lignées de CSG que j'ai pu développer et cultiver sont très différentes les unes des autres sur les aspects morphologiques, phénotypiques et d'expression du génome. Cela laisse transparaître la grande hétérogénéité intra- et inter-lignées (Patel et al., 2014).

Parmi les lignées cellulaires dérivées des biopsies que nous avons obtenues du bloc de neurochirurgie, un peu plus de 50 % ont pu être dérivées en lignées de CSG. Notre protocole comprend en fait 2 étapes. La première consiste à dériver une première lignée de cellules de GBM à partir de la biopsie initiale, pour ensuite les transférer dans un milieu de sélection des CSG. Au moment de dissocier la tumeur, avant de la mettre en culture, elle est découpée, puis le broyat est filtré sur une membrane excluant les agrégats de plus de 80-100 μm . S'ensuivent plusieurs passages permettant la purification des cellules tumorales qui adhèrent afin de séparer les cellules non tumorales telles que les éléments figurés du sang. On ne peut pas exclure que cette étape très violente pour les cellules n'affecte la portion de CSG présentes, notamment lors des passages successifs où leur capacité d'adhérence moindre pourrait en éliminer une partie. D'autres protocoles quant à eux, consistent à dériver immédiatement les cellules souches tumorales depuis la biopsie dissociée, par FACS en sélectionnant les cellules sur l'expression d'un ou deux marqueurs de cellules souches (CD133, CD44...) (Greve et al., 2012; Wang et al., 2012). Les biopsies prélevées ne représentent cependant qu'un fragment de la tumeur totale. Or le GBM est considéré comme une tumeur solide très hétérogène et il est donc très probable que les biopsies ne comportent pas la totalité des types cellulaires. Cette notion a été décrite par l'équipe de Charles Swanton en analysant les profils d'expression de plusieurs sites de ponction d'une tumeur de rein et de ses métastases (Brennan et al., 2013; Gerlinger et al., 2012). De plus, les CSG sont fréquemment retrouvées dans le cœur de la tumeur où les conditions d'hypoxie, de sous-nutrition et d'acidité du pH sont favorables à leur maintien (Kalkan, 2015; Martínez-González et al., 2012). Ajoutées à cela, les quantités variables de CSG au sein des GBM fluctuent habituellement entre 0,1 et 25 % (Singh et al., 2003) et sont un facteur de réussite ou d'échec pour la dérivation des CSG. De plus, de manière encore mal comprise, certaines populations de CSG sont très prolifératives, tandis que d'autres demeurent quiescentes *in vitro* (Chen et al., 2016), complexifiant encore leur obtention. Malgré ces contraintes, le protocole de dérivation que j'ai utilisé permet d'enrichir la population de CSG tout en éliminant les cellules plus différenciées incapables de survivre dans un milieu sans sérum et avec EGF et bFGF. L'intérêt majeur de cette approche réside dans la capacité des cellules à reproduire et même déterminer l'hétérogénéité de la tumeur de départ (Ghazi et al., 2012; Hale et al., 2013). En effet, l'analyse des tumeurs formées à partir d'un greffe de CSG permet

de reproduire le phénotype, le génotype et l'hétérogénéité de la tumeur parentale (Jackson et al., 2014; Wakimoto et al., 2012).

La production de lignées de GSC à partir de lignées adhérentes classiques (comme les lignées U87MG, U251 ou U373) reste controversée en raison (Iacopino et al., 2014; Qiang et al., 2009) de la variabilité du potentiel de clonogénicité et de l'existence de blocages du cycle cellulaire. Dans nos mains, les lignées GSU 118 et GSU 373 présentent toutes deux des morphologies de gliomasphères très irrégulières ainsi que des cycles cellulaires très différents comparativement aux autres cellules. Les profils des cycles cellulaires suggèrent un blocage, visiblement au profit de G0/G1 et S, faisant quasiment disparaître les phases G2/M. Au contraire, les lignées GSHB 14 ou GSHB 30 présentent des profils de prolifération et clonogénicité très proches de ceux de notre lignée de référence NCH644. Ces différences pourraient refléter le nombre réel de cellules souches qui se perd au cours des passages au profit de cellules avec des propriétés plus proches de celles des progéniteurs (capacité de prolifération moindre et état de différenciation accru). D'ailleurs, j'ai démontré la présence de marqueurs des cellules souches et des cellules différenciées dans les lignées de GBM tout comme dans les lignées de cellules souches dérivées. Il en ressort de fortes disparités d'expression, mais ces résultats montrent que si les lignées parentales de GBM expriment tous les marqueurs en quantités variables, les CSG dérivées, ainsi que la lignée NCH644 expriment plus fortement (en RT-qPCR) et plus souvent (fréquence de cellules positives en immunomarquage) les marqueurs de cellules souches au détriment des marqueurs de différenciation. La description de l'expression de ces marqueurs dans les cellules souches n'est pas fréquente dans la littérature mais certains travaux rapportent l'expression de leurs ARNm ou même de leurs protéines notamment pour GFAP (Pollard et al., 2009), ou encore Tuj-1 et Gal-C (Beier et al., 2007). Cette expression atypique de marqueurs de différenciation rappelle la difficulté de définir l'identité des cellules souches sur la base de marqueurs moléculaires, puisqu'ils sont souvent partagés par d'autres types cellulaires non souches (Brescia et al., 2012). Dans ce contexte, j'ai complété l'analyse d'expression des gènes des cellules souches et de différenciation avec d'autres cibles complémentaires en RT-qPCR. De manière cohérente, les gènes impliqués dans le maintien de l'indifférenciation sont plus exprimés que ceux impliqués dans la différenciation. Le cas de la nestine montre que ce marqueur est toujours très exprimé et considéré comme un marqueur fort des CSG (Neradil and Veselska, 2015; Jin et al., 2013). Mais il est également exprimé par la plupart des cellules de GBM et des tumeurs du SNC (Veselska et al., 2006). Ce n'est donc pas un marqueur exclusif des CSG, mais son expression est nécessaire puisque son inhibition entraîne la perte

du phénotype de cellules souches (Matsuda et al., 2015). Son expression dans les CSG est corrélée à la présence d'autres marqueurs des cellules souches comme Sox2, OCT4 et musashi-1, une corrélation que l'on ne retrouve pas dans les cellules tumorales en général (Iacopino et al., 2014). Le cas de CD133 prête lui aussi à de très nombreuses controverses. C'est probablement un des marqueurs les plus clivant dans le monde des cellules souches. Normalement exclusif des cellule souches, toutes ne l'expriment pas (Lathia et al., 2015; Qiang et al., 2009). Une étude a cependant démontré que CD133 n'est pas restreint aux cellules souches et que des cellules l'exprimant ou non étaient tout autant capables de générer des tumeurs dans un modèle de cancer du côlon (Shmelkov et al., 2008). Pour ajouter un niveau de complexité supplémentaire, sa détection est rendue très difficile à cause de l'existence de 5 promoteurs alternatifs (dont 2 formes potentiellement inactivées par des méthylations) régulant sa transcription et générant au moins 7 isoformes connus de CD133 issus de splicing alternatifs (Pellacani et al., 2011; Shmelkov et al., 2004). S'ajoutent à cela les modifications post-traductionnelles élevées comme le niveau de glycosylation de la protéine. Sa détection par immunocytochimie en devient alors très aléatoire (Campos and Herold-Mende, 2010; Campos et al., 2011). Les anticorps disponibles pour marquer CD133 reconnaissent des épitopes glycosylés extracellulaires souvent dégradés ou masqués par la fixation irréversible de lectines. Aussi, j'ai dû utiliser du méthyl α -D-mannopyranoside, un bloqueur des lectines endogènes, pour obtenir un marquage convainquant de CD133 dans nos lignées. La plasticité intrinsèque des CSG est sans doute également responsable de ces controverses puisque les marqueurs font sans aucun doute l'objet de régulations d'expressions au cours du temps en partie dépendantes des facteurs du microenvironnement.

Ainsi, la capacité des CSG à produire des gliomasphères en culture reste une validation fonctionnelle forte pour s'assurer de l'identité des cellules sélectionnées. Il est donc important de réaliser des tests de formation de sphères sur les lignées que j'ai dérivées afin de déterminer précisément leur potentiel de clonogénicité.

Afin d'homogénéiser ces populations très hétérogènes, il serait possible de trier les cellules, par exemple par FACS et de sélectionner des clones exclusivement positifs pour certaines combinaisons de marqueurs avant d'observer leur comportement. Cette opportunité, saisie par de nombreux laboratoires, permet d'obtenir des résultats précis focalisés sur une sous-population donnée de CSG mais risque de réduire l'hétérogénéité normalement produite dans une tumeur composée de plusieurs clones de CSG, au risque de

ne pas reproduire la tumeur initiale. Certains travaux établissent clairement un lien entre le sous-type moléculaire des GBM et la capacité des cellules à générer des CSG (Verhaak et al., 2010). Ainsi la sous-classe mésoenchymateuse caractérisée par la mutation typique de NF1 est plus apte à former des CSG que la classe pro-neurale pour laquelle la mutation d'IDH1 et l'amplification de PDGFRA sont les plus fréquentes (Mao et al., 2013; Nakano, 2014). De manière intéressante, une étude de Liu et collaborateurs a utilisé la technologie de MADM (Analyse Mosaïque par Double Marqueurs) pour démontrer que la mutation de NF1 (ainsi que P53) était nécessaire pour donner naissance à des CSG à partir de progéniteurs d'oligodendrocytes sains (Liu et al., 2011).

De même, la caractérisation des mutations courantes observées en clinique pourrait s'avérer utile pour une meilleure caractérisation de nos lignées. Elles donnent un point de vue supplémentaire qui peut servir au diagnostic et éventuellement au type de traitement à apporter. Cette analyse peut être recherchée sur les mutations du GBM de manière générale, rejoignant en partie la classification de Verhaak, ou alors spécifiquement aux altérations retrouvées dans les CSG. L'expression de nestine et/ou CD133 est par exemple associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de GBM (Zhang et al., 2008).

L'établissement et la caractérisation de lignées de CSG ne sauraient être complets sans la mise en différenciation et l'étude de leur tumorigénicité. De manière très cohérente avec les études existantes (Ricci-Vitiani et al., 2010; Pollard et al., 2009; Galli et al., 2004; Singh et al., 2003), les deux lignées que nous avons étudiées plus en détails : les NCH644 et les GSHB 30 sont capables de générer des cellules exprimant les marqueurs de différenciation gliale et neuronale et sont capables de générer des tumeurs. Mais ce qui est plus étonnant c'est que ces cellules expriment simultanément plusieurs marqueurs de voies de différenciation opposées. Ces co-expressions comme celle de GFAP et MAP2 dans un milieu contenant du sérum rappellent des phénotypes développementaux tel que la transition des CSN GFAP+ en neurones (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009), ou celle de la glie radiaire en neurones lors de la corticogénèse (Alvarez-Buylla et al., 1990). Par contre, l'expression simultanée des autres marqueurs (comme O4 + GFAP, ou MAP2 + O4, voire MAP2 + GFAP + O4) peut sembler plus exotique et demeure très peu décrite dans la littérature. Elle met en avant un point fondamental des CSG : une forte plasticité et une dérégulation massive des voies de différenciation. Cette plasticité contribue à l'hétérogénéité (Noble and Dietrich, 2004) et est donc en partie responsable de cette difficulté clinique à éradiquer le GBM. Il apparaît donc essentiel de mieux comprendre cette

hétérogénéité, voire d'en tirer profit pour élaborer de nouveaux traitements (Parker et al., 2015) prenant en compte l'activation sélective des voies de différenciation. Il a d'ailleurs été démontré que la différenciation forcée des CSG pouvait augmenter leur sensibilité aux rayonnements ionisants ou aux chimiothérapies (cf. introduction paragraphe 3.6.3). Dans cette logique, j'ai collaboré durant ma thèse sur un projet d'analyse à très haut débit de CSG à l'échelle de la cellule unique. Ce projet encore en cours de développement est mené en encapsulant individuellement les CSG dans des gouttelettes dans un système de microfluidique. Son but est d'analyser le protéome et le transcriptome (avec une focalisation sur les voies de différenciation) de chaque cellule en réponse à des traitements, comme les peptides transmembranaires développés au laboratoire. Couplé au système iMESYS, présenté dans la partie 3 des résultats, il s'agirait de déterminer la réponse aux traitements en prenant en compte cette extraordinaire hétérogénéité des GBM et plus particulièrement des GSC.

2. Evaluation de l'effet des peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 sur les CSG

2.1 Les peptides transmembranaires inhibent la croissance des CSG *in vitro*.

Le récepteur neuropiline-1 a été identifié précédemment comme marqueur de l'agressivité des GBM et particulièrement impliqué dans la survie des CSG (Hamerlik et al., 2012). Nous avons également démontré que plexine-A1 est un marqueur pronostique des GBM (Jacob et al., 2016). Dans mon travail de thèse j'ai pu démontrer que les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 sont des inhibiteurs sélectifs des CSG, en faisant de bons candidats pour les thérapies ciblées. Leur effet spécifique sur la prolifération des CSG et pas sur les CSN pourrait s'expliquer par la différence du niveau d'expression des deux récepteurs dans les deux types de cellules. Partant d'un principe d'action de masse, il est tentant de spéculer que les CSG qui expriment entre 2,3 et 3 fois plus les récepteurs NRP1 et PlexA1 que les CSN, aient une signalisation intracellulaire dépendante à ses récepteurs accrue. L'impact du blocage de ces voies en serait d'autant plus important. Si la population de CSN est plutôt homogène, la population de CSG l'est moins, car elle contient de nombreuses cellules progénitrices ou partiellement différenciées (Soeda et al., 2015). Le résultat obtenu ne reflète donc pas uniquement la biologie des CSG. Cette forte hétérogénéité pourrait également expliquer l'effet anti-prolifératif modeste des peptides sur les CSG (compris entre 5 et 11 % d'inhibition de prolifération).

Pour s'affranchir de ce facteur, j'ai procédé au test de formation de sphères : la véritable référence pour mesurer les propriétés d'autorenouvellement et de clonogénicité des cellules souches (Nishi et al., 2014; Wan et al., 2010). Nous avons ici choisi de déposer 30 cellules par puit de plaque 96 puits afin de minimiser les risques de fusion de sphères observés à forte concentration ou de quiescence des cellules à faible concentration, privées de l'effet paracrine. Ce choix arbitraire repose sur des expériences préliminaires dans lesquelles j'ai testé des gammes de concentrations allant de 1 cellule à 100 cellules par puit. La concentration retenue de 30 cellules est apparue comme un bon compromis entre le temps nécessaire pour la formation de sphères quantifiables (> 8 cellules) et le risque modéré de fusion. Il faut également noter que dans ce test, un comptage réel du nombre de cellules par puit était effectué après chaque dépôt pour déterminer de manière exacte le taux de formation de sphères. Ce comptage fastidieux mais néanmoins nécessaire a été facilité par le marquage des cellules avec une sonde cytoplasmique fluorescente (CellTracker orange CMRA) permettant une détection en fluorescence plus sensible. De manière intéressante, la gamme de concentration de peptide testée (de 10^{-7} à 10^{-12} M) a montré que le peptide MTP-NRP1 n'avait pas d'activité à 10^{-7} M dans ces conditions de culture. L'effet maximal est observé à 10^{-9} M et 10^{-10} M. Ce résultat montre que la membrane des cellules joue un rôle majeur dans le contrôle de la partition des peptides et de leur solubilité. A 10^{-7} M, dans le volume de milieu utilisé, le ratio peptide/cellule est trop fort et conduit majoritairement à des interactions peptides/peptides entraînant sans doute l'oligomérisation, voire l'agrégation des peptides qui empêchent ainsi leur activité biologique. La réduction de la concentration permet une partition des peptides à la membrane dans des proportions compatibles avec des interactions avec les segments transmembranaires ciblés. Cet effet reste dose dépendant puisqu'il décroît à 10^{-10} M et se perd à 10^{-12} M. Ce risque d'oligomérisation et/ou précipitation des peptides à trop forte concentration a déjà pu être observé au laboratoire avec des versions rhodaminées du peptide MTP-NRP1 (Roth et al., 2008). Ainsi, le calcul théorique³² montre que le nombre relatif de molécules apportées pour 30 cellules à 10^{-9} M est dans le même ordre de grandeur qu'avec les 10^{-7} M de MTP-NRP1 apportés pour 5 000 cellules. Les deux peptides inhibent d'ailleurs de manière quasi identique la formation de sphères (environ 34 %). Dans tous les cas, cet effet place les peptides comme des molécules actives sur la croissance des CSG à de très faibles concentrations. En effet, tous nos travaux *in vitro* ou *in vivo* en cours ou précédemment publiés ont montré une activité inhibitrice des peptides MTP-NRP1, MTP-

³² Détails du calcul du nombre de peptides par cellules : $\text{Nbr}_{\text{pept}} = (\text{C}_{\text{pept}} \times \text{V}_{\text{pept}} \times \text{N. Avogadro}) / \text{nbr}_{\text{cellules}}$

PlexA1 ou MTP-HER2 à des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-8} M. D'ailleurs nous avons précédemment démontré que MTP-NRP1 diminuait la phosphorylation d'AKT à ces mêmes concentrations, dans un modèle de cancer du sein (Arpel et al., 2016). De manière similaire, le peptide ciblant plexine-A1 dans des cellules de GBM diminue la forme phosphorylée d'AKT (Jacob et al., 2016). Nous n'avons pas recherché l'impact de MTP-NRP1 ou MTP-PlexA1 spécifiquement sur les voies de signalisation des CSG en réponse aux traitements. Pourtant, cette analyse pourrait s'avérer intéressante pour comprendre les différences d'effets mesurés entre les CSG et les CSN. Ces deux populations expriment globalement les mêmes corécepteurs, mais présentent des sensibilités différentes aux peptides TM. Une analyse plus systématique des récepteurs et voies de signalisation dans les deux populations s'avère nécessaire pour comprendre cette différence. Il existe encore peu d'études sur la contribution fonctionnelle de neuropiline-1 ou de plexine-A1 dans les cellules souches neurales. Les fonctions identifiées sont essentiellement liées à la migration comme par exemple pour les cellules de la crête neurale (Schwarz et al., 2009) ou la différenciation (Crigler et al., 2006). Ainsi, cette absence d'effet sur les CSN pourrait être spécifique de la prolifération. Il faudrait donc pouvoir analyser l'impact des peptides MTP sur les autres fonctions des récepteurs.

2.2 Les peptides MTP-NRP1 et MTP-PlexA1 ont des effets opposés sur les CSG *in vivo*.

Les CSG sont connues pour être très résistantes aux traitements conventionnels et leur capacité à initier les tumeurs les placent souvent à la source des récurrences post-chirurgicales (Jackson et al., 2014). Nous avons voulu vérifier si nos deux peptides avaient un effet sur la capacité des CSG à initier une tumeur. Nous avons élaboré un protocole permettant d'analyser la prise de tumeurs à partir de greffes sous-cutanées de CSG NCH644 fluorescentes, sur animal vivant. Pour adresser la question de la capacité intrinsèque des CSG à générer une tumeur, les cellules avaient été préalablement traitées avec du peptide ou son contrôle LDS pendant une heure à 10^{-7} M, juste avant la greffe. De cette manière, on s'assure de ne bloquer que les récepteurs des CSG sans impacter les récepteurs NRP1 ou Plex-A1 dans le microenvironnement de l'hôte. Dans le cas de MTP-NRP1, il a été frappant de remarquer qu'il ne bloque pas l'initiation des tumeurs, mais qu'il entraîne par contre une diminution du volume final des tumeurs équivalent à la diminution de la formation de sphères *in vitro* (environ - 34 %). Dans le cas de MTP-PlexA1, le peptide a bloqué l'initiation

des tumeurs, sans pour autant impacter la taille finale des rares tumeurs qui ont pu se développer (5/20), par rapport au contrôle LDS. Cette dualité fonctionnelle pose encore le problème de la nature exacte du complexe de récepteurs impliqué dans ces processus. En effet, le peptide MTP-NRP1 bloque également la formation du dimère NRP1-PlexA1 (Jacob et al., 2016; Nasarre et al., 2010) tout comme le fait le peptide MTP-PlexA1. Ainsi, la différence d'effet passe nécessairement par l'altération d'autres corécepteurs associés au complexe. Parmi les nombreux récepteurs connus pour interagir avec le système NRP/Plex (Meyer et al., en révision CAM), VEGFR2 apparaît comme un candidat particulièrement intéressant compte tenu de son rôle dans l'initiation du GBM (Yao et al., 2013) et la survie des CSG (Hamerlik et al., 2012). Mais il y a également de nombreux autres co-récepteurs de NRP1 impliqués dans la croissance tumorale et qui pourraient être impliqués. Le récepteur VEGFR1 est notamment responsable de la dissémination de cellules tumorales neuroectodermiques (lignée de PNET Dev) en réponse à la Sema3A en agissant sur ERK1/2, puis p38 (Bagnard et al., 2004, 2001). Les récepteurs C-MET et TGF- β 1 (par sa voie non canonique) en association avec NRP1 augmentent également leur signalisation pro-tumorale en activant les mêmes voies ERK1/2, p38 ou encore Pi3K/AKT (Prud'homme and Glinka, 2012). La thérapie par MTP-NRP1 étend finalement son action à d'autres récepteurs impliqués dans la prolifération des cellules tumorales, un mode d'action atypique qui justifie d'autant plus l'effet observé sur la croissance des tumeurs *in vivo*.

L'identification de corécepteurs spécifiques de plexine-A1 semble plus difficile car les travaux sur ce sujet sont encore peu nombreux. Plexine-A1 régule l'activité de CRMP et Rac, impliqués respectivement dans la plasticité des microtubules et des filaments d'actine (Arimura et al., 2005; Kozma et al., 1997), ou encore FARP2 et R-ras impliqués dans l'adhérence dépendante des intégrines (Toyofuku et al., 2005). Ces voies participent à la dissémination et à l'adhérence des cellules en réponse notamment à la Sema3A. Cela expliquerait l'aptitude du peptide MTP-PlexA1 à diminuer la capacité des CSG à s'ancrer dans leur nouvel environnement après la greffe puis à se disséminer (Bagci et al., 2009).

La recherche des partenaires de signalisation pourrait être menée sur le test de formation de sphères *in vitro* qui est considéré comme prédictif de l'activité des drogues anti-tumorales *in vivo* (Kim and Alexander, 2014). Au-delà de la recherche d'effets potentiellement synergiques ou additifs d'une combinaison des deux peptides MTP, il serait possible de lancer un criblage des conséquences de l'inactivation spécifique par si/sh-RNA des différents partenaires suspectés. Cet effet fonctionnel différent renforce en outre la

notion de spécificité du blocage des segments transmembranaires. En effet, l'une des caractéristiques du segment transmembranaire est de pouvoir réaliser des interactions sélectives sur plusieurs faces de l'hélice transmembranaire qui offre de nombreuses interfaces (motifs) d'interactions. Associées aux capacités de pivot, de piston ou d'orientation (Yu et al., 2015; Hubert et al., 2010) qui démultiplient la mécanique d'interaction, les segments transmembranaires offrent une régulation fine des conformations des domaines extra ou intracellulaires (Arkhipov et al., 2013). Ces capacités fonctionnelles illustrent la complexité du mode d'action des peptides MTP et justifient en même temps le potentiel thérapeutique de ces outils.

Nous avons récemment montré que des animaux pré-traités avec MTP-NRP1 développaient des tumeurs moins volumineuses et en plus petit nombre dans un modèle de métastases de tumeurs du sein (Arpel et al., 2016). Il pourrait donc être intéressant d'inverser le protocole utilisé pour les greffes *in vivo*, en pré-traitant les animaux pendant les trois jours précédents la greffe de CSG qui ne seraient cette fois pas pré-incubées avec le peptide. De cette manière, il serait possible d'étudier la part uniquement microenvironnementale de l'initiation des tumeurs. Cette approche permettrait en outre de tester l'intérêt d'un traitement préventif administré après la chirurgie et/ou la radiothérapie. Dans ce contexte, l'inhibition du système angiogénique de l'hôte par MTP-NRP1 ou MTP-PlexA1 pourrait certainement diminuer la capacité des CSG à se développer, connaissant la grande affinité des CSG pour la niche angiogénique et les cellules endothéliales, vitale à leur survie (Galan-Moya et al., 2014; Calabrese et al., 2007). Il existe par ailleurs déjà des traitements bloquant le VEGF pro-angiogénique comme l'AVASTIN®. Il est donné dans les récidives pour son effet de baisse de l'angiogenèse à court terme. En revanche, il entraîne une normalisation de la formation des vaisseaux à long terme qui se traduit par une récurrence souvent fulgurante, favorisant sans doute les CSG survivantes dans cette niche angiogénique stabilisée. Une thérapie concomitante de peptides MTP-NRP1 ou MTP-PlexA1 pourraient, dans ces circonstances participer à diminuer le dialogue des cellules endothéliales avec les CSG et permettre ainsi de réduire/ralentir le processus de récurrence.

Le Dr. Laure Thomas avait démontré au laboratoire à l'aide de peptides rhodaminés ou biotinylés que les peptides MTP traversent la barrière hémato-encéphalique (BHE ; Jacob et al., en préparation). Cette propriété, bien que discutable dans le cas du glioblastome qui présente une vascularisation imparfaite et anarchique, suggérerait la possibilité d'évaluer

l'effet de ces peptides sur des CSG greffées dans le cerveau de souris. Le travail a pu être conduit avec le peptide MTP-NRP1 administré tous les trois jours à la concentration de 1,5 µg/Kg pendant 25 jours après 5 jours de développement de tumeurs, produites par la greffe de cellules NCH644 fluorescentes dans le striatum de souris. La diminution de l'accroissement des tumeurs observée confirme que le peptide MTP-NRP1 passe effectivement la BHE et agit sur la croissance tumorale en accord avec les autres travaux du laboratoire. La croissance des tumeurs que j'ai obtenues était particulièrement hétérogène (y compris dans le groupe contrôle) et a rendu impossible l'analyse des effets du peptide par une mesure du volume tumoral moyen. Or, grâce à l'utilisation de l'imagerie de fluorescence (système NightOwl) j'ai pu suivre la croissance individuelle des tumeurs. Les résultats de l'expérience sont présentés selon les critères de MacDonald de réponse aux traitements du GBM. Cette classification se base normalement sur la mesure du grand et du petit diamètre de la tumeur obtenus classiquement en IRM et/ou CT-scan. Ces critères ont connu de nombreuses mises à jour ou réévaluations dans plusieurs études cliniques telles que AVAglio (2009), RANO (2010) ou le très récent programme RTOG 0825 (Weller and Yung, 2013) et sont utilisés en clinique humaine pour une meilleure stratification des patients pour la réponse aux traitements. L'application de ce mode d'analyse s'est révélé tout particulièrement intéressant pour les critères RECIST (Eisenhauer et al., 2009; Therasse et al., 2000) dans un article démontrant la meilleure corrélation entre l'efficacité d'un médicament dans un modèle préclinique chez l'animal et les résultats obtenus chez l'Homme (Nguyen et al., 2015; Roberts et al., 2012). Ainsi, nos résultats montrent un ralentissement important de plus de 60 % de la croissance des CSG dans les souris traitées avec MTP-NRP1, accompagné de réponses partielles dans la majorité des souris. Le peptide MTP-NRP1 a donc nécessairement des effets anti-tumoraux qui dépassent ses fonctions habituellement décrites (prolifération, migration, angiogenèse), puisqu'il semble capable d'affecter la composante des CSG.

Ces résultats encourageants devraient être confirmés dans d'autres lignées de CSG, comme celles que nous avons dérivées au laboratoire. En parallèle, une étude similaire devrait être conduite avec le peptide MTP-PlexA1 seul ou en association avec MTP-NRP1 afin d'observer si l'inhibition supplémentaire de plexine-A1 améliorerait encore les résultats. D'ailleurs, les peptides TM apparaissent comme de bons candidats médicaments pour les associations en raison de leur excellent profil de tolérance et leur activité multi-cibles. Les travaux du laboratoire (Fritz et al., en préparation) montrent par exemple que l'association de MTP-NRP1 avec du témozolomide améliore l'effet anti-tumoral dans des

modèles de GBM orthotopiques. De même, l'association de MTP-NRP1 avec du Sunitinib® renforce également l'activité anti-tumorale et anti-angiogénique. Ce peptide est actuellement en cours de développement par la société Peptimimesis, issue des travaux du laboratoire, en partenariat avec un groupe industriel pharmaceutique.

3. Développement du système iMESYS pour le suivi de la différenciation des cellules souches

Une des limitations majeures actuelles dans la caractérisation de la différenciation des cellules est la difficulté de prendre en compte la plasticité du phénomène en raison des techniques d'analyse qui nécessitent le plus souvent de fixer ou de lyser les cellules. Cette étape ne donne finalement qu'une vision statique des choses alors même que la plasticité et l'hétérogénéité régissent les CSG dans le temps. Pour contrecarrer ce biais, certaines études font état de l'usage de rapporteurs fluorescents contrôlés par des promoteurs spécifiques comme par exemple dans l'étude de Ravin et collaborateurs sur l'analyse du lignage et la différenciation de CSN murines (Ravin et al., 2008). En utilisant plusieurs rapporteurs fluorescents contrôlés chacun par un promoteur spécifique d'une lignée cellulaire, nous avons montré qu'il était possible de suivre toutes les possibilités de différenciation des cellules souches dans le temps et ce, sur cellules vivantes. Le développement de ce système inductible à expression mosaïque des protéines fluorescentes (iMESYS) se base avant tout sur la robustesse des promoteurs contrôlant l'expression des protéines cibles. Nous sommes partis du constat qu'une CSG peut potentiellement donner des cellules exprimant des marqueurs des neurones, des astrocytes ou des oligodendrocytes, mais également dans certains cas se transdifférencier en cellules associées aux vaisseaux sanguins (Cheng et al., 2013; Scully et al., 2012; Hallani et al., 2010). Ici, nous avons élaboré un système à 4 vecteurs, chacun composé d'un promoteur spécifique à chaque lignée pouvant découler des CSG et guidant l'expression d'une protéine fluorescente spécifique. Chacune des constructions comporte un antibiotique de sélection eucaryote différent, permettant de sélectionner les cellules ayant intégré de manière stable les transgènes. De cette manière, toute cellule peut accueillir théoriquement les 4 constructions et potentiellement exprimer un ou plusieurs rapporteurs fluorescents selon son destin. C'est à notre connaissance, le premier système permettant une telle approche multicanale et spécifique de plusieurs lignages cellulaires. De plus, comme nous le développerons plus tard, bien que mis au point

pour une application dans les CSG, ce modèle est extensible à toutes les indications et tous les types de cellules en voie de différenciation.

3.1 Choix et critiques du vecteur lentiviral

Le développement du projet a nécessité une période de mise au point avec un challenge particulier pour choisir le vecteur qui devait porter les constructions. Nous avons initialement intégré les premières constructions développées : GFAP-GFP et MAP2-mCherry, dans des vecteurs rétroviraux (squelette plasmidique pQCXIB) en prenant l'avantage de l'infection relativement aisée des cellules en division par les rétrovirus. Il s'est avéré que dans nos expériences, le succès d'infection était médiocre sur des CSG NCH644 et NCH421K (cette lignée n'est pas décrite dans ce manuscrit) pour des raisons mal définies. Nous avons alors transféré les constructions dans des vecteurs lentiviraux, dont les nouvelles générations ont été optimisées pour transduire tous types de cellules parmi lesquelles les cellules souches (Canté-Barrett et al., 2016). Ce modèle se révéla être de loin le plus efficace, avec des succès d'infection montant jusqu'à 50 à 70 % avec un contrôle positif CMV-GFP. Des versions optimisées de lentivirus ont été développées récemment avec des chaînes d'anticorps anti-CD133 enchâssés dans la membrane lipidique des lentivirus, de manière à infecter sélectivement les cellules souches CD133+ (Bayin et al., 2014). On pourrait envisager d'importer ce genre de pseudotypage sur les lentivirus du système iMESYS pour en augmenter encore l'adressage ou la spécificité. Dans ce cas, il devient même possible d'inter-changer les anticorps présents dans la membrane du vecteur, pour modifier leur tropisme et adresser différentes sous populations de CSG en fonction de la nature des marqueurs de surface exprimés.

La montée en puissance et la démocratisation de l'utilisation du système CRISPR/Cas9 laisse penser qu'en débutant le projet aujourd'hui, cette approche aurait pu être favorisée. Cette technique mise au point il y a quelques années permet d'éditer le génome *a volo* en ciblant précisément les *loci* des chromosomes à cibler. Elle facilite grandement l'insertion de transgènes, tout en évitant les parties régulatrices ou codantes de l'ADN des cellules visées (Doudna and Charpentier, 2014). Cette technologie très astucieuse pourrait à terme être utilisée pour minimiser la toxicité cellulaire observée des lentivirus, ou bien simplement servir à la transduction de cellules et de tissus sur lesquels les virus demeurent inefficaces. Sur ce point, les lentivirus utilisés dans le projet iMESYS présentent

certes un bon taux de succès et ont permis la transduction d'un grand nombre de lignées cellulaires (SHS-Y5Y, hNSC#5205, HUVEC, NCH644, GSHB 30), mais l'insertion des transgènes qu'ils portent se fait au hasard dans le génome (Ciuffi, 2008). Les gènes subissant l'intégration des transgènes génèrent dans environ 50 % des cas un splicing alternatif et des versions de transcrits totalement aberrants (Moiani et al., 2012). Ce biais inhérent à l'usage de n'importe quel vecteur lentiviral peut être minimisé en limitant le nombre de copies du transgène apporté. C'est pourquoi j'ai effectué une gamme de concentration de vecteurs allant d'une M.O.I = 1 à 100. J'ai sélectionné la plus faible concentration pour laquelle j'observais le maximum de transduction avec un vecteur portant une construction CMV-GFP, à savoir une M.O.I = 3. Toutes les constructions virales utilisées ont ainsi été titrées par RT-qPCR afin de maîtriser le nombre de copies de transgènes d'iMESYS apportés par cellule. Cela signifie qu'une cellule peut être infectée en théorie au maximum avec 12 copies de transgènes provenant de 4 constructions différentes (chacune étant transduite à une M.O.I = 3). Dans tous les cas, ces valeurs restent dans les standards utilisés en génie moléculaire, habituellement compris entre 1 et 30 (Zhang et al., 2004), mais pouvant parfois atteindre 100 voire 1000, ce qui ne semble plus pertinent (Chen et al., 2013).

3.2 Le système iMESYS est spécifique des types cellulaires qu'il révèle.

Afin de révéler les types cellulaires neuraux (neurone, astrocytes et oligodendrocytes) ou les cellules de type endothéliales, nous avons sélectionné des promoteurs spécifiques de chacune des lignées cellulaires à partir de la bibliographie existante. Il était important de construire le système iMESYS autour de 4 promoteurs révélant des cellules à la fois suffisamment différenciées, pour éviter d'être exprimés trop précocement aux stades de progéniteurs, tout en ayant une activité maintenue le plus longtemps possible dans la voie de différenciation. Nous avons donc choisi les promoteurs des marqueurs spécifiques : GFAP (astrocyte, (Lawlor et al., 2009)), MAP2 (neurone, (Addis et al., 2011)), CNP (oligodendrocytes, (Millet et al., 2012; Yuan et al., 2002)) et Tie-2 (cellules endothéliales, (Li et al., 2010)). Parmi eux, les promoteurs GFAP et CNP peuvent prêter à discussion. Bien que GFAP soit spécifique des astrocytes, les CSN sont maintenues dans un état d'astrocyte souche exprimant également GFAP (Zhang et al., 2015; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Namba et al., 2005). Néanmoins, il demeure le marqueur de référence pour l'étude des astrocytes dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* (von Jonquieres et

al., 2013; Ravin et al., 2008; Brenner et al., 1994). Concernant le promoteur de CNP, il existe deux variantes normalement exprimées à des stades de développement différents. Dans leurs versions optimisées, l'un est court, et l'autre plus long contient le premier exon et le premier intron de la séquence codante du gène de la CNP. Dans notre étude nous avons choisi une séquence promotrice hybride, contenant les deux variantes (dénommées CNP 1/2), pour augmenter le niveau de régulation de l'expression de son gène cible (Gravel et al., 1998).

L'un des points de départ du développement du système iMESYS a été de valider la spécificité de l'expression des protéines fluorescentes en fonction des types cellulaires. J'ai d'abord voulu vérifier que les constructions ne s'activent pas de manière aléatoire dans des cellules COS-7 qui n'expriment aucun des marqueurs (comme le confirme les expériences d'immunomarquage réalisées). De manière complémentaire, il a fallu vérifier l'activité sélective des constructions dans des cellules différenciées. J'ai ainsi pu démontrer que seule la construction MAP2-mCherry s'activait dans des cellules neuronales (SHS-Y5Y) et que la construction Tie-2-mVenus était spécifique des cellules endothéliales, sans qu'aucune autre construction ne s'active dans aucune de ces lignées. Idéalement, il aurait fallu procéder à cette vérification pour les deux autres constructions GFAP-GFP et CNP-CFP. J'ai tenté de le faire sur des cultures gliales mixtes (contenant astrocytes et oligodendrocytes) murines, des tranches organotypiques de cerveau de souris, des cellules précurseurs d'oligodendrocytes murins placées en différenciation. Cependant, il a été absolument impossible de transduire ces préparations avec quelque vecteur viral que ce soit (aucun signal GFP dans la condition de contrôle positif d'infection) ni même en transfection directe des plasmides lentiviraux par JetPEI. Ces contrôles restent donc une priorité pour donner plus de poids à la validité du système. Il est envisagé par exemple de travailler sur des iPSC induites en astrocytes ou oligodendrocyte. Pour pallier à ce problème il serait éventuellement possible de tester les vecteurs lentiviraux pseudotypés avec des anticorps spécifiques des cellules visées (comme ceux chargés avec l'anticorps CD133 présenté plus haut) ou de passer par la technologie CRISPR/Cas9. Cependant, nous avons tout de même trouvé la possibilité de valider la spécificité du système iMESYS en transduisant les constructions individuellement dans des cellules souches neurales humaines embryonnaires (obtenues de P. Dirks, Toronto, Canada). Ces cellules donnent non seulement la possibilité de valider les constructions iMESYS dans un modèle de cellules souches normales, mais représentent également le premier pas d'un transfert de la technologie vers ce type de cellules. J'ai pu y démontrer que le système iMESYS est fidèle, puisque les ratios de cellules souches exprimant les marqueurs de

différenciation coïncident parfaitement avec celles qui expriment les rapporteurs fluorescents correspondant. Il pourrait paraître surprenant que des CSN expriment les gènes rapporteurs relatifs à l'activité des promoteurs spécifiquement neuronaux ou oligodendrocytaires. Néanmoins, il est admis qu'une très faible fraction de cellules plus différenciées subsistent dans ces cultures, habituellement moins de 5 à 10 % (Glaser et al., 2007; Sun et al., 2008), une proportion confirmée par nos propres immunomarquages (cf. résultats). Il apparaît dans ce cas intéressant de voir que le système iMESYS est capable de détecter des populations de cellules minoritaires. Pour plus de précisions dans l'analyse, des immunomarquages de validation dirigés contre les marqueurs spécifiques devront être conduits directement sur les cellules exprimant les rapporteurs fluorescents. Il faudra compléter ces analyses en effectuant des infections multiples de manière à obtenir des CSN avec les trois constructions neurales. Cependant, les premières tentatives montrent que dans les conditions expérimentales similaires au CSG, les CSN ne survivent pas à la sélection par plusieurs antibiotiques, même s'ils sont administrés en fractionné dans le temps. Cependant, en mettant les cellules en condition de différenciation pendant 2 semaines, j'ai pu démontrer que le nombre de cellules GFP+ augmentait rapidement, témoignant de la sensibilité du promoteur. En effectuant le même test de différenciation avec des CSN MAP2-mCherry, j'ai pu observer une stagnation de l'expression basale durant la première semaine, avant une augmentation lente du nombre de cellules exprimant la mCherry. Il est intéressant de noter que les pourcentages de cellules mCherry augmentent dans la lignée de CSN MAP2-mCherry quand le taux de cellules exprimant la GFP n'augmente plus dans l'autre lignée de CSN infectées avec la construction GFAP-GFP. Il serait évidemment intéressant de confirmer cet effet croisé sur une même lignée de CSN transduite avec les deux constructions. Il est à ce stade tentant de spéculer que l'apparition du rapporteur mCherry puisse se faire dans les cellules dans lesquelles le signal GFP baisse. Pour le moment des analyses de différenciation avec des cellules souches neurales portant la construction CNP-CFP sont encore en développement, et demandent à être complétées. En effet, la différenciation de cellules humaines en oligodendrocytes exprimant le CNP nécessite plus de 3 semaines de différenciation, pendant lesquelles, pour des raisons inconnues, les cellules infectées finissent par mourir. Des investigations plus poussées sur la toxicité potentielle des transgènes CNP-CFP ou sur la composition du milieu de culture devront être menées.

Les étapes de développement suivantes ont été effectuées sur des CSG NCH644. Leur caractère tumoral et hautement plastique nous permet de les différencier en seulement 5

jours. Mais il est possible de faire durer les tests jusqu'à 2 semaines et de moduler les apports de facteurs de croissance pour modifier leur comportement de différenciation. Ainsi, après 5 jours de différenciation, des immunomarquages contre les marqueurs neuraux spécifiques ont été effectués sur 3 lignées de NCH644 sélectionnées et stabilisées, portant chacune une seule des constructions iMESYS. Cela a permis de déterminer les pourcentages de co-localisation (et donc d'efficacité du système iMESYS) des immunocytochimies et des rapporteurs fluorescents. Entre 74 % et 88 % des cellules selon la construction présentent à la fois l'immunomarquage et le rapporteur iMESYS. Ce taux élevé montre que la plupart des cellules engagées dans un lignage cellulaire peuvent être révélées avec ce système. En revanche, une portion plus faible de cellules exprime également les marqueurs de différenciation sans exprimer le rapporteur fluorescent et vice-versa. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat. Les cellules exprimant le marqueur sans exprimer le rapporteur iMESYS relié peuvent avoir subi des modifications épigénétiques du transgène comme des méthylations, des modifications de la régulation des histones ou même des pertes partielles/totales de séquences d'ADN (Choi et al., 2013; Nowakowski et al., 2013). Cet effet a été particulièrement décrit dans les cellules souches en cours de différenciation *in vivo* chez la souris. Une analyse des CpGs pourrait probablement répondre à la question du statut des méthylations. Cela laisserait penser que les cellules des lignées stables finissent par méthyler les transgènes lentiviraux. Une des solutions consiste donc à reproduire régulièrement de nouvelles lignées avec les constructions iMESYS. La présence de la protéine cible sans l'expression du rapporteur fluorescent peut aussi simplement illustrer la dynamique du processus de synthèse des protéines et de leur temps de demi-vie. Ainsi, la présence de la protéine sans activité du promoteur peut traduire l'inertie du système : le promoteur n'est plus actif mais le temps de demi-vie des protéines fluorescentes, de l'ordre de 24 à 30 heures (Shaner et al., 2005), les rend encore détectable. Cette inertie du système peut également expliquer le cas des cellules positive pour l'activité du promoteur mais négative pour la protéine cible : le système détecte cette fois l'activation du promoteur sans que la production de la protéine cible ne soit suffisante pour atteindre son seuil de détection. Dans une version ultérieure du système iMESYS, les protéines fluorescentes pourraient être remplacées par des versions mutées volontairement instables à la demi-vie drastiquement diminuée à 5,5 heures (Corish and Tyler-Smith, 1999), voire même 2 heures (Li et al., 1998), pour atteindre un niveau d'analyse précis du temps d'activation des promoteurs.

La validation sur les CSG de la construction endothéliale Tie2-mVenus s'est faite à part. L'objectif était de pouvoir mesurer la capacité de transdifférenciation des CSG. Or, comme expliqué précédemment, ce processus est complexe et sujet à certaines controverses. Dans certains cas, ce sont des phénotypes endothéliaux avec les marqueurs associés qui sont retrouvés (Ricci-Vitiani et al., 2010) alors que d'autres études montrent plutôt un phénotype péricytaire (Scully et al., 2012). Les deux possibilités coexistent probablement, sans s'exclure mutuellement. La question du lien entre l'expression d'un marqueur et la fonction associée reste souvent ouverte. Ainsi, les cellules peuvent exprimer Tie-2, VEGFR, CD31, NG2, desmine ou α -SMA, sans pour autant être capables de former des pseudo-tubes vasculaires *in vitro* (comme le font par exemple les cellules endothéliales) ou même de participer à l'angiogenèse *in vivo*. Après les constructions neurales, le système iMESYS à 4 couleurs et 4 cassettes de sélection n'autorisait donc plus qu'un transgène à ajouter. Nous avons fait le choix de Tie-2, un marqueur spécifique des cellules endothéliales (Li et al., 2010), même si une petite fraction (moins de 5 %) de péricytes d'origine mésenchymateuse l'exprime aussi (De Palma et al., 2005). Il serait d'ailleurs intéressant de former une collection de constructions avec les différents promoteurs vasculaires pour pouvoir analyser également la transdifférenciation péricytaire (Scully et al., 2012). Nos résultats montrent que Tie-2 n'est pas exprimé par les CSG à l'état indifférencié, mais que son expression apparaît en condition de différenciation. Cette induction d'expression est amplifiée par un milieu conditionné de cellules endothéliales contenant 10 % de sérum, après 7 jours. Pourtant, même placées dans le matrigel, les cellules n'étaient pas capables de former des tubes. Peut-être que la présence de cellules endothéliales co-cultivées permettraient aux CSG d'accompagner la formation des tubes en plus d'exprimer le marqueur Tie-2, révélé par l'expression du rapporteur mVenus. Ainsi, cette induction du promoteur Tie-2 révèle le principe de transdifférenciation sans pouvoir le confirmer d'un point de vue fonctionnel. L'analyse *in vivo* de l'activation de cette construction devrait apporter des informations sur ce point.

3.3 Le système iMESYS révèle une expression mosaïque des marqueurs de différenciation dans les CSG

En utilisant le système iMESYS neural complet (les trois constructions simultanément), nous avons pu révéler que les CSG expriment toutes les combinaisons théoriquement possibles (CFP seule, GFP seule, mCherry seule, CFP + GFP, CFP + mCherry,

GFAP + mCherry et les trois ensemble), générant une véritable mosaïque de nuance de couleurs. Cela montre bien la grande hétérogénéité tumorale des CSG comme nous avons pu le voir dans la partie I des résultats. Mais ce constat mène également à dire que le système de rapporteur fluorescent iMESYS permet d'analyser cette hétérogénéité sur des cellules vivantes pour accéder ainsi à la dynamique de ce processus. En effet, avec le suivi de la différenciation pendant 5 jours, on peut remarquer que tous les signaux fluorescents augmentent, signes du processus d'enfoncement des CSG dans des voies différenciation. Dans un test à plus long terme forçant la différenciation vers les voies oligodendrocytaire ou astrocytaire par des milieux de culture spécifiques, les résultats montrent que les CSG suivent les voies indiquées par les facteurs de croissance. Elles expriment davantage de CFP dans le milieu oligodendrocytaire, et davantage de GFAP dans le milieu pro-astrocytaire. Dans ces conditions ne comportant pas de facteur influençant la différenciation neuronale, aucune variation significative du signal mCherry n'est apparue. Cette partie du travail pourra être complétée avec l'ajout de différentes familles de molécules diffusible ou non, afin d'étudier l'impact du microenvironnement sur la différenciation/transdifférenciation. D'ailleurs, j'ai démontré que le système iMESYS pouvait servir d'outil pour suivre l'évolution de l'expression des marqueurs dans des cellules co-cultivées sur des tranches de cerveau pendant au moins 5 jours. Par ailleurs, j'ai débuté des expériences de greffes de CSG portant une ou les trois constructions iMESYS. Les analyses sont actuellement en cours afin d'observer l'activation des rapporteurs fluorescents dans des cellules ayant été greffées et qui se sont développées pendant 30 jours dans le cerveau de souris.

3.4 Le système iMESYS est polyvalent et peut être étendu à d'autres applications

Afin de compléter les applications de ce système, nous envisageons d'observer la différenciation des CSG après greffe intracérébrale et d'analyser le comportement des cellules pendant plusieurs semaines avec des techniques d'imagerie intravitale (Ellenbroek and van Rheenen, 2014). Il existe déjà ce genre de techniques appliquées à des souris génétiquement modifiées exprimant des protéines fluorescentes pour différents compartiments tissulaires (Ricard and Debarbieux, 2014). Le système iMESYS pourrait a priori être également étendu à de nombreuses applications nécessitant un suivi du lignage, dans des études développementales. De manière plus générale, les constructions actuelles ouvrent la possibilité de remplacer les promoteurs actuels par des promoteurs

complètement différents pour suivre un large spectre de phénomènes biologiques de manière concomitante. L'une des constructions en cours de production au laboratoire, consiste par exemple à intégrer le promoteur de facteur de transcription Hif-1 α afin de prendre en compte l'état d'hypoxie des cellules lors de la différenciation.

BIBLIOGRAPHIE

- Aci-Sèche, S., Sawma, P., Hubert, P., Sturgis, J.N., Bagnard, D., Jacob, L., Genest, M., and Garnier, N. (2014). Transmembrane recognition of the semaphorin co-receptors neuropilin 1 and plexin A1: coarse-grained simulations. *PLoS One* 9, e97779.
- Addis, R.C., Hsu, F.-C., Wright, R.L., Dichter, M.A., Coulter, D.A., and Gearhart, J.D. (2011a). Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector. *PLoS One* 6, e28719.
- Adini, A., Adini, I., Ghosh, K., Benny, O., Pravda, E., Hu, R., Luyindula, D., and D'Amato, R.J. (2013). The stem cell marker prominin-1/CD133 interacts with vascular endothelial growth factor and potentiates its action. *Angiogenesis* 16, 405–416.
- Aguirre, A., and Gallo, V. (2004). Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10530–10541.
- Alcantara Llaguno, S.R., Chen, J., and Parada, L.F. (2009). Signaling in Malignant Astrocytomas: Role of Neural Stem Cells and its Therapeutic Implications. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 7124–7129.
- Alcantara Llaguno, S.R., Wang, Z., Sun, D., Chen, J., Xu, J., Kim, E., Hatanpaa, K.J., Raisanen, J.M., Burns, D.K., Johnson, J.E., et al. (2015). Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* 28, 429–440.
- Altman, J., and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335.
- Altmann, C.R., and Brivanlou, A.H. (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int. Rev. Cytol.* 203, 447–482.
- Alvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683–686.
- Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., and Nottebohm, F. (1990). Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5, 101–109.
- Arias-Carrión, O. (2008). Basic mechanisms of rTMS: Implications in Parkinson’s disease. *Int. Arch. Med.* 1, 2.
- Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., et al. (2005). Phosphorylation by Rho Kinase Regulates CRMP-2 Activity in Growth Cones. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9973–9984.
- Arkipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N.F., Eastwood, M.P., Wemmer, D.E., Kuriyan, J., and Shaw, D.E. (2013). Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* 152, 557–569.
- Arpel, A., Sawma, P., Spenlé, C., Fritz, J., Meyer, L., Garnier, N., Velázquez-Quesada, I., Hussenet, T., Aci-Sèche, S., Baumlin, N., et al. (2014). Transmembrane Domain Targeting Peptide Antagonizing ErbB2/Neu Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis. *Cell Rep.* 8, 1714–1721.

Arpel, A., Gamper, C., Spenlé, C., Fernandez, A., Jacob, L., Baumlin, N., Laquerriere, P., Orend, G., Crémel, G., Bagnard, D., et al. (2016). Inhibition of primary breast tumor growth and metastasis using a neuropilin-1 transmembrane domain interfering peptide. *Oncotarget* 5.

Assad Kahn, S., Costa, S.L., Gholamin, S., Nitta, R.T., Dubois, L.G., Fève, M., Zeniou, M., Coelho, P.L.C., El-Habr, E., Cadusseau, J., et al. (2016). The anti-hypertensive drug prazosin inhibits glioblastoma growth via the PKC δ -dependent inhibition of the AKT pathway. *EMBO Mol. Med.* 8, 511–526.

Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., and Ahmed, A.U. (2014). Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ.* 21, 1119–1131.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.

Bagci, T., Wu, J.K., Pfannl, R., Ilag, L.L., and Jay, D.G. (2009). Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene* 28, 3537–3550.

Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S.-T., Dufay, N., Lohrum, M., Püschel, A.W., Belin, M.-F., Bolz, J., and Thomasset, N. (2001). Semaphorin 3A–Vascular Endothelial Growth Factor-165 Balance Mediates Migration and Apoptosis of Neural Progenitor Cells by the Recruitment of Shared Receptor. *J. Neurosci.* 21, 3332–3341.

Bagnard, D., Sainturet, N., Meyronet, D., Perraut, M., Miehé, M., Roussel, G., Aunis, D., Belin, M.F., and Thomasset, N. (2004a). Differential MAP kinases activation during semaphorin3A-induced repulsion or apoptosis of neural progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 722–731.

Bagri, A., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 13–31.

Ball, S.G., Bayley, C., Shuttleworth, C.A., and Kielty, C.M. (2010). Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem. J.* 427, 29–40.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.

Barazzuol, L., Jena, R., Burnet, N.G., Meira, L.B., Jeynes, J.C.G., Kirkby, K.J., and Kirkby, N.F. (2013). Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 combined with radiotherapy and temozolomide in glioblastoma. *Radiat. Oncol.* 8, 65.

Barnes, A.P., and Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 347–381.

Barrantes-Freer, A., Kim, E., Bielanska, J., Giese, A., Mortensen, L.S., Schulz-Schaeffer, W.J., Stadelmann, C., Brück, W., and Pardo, L.A. (2013). Human Glioma–Initiating Cells Show a Distinct Immature Phenotype Resembling but Not Identical to NG2 Glia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 307–324.

Barres, B.A. (2008). The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* 60, 430–440.

Bauer, N., Fonseca, A.-V., Florek, M., Freund, D., Jászai, J., Bornhäuser, M., Fargeas, C.A., and Corbeil, D. (2008). New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1 (CD133). *Cells Tissues Organs* 188, 127–138.

Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol. Rev.* 81, 871–927.

Bayin, N.S., Modrek, A.S., Dietrich, A., Lebowitz, J., Abel, T., Song, H.-R., Schober, M., Zagzag, D., Buchholz, C.J., Chao, M.V., et al. (2014). Selective Lentiviral Gene Delivery to CD133-Expressing Human Glioblastoma Stem Cells. *PLOS ONE* 9, e116114.

Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C.P. (2007). CD133+ and CD133– Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles. *Cancer Res.* 67, 4010–4015.

Beier, D., Schulz, J.B., and Beier, C.P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol. Cancer* 10, 128.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Rev. D'Épidémiologie Santé Publique* 56, 159–175.

Berezovsky, A.D., Poisson, L.M., Cherba, D., Webb, C.P., Transou, A.D., Lemke, N.W., Hong, X., Hasselbach, L.A., Irtenkauf, S.M., Mikkelsen, T., et al. (2014). Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia N. Y. N* 16, 193–206, 206-25.

Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 729–777.

Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 967–975.

Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., and Freedman, L.S. (1978). Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res.* 38, 3751–3757.

Binello, E., and Germano, I.M. (2011). Targeting glioma stem cells: a novel framework for brain tumors. *Cancer Sci.* 102, 1958–1966.

Bleau, A.-M., Hambarzumyan, D., Ozawa, T., Fomchenko, E.I., Huse, J.T., Brennan, C.W., and Holland, E.C. (2009). PTEN/PI3K/Akt Pathway Regulates the Side Population Phenotype and ABCG2 Activity in Glioma Tumor Stem-like Cells. *Cell Stem Cell* 4, 226–235.

Bongso, A., and Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 18, 827–842.

Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., and Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 67, 139–152.

Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2004). Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 84, 397–405.

- Brazel, C.Y., Limke, T.L., Osborne, J.K., Miura, T., Cai, J., Pevny, L., and Rao, M.S. (2005). Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 4, 197–207.
- Brennan, C.W., Verhaak, R.G.W., McKenna, A., Campos, B., Noushmehr, H., Salama, S.R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J.Z., Berman, S.H., et al. (2013). The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell* 155, 462–477.
- Brenner, M., Kisseberth, W.C., Su, Y., Besnard, F., and Messing, A. (1994). GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 1030–1037.
- Brescia, P., Richichi, C., and Pelicci, G. (2012). Current Strategies for Identification of Glioma Stem Cells: Adequate or Unsatisfactory? *J. Oncol.* 2012, e376894.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., and Price, P.J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567–576.
- Broadley, K.W.R., Hunn, M.K., Farrand, K.J., Price, K.M., Grasso, C., Miller, R.J., Hermans, I.F., and McConnell, M.J. (2011). Side Population is Not Necessary or Sufficient for a Cancer Stem Cell Phenotype in Glioblastoma Multiforme. *STEM CELLS* 29, 452–461.
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., and Gstraunthaler, G. (2010). Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 27, 53–62.
- Bryant, D.M., Datta, A., Rodríguez-Fraticelli, A.E., Peränen, J., Martín-Belmonte, F., and Mostov, K.E. (2010). A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat. Cell Biol.* 12, 1035–1045.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8033–8037.
- Cai, Y., and Mikkelsen, J.G. (2016). Lentiviral delivery of proteins for genome engineering. *Curr. Gene Ther.*
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., et al. (2007). A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell* 11, 69–82.
- Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L., Fuss, J.O., Campisi, J., Yaswen, P., Cooper, P.K., and Kaufman, P.D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4, e6529.
- Campos, B., and Herold-Mende, C.C. (2010). Insight into the complex regulation of CD133 in glioma. *Int. J. Cancer* 128, 501–510.
- Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K.E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., et al. (2010). Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 2715–2728.
- Campos, B., Zeng, L., Daotrong, P.H., Eckstein, V., Unterberg, A., Mairbäurl, H., and Herold-Mende, C. (2011). Expression and regulation of AC133 and CD133 in glioblastoma. *Glia* 59, 1974–1986.

- Canté-Barrett, K., Mendes, R.D., Smits, W.K., van Helsdingen-van Wijk, Y.M., Pieters, R., and Meijerink, J.P.P. (2016a). Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Res. Notes* 9, 312.
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D.S., Liu, Y., Fong, D.M., Young, D., and Doring, M.J. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat. Genet.* 36, 827–835.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 417–427.
- Castellani, V., Chédotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., and Rougon, G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27, 237–249.
- Chahal, P.S., Schulze, E., Tran, R., Montes, J., and Kamen, A.A. (2014). Production of adeno-associated virus (AAV) serotypes by transient transfection of HEK293 cell suspension cultures for gene delivery. *J. Virol. Methods* 196, 163–173.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.
- Challita, P.M., and Kohn, D.B. (1994). Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2567–2571.
- Chamberlain, K.A., Nanescu, S.E., Psachoulia, K., and Huang, J.K. (2015). Oligodendrocyte regeneration: Its significance in myelin replacement and neuroprotection in multiple sclerosis. *Neuropharmacology*.
- Chen, C., Akerstrom, V., Baus, J., Lan, M.S., and Breslin, M.B. (2013). Comparative analysis of the transduction efficiency of five adeno associated virus serotypes and VSV-G pseudotype lentiviral vector in lung cancer cells. *Virology* 453, 86.
- Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., and Zeniou, M. (2016). Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy. *Stem Cells Int.* 2016.
- Chen, X., Fang, J., Wang, S., Liu, H., Du, X., Chen, J., Li, X., Yang, Y., Zhang, B., and Zhang, W. (2014). A new mosaic pattern in glioma vascularization: exogenous endothelial progenitor cells integrating into the vessels containing tumor-derived endothelial cells. *Oncotarget* 5, 1955–1968.
- Cheng, L., Wu, Q., Huang, Z., Guryanova, O.A., Huang, Q., Shou, W., Rich, J.N., and Bao, S. (2011). L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1. *EMBO J.* 30, 800–813.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth. *Cell* 153, 139–152.
- Choi, K.-H., Park, J.-K., Kim, H.-S., Uh, K.-J., Son, D.-C., and Lee, C.-K. (2013). Epigenetic Changes of Lentiviral Transgenes in Porcine Stem Cells Derived from Embryonic Origin. *PLOS ONE* 8, e72184.
- Chojnacki, A., and Weiss, S. (2008). Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat. Protoc.* 3, 935–940.

- Chojnacki, A., Shimazaki, T., Gregg, C., Weinmaster, G., and Weiss, S. (2003). Glycoprotein 130 signaling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 1730–1741.
- Ciuffi, A. (2008). Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Curr. Gene Ther.* *8*, 419–429.
- Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat. Neurosci.* *3*, 1091–1097.
- Corish, P., and Tyler-Smith, C. (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* *12*, 1035–1040.
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Locatelli, F., Papadimitriou, D., Salani, S., Del Bo, R., Ghezzi, S., Strazzer, S., et al. (2007). Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression. *Exp. Neurol.* *205*, 547–562.
- Crigler, L., Robey, R.C., Asawachaicharn, A., Gaupp, D., and Phinney, D.G. (2006). Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp. Neurol.* *198*, 54–64.
- Cummings, B.J., Uchida, N., Tamaki, S.J., Salazar, D.L., Hooshmand, M., Summers, R., Gage, F.H., and Anderson, A.J. (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14069–14074.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., and Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* *312*, 763–767.
- Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. (2000). [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann. Pathol.* *20*, 413–428.
- De Palma, M., Veneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* *8*, 211–226.
- Devanna, P., Middelbeek, J., and Vernes, S.C. (2014). FOXP2 drives neuronal differentiation by interacting with retinoic acid signaling pathways. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- Di Donate, P., Bergery, A., Largilliere, S., and Lemaire, J.J. (2000). La neuronavigation : principe et intérêt. *ITBM-RBM* *21*, 70–77.
- Diehn, M., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2009). Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. *Semin. Radiat. Oncol.* *19*, 78–86.
- Ding, B.-S., James, D., Iyer, R., Falcatori, I., Hambardzumyan, D., Wang, S., Butler, J.M., Rabbany, S.Y., and Hormigo, A. (2013). Prominin 1/CD133 endothelium sustains growth of proneural glioma. *PLoS One* *8*, e62150.
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *13*, 543–550.

- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703–716.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron* 36, 1021–1034.
- Dorey, K., and Amaya, E. (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development* 137, 3731–3742.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Ducray, F., Idbaih, A., Wang, X.-W., Cheneau, C., Labussiere, M., and Sanson, M. (2011). Predictive and prognostic factors for gliomas. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 11, 781–789.
- Dufour, C., Cadusseau, J., Varlet, P., Surena, A.-L., de Faria, G.P., Dias-Morais, A., Auger, N., Léonard, N., Daudigeos, E., Dantas-Barbosa, C., et al. (2009). Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2373–2382.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 18, 884–901.
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., et al. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 45, 228–247.
- El Hallani, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Thomas, J.-L., Eichmann, A., et al. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain J. Neurol.* 133, 973–982.
- El Hallani, S., Colin, C., El Houfi, Y., Idbaih, A., Boisselier, B., Marie, Y., Ravassard, P., Labussière, M., Mokhtari, K., Thomas, J.-L., et al. (2014). Tumor and Endothelial Cell Hybrids Participate in Glioblastoma Vasculature. *BioMed Res. Int.* 2014.
- Ellenbroek, S.I.J., and van Rheenen, J. (2014). Imaging hallmarks of cancer in living mice. *Nat. Rev. Cancer* 14, 406–418.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., and Comella, J.X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J. Neurochem.* 75, 991–1003.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317.
- Esparza, R., Azad, T.D., Feroze, A.H., Mitra, S.S., and Cheshier, S.H. (2015). Glioblastoma stem cells and stem cell-targeting immunotherapies. *J. Neurooncol.* 1–9.

- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Facchino, S., Abdouh, M., Chatoo, W., and Bernier, G. (2010). BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 10096–10111.
- Falk, A., Holmström, N., Carlén, M., Cassidy, R., Lundberg, C., and Frisén, J. (2002). Gene delivery to adult neural stem cells. *Exp. Cell Res.* 279, 34–39.
- Fan, X., Khaki, L., Zhu, T.S., Soules, M.E., Talsma, C.E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y.-M., Maciaczyk, J., et al. (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 5–16.
- Fernandez-Fuente, G., Mollinedo, P., Grande, L., Vazquez-Barquero, A., and Fernandez-Luna, J.L. (2014). Culture Dimensionality Influences the Resistance of Glioblastoma Stem-like Cells to Multikinase Inhibitors. *Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 1664–1672.
- Fessler, E., Borovski, T., and Medema, J.P. (2015). Endothelial cells induce cancer stem cell features in differentiated glioblastoma cells via bFGF. *Mol. Cancer* 14, 157.
- Firth, A.L., and Yuan, J.X.-J. (2012). Identification of functional progenitor cells in the pulmonary vasculature. *Pulm. Circ.* 2, 84–100.
- Fogal, B., McClaskey, C., Yan, S., Yan, H., and Rivkees, S.A. (2010). Diazoxide Promotes Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation and Myelination. *PLoS ONE* 5, e10906.
- Francescone, R., Scully, S., Bentley, B., Yan, W., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., and Shao, R. (2012). Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *J. Biol. Chem.* 287, 24821–24831.
- Fu, H., Qi, Y., Tan, M., Cai, J., Takebayashi, H., Nakafuku, M., Richardson, W., and Qiu, M. (2002). Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 129, 681–693.
- Fu, J., Rodova, M., Nanta, R., Meeker, D., Van Veldhuizen, P.J., Srivastava, R.K., and Shankar, S. (2013). NPV-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial mesenchymal transition and self-renewal of glioblastoma initiating cells by regulating miR-21, miR-128, and miR-200. *Neuro-Oncol.* 15, 691–706.
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161, 1644–1655.
- Galanaud, D., Nicoli, F., Chinot, O., Confort-Gouny, S., Figarella-Branger, D., Roche, P., Fuentès, S., Le Fur, Y., Ranjeva, J.-P., and Cozzone, P.J. (2006). Noninvasive diagnostic assessment of brain tumors using combined in vivo MR imaging and spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 55, 1236–1245.
- Galan-Moya, E.M., Treps, L., Oliver, L., Chneiweiss, H., Vallette, F.M., Bidère, N., and Gavard, J. (2014). Endothelial Secreted Factors Suppress Mitogen Deprivation-Induced Autophagy and Apoptosis in Glioblastoma Stem-Like Cells. *PLoS ONE* 9.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and Characterization of Tumorigenic, Stem-Like Neural Precursors from Human Glioblastoma. *Cancer Res.* 64, 7011–7021.

- Ge, H., Tan, L., Wu, P., Yin, Y., Liu, X., Meng, H., Cui, G., Wu, N., Lin, J., Hu, R., et al. (2015). Poly-L-ornithine promotes preferred differentiation of neural stem/progenitor cells via ERK signalling pathway. *Sci. Rep.* 5, 15535.
- Gehl, J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* 177, 437–447.
- Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., et al. (2012). Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N. Engl. J. Med.* 366, 883–892.
- Ghazi, S.O., Stark, M., Zhao, Z., Mobley, B.C., Munden, A., Hover, L., and Abel, T.W. (2012). Cell of Origin Determines Tumor Phenotype in an Oncogenic Ras/p53 Knockout Transgenic Model of High-Grade Glioma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*
- Giachino, C., Basak, O., Lugert, S., Knuckles, P., Obernier, K., Fiorelli, R., Frank, S., Raineteau, O., Alvarez-Buylla, A., and Taylor, V. (2014). Molecular Diversity Subdivides the Adult Forebrain Neural Stem Cell Population. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 70–84.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., et al. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442–451.
- Giraudon, P., Dufay, N., Hardin, H., Reboul, A., Tardy, M., and Belin, M.F. (1993). Differentiation of a medulloblastoma cell line towards an astrocytic lineage using the human T lymphotropic retrovirus-1. *Neuroscience* 52, 1069–1079.
- Glaser, T., Pollard, S.M., Smith, A., and Brüstle, O. (2007). Tripotential Differentiation of Adherently Expandable Neural Stem (NS) Cells. *PLoS ONE* 2, e298.
- Glinka, Y., and Prud'homme, G.J. (2008). Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J. Leukoc. Biol.* 84, 302–310.
- Goffart, N., Kroonen, J., and Rogister, B. (2013). Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment. *Cancers* 5, 1049–1071.
- Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788.
- Gravel, M., Di Polo, A., Valera, P.B., and Braun, P.E. (1998). Four-kilobase sequence of the mouse CNP gene directs spatial and temporal expression of lacZ in transgenic mice. *J. Neurosci. Res.* 53, 393–404.
- Greve, B., Kelsch, R., Spaniol, K., Eich, H.T., and Götte, M. (2012). Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry A* 81A, 284–293.
- Gritti, A., Frölichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E.A., Cova, L., Pagano, S.F., Bjornson, C.R., and Vescovi, A.L. (1999). Epidermal and Fibroblast Growth Factors Behave as Mitogenic Regulators for a Single Multipotent Stem Cell-Like Population from the Subventricular Region of the Adult Mouse Forebrain. *J. Neurosci.* 19, 3287–3297.
- Guichet, P.-O., Guelfi, S., Teigell, M., Hoppe, L., Bakalara, N., Bauchet, L., Duffau, H., Lamszus, K., Rothhut, B., and Hugnot, J.-P. (2014). Notch1 stimulation induces a vascularization switch with pericyte-like cell differentiation of glioblastoma stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio.*

- Gürsel, D.B., Beyene, R.T., Hofstetter, C., Greenfield, J.P., Souweidane, M.M., Kaplitt, M., Arango-Lievano, M., Howard, B., and Boockvar, J.A. (2011). Optimization of glioblastoma multiforme stem cell isolation, transfection, and transduction. *J. Neurooncol.* *104*, 509–522.
- Hale, J.S., Sinyuk, M., Rich, J.N., and Lathia, J.D. (2013). Decoding the cancer stem cell hypothesis in glioblastoma. *CNS Oncol.* *2*.
- Hall, P.E., Lathia, J.D., Caldwell, M.A., and French-Constant, C. (2008). Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media. *BMC Neurosci.* *9*, 71.
- Hallani, S.E., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Thomas, J.-L., Eichmann, A., et al. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain* *133*, 973–982.
- Hamerlik, P., Lathia, J.D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., Moudry, P., Bartek, J., Jr, Fischer, W., Lukas, J., et al. (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J. Exp. Med.* *209*, 507–520.
- Han, S.-W., Nakamura, C., Kotobuki, N., Obataya, I., Ohgushi, H., Nagamune, T., and Miyake, J. (2008). High-efficiency DNA injection into a single human mesenchymal stem cell using a nanoneedle and atomic force microscopy. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *4*, 215–225.
- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., Xu, Q., Oberheim, N.A., Bekar, L., Betstadt, S., et al. (2013). Forebrain Engraftment by Human Glial Progenitor Cells Enhances Synaptic Plasticity and Learning in Adult Mice. *Cell Stem Cell* *12*, 342–353.
- Hardee, M.E., and Zagzag, D. (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am. J. Pathol.* *181*, 1126–1141.
- Haydon, P.G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 185–193.
- Hayon, Y., Dashevsky, O., Shai, E., Varon, D., and Leker, R.R. (2012). Platelet Microparticles Promote Neural Stem Cell Proliferation, Survival and Differentiation. *J. Mol. Neurosci.* *47*, 659–665.
- He, Z., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin Is a Receptor for the Axonal Chemorepellent Semaphorin III. *Cell* *90*, 739–751.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15178–15183.
- Himathongkham, S., and Luciw, P.A. (1996). Restriction of HIV-1 (subtype B) replication at the entry step in rhesus macaque cells. *Virology* *219*, 485–488.
- Hippenmeyer, S., Youn, Y.H., Moon, H.M., Miyamichi, K., Zong, H., Wynshaw-Boris, A., and Luo, L. (2010). Genetic mosaic dissection of *Lis1* and *Ndel1* in neuronal migration. *Neuron* *68*, 695–709.
- Hirata, E., Arakawa, Y., Shirahata, M., Yamaguchi, M., Kishi, Y., Okada, T., Takahashi, J.A., Matsuda, M., and Hashimoto, N. (2009). Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue. *Cancer Sci.* *100*, 1451–1459.
- von Holst, A. (2008). Tenascin C in stem cell niches: redundant, permissive or instructive? *Cells Tissues Organs* *188*, 170–177.

von Holst, A., Egbers, U., Prochiantz, A., and Faissner, A. (2007). Neural stem/progenitor cells express 20 tenascin C isoforms that are differentially regulated by Pax6. *J. Biol. Chem.* *282*, 9172–9181.

Hong, T.-M., Chen, Y.-L., Wu, Y.-Y., Yuan, A., Chao, Y.-C., Chung, Y.-C., Wu, M.-H., Yang, S.-C., Pan, S.-H., Shih, J.-Y., et al. (2007). Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 4759–4768.

Hu, B., Guo, P., Bar-Joseph, I., Imanishi, Y., Jarzynka, M.J., Bogler, O., Mikkelsen, T., Hirose, T., Nishikawa, R., and Cheng, S.Y. (2007). Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* *26*, 5577–5586.

Hubert, P., Sawma, P., Duneau, J.-P., Khao, J., Hénin, J., Bagnard, D., and Sturgis, J. (2010). Single-spanning transmembrane domains in cell growth and cell-cell interactions. *Cell Adhes. Migr.* *4*, 313–324.

Iacopino, F., Angelucci, C., Piacentini, R., Biamonte, F., Mangiola, A., Maira, G., Grassi, C., and Sica, G. (2014a). Isolation of Cancer Stem Cells from Three Human Glioblastoma Cell Lines: Characterization of Two Selected Clones. *PLOS ONE* *9*, e105166.

Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* *39*, 193–206.

Ishiwata, T., Teduka, K., Yamamoto, T., Kawahara, K., Matsuda, Y., and Naito, Z. (2011). Neuroepithelial stem cell marker nestin regulates the migration, invasion and growth of human gliomas. *Oncol. Rep.* *26*, 91–99.

Jablonska, B., Aguirre, A., Raymond, M., Szabo, G., Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G.-L., Song, H., and Gallo, V. (2010). Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat. Neurosci.* *13*, 541–550.

Jackson, E.L., Garcia-Verdugo, J.M., Gil-Perotin, S., Roy, M., Quinones-Hinojosa, A., VandenBerg, S., and Alvarez-Buylla, A. (2006). PDGFR α -Positive B Cells Are Neural Stem Cells in the Adult SVZ that Form Glioma-like Growths in Response to Increased PDGF Signaling. *Neuron* *51*, 187–199.

Jackson, M., Hassiotou, F., and Nowak, A. (2014). Glioblastoma stem-like cells: at the root of tumor recurrence and a therapeutic target. *Carcinogenesis* bgu243.

Jacob, L., Sawma, P., Garnier, N., Meyer, L.A.T., Fritz, J., Hussenet, T., Spenlé, C., Goetz, J., Vermot, J., Fernandez, A., et al. (2016). Inhibition of PlexA1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using a transmembrane domain targeting peptide. *Oncotarget* *5*.

Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G., and Batchelor, T.T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 610–622.

Jakovcevski, I., Filipovic, R., Mo, Z., Rakic, S., Zecevic, N., Jakovcevski, I., Filipovic, R., Mo, Z., Rakic, S., and Zecevic, N. (2009). Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front. Neuroanat.* *3*, 5.

Janssen, B.J.C., Malinauskas, T., Weir, G.A., Cader, M.Z., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2012). Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1293–1299.

- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11946–11950.
- Jin, X., Jin, X., Jung, J.-E., Beck, S., and Kim, H. (2013). Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 433, 496–501.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- von Jonquieres, G., Mersmann, N., Klugmann, C.B., Harasta, A.E., Lutz, B., Teahan, O., Housley, G.D., Frohlich, D., Kramer-Albers, E.-M., and Klugmann, M. (2013). Glial Promoter Selectivity following AAV-Delivery to the Immature Brain. *PLoS ONE* 8.
- Joo, K.M., Kim, S.Y., Jin, X., Song, S.Y., Kong, D.-S., Lee, J.-I., Jeon, J.W., Kim, M.H., Kang, B.G., Jung, Y., et al. (2008). Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab. Invest.* 88, 808–815.
- Joo, K.M., Jin, J., Kang, B.G., Lee, S.J., Kim, K.H., Yang, H., Lee, Y.-A., Cho, Y.J., Im, Y.-S., Lee, D.-S., et al. (2012). Trans-Differentiation of Neural Stem Cells: A Therapeutic Mechanism Against the Radiation Induced Brain Damage. *PLOS ONE* 7, e25936.
- Jordan, M., and Wurm, F. (2004). Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods San Diego Calif* 33, 136–143.
- Kalkan, R. (2015). Glioblastoma Stem Cells as a New Therapeutic Target for Glioblastoma. *Clin. Med. Insights Oncol.* 9, 95–103.
- Kalyani, A., Hobson, K., and Rao, M.S. (1997). Neuroepithelial Stem Cells from the Embryonic Spinal Cord: Isolation, Characterization, and Clonal Analysis. *Dev. Biol.* 186, 202–223.
- Kang, W., and Hébert, J.M. (2012). A Sox2 BAC Transgenic Approach for Targeting Adult Neural Stem Cells. *PLOS ONE* 7, e49038.
- Kang, T.-W., Choi, S.W., Yang, S.-R., Shin, T.-H., Kim, H.-S., Yu, K.-R., Hong, I.-S., Ro, S., Cho, J.M., and Kang, K.-S. (2014). Growth arrest and forced differentiation of human primary glioblastoma multiforme by a novel small molecule. *Sci. Rep.* 4.
- Katajisto, P., Döhla, J., Chaffer, C., Pentimikko, N., Marjanovic, N., Iqbal, S., Zoncu, R., Chen, W., Weinberg, R.A., and Sabatini, D.M. (2015). Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* 348, 340–343.
- Kazuki, Y., and Oshimura, M. (2011). Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 1591–1601.
- Keung, A.J., Dong, M., Schaffer, D.V., and Kumar, S. (2013). Pan-neuronal maturation but not neuronal subtype differentiation of adult neural stem cells is mechanosensitive. *Sci. Rep.* 3.
- Kigel, B., Rabinowicz, N., Varshavsky, A., Kessler, O., and Neufeld, G. (2011). Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling. *Blood* 118, 4285–4296.

- Kim, S., and Alexander, C.M. (2014). Tumorsphere assay provides more accurate prediction of in vivo responses to chemotherapeutics. *Biotechnol. Lett.* *36*, 481–488.
- Kirby, E.D., Kuwahara, A.A., Messer, R.L., and Wyss-Coray, T. (2015). Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 4128–4133.
- Knoblich, J.A. (2008). Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* *132*, 583–597.
- Kolodkin, A.L., and Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and Molecules of Neuronal Wiring: A Primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Komada, M. (2012). Sonic hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating cell cycle kinetics during development of the neocortex. *Congenit. Anom.* *52*, 72–77.
- Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., and Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 1201–1211.
- Kretzschmar, K., and Watt, F.M. (2012). Lineage Tracing. *Cell* *148*, 33–45.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* *32*, 149–184.
- Kwon, C.-H., Zhao, D., Chen, J., Alcantara, S., Li, Y., Burns, D.K., Mason, R.P., Lee, E.Y.-H.P., Wu, H., and Parada, L.F. (2008). Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res.* *68*, 3286–3294.
- Labrakakis, C., Patt, S., Weydt, P., Cervós-Navarro, J., Meyer, R., and Kettenmann, H. (1997). Action potential-generating cells in human glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *56*, 243–254.
- Labrakakis, C., Patt, S., Hartmann, J., and Kettenmann, H. (1998). Glutamate receptor activation can trigger electrical activity in human glioma cells. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 2153–2162.
- Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., and Schaffer, D.V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* *6*, 21–27.
- Lamb, B.T., and Gearhart, J.D. (1995). YAC transgenics and the study of genetics and human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *5*, 342–348.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* *367*, 645–648.
- Lathia, J.D., Patton, B., Eckley, D.M., Magnus, T., Mughal, M.R., Sasaki, T., Caldwell, M.A., Rao, M.S., Mattson, M.P., and French-Constant, C. (2007). Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J. Comp. Neurol.* *505*, 630–643.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., MacSwords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., et al. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 421–432.

- Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L.L., and Rich, J.N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* *29*, 1203–1217.
- Law, J.W.S., and Lee, A.Y.W. (2012). The Role of Semaphorins and Their Receptors in Gliomas. *J. Signal Transduct.* *2012*.
- Lawlor, P.A., Bland, R.J., Mouravlev, A., Young, D., and During, M.J. (2009). Efficient gene delivery and selective transduction of glial cells in the mammalian brain by AAV serotypes isolated from nonhuman primates. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 1692–1702.
- Le, A.P., Huang, Y., Pingle, S.C., Kesari, S., Wang, H., Yong, R.L., Zou, H., and Friedel, R.H. (2015). Plexin-B2 promotes invasive growth of malignant glioma. *Oncotarget* *6*, 7293–7304.
- Leclerc, C., Haeich, J., Aulestia, F.J., Kilhoffer, M.-C., Miller, A.L., Néant, I., Webb, S.E., Schaeffer, E., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., et al. (2016). Calcium signaling orchestrates glioblastoma development: Facts and conjunctures. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 1447–1459.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., et al. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* *9*, 391–403.
- Lemke, D., Weiler, M., Blaes, J., Wiestler, B., Jestaedt, L., Klein, A.-C., Löw, S., Eisele, G., Radlwimmer, B., Capper, D., et al. (2014). Primary glioblastoma cultures: can profiling of stem cell markers predict radiotherapy sensitivity? *J. Neurochem.* *131*, 251–264.
- Lemkine, G.F., Mantero, S., Migné, C., Raji, A., Goula, D., Normandie, P., Levi, G., and Demeneix, B.A. (2002). Preferential Transfection of Adult Mouse Neural Stem Cells and Their Immediate Progeny in Vivo with Polyethylenimine. *Mol. Cell. Neurosci.* *19*, 165–174.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* *60*, 585–595.
- Levy, D.E., and Lee, C. (2002). What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* *109*, 1143–1148.
- Li, L., and Bhatia, R. (2011). Molecular Pathways: Stem Cell Quiescence. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 4936–4941.
- Li, W., and Graeber, M.B. (2012). The molecular profile of microglia under the influence of glioma. *Neuro-Oncol.* *14*, 958–978.
- Li, P., Liu, Y., Maynard, J., Tang, Y., and Deisseroth, A. (2010). Use of Adenoviral Vectors to Target Chemotherapy to Tumor Vascular Endothelial Cells Suppresses Growth of Breast Cancer and Melanoma. *Mol. Ther.* *18*, 921–928.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C.-C., and Kain, S.R. (1998). Generation of Destabilized Green Fluorescent Protein as a Transcription Reporter. *J. Biol. Chem.* *273*, 34970–34975.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7526–7531.

Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713–726.

Lim, J.Y., Park, S.H., Jeong, C.H., Oh, J.H., Kim, S.M., Ryu, C.H., Park, S.A., Ahn, J.G., Oh, W., Jeun, S.-S., et al. (2010). Microporation is a valuable transfection method for efficient gene delivery into human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *BMC Biotechnol.* 10, 38.

Lindberg, N., Kastemar, M., Olofsson, T., Smits, A., and Uhrbom, L. (2009). Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma. *Oncogene* 28, 2266–2275.

Lindenbaum, M., Perkins, E., Csonka, E., Fleming, E., Garcia, L., Greene, A., Gung, L., Hadlaczky, G., Lee, E., Leung, J., et al. (2004). A mammalian artificial chromosome engineering system (ACE System) applicable to biopharmaceutical protein production, transgenesis and gene-based cell therapy. *Nucleic Acids Res.* 32, e172.

Liu, C., Sage, J.C., Miller, M.R., Verhaak, R.G.W., Hippenmeyer, S., Vogel, H., Foreman, O., Bronson, R.T., Nishiyama, A., Luo, L., et al. (2011). Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Tumor Cell of Origin in Glioma. *Cell* 146, 209–221.

Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* 5, 67.

Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450, 56–62.

Llaguno, S.R.A., Chen, J., and Parada, L.F. (2009). Signaling in Malignant Astrocytomas: Role of Neural Stem Cells and Its Therapeutic Implications. *Clin. Cancer Res.* 15, 7124–7129.

Lobo, M.V.T., Alonso, F.J.M., Redondo, C., López-Toledano, M.A., Caso, E., Herranz, A.S., Paíno, C.L., Reimers, D., and Bazán, E. (2003). Cellular Characterization of Epidermal Growth Factor-expanded Free-floating Neurospheres. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 89–103.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman).

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2074–2077.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 114, 97–109.

Louissaint Jr., A., Rao, S., Leventhal, C., and Goldman, S.A. (2002). Coordinated Interaction of Neurogenesis and Angiogenesis in the Adult Songbird Brain. *Neuron* 34, 945–960.

Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Le Franc, Y., Supatto, W., Matho, K.S., Ieng, S., Fouquet, S., Dupin, E., Benosman, R., et al. (2014). Multiplex Cell and Lineage Tracking with Combinatorial Labels. *Neuron* 81, 505–520.

- Ma, D.K., Bonaguidi, M.A., Ming, G., and Song, H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res.* *19*, 672–682.
- Macdonald, D.R., Cascino, T.L., Schold, S.C., and Cairncross, J.G. (1990). Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *8*, 1277–1280.
- Magavi, S., and Macklis, J. (2008). Immunocytochemical Analysis of Neuronal Differentiation. In *Neural Stem Cells*, L. Weiner, ed. (Humana Press), pp. 345–352.
- Malatesta, P., Hartfuss, E., and Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 5253–5263.
- Man, J., Shoemake, J., Zhou, W., Fang, X., Wu, Q., Rizzo, A., Prayson, R., Bao, S., Rich, J.N., and Yu, J.S. (2014). *Sema3C Promotes the Survival and Tumorigenicity of Glioma Stem Cells through Rac1 Activation*. *Cell Rep.*
- Mao, P., Joshi, K., Li, J., Kim, S.-H., Li, P., Santana-Santos, L., Luthra, S., Chandran, U.R., Benos, P.V., Smith, L., et al. (2013). Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 8644–8649.
- Marshall, G.P., Reynolds, B.A., and Laywell, E.D. (2007). Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *8*, 141–145.
- Martínez-González, A., Calvo, G.F., Pérez Romasanta, L.A., and Pérez-García, V.M. (2012). Hypoxic Cell Waves Around Necrotic Cores in Glioblastoma: A Biomathematical Model and Its Therapeutic Implications. *Bull. Math. Biol.* *74*, 2875–2896.
- Matsuda, Y., Ishiwata, T., Yoshimura, H., Hagio, M., and Arai, T. (2015). Inhibition of nestin suppresses stem cell phenotype of glioblastomas through the alteration of post-translational modification of heat shock protein HSPA8/HSC71. *Cancer Lett.* *357*, 602–611.
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Meir, E.G.V., Brat, D.J., Mastrogianakis, G.M., Olson, J.J., Mikkelsen, T., Lehman, N., Aldape, K., et al. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* *455*, 1061–1068.
- Meinke, G., Bohm, A., Hauber, J., Pisabarro, M.T., and Buchholz, F. (2016). Cre Recombinase and Other Tyrosine Recombinases. *Chem. Rev.*
- Mendes, F.A., Coelho Aguiar, J.M., Kahn, S.A., Reis, A.H., Dubois, L.G., Romão, L.F., Ferreira, L.S.S., Chneiweiss, H., Moura Neto, V., and Abreu, J.G. (2015). Connective-Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) Induces Astrogenesis and Fibronectin Expression of Embryonic Neural Cells In Vitro. *PLoS ONE* *10*.
- Mendez, M.G., Kojima, S.-I., and Goldman, R.D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* *24*, 1838–1851.
- Millet, V., Marder, M., and Pasquini, L.A. (2012). Adult CNP::EGFP transgenic mouse shows pronounced hypomyelination and an increased vulnerability to cuprizone-induced demyelination. *Exp. Neurol.* *233*, 490–504.
- Mishra, R., Kumar, D., Tomar, D., Chakraborty, G., Kumar, S., and Kundu, G.C. (2015). The potential of class 3 semaphorins as both targets and therapeutics in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* *19*, 427–442.

- Moiani, A., Paleari, Y., Sartori, D., Mezzadra, R., Miccio, A., Cattoglio, C., Cocchiarella, F., Lidonnici, M.R., Ferrari, G., and Mavilio, F. (2012). Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. *J. Clin. Invest.* *122*, 1653–1666.
- Molenaar, R.J. (2011). Ion Channels in Glioblastoma. *ISRN Neurol.* *2011*.
- Morgani, S.M., Canham, M.A., Nichols, J., Sharov, A.A., Migueles, R.P., Ko, M.S.H., and Brickman, J.M. (2013). Totipotent Embryonic Stem Cells Arise in Ground-State Culture Conditions. *Cell Rep.* *3*, 1945–1957.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* *505*, 327–334.
- Mu, Y., Lee, S.W., and Gage, F.H. (2010). Signaling in adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* *20*, 416–423.
- Mukthavaram, R., Ouyang, X., Saklecha, R., Jiang, P., Nomura, N., Pingle, S.C., Guo, F., Makale, M., and Kesari, S. (2015). Effect of the JAK2/STAT3 inhibitor SAR317461 on human glioblastoma tumorspheres. *J. Transl. Med.* *13*, 269.
- Naito, Z. (2011). Neuroepithelial stem cell marker nestin regulates the migration, invasion and growth of human gliomas. *Oncol. Rep.*
- Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R.G., and Strittmatter, S.M. (1998). Neuropilin-1 Extracellular Domains Mediate Semaphorin D/III-Induced Growth Cone Collapse. *Neuron* *21*, 1093–1100.
- Nakanishi, M., and Otsu, M. (2012). Development of Sendai Virus Vectors and their Potential Applications in Gene Therapy and Regenerative Medicine. *Curr. Gene Ther.* *12*, 410–416.
- Nakano, I. (2014). Stem cell signature in glioblastoma: therapeutic development for a moving target. *J. Neurosurg.* *122*, 324–330.
- Namba, T., Mochizuki, H., Onodera, M., Mizuno, Y., Namiki, H., and Seki, T. (2005). The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 1928–1941.
- Nasarre, C., Roth, M., Jacob, L., Roth, L., Koncina, E., Thien, A., Labourdette, G., Poulet, P., Hubert, P., Crémel, G., et al. (2010). Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene* *29*, 2381–2392.
- Neradil, J., and Veselska, R. (2015). Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* *106*, 803–811.
- Nguyen, S.M., Thamm, D.H., Vail, D.M., and London, C.A. (2015). Response evaluation criteria for solid tumours in dogs (v1.0): a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document. *Vet. Comp. Oncol.* *13*, 176–183.
- Nie, S., Gurra, M., Zhu, J., Thakolwiboon, S., Heth, J.A., Muraszko, K.M., Fan, X., and Lubman, D.M. (2015). Tenascin-C: A Novel Candidate Marker for Cancer Stem Cells in Glioblastoma Identified by Tissue Microarrays. *J. Proteome Res.* *14*, 814–822.

- Nishi, M., Akutsu, H., Kudoh, A., Kimura, H., Yamamoto, N., Umezawa, A., Lee, S.W., and Ryo, A. (2014). Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget* 5, 8665–8680.
- Noble, M., and Dietrich, J. (2004). The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity. *Trends Neurosci.* 27, 148–154.
- Nowakowski, A., Andrzejewska, A., Janowski, M., Walczak, P., and Lukomska, B. (2013). Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 73, 1–18.
- Ogura, K., Mizowaki, T., Arakawa, Y., Ogura, M., Sakanaka, K., Miyamoto, S., and Hiraoka, M. (2013). Initial and cumulative recurrence patterns of glioblastoma after temozolomide-based chemoradiotherapy and salvage treatment: a retrospective cohort study in a single institution. *Radiat. Oncol.* 8, 97.
- Oh, M.C., Kim, J.M., Safaei, M., Kaur, G., Sun, M.Z., Kaur, R., Celli, A., Mauro, T.M., and Parsa, A.T. (2012). Overexpression of Calcium-Permeable Glutamate Receptors in Glioblastoma Derived Brain Tumor Initiating Cells. *PLoS ONE* 7.
- Omuro A, and DeAngelis LM (2013). Glioblastoma and other malignant gliomas: A clinical review. *JAMA* 310, 1842–1850.
- Osada, H., Tokunaga, T., Nishi, M., Hatanaka, H., Abe, Y., Tsugu, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., and Nakamura, M. (2004). Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma. *Anticancer Res.* 24, 547–552.
- Otani, K., Yamahara, K., Ohnishi, S., Obata, H., Kitamura, S., and Nagaya, N. (2009). Nonviral delivery of siRNA into mesenchymal stem cells by a combination of ultrasound and microbubbles. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 133, 146–153.
- Otero-Ortega, L., Gutiérrez-Fernández, M., Ramos-Cejudo, J., Rodríguez-Frutos, B., Fuentes, B., Sobrino, T., Hernanz, T.N., Campos, F., López, J.A., Cerdán, S., et al. (2015). White matter injury restoration after stem cell administration in subcortical ischemic stroke. *Stem Cell Res. Ther.* 6, 121.
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., Pitulescu, M.E., Adams, R.H., and Parrinello, S. (2014). Direct cell–cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat. Cell Biol.* 16, 1045–1056.
- Palma, J.P., Rodriguez, L.E., Bontcheva-Diaz, V.D., Bouska, J.J., Bukofzer, G., Colon-Lopez, M., Guan, R., Jarvis, K., Johnson, E.F., Klinghofer, V., et al. (2008). The PARP inhibitor, ABT-888 potentiates temozolomide: correlation with drug levels and reduction in PARP activity in vivo. *Anticancer Res.* 28, 2625–2635.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R., and Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 425, 479–494.
- Park, S.A., Ryu, C.H., Kim, S.M., Lim, J.Y., Park, S.I., Jeong, C.H., Jun, J.A., Oh, J.H., Park, S.H., Oh, W., et al. (2011). CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas. *Int. J. Oncol.* 38, 97–103.
- Parker, N.R., Khong, P., Parkinson, J.F., Howell, V.M., and Wheeler, H.R. (2015). Molecular Heterogeneity in Glioblastoma: Potential Clinical Implications. *Front. Oncol.* 5.

- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay For Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 486–498.
- Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., et al. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 1254257.
- Pedron, S., Becka, E., and Harley, B.A.C. (2013). Regulation of glioma cell phenotype in 3D matrices by hyaluronic acid. *Biomaterials* 34, 7408–7417.
- Pellacani, D., Packer, R.J., Frame, F.M., Oldridge, E.E., Berry, P.A., Labarthe, M.-C., Stower, M.J., Simms, M.S., Collins, A.T., and Maitland, N.J. (2011). Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. *Mol. Cancer* 10, 94.
- Perego, C., Vanoni, C., Bossi, M., Massari, S., Basudev, H., Longhi, R., and Pietrini, G. (2000). The GLT-1 and GLAST glutamate transporters are expressed on morphologically distinct astrocytes and regulated by neuronal activity in primary hippocampal cocultures. *J. Neurochem.* 75, 1076–1084.
- Peyron, F., Timsit, S., Thomas, J.-L., Kagawa, T., Ikenaka, K., and Zalc, B. (1997). In situ expression of PLP/DM-20, MBP, and CNP during embryonic and postnatal development of the jimpy mutant and of transgenic mice overexpressing PLP. *J. Neurosci. Res.* 50, 190–201.
- Podergajs, N., Brekka, N., Radlwimmer, B., Herold-Mende, C., Talasila, K.M., Tiemann, K., Rajcevic, U., Lah, T.T., Bjerkvig, R., and Miletic, H. (2013). Expansive growth of two glioblastoma stem-like cell lines is mediated by bFGF and not by EGF. *Radiol. Oncol.* 47, 330–337.
- Pollard, S.M., Yoshikawa, K., Clarke, I.D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., et al. (2009). Glioma Stem Cell Lines Expanded in Adherent Culture Have Tumor-Specific Phenotypes and Are Suitable for Chemical and Genetic Screens. *Cell Stem Cell* 4, 568–580.
- Popot, J.-L., Althoff, T., Bagnard, D., Banères, J.-L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L.J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M.J., et al. (2011). Amphipols from A to Z. *Annu. Rev. Biophys.* 40, 379–408.
- Prestegarden, L., Svendsen, A., Wang, J., Sleire, L., Skaftnesmo, K.O., Bjerkvig, R., Yan, T., Askland, L., Persson, A., Sakariassen, P.Ø., et al. (2010). Glioma Cell Populations Grouped by Different Cell Type Markers Drive Brain Tumor Growth. *Cancer Res.* 70, 4274–4279.
- Prud'homme, G.J., and Glinka, Y. (2012). Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 3, 921–939.
- Püschel, A.W. (2002). The function of neuropilin/plexin complexes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 71–80.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., and Temple, S. (2000). Timing of CNS Cell Generation: A Programmed Sequence of Neuron and Glial Cell Production from Isolated Murine Cortical Stem Cells. *Neuron* 28, 69–80.
- Qiang, L., Yang, Y., Ma, Y.-J., Chen, F.-H., Zhang, L.-B., Liu, W., Qi, Q., Lu, N., Tao, L., Wang, X.-T., et al. (2009). Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 279, 13–21.

Qiu, Z.-K., Shen, D., Chen, Y.-S., Yang, Q.-Y., Guo, C.-C., Feng, B.-H., and Chen, Z.-P. (2014). Enhanced MGMT expression contributes to temozolomide resistance in glioma stem-like cells. *Chin. J. Cancer* 33, 115–122.

Quiñones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 494, 415–434.

Radke, J., Bortolussi, G., and Pagenstecher, A. (2013). Akt and c-Myc Induce Stem-Cell Markers in Mature Primary p53^{-/-} Astrocytes and Render These Cells Gliomagenic in the Brain of Immunocompetent Mice. *PLoS ONE* 8.

Rahman, M., Reyner, K., Deleyrolle, L., Millette, S., Azari, H., Day, B.W., Stringer, B.W., Boyd, A.W., Johns, T.G., Blot, V., et al. (2015). Neurosphere and adherent culture conditions are equivalent for malignant glioma stem cell lines. *Anat. Cell Biol.* 48, 25–35.

Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J. Comp. Neurol.* 141, 283–312.

Ravin, R., Hoepfner, D.J., Munno, D.M., Carmel, L., Sullivan, J., Levitt, D.L., Miller, J.L., Athaide, C., Panchision, D.M., and McKay, R.D.G. (2008). Potency and fate specification in CNS stem cell populations in vitro. *Cell Stem Cell* 3, 670–680.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.

Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., and Weiss, S. (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 4565–4574.

Ricard, C., and Debarbieux, F.C. (2014). Six-color intravital two-photon imaging of brain tumors and their dynamic microenvironment. *Front. Cell. Neurosci.* 8.

Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824–828.

Rieger, J., Wick, W., and Weller, M. (2003). Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins. *Glia* 42, 379–389.

Rimkus, T.K., Carpenter, R.L., Qasem, S., Chan, M., and Lo, H.-W. (2016). Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors. *Cancers* 8.

Rizzolio, S., Rabinowicz, N., Rainero, E., Lanzetti, L., Serini, G., Norman, J., Neufeld, G., and Tamagnone, L. (2012). Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling. *Cancer Res.* 72, 5801–5811.

Roberts, P.J., Usary, J.E., Darr, D.B., Dillon, P.M., Pfefferle, A.D., Whittle, M.C., Duncan, J.S., Johnson, S.M., Combest, A.J., Jin, J., et al. (2012). Combined PI3K/mTOR and MEK inhibition provides broad antitumor activity in faithful murine cancer models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 5290–5303.

- Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., and Püschel, A.W. (2000). Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.* *93*, 95–104.
- Roth, L., Nasarre, C., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Crémel, G., Hubert, P., and Bagnard, D. (2008). Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol. Biol. Cell* *19*, 646–654.
- Rowitch, D.H., and Kriegstein, A.R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* *468*, 214–222.
- Sabag, A.D., Bode, J., Fink, D., Kigel, B., Kugler, W., and Neufeld, G. (2012). Semaphorin-3D and semaphorin-3E inhibit the development of tumors from glioblastoma cells implanted in the cortex of the brain. *PLoS One* *7*, e42912.
- Safa, A.R., Saadatzadeh, M.R., Cohen-Gadol, A.A., Pollok, K.E., and Bijangi-Vishehsaraei, K. (2015). Emerging targets for glioblastoma stem cell therapy. *J. Biomed. Res.* *30*.
- Salmaggi, A., Boiardi, A., Gelati, M., Russo, A., Calatozzolo, C., Ciusani, E., Sciacca, F.L., Ottolina, A., Parati, E.A., La Porta, C., et al. (2006). Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia* *54*, 850–860.
- Sanai, N., Nguyen, T., Ihrig, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.-H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.-M., et al. (2011). Corridors of Migrating Neurons in Human Brain and Their Decline during Infancy. *Nature* *478*, 382–386.
- Sandberg, C.J., Altschuler, G., Jeong, J., Strømme, K.K., Stangeland, B., Murrell, W., Grasmø-Wendler, U.-H., Myklebost, O., Helseth, E., Vik-Mo, E.O., et al. Comparison of glioma stem cells to neural stem cells from the adult human brain identifies dysregulated Wnt- signaling and a fingerprint associated with clinical outcome. *Exp. Cell Res.*
- Sanson, M. (2016). Marqueurs tumoraux des gliomes. *J. Neuroradiol.* *43*, 74–75.
- Sarkar, S., Nuttall, R.K., Liu, S., Edwards, D.R., and Yong, V.W. (2006). Tenascin-C Stimulates Glioma Cell Invasion Through Matrix Metalloproteinase-12. *Cancer Res.* *66*, 11771–11780.
- Sarkar, S., Zemp, F.J., Senger, D., Robbins, S.M., and Yong, V.W. (2015). ADAM-9 is a novel mediator of tenascin-C-stimulated invasiveness of brain tumor-initiating cells. *Neuro-Oncol.* *nou362*.
- Sauvageot, C.M., and Stiles, C.D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 244–249.
- Sayd, S., Thirant, C., El-Habr, E.A., Lipecka, J., Dubois, L.G., Bogeas, A., Tahiri-Jouti, N., Chneiweiss, H., and Junier, M.-P. (2014). Sirtuin-2 activity is required for glioma stem cell proliferation arrest but not necrosis induced by resveratrol. *Stem Cell Rev.* *10*, 103–113.
- Schambach, A., Zychlinski, D., Ehrnstroem, B., and Baum, C. (2013). Biosafety Features of Lentiviral Vectors. *Hum. Gene Ther.* *24*, 132–142.
- Schernberg, A., Marabelle, A., Massard, C., Armand, J.-P., Dumont, S., Deutsch, E., and Dhermain, F. (2016). [What's next in glioblastoma treatment: Tumor-targeted or immune-targeted therapies?]. *Bull. Cancer (Paris)* *103*, 484–498.

Schneider, L., Giordano, S., Zelickson, B.R., Johnson, M., Benavides, G., Ouyang, X., Fineberg, N., Darley-Usmar, V.M., and Zhang, J. (2011). Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 2007–2017.

Schonberg, D.L., Lubelski, D., Miller, T.E., and Rich, J.N. (2014). Brain tumor stem cells: molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol. Aspects Med.* *0*, 82–101.

Schwarz, Q., Maden, C.H., Vieira, J.M., and Ruhrberg, C. (2009). Neuropilin 1 signaling guides neural crest cells to coordinate pathway choice with cell specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 6164–6169.

Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S.L., Oh, D., Schapiro, R., Moral, L., Yan, W., and Shao, R. (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 12950–12960.

Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* *2*, 905–909.

Sharif, A., Legendre, P., Prévot, V., Allet, C., Romao, L., Studler, J.-M., Chneiweiss, H., and Junier, M.-P. (2007). Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene* *26*, 2695–2706.

Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.-M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* *3*, 289–300.

Sherry, M.M., Reeves, A., Wu, J.K., and Cochran, B.H. (2009). STAT3 Is Required for Proliferation and Maintenance of Multipotency in Glioblastoma Stem Cells. *STEM CELLS* *27*, 2383–2392.

Shirahata, M., Iwao-Koizumi, K., Saito, S., Ueno, N., Oda, M., Hashimoto, N., Takahashi, J.A., and Kato, K. (2007). Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 7341–7356.

Shmelkov, S.V., Jun, L., Clair, R.S., McGarrigle, D., Derderian, C.A., Usenko, J.K., Costa, C., Zhang, F., Guo, X., and Rafii, S. (2004). Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* *103*, 2055–2061.

Shmelkov, S.V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St. Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D.K., et al. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133– metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J. Clin. Invest.*

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* *63*, 5821–5828.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396–401.

Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., Pastorino, S., Yang, M., Hoffman, R.M., Kesari, S., et al. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4274–4280.

- Soeda, A., Hara, A., Kunisada, T., Yoshimura, S., Iwama, T., and Park, D.M. (2015). The Evidence of Glioblastoma Heterogeneity. *Sci. Rep.* 5, 7979.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735–745.
- Song, H., Stevens, C.F., and Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39–44.
- Sperduto, P.W. (2003). A review of stereotactic radiosurgery in the management of brain metastases. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2, 105–110.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D’Amour, K.A., and Gage, F.H. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1, 515–528.
- Suh, H., Deng, W., and Gage, F.H. (2009). Signaling in adult neurogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 253–275.
- Sulpice, E., Plouët, J., Bergé, M., Allanic, D., Tobelem, G., and Merkulova-Rainon, T. (2008). Neuropilin-1 and Neuropilin-2 Act as Coreceptors, Potentiating Proangiogenic Activity. *Blood* 111, 2036–2045.
- Sun, Y., Pollard, S., Conti, L., Toselli, M., Biella, G., Parkin, G., Willatt, L., Falk, A., Cattaneo, E., and Smith, A. (2008). Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 245–258.
- Suvà, M.L., Rheinbay, E., Gillespie, S.M., Patel, A.P., Wakimoto, H., Rabkin, S.D., Riggi, N., Chi, A.S., Cahill, D.P., Nahed, B.V., et al. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell* 157, 580–594.
- Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., and Okano, H. (2010). The Neural Stem/Progenitor Cell Marker Nestin Is Expressed in Proliferative Endothelial Cells, but Not in Mature Vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 721–730.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G.I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M.L., Goodman, C.S., Poo, M., et al. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71–80.
- TANG, Y., GARSON, K., LI, L., and VANDERHYDEN, B.C. (2015). Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection. *Oncol. Lett.* 9, 55–62.
- Temple, S. (1989). Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* 340, 471–473.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117.
- Therasse, P., Arbuuck, S.G., Eisenhauer, E.A., Wanders, J., Kaplan, R.S., Rubinstein, L., Verweij, J., Van Glabbeke, M., van Oosterom, A.T., Christian, M.C., et al. (2000). New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 205–216.
- Till, J.E., McCulloch, E.A., and Siminovitch, L. (1964). A STOCHASTIC MODEL OF STEM CELL PROLIFERATION, BASED ON THE GROWTH OF SPLEEN COLONY-FORMING CELLS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 29–36.
- Tinsley, R.B., Vesey, M.J., Barati, S., Rush, R.A., and Ferguson, I.A. (2004). Improved non-viral transfection of glial and adult neural stem cell lines and of primary astrocytes by combining agents with complementary modes of action. *J. Gene Med.* 6, 1023–1032.
- Toledo, C.M., Ding, Y., Hoellerbauer, P., Davis, R.J., Basom, R., Girard, E.J., Lee, E., Corrin, P., Hart, T., Bolouri, H., et al. (2015). Genome-wide CRISPR-Cas9 screens reveal loss of redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma stem-like cells. *Cell Rep.* 13, 2425–2439.
- Touat, M., Dhermain, F., André, F., and Sanson, M. (2015). Adapting the drivers to the road: a new strategy for cancer evolution? *Ann. Oncol.* 26, 827–829.
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., and Kikutani, H. (2005). FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nat. Neurosci.* 8, 1712–1719.
- Tropepe, V., Sibililia, 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.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 14720–14725.
- Uhrbom, L., Dai, C., Celestino, J.C., Rosenblum, M.K., Fuller, G.N., and Holland, E.C. (2002). Ink4a-Arf Loss Cooperates with KRas Activation in Astrocytes and Neural Progenitors to Generate Glioblastomas of Various Morphologies Depending on Activated Akt. *Cancer Res.* 62, 5551–5558.
- Usui, H., Taniguchi, M., Yokomizo, T., and Shimizu, T. (2003). Plexin-A1 and plexin-B1 specifically interact at their cytoplasmic domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 927–931.
- Venere, M., Han, Y.-G., Bell, R., Song, J.S., Alvarez-Buylla, A., and Blesch, R. (2012). Sox1 marks an activated neural stem/progenitor cell in the hippocampus. *Development* 139, 3938–3949.

- Venere, M., Hamerlik, P., Wu, Q., Rasmussen, R.D., Song, L.A., Vasanji, A., Tenley, N., Flavahan, W.A., Hjelmeland, A.B., Bartek, J., et al. (2014). Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ.* *21*, 258–269.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* *17*, 98–110.
- Vescovi, A.L., Galli, R., and Reynolds, B.A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 425–436.
- Veselska, R., Kuglik, P., Cejpek, P., Svachova, H., Neradil, J., Loja, T., and Relichova, J. (2006). Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC Cancer* *6*, 32.
- Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., Marcello, J., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., et al. (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 4722–4729.
- Wakimoto, H., Mohapatra, G., Kanai, R., Curry, W.T., Yip, S., Nitta, M., Patel, A.P., Barnard, Z.R., Stemmer-Rachamimov, A.O., Louis, D.N., et al. (2012). Maintenance of primary tumor phenotype and genotype in glioblastoma stem cells. *Neuro-Oncol.* *14*, 132–144.
- Walker, K., and Hjelmeland, A. (2014). Method for Efficient Transduction of Cancer Stem Cells. *J. Cancer Stem Cell Res.* *1*, 1.
- Walker, C., Baborie, A., Crooks, D., Wilkins, S., and Jenkinson, M.D. (2011). Biology, genetics and imaging of glial cell tumours. *Br. J. Radiol.* *84 Spec No 2*, S90-106.
- Wan, F., Zhang, S., Xie, R., Gao, B., Campos, B., Herold-Mende, C., and Lei, T. (2010). The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *20*, 877–889.
- Wang, C., Xie, J., Guo, J., Manning, H.C., Gore, J.C., and Guo, N. (2012). Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol. Rep.* *28*, 1301–1308.
- Wang, J., Sakariassen, P.Ø., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Bøe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Røslund, G., Thorsen, F., Stuhr, L., et al. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int. J. Cancer* *122*, 761–768.
- Wang, J., Wakeman, T.P., Latha, J.D., Hjelmeland, A.B., Wang, X.-F., White, R.R., Rich, J.N., and Sullenger, B.A. (2010a). Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *28*, 17–28.
- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., and Tabar, V. (2010b). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* *468*, 829–833.
- Wang, Y., Yang, J., Zheng, H., Tomasek, G.J., Zhang, P., McKeever, P.E., Lee, E.Y.-H.P., and Zhu, Y. (2009). Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer Cell* *15*, 514–526.

Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 12425–12430.

Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescovi, A.L., Morshead, C., Craig, C.G., and van der Kooy, D. (1996). Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci.* *19*, 387–393.

Weissman, I.L. (1994). Stem cells, clonal progenitors, and commitment to the three lymphocyte lineages: T, B, and NK Cells. *Immunity* *1*, 529–531.

Weller, M., and Yung, W.K.A. (2013). Angiogenesis inhibition for glioblastoma at the edge: beyond AVAGlio and RTOG 0825. *Neuro-Oncol.* *15*, 971.

Wen, P.Y., Macdonald, D.R., Reardon, D.A., Cloughesy, T.F., Sorensen, A.G., Galanis, E., DeGroot, J., Wick, W., Gilbert, M.R., Lassman, A.B., et al. (2010). Updated Response Assessment Criteria for High-Grade Gliomas: Response Assessment in Neuro-Oncology Working Group. *J. Clin. Oncol.* *28*, 1963–1972.

West, D.C., Rees, C.G., Duchesne, L., Patey, S.J., Terry, C.J., Turnbull, J.E., Delehedde, M., Heegaard, C.W., Allain, F., Vanpouille, C., et al. (2005). Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* *280*, 13457–13464.

White, P.M., Morrison, S.J., Orimoto, K., Kubu, C.J., Verdi, J.M., and Anderson, D.J. (2001). Neural Crest Stem Cells Undergo Cell-Intrinsic Developmental Changes in Sensitivity to Instructive Differentiation Signals. *Neuron* *29*, 57–71.

Wurmser, A.E., Nakashima, K., Summers, R.G., Toni, N., D'Amour, K.A., Lie, D.C., and Gage, F.H. (2004). Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* *430*, 350–356.

Yang, Y., Vidensky, S., Jin, L., Jie, C., Lorenzini, I., Frankl, M., and Rothstein, J.D. (2011). Molecular Comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ Astrocytes In Vivo In Astroglial Reporter Mice. *Glia* *59*, 200–207.

Yang, Y.-P., Chang, Y.-L., Huang, P.-I., Chiou, G.-Y., Tseng, L.-M., Chiou, S.-H., Chen, M.-H., Chen, M.-T., Shih, Y.-H., Chang, C.-H., et al. (2012). Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *J. Cell. Physiol.* *227*, 976–993.

Yao, X., Ping, Y., Liu, Y., Chen, K., Yoshimura, T., Liu, M., Gong, W., Chen, C., Niu, Q., Guo, D., et al. (2013). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2) Plays a Key Role in Vasculogenic Mimicry Formation, Neovascularization and Tumor Initiation by Glioma Stem-like Cells. *PLoS ONE* *8*.

Yu, D., Ma, X., Tu, Y., and Lai, L. (2015). Both piston-like and rotational motions are present in bacterial chemoreceptor signaling. *Sci. Rep.* *5*, 8640.

Yu, W.-P., Collarini, E.J., Pringle, N.P., and Richardson, W.D. (1994). Embryonic expression of myelin genes: Evidence for a focal source of oligodendrocyte precursors in the ventricular zone of the neural tube. *Neuron* *12*, 1353–1362.

Yuan, X., Chittajallu, R., Belachew, S., Anderson, S., McBain, C.J., and Gallo, V. (2002). Expression of the green fluorescent protein in the oligodendrocyte lineage: A transgenic mouse for developmental and physiological studies. *J. Neurosci. Res.* *70*, 529–545.

Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., and Yu, J.S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392–9400.

Zeniou, M., Fève, M., Mameri, S., Dong, J., Salomé, C., Chen, W., El-Habr, E.A., Bousson, F., Sy, M., Obszynski, J., et al. (2015). Chemical Library Screening and Structure-Function Relationship Studies Identify Bisacodyl as a Potent and Selective Cytotoxic Agent Towards Quiescent Human Glioblastoma Tumor Stem-Like Cells. *PLoS One* 10, e0134793.

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., and Herold-Mende, C.C. (2008). Stem Cell Marker CD133 Affects Clinical Outcome in Glioma Patients. *Clin. Cancer Res.* 14, 123–129.

Zhang, S.-C. (2001). Defining glial cells during CNS development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 840–843.

Zhang, B., Metharom, P., Jullie, H., Ellem, K.A., Cleghorn, G., West, M.J., and Wei, M.Q. (2004). The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet. Vaccines Ther.* 2, 6.

Zhang, J., Jiao, J., Zhang, J., and Jiao, J. (2015). Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis, Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *BioMed Res. Int.* 2015, 2015, e727542.

Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z., and Fang, J. (2008). Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 27, 85.

Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., Marro, S., Patzke, C., Acuna, C., Covy, J., et al. (2013). Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Neuron* 78, 785–798.

Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* 132, 645–660.

Zheng, X., Shen, G., Yang, X., and Liu, W. (2007). Most C6 Cells Are Cancer Stem Cells: Evidence from Clonal and Population Analyses. *Cancer Res.* 67, 3691–3697.

Zong, H., Espinosa, J.S., Su, H.H., Muzumdar, M.D., and Luo, L. (2005). Mosaic Analysis with Double Markers in Mice. *Cell* 121, 479–492.

ANNEXES

Annexe 1: Résumé des publications et communications

Publications

Meyer L.A.T., Lefebvre O., Selvadurai H., Dirks P. and Bagnard D. Tracking NSC and GSC differentiation with a lentivirus-based inducible multicolor fluorescent reporter system

- *En préparation*

Meyer L.A.T., Fritz J., Fernandez A., Loeuillet A. and Bagnard D. Production and characterization of glioblastoma and glioblastoma stem cell lines.

- *En préparation*

Fritz J., Jacob L., **Meyer L.A.T.**, Fernandez A., Thomas L., Baumlin N., Cremel G. and Bagnard D. Preclinical validation of the anti-glioblastoma growth effect of NRP1 transmembrane domain targeting peptide.

- *En préparation*

Meyer L.A.T., Kaselis A., Satkauskas S. and Bagnard D. Analysis of Semaphorin-induced growth cone collapse and axon growth inhibition.

- *Sous presse, Semaphorin signaling, Methods in Molecular Biology, 2016.*

Meyer L.A.T., Fritz J., Pierdant Mancera M. and Bagnard D. Current drug design to target the Semaphorins/Neuropilins/Plexins complexes.

- *Soumis, Cell Adhesion and Migration, 2016*

Jacob L, Sawna P, Garnier N, **Meyer L.A.T.**, Fritz J, Hussenet T, Spenlé C, Goetz J, Vernot J, Fernandez A, Baumlin N, Aci-Sèche S, Orend G, Kehrl P, Roussel G, Crémel G, Genest M, Hubert P, Bagnard D. Inhibition of plexin-A1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using transmembrane domain targeting peptide.

- *Oncotarget, 2016*

Arpel A., Sawma P., Spenlé C., Fritz J., **Meyer L.**, Garnier N., Velazquez-Quesada I., Hussenet T, Aci-Sèche S., Baumlin N., Genest M., Brasse D., Hubert P., Crémel G., Orend G., Laquerrière P. and Bagnard D. Transmembrane domain targeting peptide antagonizing ErbB2/Neu inhibits breast tumor growth and metastasis.

- *Cell Reports, 2014.*

Lionel Meyer, Olivier Lefebvre, Dominique Bagnard. Development of an inducible mosaic expression system for neural stem cell and glioma stem cell differentiation analysis.

- Réunion scientifique publique Medalis (Strasbourg, France, 8 décembre 2015).
- **Prix du meilleur poster**

Lionel Meyer, Laurent Jacob, Michael van der Heyden, Christel Herold-Mende, and Dominique Bagnard. Identification of a differential role of Plexin-A1 and Neuropilin-1 in glioblastoma derived stem cells.

- Gordon Research Conference: "Stem cell and Cancer". (Ventura, CA, USA, 15-20 février 2015).

Lionel Meyer, Aurore Fernandez, Laurent Jacob, Gérard Crémel, Pierre Kehrli and Dominique Bagnard. Therapeutic transmembrane peptides Neuropilin-1 and Plexin-A1 inhibit glioblastoma stem cell growth.

- 12th annual meeting of the International Society for Stem Cell Research (Vancouver, BC, Canada, 18-21 juin 2014).

Lionel Meyer, Aurore Fernandez, Laurent Jacob, Gérard Crémel, Pierre Kehrli and Dominique Bagnard. Therapeutic transmembrane peptides Neuropilin-1 and Plexin-A1 inhibit glioblastoma stem cell growth.

- EMBO/EMBL Symposium: Tumor microenvironment (Vancouver, BC, Canada, 18-21 juin 2014).

Lionel Meyer, O. Lefebvre, Y. Beck, A. Marin, A. Wagner, A. Griffiths and D. Bagnard. Towards the screening of glioblastoma stem cells drug sensitivity by mosaic analysis and droplet-based single cell encapsulation.

- 17^e Cancéropôle Grand Est (Strasbourg, France, 25-26 novembre 2012).

Lionel Meyer, O. Lefebvre, Y. Beck, A. Marin, A. Wagner, A. Griffiths and D. Bagnard. Towards the screening of glioblastoma stem cells drug sensitivity by mosaic analysis and droplet-based single cell encapsulation.

- Réunion scientifique publique Medalis (Strasbourg, France, 22 octobre 2013).

Lionel Meyer, Aurore Fernandez, Christel Herold-Mende, Pierre Kehrli and Dominique Bagnard; Towards the systematic comparison of the proliferative and differentiation capacity of neural stem cells and glioblastoma stem cells.

- 11th Annual meeting of the International Society for Stem Cell Research (Boston, MA, USA, 12-15 juin 2013).

Lionel Meyer, Aurore Fernandez, Laurent Jacob, Nadège Baumlin, Christel Herold-Mende, Pierre Kehrli, Dominique Bagnard. Evaluation of the impact of therapeutic transmembrane peptides on glioblastoma stem cells.

- 16^e Cancéropôle Grand Est (Strasbourg, France, 13-14 novembre 2012).

Lionel Meyer, Aurore Fernandez, Guy Roussel, Dominique Bagnard. Use of a Neurosphere / Gliomasphere culture model for drug screening.

- Réunion scientifique publique Medalis (Strasbourg, France, 30 mars 2012).

Annexe 2 : Publications parues ou soumises

1.

*Arpel A., Sawma P., Spenlé C., Fritz J., **Meyer L.**, Garnier N., Velazquez-Quesada I., Hussenet T, Aci-Sèche S., Baumlin N., Genest M., Brasse D., Hubert P., Crémel G., Orend G., Laquerrière P. and Bagnard D.* Transmembrane domain targeting peptide antagonizing ErbB2/Neu inhibits breast tumor growth and metastasis.

- *Cell Reports, 2014.*

2.

*Jacob L, Sawna P, Garnier N, **Meyer L.A.T.** Fritz J, Hussenet T, Spenlé C, Goetz J, Vernot J, Fernandez A, Baumlin N, Aci-Sèche S, Orend G, Kehrl P, Roussel G, Crémel G, Genest M, Hubert P, Bagnard D.* Inhibition of plexin-A1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using transmembrane domain targeting peptide.

- *Oncotarget, 2016*

3.

***Meyer L.A.T.**, Kaselis A., Satkauskas S. and Bagnard D.* Analysis of Semaphorin-induced growth cone collapse and axon growth inhibition.

- *Sous presse, Semaphorin signaling, Methods in Molecular Biology, 2016.*

4.

***Meyer L.A.T.**, Fritz J., Pierdant Mancera M. and Bagnard D.* Current drug design to target the Semaphorins/Neuropilins/Plexins complexes.
Soumis, Cell Adhesion and Migration, 2016

Transmembrane Domain Targeting Peptide Antagonizing ErbB2/Neu Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis

Alexia Arpel,^{1,5} Paul Sawma,² Caroline Spenlé,¹ Justine Fritz,¹ Lionel Meyer,¹ Norbert Garnier,³ Inés Velázquez-Quesada,¹ Thomas HusseNET,¹ Samia Aci-Sèche,^{3,4} Nadège Baumlin,¹ Monique Genest,³ David Brasse,⁵ Pierre Hubert,² Gérard Crémel,¹ Gertraud Orend,¹ Patrice Laquerrière,⁵ and Dominique Bagnard^{1,*}

¹INSERM U 1109, Labex Medalis, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg University, Strasbourg 67200, France

²CNRS LISM UMR 7255, Aix Marseille University, Marseille 13402, France

³CNRS UPR 4301, Centre de Biophysique Moléculaire (CBM), Orleans University, Orleans F-45071, France

⁴ICOA UMR 7311, Orleans University, Orleans 45100, France

⁵CNRS UMR 7178, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, Strasbourg University, Strasbourg 67037, France

*Correspondence: bagnard@unistra.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.044>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

SUMMARY

Breast cancer is still a deadly disease despite major achievements in targeted therapies designed to block ligands or ligand-binding subunits of major tyrosine kinase receptors. Relapse is significant and metastases deleterious, which demands novel strategies for fighting this disease. Here, we report a proof-of-concept experiment demonstrating that small peptides interfering with the transmembrane domain of the tyrosine kinase epidermal growth factor receptor ErbB2 exhibit anticancer properties when used at micromolar dosages in a genetically engineered mouse model of breast cancer. Different assays demonstrate the specificity of the ErbB2-targeting peptide, which induces long-term reduction of ErbB2 phosphorylation and Akt signaling consistent with reduced tumor cell proliferation and increased survival. Microcomputed tomography analysis established the antimetastatic activity of the peptide and its impact on primary tumor growth. This reveals the interior of the cell membrane as an unexplored dimension for drug design.

INTRODUCTION

Breast tumorigenesis is a multistep process leading cells to undergo genetic and epigenetic transformations eventually giving rise to invasive carcinoma with bad prognosis (Bombonati and Sgroi, 2011). The ErbB family of tyrosine kinase receptors plays a key role in breast carcinogenesis through complex signaling networks made of multiple heterodimeric combinations of ErbB receptors (Eccles, 2011). Although having no identified ligand, ErbB2 is amplified and overexpressed in high-grade ductal carcinoma (Ross and Fletcher, 1999) and in high-grade in-

flammatory breast cancer (Charafe-Jauffret et al., 2004) thereby being largely involved in the induction and development of the malignant transformation (Freudenberg et al., 2009). Several studies revealed the importance of the dimeric status of ErbB2 triggering signaling cascades including the MAPK and PI3K/Akt pathways (Freudenberg et al., 2009). ErbB2 promotes cell proliferation, supports survival, and also favors invasion and metastasis. Most of the ErbB2-positive cancers resist to ErbB2-targeted therapies or tyrosine kinase inhibitors (Arteaga et al., 2012). The heterodimerization capacity of ErbB2 with ErbB1 or ErbB3 and activation of compensatory signaling pathways are considered as important resistance mechanisms (Yamaguchi et al., 2014). An ideal therapeutic strategy would hence be to interfere with receptor interactions by preventing dimerization and oligomerization in order to block redundant or compensatory downstream signaling pathways. Mounting evidence nowadays demonstrate that the transmembrane domains act as crucial regulators of integral membrane receptors interactions. Strikingly, the transmembrane domains of ErbB family members are also critically involved in ErbB signaling not only by stabilizing dimerization but also by controlling structural rearrangements favoring optimal conformational positioning for kinase activation (Cymer and Schneider, 2010). Hence, point mutations in the transmembrane domain of the murine homolog of ErbB2 (mErbB2 also called Neu) lead to constitutive activation of the receptor. This observation led Gullick and collaborators to show that expression in cells of short transmembrane mErbB2 proteins lacking any other interacting domains reduced cell growth both in vitro and in vivo (Lofts et al., 1993). Thus, blocking transmembrane-domain-dependent mErbB2 dimerization may represent an avenue for the design of a novel type of drugs with anticancer properties. Indeed, after successful inhibition of brain tumor growth when disrupting the nontyrosine kinase receptor Neuropilin-1 oligomerization by administration of a synthetic peptide antagonizing its transmembrane domain (Nasarre et al., 2010), we decided to explore how a similar strategy would apply for the inhibition of mErbB2 and how this may efficiently

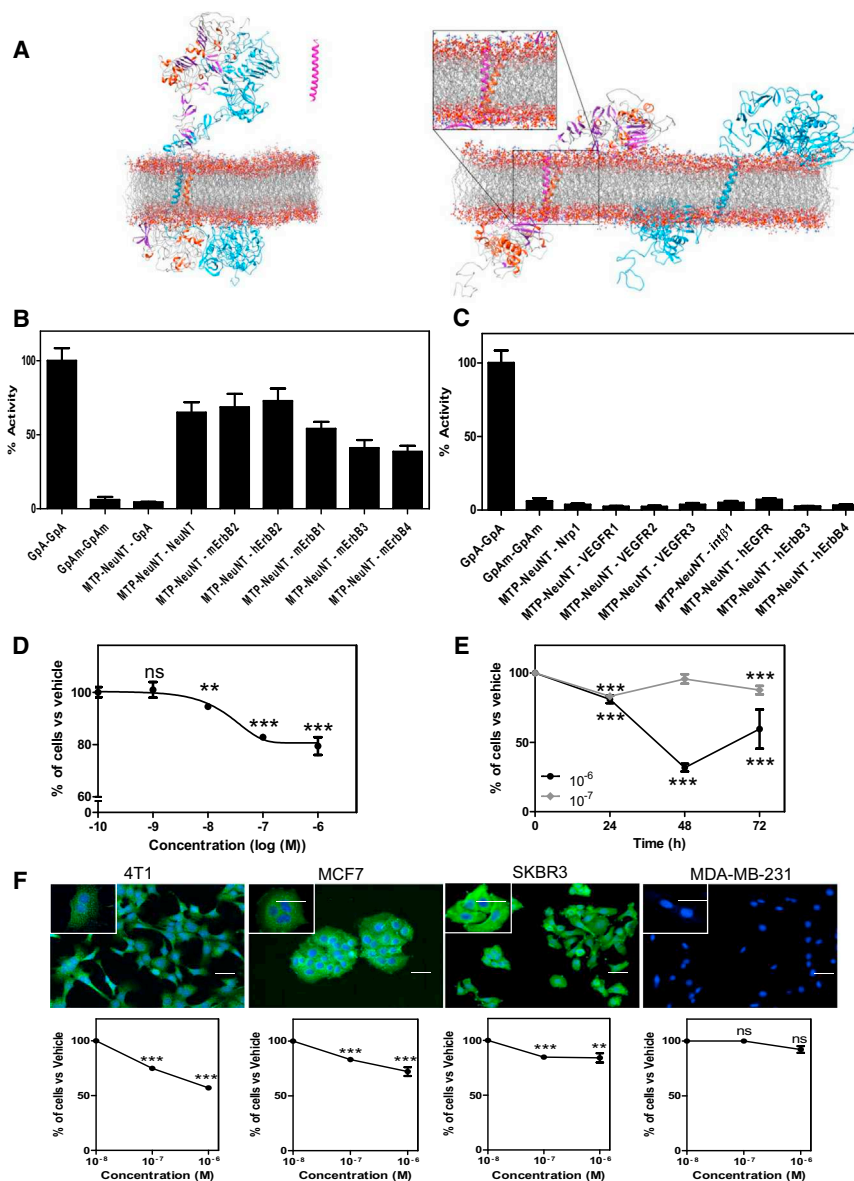


Figure 1. Demonstration of the Peptide-Based Inhibition of NeuNT/ErbB2 Receptor

(A) Analogy-based model of the nearly full-length monomeric and dimeric ErbB2 receptor illustrating the interaction between native transmembrane domains (TMDs) or with a peptide mimicking the TMD.

(B and C) Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System demonstrating the specificity and capacity of positive (B) or negative (C) homo- or heterodimerization of NeuNT TMD.

(D) Demonstration of the dose-dependent anti-proliferative effect of MTP-NeuNT in NT193 cells derived from MMTV-NeuNT tumor-bearing mice using a MTT assay.

(E) Demonstration of the prolonged and intensified antiproliferative effect of the peptide over time.

(F) Proliferation assay (MTT) respectively from left to right on 4T1, MCF7, SKBR3, MDA-MB-231 cell lines treated with MTP-NeuNT or vehicle (LDS) at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ M for 24 hr. Only cells expressing ErbB2 exhibit reduced proliferation when treated with the therapeutic peptide.

Data are presented as mean ± SEM from triplicate experiments. p values were determined by Mann-Whitney test in comparison to control LDS at 10⁻⁷ and 10⁻⁶ M for 24 hr. ***p < 0.0001, **p < 0.001 compared to vehicle. n.s., not significant. Scale bars, 50 μm. See also Table S1.

experiment demonstrates that drugs targeting the transmembrane domain of tyrosine kinases offer a credible alternative to classical approaches focused on extra or intracellular domains.

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular Modeling of NeuNT Transmembrane Domain

The substitution of a valine for a glutamic acid in the transmembrane domain (TMD) of the mErbB2 receptor leads to the constitutive activation of the receptor in

impact the metastatic process that remains nowadays the major challenge in breast cancer. We conducted this proof-of-concept experiment in an animal model of genetically induced breast tumors in which primary tumors are driven by the expression of a transforming mutant mErbB2 (NeuNT, exhibiting a mutation in its transmembrane domain leading to the constitutive activation of the receptor) oncogene under the MMTV mammary specific promoter (MMTV-NeuNT). Besides allowing the analysis in fully immune-competent mice, this model also gives rise to lung metastasis and has been clearly shown to be highly predictive of drug efficacy in human (Roberts et al., 2012). Here, we report that long-term triweekly intraperitoneal administration of low doses of a synthetic Membrane Targeting Peptide (MTP) mimicking the transmembrane domain of NeuNT (MTP-NeuNT) triggers sustained inhibition of the Akt pathway thereby impeding tumor cell growth and metastasis. Hence, this proof-of-concept

a dimeric state and carcinogenesis (Weiner et al., 1989). We first performed molecular modeling of TMD dimerizing interface to better predict the interaction of a TMD-NeuNT mimicking peptide (MTP-NeuNT) with the native TMD. Figure 1A shows the MTP-NeuNT in the context of the nearly full-length dimeric NeuNT receptor. This model is based on the recently published molecular dynamics study of EGFR dimers (Arkhipov et al., 2013). Our approach illustrates how the transmembrane domain kindly accommodates to the interface of the active receptor as previously suggested (Bagossi et al., 2005). Our model supports the idea of an active role of the TMD to control the proper dimeric and conformational organization of the receptor as recently described for EGFR (Endres et al., 2013). The crossing angle of the transmembrane helices at -45 degrees involves small residues in the core of the dimer. Such conformation was shown to be among the most stable in previously published ErbB2

TMD models (Bocharov et al., 2010). Thus, in the case of NeuNT receptor, MTP-NeuNT peptide would inhibit signaling by interfering with homodimerization of the TMD of the NeuNT receptor through direct competition for binding to the dimerization interface. When locked within the dimerization interface, MTP-NeuNT peptide would also prevent further heterodimerization by reducing its availability for any other interactions.

NeuNT Transmembrane Domain Sequence Exhibits Highly Specific Interactions

To address the specificity of MTP-NeuNT, we performed a two hybrid-like screening using the BACTH system (Karimova et al., 2001). Constructions encoding several TMD containing GxxxG motifs were used to measure interactions with NeuNT TMD (Figures 1B and 1C). This assay confirmed the high propensity of the MTP-NeuNT peptide to dimerize with NeuNT TMD when compared with positive control GPA-GPA (Glycophorin A) interaction or negative GPAm-GPAm interaction (mutated nondimerizing version of Glycophorin-A TMD in which glycine 83 is replaced by an isoleucine). NeuNT TMD sequence showed no heterodimerization with various GxxxG-containing sequences including Glycophorin A, Neuropilin-1, Vascular endothelial growth factor receptor 1, Vascular endothelial growth factor receptor 2, Vascular endothelial growth factor receptor 3, or Integrin Beta 1 (Figure 1C). The MTP-NeuNT sequence showed strong heterodimerization capacity with the mouse ErbB2 sequence (mErbB2) or the human ErbB2 sequences (hErbB2). Moreover, the NeuNT sequence significantly interacted with the murine orthologous of ErbB1 (mErbB1), ErbB3 (mErbB3), and ErbB4 (mErbB4) but not with the human orthologous of these receptors (Figures 1B and 1C). Strikingly, using proximity ligation assay (Duolink system), we were able to show that MTP-NeuNT significantly reduced the number of ErbB2/ErbB3 dimer/oligomers in two different cell lines including the NeuNT and MCF7 cells (Figure S1). Thus, this part of the study confirmed stable homo- and heterodimer formation of the ErbB2 TMD (Bennasroune et al., 2004; Cymer and Schneider, 2010) and allowed us to define the dimerizing and antagonizing capability of the MTP-NeuNT peptide while demonstrating the specificity of interactions.

MTP-NeuNT Exhibits a Long-lasting Inhibitory Effect

There was no cellular model allowing the study of NeuNT signaling in a native context. To circumvent this issue, we developed a cell line derived from tumors collected in MMTV-NeuNT mice (NT193 cell line). This cell line exhibits epithelial and metastatic properties and constitutively expresses the mutated version of ErbB2. We performed a dose-response analysis to characterize the inhibition of cell proliferation that was obtained with 10^{-8} M of the peptide reaching a maximal effect at 10^{-6} M (-21% at 10^{-6} M versus vehicle, $p < 0.001$, Mann-Whitney test) (Figure 1D). Moreover, we found that treating the cells with 10^{-6} M had a prolonged and intensified effect as seen by a significant 2- to 3-fold amplification of the inhibitory effect when measuring cell proliferation at 48 and 72 hr post-treatment (-68% at 48 hr and -41% at 72 hr compared to control, $p < 0.001$ Mann-Whitney test). This long-lasting effect is dose dependent because 10^{-7} M of the MTP-NeuNT peptide only showed mild reduction

over time (-17% at 24 hr, $p < 0.0001$ at 48 hr, $p = 0.24$, and -12% at 72 hr, $p < 0.0004$, compared to control, Mann-Whitney test) (Figure 1E). This persistent effect is consistent with our previous confocal microscopy observations demonstrating that similar TMD peptides enter the cells within a time frame of 30–50 min and that they can be imaged at the membrane up to 72 hr postincubation before endocytosis and degradation (Nasarre et al., 2010; Popot et al., 2011). Hence, we verified that MTP-NeuNT inhibited proliferation of another murine breast cancer cell line (4T1 cells) and ErbB2 expressing human breast cancer lines (MCF7, SKBR3) but had no effect on human MDA-MB-231 cells lacking expression of ErbB2 at the protein level (Figure 1F). Interestingly, partial knockdown of ErbB2 in MCF7 cells was correlated to decreased activity of MTP-NeuNT peptide (Figure 2A). The specificity of the peptide was also confirmed in gain-of-function experiments in which ErbB2 was expressed in MDA-MB-231 cells. Indeed, the proliferation of MDA-MB-231 ErbB2-positive cells was significantly decreased when treated with 10^{-6} M of MTP-NeuNT (Figure 2B).

MTP-NeuNT Inhibits ErbB2 Phosphorylation and Akt Phosphorylation

Because we observed an ErbB2-dependent negative impact of MTP-NeuNT on tumor cell expansion, we investigated how this peptide affects ErbB2 signaling. We observed a significant 45% reduction of ErbB2 phosphorylation (normalized to total ErbB2) in MTP-NeuNT-treated NT193 cells compared to control conditions (lithium dodecyl sulphate [LDS], $p = 0.0078$, Mann-Whitney test, Figure 2C) using a phosphospecific ELISA assay. Moreover, we also found a 58% decrease of Akt phosphorylation ($p < 0.0001$, chi-square test) in NT193 cells treated for 1 hr (Figure 2D). Strikingly, we found sustained inhibition of Akt phosphorylation up to 72 hr consistent with long-term inhibition of cell proliferation (Figure 2E). Similarly, Erk1/2 phosphorylation (the second most important signaling pathway triggered by NeuNT/ErbB2) was significantly reduced in the presence of the peptide (Figure 2E). Hence, MTP-NeuNT is able to inhibit the proliferative and survival signaling cascades triggered by the NeuNT/ErbB2 receptor. From a therapeutic point of view, the inhibition of the Akt pathway highlights an interesting antitumoral potential of the peptide because the Akt pathway is hyperactive in more than 70% of breast cancers (Grunt and Mariani, 2013) and is considered as one of the major source of tumor cell survival and metastasis (Kim and Chung, 2002).

MTP-NeuNT Improves Overall Survival of MMTV-NeuNT Mice

MMTV-NeuNT transgenic mice develop stochastic mammary adenocarcinoma approximately from 12 weeks of age (Muller et al., 1988). To determine how MTP-NeuNT would affect breast tumor growth, we administrated intraperitoneal bolus of 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of the peptide (a concentration equivalent to 10^{-6} M) three times a week starting when the first palpable tumor reached a volume of 200 mm^3 . Tumor occurrence was identical in both groups (100%) within a similar time frame to reach 200 mm^3 tumors (214 days in control versus 218 days in MTP-NeuNT group, $p = 0.95$, Mann-Whitney test) before administration of treatments. A waterfall plot of best response (determined between day 21

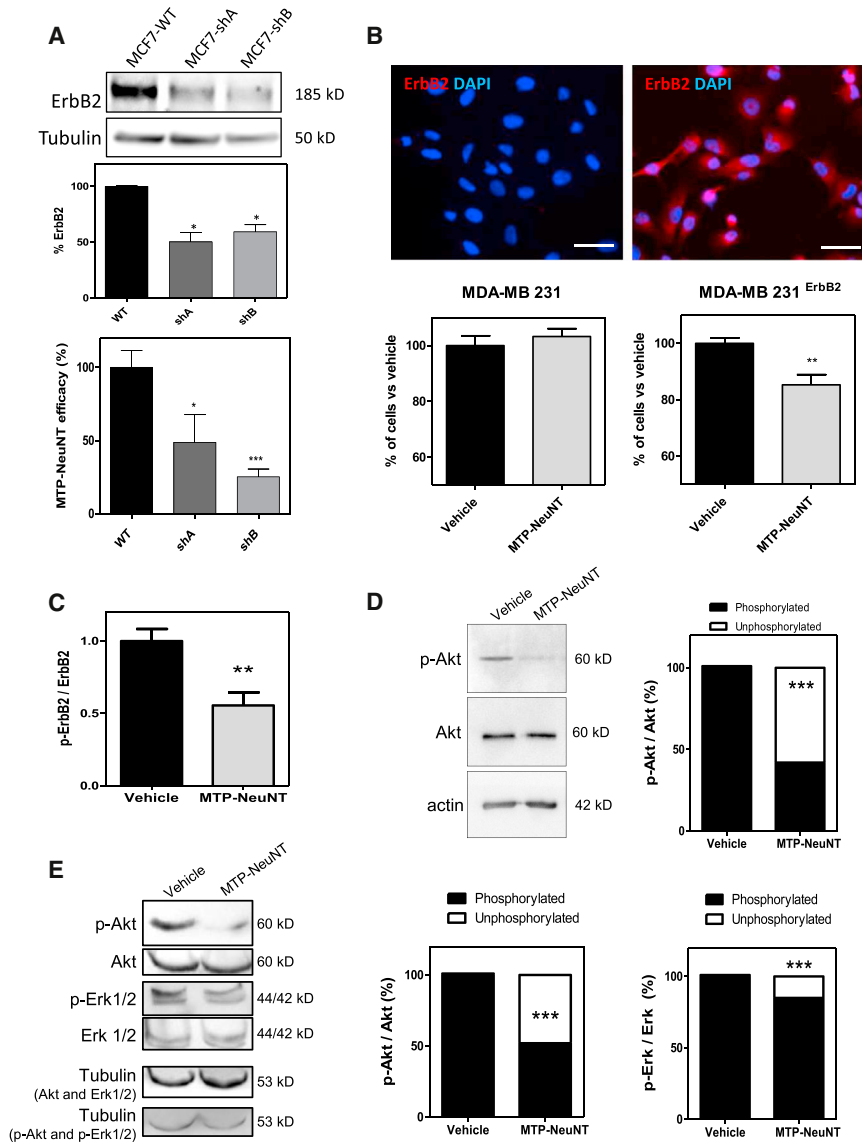


Figure 2. Characterization of MTP-NeuNT Inhibitory Effect

(A) We were able to generate two different clones of MCF7 cells partially knockdown for ErbB2. These clones showed reduced sensitivity to MTP-NeuNT almost proportional to the level of knockdown. Data are presented as mean \pm SEM from triplicate experiments.

(B) To better confirm the link between cell sensitivity and expression level of ErbB2, we performed gain-of-function experiments in MDA-MB231 cells (lacking ErbB2 expression) becoming sensitive to MTP-NeuNT when expressing ErbB2. Data are presented as mean \pm SEM from triplicate experiments.

(C) Demonstration of the inhibition of ErbB2 phosphorylation (ELISA assay). Data are presented as mean \pm SEM from triplicate experiments.

(D) Akt phosphorylation (western blot) in NT193 cells treated with 10^{-6} M of MTP-NeuNT.

(E) Demonstration of the sustained inhibition of Akt phosphorylation after 2 days treatment also accompanied by significant reduction of Erk1/2 phosphorylation.

latency in MMTV-NeuNT mice (Yang et al., 2002). Thus, antagonizing the TMD of NeuNT appears as a potent therapeutic strategy.

Antimetastatic Activity of MTP-NeuNT

The occurrence of lung metastasis is a critical step in breast cancer progression and linked to disease-associated death (Chambers et al., 2002). Thus, we decided to monitor whether the improved survival of mice treated with MTP-NeuNT could reflect reduced lung metastatic colonization. To this end, we analyzed the serial μ CT images collected at

and day 28 of treatment according to the RECIST criteria) revealed that 100% of the treated animals responded to the treatment with 33% of SD (stable disease, $< -30\%$ decrease of target lesion) and 67% with PR (partial response $>30\%$ decrease of target lesion) (Figure 3A). This high response rate translated into a marked survival benefit (Figure 3B) with a median survival increase up to 122% compared with untreated animals (73.5 days in control animals versus 90 days in MTP-NeuNT-treated animal, $p = 0.0182$, log-rank test). We also found that the delay for the appearance of second tumors (defined as the second palpated tumor) was doubled in MTP-NeuNT-treated mice as compared to control mice (4.6 days in control group versus 10.4 days in MTP-NeuNT-treated animals, $p = 0.0066$, Mann-Whitney test) thereby demonstrating an overall impact on disease progression. In comparison to our results for MTP-NeuNT that already reduced primary tumor onset and growth, a genetically delivered TGF β antagonist had no effect on tumor

different time points of the protocol. Figure 3C is showing representative examples of the metastases detected in the control or the MTP-NeuNT-treated group. A waterfall plot of best response (determined between week 7 and week 8 of treatment according to the RECIST criteria) revealed that 100% of the treated animals responded to the treatment with 20% of SD and 80% with PR including two individuals above 90% of decrease in metastasis volume (Figure 3D). Quantitative measurements of the total number of metastasis in randomly selected five of ten control mice and five of ten MTP-NeuNT mice revealed a 2.4-fold decrease ($n = 26$ detectable metastases in control versus $n = 11$ metastases in MTP-NeuNT group) in treated animals after 8 weeks of treatment (Figure 3E). Determination of metastases volumes also revealed a 4.5-fold decrease when comparing cumulated volumes of metastases in mice of MTP-NeuNT group with those of the control group (cumulated volume CV = 78.3 mm 3 in control versus CV = 17.5 mm 3 in MTP-NeuNT group) (Figure 3F). Hence,

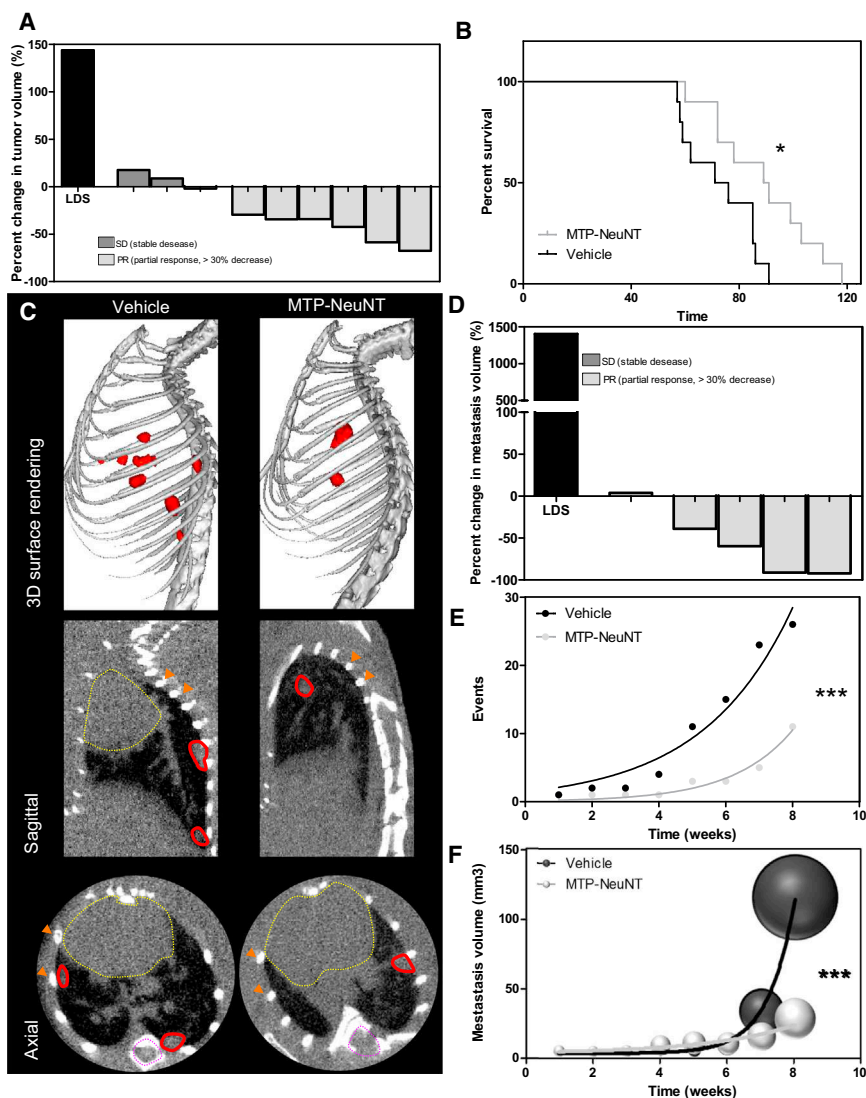


Figure 3. Effect of MTP-NeuNT In Vivo

(A) Demonstration of the inhibitory effect of NeuNT peptide on primary tumors volumes between day 21 and day 28 of treatment. The Waterfall graph represents the percent change in tumor volume of individual treated animals (gray bars, n = 9) compared to the averaged tumor volume increased determined in the control group (dark bar, n = 10). This demonstrates that 100% of the treated animals responded to the treatment with 30% stable disease and 70% partial response.

(B) Kaplan-Meier survival curve demonstrating a significant increased survival of the treated animals compared to the control animals.

(C) Representative example of lung metastases seen from μ CT 3D surface rendering or single sagittal and axial sections of the lungs in a control animal (left panel) and in a treated animal (right panel). Lung metastases are surrounded in red, heart in dashed yellow, and orange arrowheads point to ribs.

(D) Waterfall graph representing the percentage change in metastases volume of individual treated animals (gray bars, n = 5) compared to the averaged metastases volume increase determined in the control group (dark bar, n = 5) between weeks 7 and 8 of treatment.

(E and F) (E) Regression curves indicating that MTP-NeuNT treatment decreases the number of lung metastasis over time and (F) the cumulated volume of lung metastases.

lung metastases using Ki67 staining (Figure 4B). Moreover, we observed a 1.9-fold increase of TUNEL-positive cells in the metastases of treated animals illustrating that the peptide impaired tumor cell survival (Figure 4C). Hence, Akt phosphorylation was 4.9-fold decreased (Figure 4D). Altogether these data demonstrate that the therapeutic peptide is

μ CT analysis revealed a significant antimetastatic effect of MTP-NeuNT characterized by both a reduction of the number and size of the lesions.

MTP-NeuNT Inhibits Metastasis Proliferation and Prevents Parenchymal Invasion

Because micrometastases (<1 mm in diameter) are difficult to analyze by μ CT, we decided to perform histological examination of the lungs to further analyze the antimetastatic effect of MTP-NeuNT. This allowed us to confirm an overall 1.8-fold reduction of the mean number of lung metastasis (Figure 4A). Interestingly, a detailed analysis allowed us to distinguish between intravascular and parenchymal metastases (Siegel et al., 2003) to reveal a 2.6-fold decrease of the number of parenchymal metastases in the MTP-NeuNT-treated group compared to the control group. This result suggests that the peptide is able to reduce parenchymal invasion, presumably because impeding extravasation of metastasizing cells forming emboli in blood vessels. We also found a general 2.7-fold decrease of tumor cell proliferation in

able to slow down proliferation and extravasation of metastatic cells and survival as a consequence of Akt pathway inhibition.

Conclusions

We believe that the transmembrane domain of tyrosine kinase receptors is an eligible domain for drug design because this underestimated domain is crucial for the control of receptor activation (Arkhipov et al., 2013; Endres et al., 2013). Our study demonstrates that a peptide mimicking the TMD of the mutant mErbB2 (NeuNT) is able to specifically antagonize NeuNT, mouse and human ErbB2 thereby inhibiting phosphorylation of the receptor and downstream signaling. This long-lasting inhibitory property translated into improved survival and strong reduction of metastasis growth of mice presenting genetically induced mammary tumors. Strikingly, micromolar dosage was sufficient to trigger significant therapeutic benefit with no histological sign of toxicity (Figure S2). This unique strategy may apply to other tyrosine kinase receptors, therefore opening an avenue for drug design.

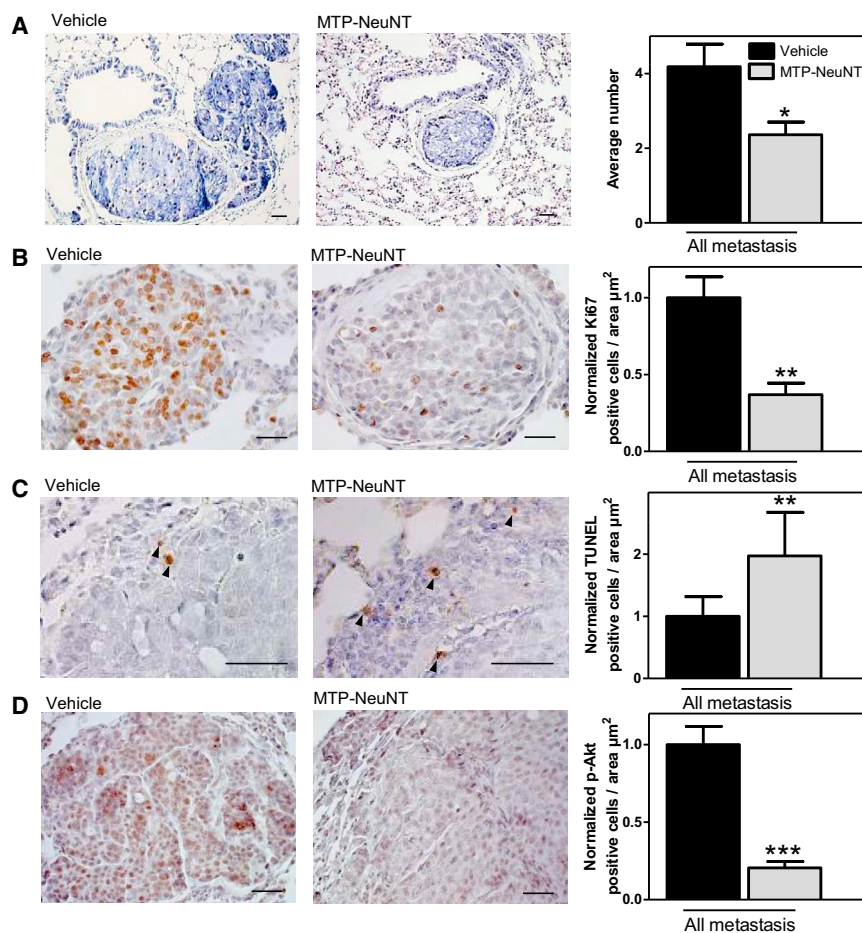


Figure 4. Histological Analysis of Lung Metastases

(A) Representative microphotographs illustrating extravasating metastasis and pure intravascular metastasis in the control and treated group, respectively. Systematic quantification of the number of metastasis reveals a 2-fold reduction in MTP-NeuNT-treated animals.

(B) Demonstration of the antiproliferative activity of the peptide by systematic counting of Ki67-positive cells.

(C) Demonstration of the proapoptotic effect of the peptide using the TUNEL method.

(D) Demonstration of the inhibition of the Akt pathway by systematic counting of phospho-Akt-positive cells in metastasis.

In (B)–(D), the left part is showing representative images of Ki67, TUNEL, or phospho-Akt-positive cells (immunocytochemistry, scale bars, 50 μm). The right parts are presenting the corresponding quantitation, p values are determined by Mann-Whitney test, *p < 0.05; **p < 0.001; ***p < 0.0001. Data are presented as mean \pm SEM.

I-TASSER. The homology models of the monomeric and the dimeric ErbB2 receptors were energetically minimized before their insertion in a lipid bilayer.

Estimation of MTP-NeuNT Dimerization: BACTH Method

A bacterial two-hybrid system based on the recombination of adenylate cyclase CyaA from *Bordetella pertussis* was used to measure both homo- and heterodimerization propensities of transmembrane domains of interest. We have

modified the BACTH pKTN25 and pUT18 plasmids so that they encode for hybrid proteins containing a signal sequence followed by the different TMDs of interest and the T25 and T18 fragments of adenylate cyclase. Double transformation in BTH101 (cya-) *E. coli* cells, cell growth and induction, and beta-Galactosidase assay in 96-well arrays were performed on a TECAN machine. Peptide sequences used in this study are summarized in Table S1.

Immunocytochemistry

Cells were grown on sterile glass coverslips for 1 day before immunofluorescence staining. The cells were fixed with 4% formaldehyde (FA) for 10 min. The samples were gently rinsed with PBS before adding the blocking solution (FCS 5%) for a minimum of 30 min. Cells were permeabilized using 1 \times PBS with 0.1% Tween 20 for 5 min. Primary HER2/ErbB2 (Cell Signaling #2242, diluted 1/50 from stock solution) antibody diluted in 5% fetal calf serum (FBS)-PBS was added to the cell over night at room temperature (RT). After three washes of 5 min secondary antibody (donkey anti-rabbit, Jackson ImmunoResearch 711-165-152 diluted 1/1,000 from stock) was added at RT for 90 min. After washing in PBS, the cell nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1/30,000 in water) for 10 min. Glass coverslips were finally mounted on microscopy glass slides using a polymerization medium (FluorSave reagent, Calbiochem-Merck cat# 345789).

Histology

Giemsa Staining

Lungs (left lobes) were removed and fixed overnight in 4% FA. Following extensive washes organs were dehydrated in 100% ethanol for a day and then embedded in paraffin. Samples were stored at RT. The paraffin-embedded tissue blocks sections (7 μm thickness) were dewaxed and rehydrated through

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

All cell media were supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 100 IU/ml penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Sigma), and cultures were performed at 37°C, 5% CO₂. MDA-MB-231 (ErbB2 negative), MCF7 (ErbB2 positive), SKBR3 (overexpressing ErbB2) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco). Murine Balb/c 4T1 (ErbB2 positive) cells were grown in RPMI1640 (Gibco). NT193 cells were derived from MMTV-NeuNT primary tumors.

Peptides

Peptides have been synthesized by the Peptide Specialty Laboratories GmbH by automatic peptide synthesis (Fmoc chemistry). The peptide corresponding to the TM sequence of NeuNT: TFIATVEGVLLFLILVVVVGILIKRR (in one-letter code, amino acid T⁶⁵⁴ to R⁶⁸⁰ according to Swissprot entry P06494) is referred as MTP-NeuNT. Peptides purity estimated by RP-HPLC was more than 90% according to manufacturer indication.

Modeling of the NeuNT Receptor Dimer and MTP-NeuNT

The nearly full length of the monomeric and the dimeric ErbB2 receptors were modeled by homology using MODELLER 9.11. The multitemplates strategy was employed using as templates the recent model of EGFR obtained by molecular dynamics and the X-rays and NMR structures of the domains available for the murine ErbB2 receptor. These domains are the extracellular region (PDB.ID 1N8Y), the kinase domain (PDB.ID 3PP0), and the right-handed dimer model of the TM domain. The 3D structure of the missing part of the intracellular domain of the murine ErbB2 was modeled using the prediction server

100% Toluene (2 washes of 15 min) then 100%–70% alcohol (10 min each) and then stained with Giemsa stain (RAL#320310-0125, diluted 1/50 from stock solution) for 2 hr at 37°C. After extensive washing, differentiation is achieved with 0.5% aqueous acetic solution for 30 s. Sections are then rapidly dehydrated in 70%–100% alcohol baths with rapid dips in each bath before final wash in toluene for 15 min. Slides were mounted in Eukitt (Sigma) for long term conservation and microscopic observation.

Hematoxylin-Eosin

The paraffin embedded kidney and liver sections were dewaxed and rehydrated as described above. Sections were stained with hematoxylin (Surgipath #01562E) for 5 min and washed with running tap water. Differentiation was accomplished in acid alcohol solution for 7 s followed by thorough wash (running tap water for at least 10 min). Sections were incubated in eosin (Harris, RAL# 31273-7) for 10 s, rinsed again, and dehydrated as described above before mounting in Eukitt (Sigma #03989).

Cell Proliferation

In vitro cell proliferation was monitored using MTT (3-[4,5 -Dimethylthiazol-2 -yl]-2,5-di phenyl tetrazolium bromide) proliferation assay according to manufacturer's instruction (Sigma, M2128). Optical density was determined at 570 nm using an ELISA plate reader spectrophotometer (EL800, BioTek Instruments). NT193 cells were seeded at a density of 10,000 cells per well in a 96-well plate; the cells were then incubated with various peptide concentrations (ranging from 10^{-9} to 10^{-6} M) or corresponding vehicle (LDS, ranging from 0.72 to 720 μ M). In vivo cell proliferation was determined by quantification of Ki67-positive cells. Dewaxed sections were boiled with the antigen retrieval sodium citrate buffer (pH 6) for 20 min (Sigma #CO759). After incubation with blocking solution (PBS Triton-100X +5% NGS) for 20 min, the avidin/biotin blocking solutions were added on the tissue for 15 min, respectively (Blocking kit from Vector Laboratories SP-2001). The primary anti-Ki67 antibody (Thermo Scientific, RM-9106) was added in blocking solution overnight at a dilution of 1/200, whereas secondary antibody (goat anti-rabbit, Vector Laboratories, #PI-1000) was added at a dilution of 1/200 in PBS for 1 hr at room temperature. Revelation was performed using Elit Vectastain kit (PK-6100). All specimens were counterstained with hematoxylin.

Determination of Apoptosis

Sections were prepared as above to determine apoptosis using the ApopTag Plus Peroxidase In situ Hybridization and Detection Kit (Chemicon, S7101) according to the manufacturer's instructions. The number of positive cells was counted on a total of eight sections of the control group and eight sections of the MTP-NeuNT-treated group. Data were expressed as the number of positive (apoptotic) cells per area (μm^2).

Image Acquisition

Cell fluorescence images were acquired with the fluorescence Zeiss Imager Z2 equipped with HXP 120 W lamp and ApoTome system. Lung metastasis images were acquired using a microscope Zeiss AXIOZoom.V16. Images were analyzed using AxioVision 4.7.2 (Zeiss), Zen (Zeiss), and Image J (Wayne Rasband, NIH) software.

Phosphorylation of ErbB2 Receptor on NT193 Cells

Phospho-Neu (Y1221/Y1222) cell-based colorimetric ELISA Kit (Immunoway Biotechnology Company) was used to monitor levels of phosphorylated mErbB2 and related total mErbB2 receptor. NT193 cells were seeded into the wells of the 96-well plate at densities of 30,000 cells in 200 μ l cell-culture media and serum starved overnight. The cells were then treated with either vehicle (LDS 720 μ M) or MTP-NeuNT peptide for 1 hr at 10^{-6} M. mErbB2 phosphorylation was assessed according to the manufacturer's instructions.

Western Blot

Before protein extraction, the cells were treated either with 10^{-6} M of MTP-NeuNT or Vehicle (LDS, 720 μ M). Protein sample preparation was completed with Laemmli buffer supplemented with protease inhibitor (Roche tablets, #11836145001) and 5 mM of Na orthovanadate. Proteins were resolved in an 8% SDS/PAGE gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Whatman). The blots were soaked in blocking solution (TBS/1% Tween 20/5% milk

for 1 hr at RT. First antibodies (rabbit anti-phospho-akt, Rabbit anti-akt, Cell Signaling #4060 and #9272, respectively) and mouse antiactin (Chemicon #MAB1501R) were incubated overnight at 4°C. Secondary antibodies (anti-rabbit-HRP, GE Healthcare, #NA934V and anti-mouse-HRP, GE Healthcare, #NXA931) were incubated 1 hr a RT in TBS/1% Tween 20/5% milk. The revelation step was performed using streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Amersham #RPN1051) according to the manufacturer instructions. Images of the immune blots were acquired and analyzed thanks to the GENE GNOME apparatus (Syngene Bio Imaging).

Loss- and Gain-of-Function Experiments

Lentiviruses producing HEK293T cells were transfected using the JetPEI transfection reagent (PolyPlus Transfection) with a set of two different pGFP-C-shLenti 29MER plasmid vectors: TL320342A, TL320342B (OriGene) and three lentivirus packaging plasmid vectors containing pMDL g/p RRE, pRSV-rev, pMD2-VSVG (Addgene). After 48 hr, the HEK293T cells culture media was harvested and transferred on MCF7 cells growth media containing 8 μ g/ml protamine sulfate (Sigma-Aldrich) for 72 hr prior to selection with 5 μ g/ml puromycin. Screening of protein knockdown was done by western blot as described above.

Gain-of-Function Experiment

MDA-MB-231 (negative for HER2 and not sensitive to MTP-NeuNT) were transfected with a plasmid vector PSV2neo carrying the sequence coding for the human version of HER2 receptor. The transfection of MDA-MB231 was done with the JetPEI (Polyplus Transfection) reagent according to the manufacturer procedure. Cells were then selected with geneticin sulfate G418 (Life Technologies) for 10 days before using them for functional assays.

Animal Handling and In Vivo Ethical Statement

Experiments were performed according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (E67-6-482-21) and the European Directive with approval of the regional ethical committee (reference AL/55/62/02/13). Mice received food and water ad libitum. Animals were sacrificed using CO₂. All necessary precautions were taken to minimize pain or discomfort of the animals. General health status was monitored three times a week by independent observers. Sacrifice of the animal was effectuated when reaching limit ethical endpoints.

Production of the Transgenic MMTV-NeuNT Mice

Transgenic FVB mice expressing the mutant activated form of murine ErbB2 (NeuNT) under control of the mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter (Muller et al., 1988) were kindly obtained from Dr. Gerhard Christofori (University of Basel). We generated a cohort of 20 mice receiving either 15 μ g/kg of MTP-NeuNT or vehicle (LDS, 720 μ M) three times a week. Treatments were administrated when the first palpated tumor reached 200 mm³ volume as determined using electronic caliper.

In Vivo Imaging and Surface Rendering of μ CT

In vivo μ CT, equipped with dedicated anesthesia chamber, was performed on a weekly basis at the IPHC (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien), Strasbourg, France. Acquisition parameters were 40 kVp, 250 IA, and 235 ms exposures per projection in binning 2×2 with a projection pixel size of $100 \times 100 \text{ cm}^2$. A full image data set covered 360° in 0.47° steps for a total of 768 projections. Images were reconstructed with a cone-beam reconstruction algorithm producing in real time a 3D image with an isotropic voxel size of 0.1 mm. The delivered dose during each microCT exam was 48 mGy. Once the metastasis was detected in the lung, its volume was calculated as follows: $V = (4/3) \cdot \pi \cdot r_x \cdot r_y \cdot r_z$, where r is the radius of the metastasis and x, y, z are the axial directions.

Statistics

Statistical analyses were performed using Mann-Whitney test (for sample $n < 30$), chi-square analysis (for qualitative data), extra sum of square F test (for the μ CT number of metastasis curves) using GraphPad software. p values are given in the figure legends, and values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. A minimum of three independent experiments was

performed for in vitro assays (proliferation, ErbB2 phosphorylation, and western blot). For in vivo experiments, the sample size calculation anticipated a therapeutic effect of 20% for a SD of 14% and confidence interval of confidence 95% (Lamorte's Power calculation, University of Boston).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes two figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.044>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.A. performed animal studies, in vitro assays, histology and staining, western blots, and data analysis; P.S. and P.H. conducted BACTH assays and related analysis; C.P. performed western blots and Duolink assays; J.F. and L.M. performed loss- and gain-of-function experiments, N.G., S.A.-S., and M.G. performed modeling of Neu receptor; I.V.-Q., T.H., and G.O. produced and validated the NeuNT cell line, G.C. was in charge of peptide production, control, and solubilization; D. Brasse and P.L. supervised and designed μ CT imaging and analysis; D. Bagnard designed the study, coordinated the project, and analyzed data.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to D. Gerhard Christofori for providing the MMTV-NeuNT model and to Florian Busso and Abdoul Ahad Ould Sidi for excellent technical support for the 3D surface rendering of lung metastases. This work was supported by INCA to G.O., ANR -10-BLAN-1507 to D. Bagnard/P.H./M.G., and Ligue Régionale contre le Cancer to D. Bagnard. This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034_Medails and received a financial support from French government managed by "Agence National de la Recherche" under "Programme d'investissement d'avenir."

Received: July 17, 2013

Revised: May 27, 2014

Accepted: July 24, 2014

Published: September 11, 2014

REFERENCES

- Arkipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N.F., Eastwood, M.P., Wemmer, D.E., Kuriyan, J., and Shaw, D.E. (2013). Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* 152, 557–569.
- Arteaga, C.L., Sliwkowski, M.X., Osborne, C.K., Perez, E.A., Puglisi, F., and Gianni, L. (2012). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 16–32.
- Bagossi, P., Horváth, G., Vereb, G., Szöllösi, J., and Tózsér, J. (2005). Molecular modeling of nearly full-length ErbB2 receptor. *Biophys. J.* 88, 1354–1363.
- Bennasroune, A., Fickova, M., Gardin, A., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Crémel, G., and Hubert, P. (2004). Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. *Mol. Biol. Cell* 15, 3464–3474.
- Bocharov, E.V., Volynsky, P.E., Pavlov, K.V., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2010). Structure elucidation of dimeric transmembrane domains of bitopic proteins. *Cell Adhes. Migr.* 4, 284–298.
- Bombonati, A., and Sgroi, D.C. (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *J. Pathol.* 223, 307–317.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Charafe-Jauffret, E., Tarpin, C., Bardou, V.-J., Bertucci, F., Ginestier, C., Braud, A.-C., Puig, B., Geneix, J., Hassoun, J., Birnbaum, D., et al. (2004). Immunophenotypic analysis of inflammatory breast cancers: identification of an 'inflammatory signature'. *J. Pathol.* 202, 265–273.
- Cymer, F., and Schneider, D. (2010). Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adhes. Migr.* 4, 299–312.
- Eccles, S.A. (2011). The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 685–696.
- Endres, N.F., Das, R., Smith, A.W., Arkhipov, A., Kovacs, E., Huang, Y., Pelton, J.G., Shan, Y., Shaw, D.E., Wemmer, D.E., et al. (2013). Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* 152, 543–556.
- Freudenberg, J.A., Wang, Q., Katsumata, M., Drebin, J., Nagatomo, I., and Greene, M.I. (2009). The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Exp. Mol. Pathol.* 87, 1–11.
- Grunt, T.W., and Mariani, G.L. (2013). Novel approaches for molecular targeted therapy of breast cancer: interfering with PI3K/AKT/mTOR signaling. *Curr. Cancer Drug Targets* 13, 188–204.
- Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2001). Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 73–82.
- Kim, D., and Chung, J. (2002). Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 106–115.
- Lofts, F.J., Hurst, H.C., Sternberg, M.J., and Gullick, W.J. (1993). Specific short transmembrane sequences can inhibit transformation by the mutant neu growth factor receptor in vitro and in vivo. *Oncogene* 8, 2813–2820.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R., and Leder, P. (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54, 105–115.
- Nassarre, C., Roth, M., Jacob, L., Roth, L., Koncina, E., Thien, A., Labourdette, G., Poulet, P., Hubert, P., Crémel, G., et al. (2010). Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene* 29, 2381–2392.
- Popot, J.-L., Althoff, T., Bagnard, D., Banères, J.-L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L.J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M.J., et al. (2011). Amphipols from A to Z. *Annu Rev Biophys* 40, 379–408.
- Roberts, P.J., Usary, J.E., Darr, D.B., Dillon, P.M., Pfefferle, A.D., Whittle, M.C., Duncan, J.S., Johnson, S.M., Combest, A.J., Jin, J., et al. (2012). Combined PI3K/mTOR and MEK inhibition provides broad antitumor activity in faithful murine cancer models. *Clin. Cancer Res.* 18, 5290–5303.
- Ross, J.S., and Fletcher, J.A. (1999). The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin. Cancer Biol.* 9, 125–138.
- Siegel, P.M., Shu, W., Cardiff, R.D., Muller, W.J., and Massagué, J. (2003). Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8430–8435.
- Weiner, D.B., Kokai, Y., Wada, T., Cohen, J.A., Williams, W.V., and Greene, M.I. (1989). Linkage of tyrosine kinase activity with transforming ability of the p185neu oncoprotein. *Oncogene* 4, 1175–1183.
- Yamaguchi, H., Chang, S.-S., Hsu, J.L., and Hung, M.-C. (2014). Signaling cross-talk in the resistance to HER family receptor targeted therapy. *Oncogene* 33, 1073–1081.
- Yang, Y.-A., Dukhanina, O., Tang, B., Mamura, M., Letterio, J.J., MacGregor, J., Patel, S.C., Khozin, S., Liu, Z.-Y., Green, J., et al. (2002). Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J. Clin. Invest.* 109, 1607–1615.

Inhibition of PlexA1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using a transmembrane domain targeting peptide

Laurent Jacob^{1,2,3,4}, Paul Sawma^{5,*}, Norbert Garnier^{6,*}, Lionel A.T. Meyer^{1,2,3,4,*}, Justine Fritz^{1,2,3,4,*}, Thomas Hussenet^{1,2,3,4,*}, Caroline Spenlé^{1,2,3,4,*}, Jacky Goetz^{1,2,3,4,7}, Julien Vermot⁷, Aurore Fernandez^{1,2,3,4}, Nadège Baumlin^{1,2,3,4}, Samia Aci-Sèche^{6,8}, Gertraud Orend^{1,2,3,4}, Guy Roussel^{1,2,3,4}, Gérard Crémel^{1,2,3,4}, Monique Genest⁶, Pierre Hubert⁵, Dominique Bagnard^{1,2,3,4}

¹Inserm U1109, MN3T team, Strasbourg, France

²Université de Strasbourg, Strasbourg, France

³LabEx Medalis, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁴Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Strasbourg, France

⁵LISM (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires), UMR 7255, CNRS-Aix Marseille Université, France

⁶Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301, CNRS, rue Charles Sadron, affiliated to the University of Orléans, France

⁷Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), CNRS/INSERM/UDS, Illkirch, France

⁸Current address: Institut de Chimie Organique et Analytique UMR, Université d'Orléans, Orléans, France

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Dominique Bagnard, **email:** bagnard@unistra.fr

Keywords: *plexin, anti-cancer drug, angiogenesis, biomarker, glioblastoma*

Received: July 11, 2016

Accepted: July 21, 2016

Published: August 05, 2016

ABSTRACT

The neuropilin-plexin receptor complex regulates tumor cell migration and proliferation and thus is an interesting therapeutic target. High expression of neuropilin-1 is indeed associated with a bad prognosis in glioma patients. Q-RTPCR and tissue-array analyses showed here that Plexin-A1 is highly expressed in glioblastoma and that the highest level of expression correlates with the worse survival of patients. We next identified a developmental and tumor-associated pro-angiogenic role of Plexin-A1. Hence, by using molecular simulations and a two-hybrid like assay in parallel with biochemical and cellular assays we developed a specific Plexin-A1 peptidic antagonist disrupting transmembrane domain-mediated oligomerization of the receptor and subsequent signaling and functional activity. We found that this peptide exhibits anti-tumor activity *in vivo* on different human glioblastoma models including glioma cancer stem cells. Thus, screening Plexin-A1 expression and targeting Plexin-A1 in glioblastoma patients exhibit diagnostic and therapeutic value.

INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM) is a devastating disease with poor prognosis [1]. Highly infiltrative and vascularized, these tumors are composed of multi-clonal cell types with various migratory and proliferative properties, and are genetically very heterogeneous. This obvious cellular heterogeneity largely accounts for the observed resistance to all available therapeutic strategies including, surgery, radiotherapy and chemotherapy [2]. Significant

recent progress in targeted therapy comprises blocking various receptor tyrosine kinases (RTK) [3] or inhibiting angiogenesis [4]. However, the clinical outcome remains poor and the overall survival of patients is only modestly improved over last decade [5]. Hence, there is a crucial need in identifying new therapeutic targets and to develop efficient inhibitors of these targets preferably avoiding side effects. We had taken advantage of one important requirement for signal transduction of RTK and other membrane receptors which is dimerization

or oligomerization. We focused on the transmembrane domain of single-pass transmembrane proteins. The function of this domain contributes mainly to regulation of signal transduction rather than membrane anchoring [6]. Transmembrane domain interactions (TMD) have been described for many RTK including the ErbB family [7] and other cell surface receptors such as integrins [8], the amyloid precursor protein APP [9] or the T-cell receptor [10]. Thus, targeting TMD interactions represents a unique novel alternative strategy. Indeed, we had recently shown that the TMD of Neuropilin-1 (NRP1) is crucial for the dimerization and oligomerization of this receptor [11] that controls a wide range of biological functions. Strikingly, a synthetic peptide mimicking the TMD of NRP1 (MTP-NRP1) acts as a potent inhibitor by antagonizing dimerization. We had shown that MTP-NRP1 impaired tumor cell migration and angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* assays thereby reducing brain tumor growth [12] thus suggesting that TMD-interfering peptides may represent a novel class of therapeutic agents [6]. Although most work had focused on homo-dimerization of TMD containing receptors, hetero-dimerization may be key to their wide signaling function. We decided to further explore the possibility of antagonizing signaling partners of NRP1 by interfering with hetero-association of NRP1 with other important cancer associated receptors.

Here, we report that Plexin-A1 (PlexA1), one of the signaling partners of NRP1 [13] is a potential novel prognostic marker for GBM patient survival. Using computer simulation and a two-hybrid system (BACTH) we further showed that NRP1/PlexA1 TMDs do interact with each other by forming trimers. We demonstrated that a synthetic transmembrane peptide mimicking the TMD of PlexA1 (MTP-PlexA1) reduced GBM cell proliferation and blocked VEGF-induced tumor cell dissemination due to disruption of NRP1/PlexA1 heterodimerisation and subsequent inhibition of the PlexA1 dependent Rho-GTPase. Employing MTP-PlexA1 in GBM cancer models revealed an anti-angiogenic activity largely accounting for its antitumor activity. Overall, this study identifies PlexA1 as a novel potential biomarker of GBM as well as a novel therapeutic target for which we have developed a specific potent inhibitor

RESULTS

PlexA1 is a prognostic marker of GBM

We first determined the expression of PlexA1 in our collection of 17 GBM RNA samples using Q-RT-PCR. This revealed a systematic overexpression of PlexA1 ranging from 1.6- to 40-fold when compared to grade II astrocytoma (Figure 1A). To further explore the expression profile of PlexA1 we performed a tissue micro-array (US Biomax) on a total of 295 biopsies of patients with glioma (Figure 1B). Normal brain tissue served as positive

control and negative control was performed by omitting primary antibody (Figure 1C). Quantitative analysis revealed a correlation between glioma grade and the level of PlexA1 expression. Grade II and grade III astrocytoma showed increased levels of PlexA1 being intermediate to grade I and IV (Figure 1D). To examine whether the high expression of PlexA1 in GBM may have a prognostic value we performed data mining of the Rembrandt repository collection [20] (Supplementary Figure S1). Our analysis of 385 annotated gliomas revealed that patients expressing the highest level of PlexA1 (above the median expression of PlexA1) had a reduced probability of survival (Median survival = 510 days) when compared to patients expressing lowest level of PlexA1 (below the median expression of PlexA1, median survival 689 days, $p = 0.0018$, log rank test). This large scale analysis confirmed the results obtained with the tissue array. Strikingly, when restricting the analysis to the group of GBM (grade IV) patients only ($n = 181$), the correlation between the high level of PlexA1 and a reduced survival was still significant. Median survival was 369 days for patients with expression above median while it reached 474.5 days for patients whose expression of PlexA1 was below the median ($p = 0.0225$, log rank test). Further analysis taking into account age or gender did not reveal additional information (data not shown). However, we were able to confirm this correlation of high expression of PlexA1 to poorest survival in an independent data set, the TCGA repository collection. In this collection of 499 GBM the median survival was 466 days for patients with the lowest PlexA1 (below the median expression) and 370 days for those with highest expression (above the median expression, $p = 0.005$, log-rank test, Supplementary Figure S1D).

Molecular simulations analyzing PlexA1 and NRP1 TMD interactions

Previous results discovered using coarse grain simulation in a DOPC (Dioleoylphosphatidylcholine) membrane bilayer model that NRP1 and PlexA1 TM domains produce homo- and hetero-dimers [21] which had been confirmed in a biochemical assays [22]. Here, we extended this analysis by simulating multiple interactions between NRP1 and PlexA1 TM domains. The time required for the formation of the TMD1 NRP1-TMD2 NRP1 homodimer is not exceeding 5 μ s (Figure 2A top, simulation 1). The two TM domains associated in right handed interactions with a crossing angle of -32° on average. The contact map (Figure 2A) showed symmetric and well-defined interacting motif M12xxxG16xxxG20 with closest distances around 0.5 nm. One μ s later TMD3 PlexA1 approached TMD1 NRP1-TMD2 NRP1 homodimer to form a stable trimer until the end of the simulation (18 μ s) (Figure 2B and 2C top). The crossing angles were $+33^\circ$ and $+4^\circ$ on average for the heterodimers TMD2 NRP1-TMD3 PlexA1 and

TMD1 NRP1-TMD3 PlexA1 respectively. The TMD2 NRP1-TMD3 PlexA1 contact map exhibited the key interfacial residues A11 and A14 for TMD2 NRP1 and G9 for TMD3 PlexA1 (closest distances around 0.5 nm) (Figure 2B bottom). Milder contacts, with closest distances around 0.7 nm, were observed between TMD1 NRP1 (V22 and V26) and TMD3 PlexA1 (V20 and A23) (Figure 2C bottom). A representative conformation

of this trimer is shown in Supplementary Figure S3A. When simulating the association of TMD1 NRP1-TMD2 PlexA1-TMD3 PlexA1 interaction (simulation 2) we very quickly (about 1 μ s) observed the formation of a TMD1 NRP1-TMD2 PlexA1 heterodimer (Figure 2D top). The two TMD associated in right handed interactions with a crossing angle of -33° on average. Beyond 26 μ s the TMD3 PlexA1 monomer diffused within the membrane

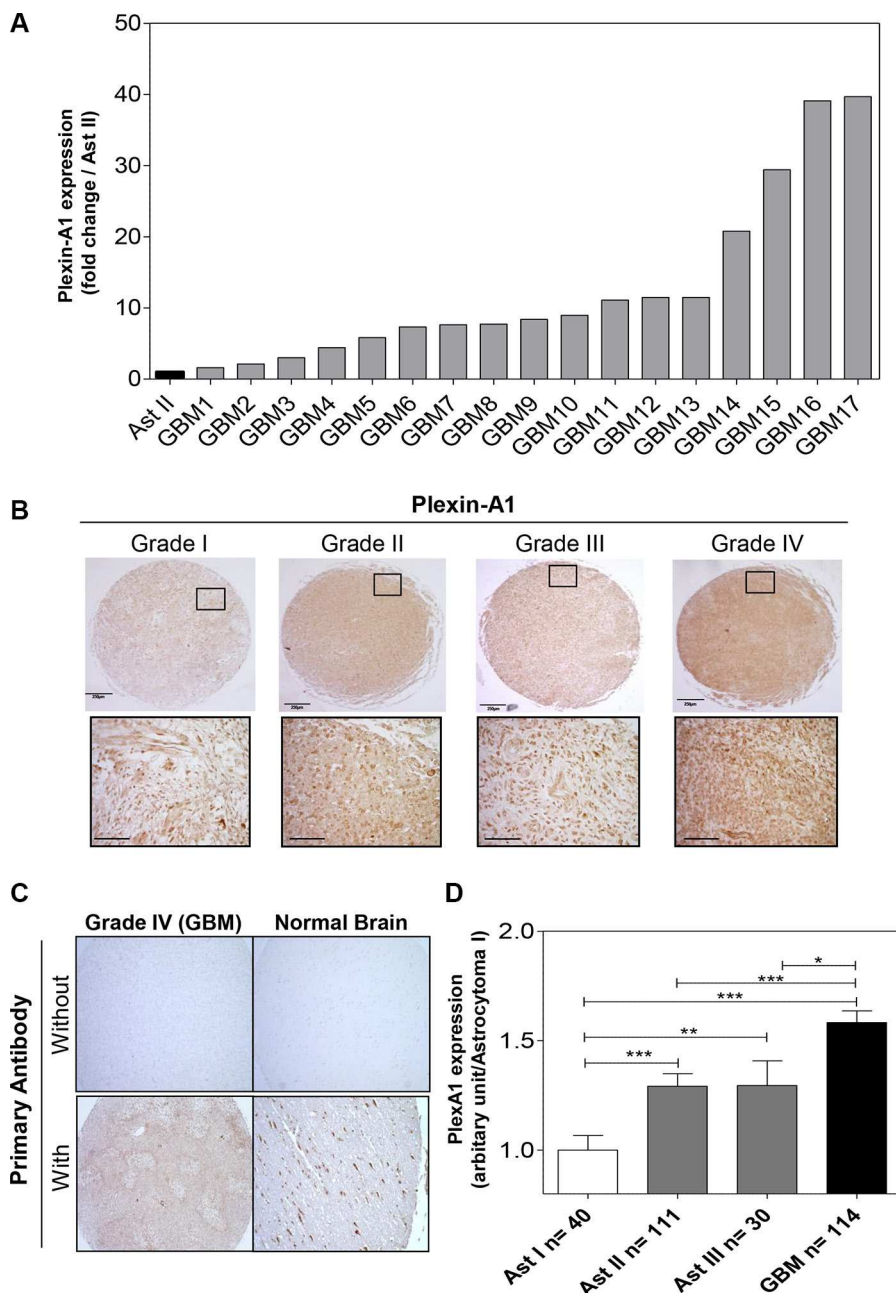


Figure 1: PlexA1 expression correlates with glioma severity. (A) Q-RTPCR analysis of PlexA1 expression in 17 GBM biopsies compared to a low grade astrocytoma (grade II). (B) Tissue array analysis. Insets show higher magnification of each picture (scale bar: 40 μ m). (C) Quality control experiments verifying the specificity of the signal in a GBM and a normal brain sample with (positive control) or without primary antibody (negative control). (D) Quantification of PlexA1 expression level according to the grade of the tumor, Ast I = Astrocytoma grade I, Ast II = Astrocytoma grade II, Astrocytoma grade III, GBM = Glioblastoma.

and then joined the TMD1 NRP1-TMD2 PlexA1 heterodimer to form a stable trimer until the end of the simulation (40 μ s) (Figure 2E and 2F top). The TMD1 NRP1-TMD3 PlexA1 heterodimer and TMD2 PlexA1-TMD3 PlexA1 homodimer associated in right handed interactions with crossing angles equal to -36° and -45° respectively. The contact maps exhibited the interacting motif M12xxxG16xxxG20 for TMD1 NRP1 and the key residues G11, G15 and L19 for TMD2 PlexA1 and TMD3 PlexA1. A representative conformation of this

trimer is shown in Supplementary Figure S3B. Hence, a longer molecular dynamic simulation implicating 3 NRP1 TMD and 3 PlexA1 TMD (simulation 3) showed that interactions were highly dynamic and allowed transitions from hetero-dimers to trimeric complexes eventually interacting with each other (Figure 2G). Thus, the CG-MD simulations suggested that adding a synthetic peptide mimicking the TMD of PlexA1 could compete with naturally occurring TMD interactions thereby leading to signal transduction alteration as previously described [11].

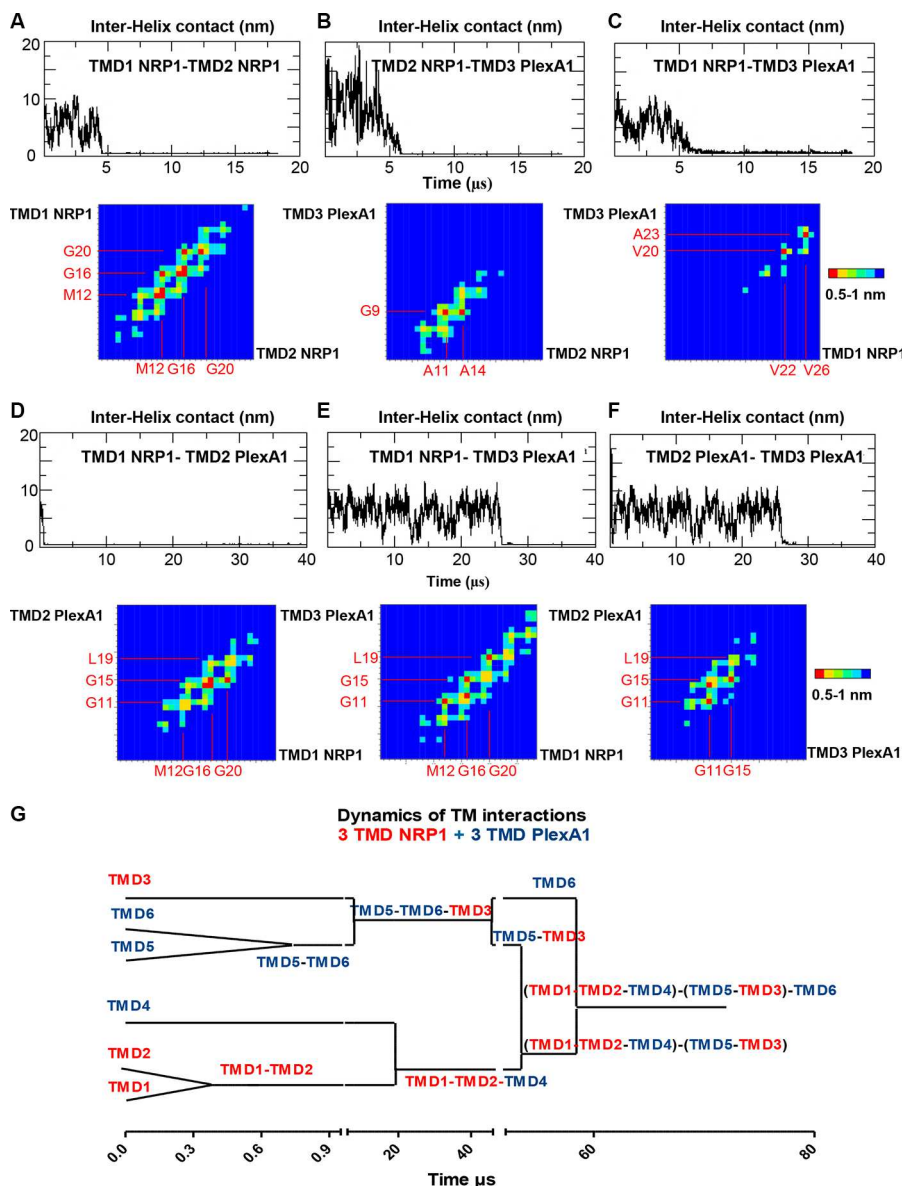


Figure 2: Dynamic of PlexA1 TMD interactions. The graphs represent the inter helix distance between two monomers as a function of time. Contact maps exhibit the residue pairs (key interfacing residues) having the smallest distances between two helices backbones. The red squares correspond to the closest distances $0.5 \text{ nm} < d < 0.6 \text{ nm}$ and the blue squares correspond to the longest distances ($d > 1 \text{ nm}$). The yellow, green and light blue squares correspond to intermediate distances $0.6 < d < 0.7, 0.8, 0.9 \text{ nm}$. (A–F) CG simulation including different compositions of NRP1 and PlexA1 TMDs. (G) Dynamics of the interactions between 3 NRP1 TMDs and 3 PlexA1 TMDs inserted in DOPC bilayer along a 72 μ s simulation.

PlexA1 TMD exhibit specific interactions

To further explore the TMD interactions of PlexA1 we used a bacterial two-hybrid system for a more systematic analysis of TMD interactions [22]. TMD sequences of PlexA1 and various potential interacting partners including NRP1 and all other members of the Plexin-A family were co-expressed in the bacteria to define the hierarchy of the interactions. This interaction study confirmed computer simulations as demonstrated by a significant interaction between NRP1 and PlexA1 TMD (Figure 3A). The systematic analysis confirmed the homo-dimerization capacity of PlexA1 and also revealed positive interactions with the TMD of Plexin-A4 but weaker interactions with Plexin-A2 and Plexin-A3. The use of additional constructions encoding the TMD of Plexin-B1, cMET, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3,

GPA, HER2 or Integrin Beta-1 showed no significant interaction with PlexA1 TMD while all of these receptors contain GxxxG-like motifs thereby demonstrating the high specificity of the interacting profile of PlexA1 TMD (Figure 3B).

A surface plasmon resonance (SPR, Biacore) analysis was also conducted with a synthetic biotinylated PlexA1 peptide immobilized on the chip. This allowed us to confirm some of the results obtained by BACTH because the PlexA1 TMD mimetic peptide significantly interacted with NRP1 (chosen as a positive interaction according to the BACTH assay) but not with VEGFR-2 (chosen as a negative interaction from the BACTH results) (Figure 3C–3D). Due to the high hydrophobic nature and difficulty to produce TMD peptides we only performed this experiment with TMD peptides for which we had experience of successful synthesis.

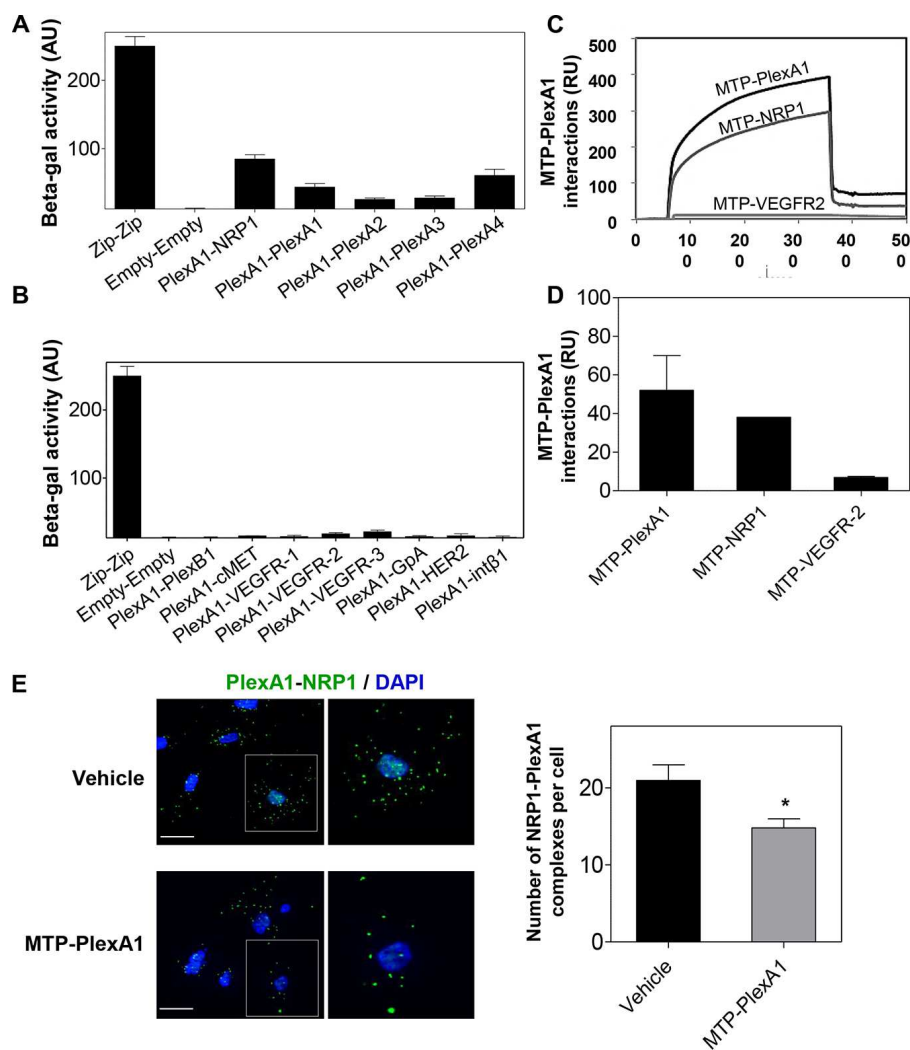


Figure 3: Specificity of the PlexA1 TMD interactions. (A, B) BACTH assay demonstrating the positive or negative homo- or hetero dimerization of PlexA1 TMD with the TMD of putative co-receptors. “Zip sequence” is the positive control of dimerization and “Empty” is the negative control of this bacterial system. (C, D) SPR assay (Biacore) to quantify MTP-PlexA1 interactions with PLexA1, NRP1 and VEGFR2 TMDs. (E) Proximity ligation assay showing that MTP-PlexA1 (10^{-7} M) decreases the number of PLexA1-NRP1 interactions (green dots) in U373MG cells (scale bar = 20 μ m).

MTP-PlexA1 disrupts dimerization of PlexA1 with its co-receptors

To demonstrate that MTP-PlexA1 is able to alter receptor complex formation we performed an *in situ* proximity ligation assay (Duo-link system, Sigma-Aldrich) [23]. As seen in Figure 3E, we observed numerous NRP1/PlexA1 complexes at the cell surface (U373MG cells) in control conditions (vehicle treated cells). However, the addition of MTP-PlexA1 induced a 29.4% reduction of NRP1/PlexA1 complexes. Additional specificity controls were performed using a mutated version of MTP-PlexA1

(in which 3 glycines of the GxxxGxxxG motif were replaced by 3 valines or MTP-Neu, an anti-breast cancer peptide known to not interact with PlexA1) as described in Supplementary Figure S2. Moreover, we found that SemA3A-induced co-immunoprecipitation of NRP1 or Plexin-A4 with PlexA1 was significantly reduced (–24.6% for NRP1 and –35.5% for PlexA4) in the presence of MTP-PlexA1 (Figure 4A). Similar results were obtained when cells were exposed to VEGF (39.4% NRP1 and 35.4% PlexA4, Figure 4B). Altogether these results demonstrate that MTP-PlexA1 is able to reduce oligomerization of PlexA1 in resting conditions or in response to SemA3A or VEGF ligands.

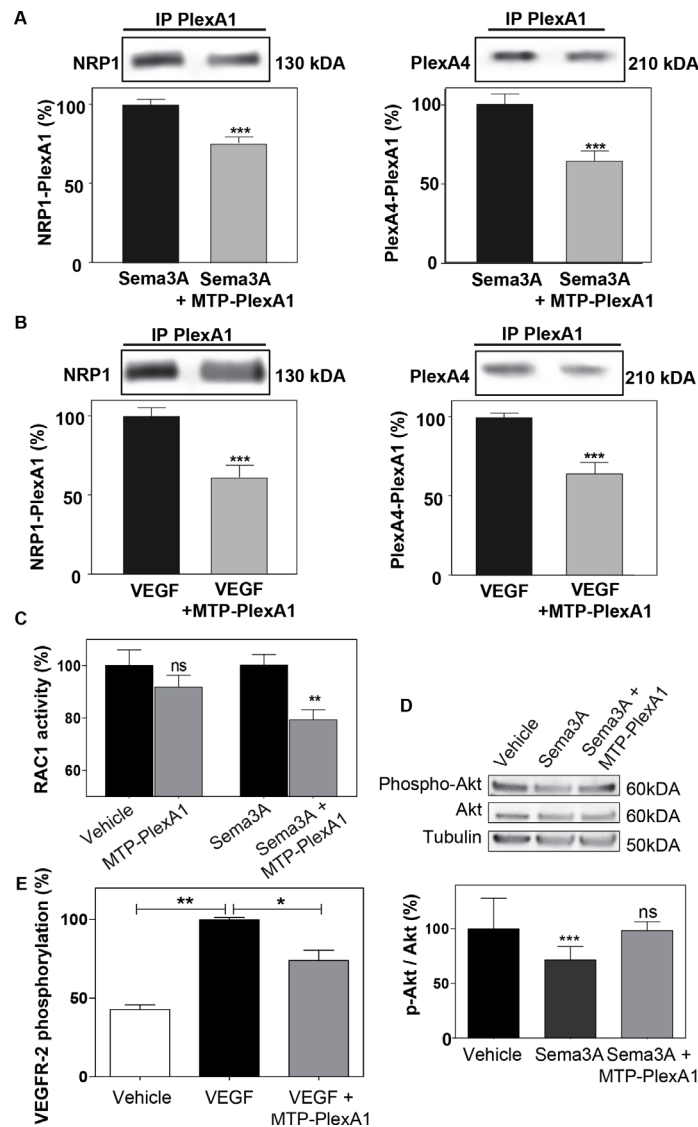


Figure 4: MTP-PlexA1 inhibits PlexA1 signaling. (A) Representative immunoblotting images revealing the amount of NRP1 and PlexA4 co-immunoprecipitated with PlexA1 in U373MG cells stimulated with SemA3A (100 ng/ml) or SemA3A + MTP-PlexA1 (10^{-7} M) (A) or in cells stimulated with VEGF (100 ng/ml) or VEGF + MTP-PlexA1 (10^{-7} M) (B). (C) Rac-1 activation assay in resting condition and after SemA3A-induced Rac-1 activation in U373 MG cells. (D) Western blot analysis of phosphorylated Akt, total Akt and tubulin in U373MG cells treated with the vehicle (LDS 72 μ M), SemA3A (100 ng/ml) or SemA3A + MTP-PlexA1 (10^{-7} M). The lower panel is showing the quantification of the p-Akt/Akt ratio in the different conditions. (E) MTP-PlexA1 decreases VEGFR-2 phosphorylation induced by VEGF (100 ng/ml) in HUVEC cells.

MTP-PlexA1 blocks the signaling capacity of PlexA1

PlexA1 is a Rho-GTPase activating protein. Consistently, it has been shown that in response to Semaphorin 3A, the Rho-GTPase Rac1 is activated and sequestered at the plasma membrane [24]. Here, using an ELISA-based assay we were able to show that MTP-PlexA1 significantly inhibited Semaphorin 3A-induced Rac1 activity while not affecting this Rho-GTPase activity in the absence of ligand (Figure 4C). Moreover, it has been shown that Semaphorin 3A inhibits Akt phosphorylation through binding of Rnd1 to PlexA1. Our data show that Semaphorin 3A-induced inhibition of Akt phosphorylation (–33%, Figure 4D) is blocked by the addition of MTP-PlexA1. Hence, a previous study suggested a pro-angiogenic effect of PlexA1 [25]. Indeed, when measuring the phosphorylation of VEGFR-2 using an ELISA assay we also found that MTP-PlexA1 significantly reduced VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2 (–26%, Figure 4E). From these experiments we concluded that MTP-PlexA1 is able to antagonize major signaling pathways of PlexA1 receptor.

PlexA1 exhibits a pro-angiogenic activity that can be blocked by MTP-PlexA1

We observed PlexA1 positive blood vessels in the tissue array of GBM samples (Figure 5A). Interestingly, blood vessels in control normal brain tissue were not expressing PlexA1. Additional experiments performed in the mouse brain showed that only developing embryonic but not mature adult blood vessels expressed PlexA1 (see Supplementary Figure S4). These data suggested a role of PlexA1 during developmental and pathological angiogenesis. To address this possibility we first used a transgenic zebra-fish model *tg(kdrl:eGFP)* highlighting the endothelial cells. This allowed us to assess the angiogenic activities *in vivo* by analyzing formation of intersegmental vessels (ISVs) after morpholino-based knockdown of the target. Indeed, using a morpholino sequence against PlexA1 previously characterized [19] we observed a significant number of abnormal angiogenic sprouts in ISVs when compared to controls (no injection of morpholino) or mismatch PlexA1 morpholino 28 hours post fertilization (Figure 5B). This result confirmed *in vivo* the importance of PlexA1 in blood vessel development. We next performed a 3D migration assay with HMEC spheroids grown in a plasma clot and showed that VEGFA-induced cell migration was abolished when adding the PlexA1 inhibitory peptide (Figure 5C). Moreover, using a pseudo-tube formation assay with human endothelial HUVEC cells grown on matrigel, we found that the addition of MTP-PlexA1 significantly blocked tube-like structure intersections thereby demonstrating a negative impact of the peptide

on HUVEC migration (–68%, $p = 0.0087$) (Figure 5D). Interestingly, the use of the mutated version of MTP-PlexA1 confirmed the specificity of this anti-angiogenic effect because MTP-PlexA1^{mut} was not able to reduce the number of tube-like structures (see Supplementary Figure S2B). This inhibition of VEGFA-induced HUVEC cell migration was confirmed in a live monitoring transwell assay with MTP-PlexA1 (–63%, $p = 0.0002$; X-Celligence system, ACEA Biosciences, Figure 5E). Hence, to further validate the inhibition of the PlexA1 pro-angiogenic activity in the presence of MTP-PlexA1 we also analyzed the vascular development of the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. In this assay we confirmed the expression of PlexA1 in developing blood vessels and we also showed that local deposition of MTP-PlexA1 significantly inhibited VEGFA-induced vascular growth and complexity (Figure 5F). Altogether, these results characterized the pro-angiogenic effect of PlexA1 and demonstrated that this effect can be fully antagonized with MTP-PlexA1.

MTP-PlexA1 inhibits tumor growth

To address the biological consequences of MTP-PlexA1-mediated inhibition of PlexA1 we used the U118MG-Luc glioma cell line genetically engineered to express the luciferase reporter gene. The addition of MTP-PlexA1 to U118MG-Luc cells reduced proliferation in a dose dependent manner as measured in a MTT assay (Figure 6A). Cells were then grafted subcutaneously and tumor growth was monitored every 5 days for a total period of 20 days. As seen in Figure 6B, U118MG-Luc formed large tumors continuously growing in control conditions while tumor growth was dramatically slowed down in the animals receiving the therapeutic peptide every day (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The quantitative analysis of the cumulated luminescent signal acquired all along the protocol confirmed the strong reduction of tumor development translating into a marked 75% reduction of the averaged luminescent signal at the end point (Figure 6C). The waterfall graph of best response [26] also showed that 2 out of 10 mice did not respond to the treatment. However, responses were strong for 8 out of 10 mice with some responses close to 100%, all of them being at least Partial Response (PR) (Figure 6D). In order to clarify the mechanism by which MTP-PlexA1 is exerting tumor growth inhibition we collected tumors and analyzed them histologically. When performing a proximity ligation assay on tumor tissue sections we could visualize a two-fold reduction of interactions of PlexA1 and NRP1 when mice had been treated with MTP-PlexA1 (–48.5%, $p = 0.0051$, Mann Whitney test, Figure 6E). We also found that the number of proliferative cells determined by counting PH3 positive cells on the whole surface of 5 sections per tumor was 37.3% ($p = 0.0022$, Mann Whitney test) decreased in treated animals compared to the control group (Figure 6F). Moreover, when determining the

density of blood vessels using CD31 immunostaining we found a significant 11.4% reduction ($p = 0.0436$, Mann Whitney test) of tumor-associated blood vessels in the animal group receiving MTP-PlexA1 (Figure 6G). This part of the study demonstrated that inhibition of tumor growth *in vivo* can be explained by an anti-proliferative and an anti-angiogenic effect of MTP-PlexA1 mirroring the results of the *in vitro* assays. Hence, we performed an

orthotropic grafting experiment to monitor the effect of MTP-PlexA1 on GBM tumors developing in their native microenvironment. While not strongly impacting on tumor volume (-14.5% , $p = 0.54$, Mann Whitney test) the intraperitoneal administration of MTP-PlexA1 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) every 3 days for 3 weeks induced a significant inhibition of cell proliferation (-38.3% PH3 positive cells $p = 0.0023$, Mann Whitney test, Supplementary Figure S5A–S5B)

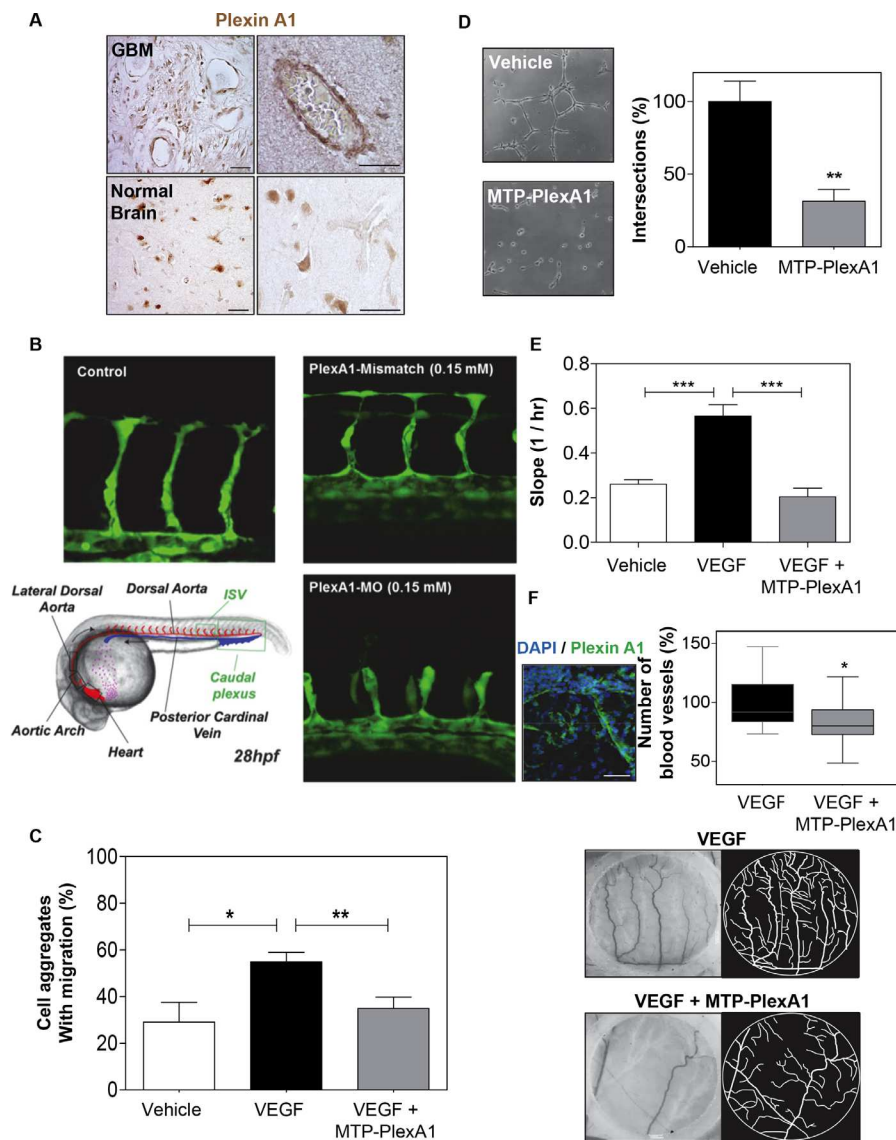


Figure 5: MTP-PlexA1 inhibits developmental and tumor-specific PlexA1 pro-angiogenic role. (A) Microphotographs illustrating the expression of PlexA1 in vascular-like structures in human glioma tissues. (Scale bar: $40 \mu\text{m}$). (B) Morpholino-based PlexA1 knockdown in Zebrafish *tg(kdrl:eGFP)* line. Representative images of control, Plexin-A1 mismatch and Pexin-A1 knockdown embryos (*plxna1MO*) are shown 28 hours post fertilization (28hpf). (C) Demonstration of the capacity of MTP-PlexA1 (10^{-7}M) to block VEGF ($100 \text{ ng}/\text{ml}$)-induced migration of HMEC cells from micro-aggregates growing in a 3D plasma clot. (D) Demonstration of MTP-PlexA1 anti angiogenic effect on HUVEC cells grown 5 h on a matrigel with 10^{-7}M of the peptide or in control (vehicle treated) condition. (E) Live-monitoring of VEGF-induced HUVEC cell migration assay using the XCelligence system (transwell assay). (F) Microphotographs illustrating the expression of PlexA1 in blood vessels of the chick chorioallontoic membrane (upper left picture). Microphotographs (middle and lower left pictures) and camera lucida drawing (middle and lower right pictures) showing representative fields of observation after 24 h incubation with VEGF ($100 \text{ ng}/\text{ml}$, +vehicle) or VEGF + MTP-PlexA1 (10^{-7}M). The number of VEGF-induced new blood vessels is shown in the graph.

and reduced angiogenesis (-14.3% $P = 0.0378$, Mann Whitney test, Supplementary Figure S5C–S5D) in tumors of MTP-PlexA1 treated mice in comparison to controls. A similar anti-tumor effect was also demonstrated in tumors upon grafting the other cell line U373MG (Supplementary Figure S6).

MTP-PlexA1 inhibits cancer stem cells-dependent tumor growth

Mounting evidence supports a crucial role of cancer stem cells in the initiation or relapse of tumors [27]. This is particularly the case for gliomas [28]. Thus, we

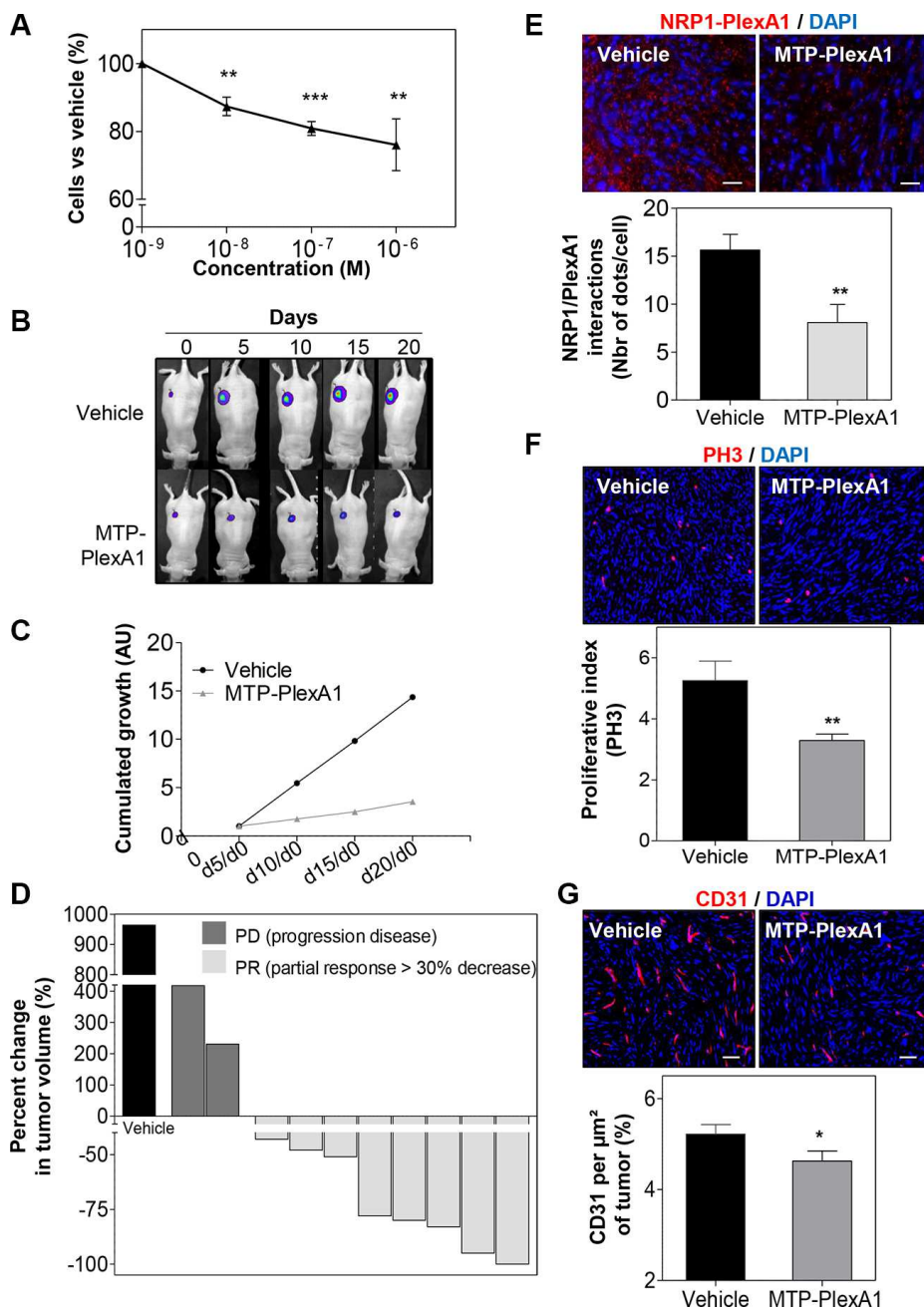


Figure 6: Demonstration of the anti-tumor effect of MTP-PlexA1. (A) MTT assay showing the dose-dependent anti-proliferative effect of MTP-PlexA1 after 24h culture of U118MG. (B) Representative photographs illustrating the kinetic of tumor growth over 20 days in the two experimental groups. (C) Cumulated growth curves of the tumors (UA: Arbitrary Unit). (D) Waterfall plot of best response representing the percent change in tumor volume of individual treated animals (grey bars, $n = 10$) compared to the average tumor volume increased determined in the control group (dark bars, $n = 10$). (E) Proximity ligation assay on tumor slices showing that MTP-PlexA1 (10^{-7} M) decreases the number of PlexA1-NRP1 interactions in U118MG cells. (F) Representative microphotographs and related quantification of PH3 positive cells in tumor slices (G) Representative microphotographs and related quantification of CD31 positive regions in tumor slices (% CD31 per μm^2 of tumors).

decided to evaluate to what extent MTP-PlexA1 would affect glioma stem cell (GSC) growth. To this end, we used the NCH644 human cell line derived from a patient biopsy [29]. As seen in Figure 7A, GSCs co-express PlexA1 and stem cell markers Nestin or Sox2. Moreover, Q-RTPCR analysis revealed that NCH644 cells exhibited strong overexpression of PlexA1 when compared to the level in normal brain (23 fold) or grade II astrocytoma (78 fold) (Figure 7B). Interestingly, MTP-PlexA1 reduced the proliferation capacity of the GSC grown in large populations as seen using a MTS assay (-10% $p < 0.0001$, Figure 7C). We next performed a sphere forming assay in which cells were plated into 96-well plates at a low density (30 cells per well) to monitor production of clones from

individual cells growing as non-adherent gliomaspheres. A minimum of 30 cells per well was required to allow sufficient sphere production (composed of at least 8 cells) in a time frame compatible with drug testing. Visual control of sphere formation on a daily basis confirmed that cellular edifices were arising from single cells and not due to cell clumping. Strikingly, the addition of MTP-PlexA1 at a concentration of 10^{-9} M decreased the ability of GSC to form sphere by 33.3% (vehicle = 100% \pm 9.7%; MTP-PlexA1 = 66.7% \pm 5.2, $p = 0.0015$, Student *T* test) thereby demonstrating the capacity of the peptide to inhibit GSC clonal expansion (Figure 7D). To address whether this inhibitory effect is sufficient to impede tumor development *in vivo* we performed a xenograft

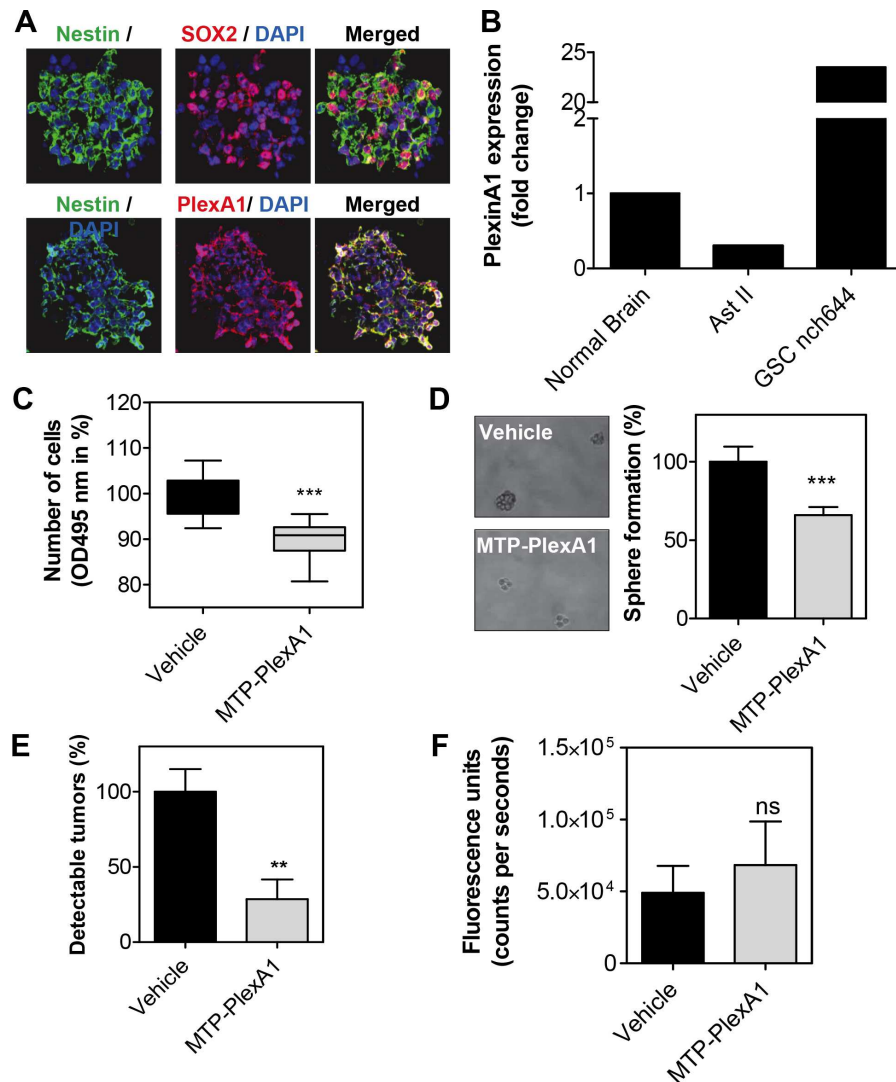


Figure 7: MTP-PlexinA1 inhibits cancer stem cells-dependent tumor growth. (A) Expression of Nestin (green), Sox2 (red) in NCH644 glioma stem cells. PlexA1 receptor (red) is expressed in Nestin positive cells (green) (scale bar 100 μ m). (B) Q-RTPCR analysis showing the expression of PlexA1 in normal brain, Astrocytoma II (Ast II) and NCH644. MTS proliferation assay (C) and sphere formation assay (D). (E) Detectable tumors (%) after *in vivo* grafting. (F) Fluorescence signal produced by tumors that were able to grow over the five days period in the vehicle treated cells (black bar) and MTP-PlexA1 treated cells (grey bar).

experiment. NCH644 GCS were grafted in the flank of nude mice in a way to obtain two bilateral tumors derived from either control cells without treatment or from cells that had been pre-incubated with MTP-PlexA1. This was done using a fluorescent version of the NCH644 cell line (mCherry-NCH644) allowing live monitoring of tumor appearance (Figure 7E). We choose to monitor tumor development over a 5 days period of time as a compromise to reach the size of detectable tumors while conserving significant inhibitory activity of MTP-PlexA1 (at least for the first three days as previously shown for equivalent membrane targeting peptides [12]). Because we failed to detect tumors when grafting the cells in the brain for sensitivity reasons, this experiment was conducted in a subcutaneous localization. Strikingly, with control cells we observed the development of 14 tumors in the 20 grafted mice (Figure 7E). However, GCS pre-incubated with the peptides only rarely gave rise to detectable tumors (4 out of 20 mice, -71.4%, $p = 0.0032$, Mann Whitney test). However, the pre-incubation of the cells with the peptide was not sufficient to block the proliferation of the cells over the 5 days period because the size of the few tumors that were able to grow was comparable to the one of the control group ($p = 0.4258$, Mann Withney test, Figure 7F).

DISCUSSION

While confirming that targeting the transmembrane domain of membrane receptors offers a credible alternative to other existing drugs targeting intra or extra cellular domains of membrane receptors, our study identifies novel functions for PlexA1 with fundamental novel and clinical relevance.

The identification of suitable biomarkers is complicated in GBM by the short range of patient survival, the great heterogeneity as well as an incomplete understanding of the physiopathology of these tumors. For example, the IDH1 mutation appears to be a prognostic marker (with better outcome) for GBM [30] and EGFR amplification is frequent in GBM (25% to 33%, [31]). The MGMT methylation is also considered as a prognostic tool and a predictive marker of drug efficacy since it is correlated with a better response to alkylating agents such as temozolomide [32]. Here, we found that the expression of PlexA1 correlated with the grade of glioma defining three groups with low (grade I), medium (Grade II/III) and high PlexA1 expression in high grade glioma (Grade IV, glioblastoma). The prognostic value of PlexA1 has already been described for patients with pancreatic tumors [33]. Our results now suggest that PlexA1 expression level may also be considered as a potential diagnostic and prognostic marker in glioblastoma. In the present study, a striking feature of PlexA1 expression was the staining of tumor associated blood vessels in patient biopsies similarly to gastric cancer where PlexA1 is associated with microvessel density [34]. Intriguingly,

we failed to detect PlexA1 in blood vessels in human normal brain or in adult mouse brain. The expression of PlexA1 in blood vessels was restricted to developmental and tumor angiogenesis. Thus, because angiogenesis is a marker of cancer severity [35] and more precisely of glioma malignancy [36], the prognostic value of PlexA1 may be the consequence of this expression in tumor-associated blood vessels. In the present study both *in vitro* and *in vivo* assays showed a clear pro-angiogenic role of PlexA1. This is consistent with previous work that showed inhibition of tube formation by HUVEC cells upon knocked-down of PlexA1 [25]. Because no study reports the direct binding of VEGF to PlexA1, PlexA1-mediated endothelial cell migration and blood vessel formation requires the involvement of VEGF binding partners and/or VEGFR modulators. The results of our co-immunoprecipitation experiment showed in the presence of MTP-PlexinA1 a reduction of PlexinA1-NRP1 and PlexinA1-PlexinA4 interaction, two receptors involved in glioma-associated tumor angiogenesis [25]. We however cannot exclude that additional pro-angiogenic ligands such as PDGF, FGF, TGF- β 1, that have been shown to be linked to NRP1 [37–39], may also recruit PlexA1 directly or indirectly through the formation of specific receptor complexes. Coarse grain simulations revealed the dynamic association of NRP1 and PlexA1 TMDs being capable of homodimerization, heterodimerization, oligomerization and/or transitions from one status to the other. This highly dynamic behavior is probably the source of a wide range of interaction capabilities of PlexA1. The role of TMD in the association and stabilization of membrane anchored receptor is becoming well-described. This is demonstrated for several families of receptors including TLR [10], integrins [8] or tyrosine kinase [40]. Very recently, it has been shown that the activation of EGFR requires an N-terminal interaction between the transmembrane helices [41, 42]. These studies clearly showed that both TMD and juxtamembrane domain influence extracellular domain of EGFR receptor. Thus, besides the importance of extracellular domain interactions in regulating ligand binding and receptor association, TMD should now be also considered as crucial regulators of receptor activity. The contact maps we created from simulations revealed the existence of multiple potential interfaces with unexpected amino acids (such as the G11xxxG15xxxL19) favoring the different types of interactions between NRP1 and PlexA1 with adapted crossing angles. PlexA1 TMD contains long series of 6 glycines (G9, G11–G15) generating two GxxxG like motifs being on different faces of the helix therefore creating at least two opposite surfaces for interactions. Related TMD interactions are very specific because PlexB1, c-MET, VEGFR-1,-2,-3, HER-2, Integrin- β 1 TMD exhibited no significant interaction with PlexA1 TMD. Thus, the existence of a GxxxG motif is not sufficient to trigger an interaction. Rather, the whole sequence is defining the specificity of interactions. Hence,

it remains to be determined the exact fraction of peptide reaching the tumors (heterotopic or brain orthotopic tumors) to define the optimal dosage of the peptide. Moreover, combination therapies with standard of care strategies open novel opportunities. The most striking result was obtained when using the patient derived cancer stem cell line NCH644 [29]. Besides the high level of PlexA1 expression in glioma stem cells, we also found that MTP-PlexA1 inhibited sphere formation and proliferation. This is indicating that blocking PlexA1 directly inhibited the stem cell renewal capability in a range translating into a marked inhibition of tumor production *in vivo*.

In conclusion, we had identified PlexA1 as a diagnostic and prognostic marker of GBM. We also described the developmental or tumor associated pro-angiogenic activity of this receptor that also promotes tumor cell proliferation and migration. Furthermore we demonstrated that the transmembrane domain of this receptor regulates PlexA1 oligomerization and can be antagonized by a peptide mimicking the native sequence. Hence, this peptide appears as a good drug candidate to interfere with cancer stem cells and angiogenesis thus slowing down GBM growth.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

U373MG (08061901) and U118MG are human GBM cell lines obtained from the ECACC and the ATCC respectively. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) provided by PromoCell (C-12200) and HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell-1) provided by Dr Ellen van Obberghen-Schilling (Institute of Biology Valrose, Nice). Details of culture are presented in supplementary method section.

Tissue array and glioblastoma biopsies

Slides of human brain gliomas tissue arrays were obtained from US Biomax (BS17016a/GL2083a/GL806b/GL803a/CNS801). The detailed immunocytochemical procedure is provided in supplementary method section. Samples from patients diagnosed with GBM were provided by the Neurosurgery department of Hautepierre hospital and collected by the Centre de Ressources Biologiques (CRB). This collection was approved by the French Ministry of Health and received authorization number DC-2009-1016. All samples were anonymized for research. Total RNA was extracted after cell dissociation of human GBM surgical specimens immediately after resection. RNAs of grade II Astrocytoma were purchased from Clinisciences (CR562205). Details of the Q-RT-PCR analysis are provided in supplementary method section.

Modeling of TM interaction and MTP-PlexA1

Coarse-grained molecular dynamics (CG-MD) simulations were used to investigate the dynamics of the association of several NRP1 and PLXA1 TM domains when embedded in a DOPC (1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) lipid bilayer. The GROMACS software package (version 4.5.4) [14, 15] was used. The TM peptides, the lipids and the water CG particles were described with the MARTINI force-field version 2.1 [16–18]. A detailed procedure of the system setup and analysis is provided in supplementary method section.

Angiogenesis in the zebra fish

For knockdown of PlexA1 in the zebra fish we used morpholino oligonucleotides described by [19]. MO (5'-GCCACATATCTGCACTGGTCCTTGA-3') was injected at the one-cell stage. Animals (Tg(flk1:egfp)) were incubated at 28.5°C for 5 hours before treatment with 1-phenyl-2-thiourea (PTU) to prevent pigment formation. Zebrafish embryos were staged, anesthetized with 0.02% tricaine solution, and mounted in drops of 0.8% low-melting point agarose (Sigma Aldrich). They were imaged at 28 hpf using a confocal microscope: both intersegmental vessels and the caudal plexus regions were imaged.

Heterotopic xenografts

Experiments were performed according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (E67-6-482-21) and the European Directive with approval of the regional ethical committee (Reference AL/55/62/02/13). Heterotopic grafts were produced by injecting 10⁶ cells in the flank of pathogen-free NMRI nude mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Intraperitoneal administration of vehicle (LDS 72 μM) or MTP-PlexA1 treatment (10–7 M) were done every days during 20 days when the tumors reached a minimal volume of 100 mm³. For the experiment conducted with cancer stem cell line NCH644mCherry, we performed bilateral grafting of 10⁶ cells on each flank of 20 nude mice without treatment or pre-incubated for 1 hour with MTP-PlexA1 at 10–7 M. After 5 days, the fluorescence emission of developing tumors was recorded using the NightOwl system (Berthold) using appropriate excitation and emission filters (580 nm/620 nm respectively).

Chick embryonic chorio-allantoic membrane assay

The CAM assay was performed using Leghorn eggs. After 4 days incubation at 37°C, the shells were opened and the embryos were transferred to a Petri dish. The CAMs were grown for additional 4 days before deposition of silicone reservoirs in a region containing one large

vessel. Reservoirs were filled with 20 μ l VEGF165 solution (20 μ g/ml) or a combination of VEGF165 (20 μ g/ml) + MTP-PlexA1 (10⁻⁷ M). After 24 h incubation, micro-photographs were taken for quantification of vessel growth. Camera lucida drawing was systematically performed to allow better counting of blood vessels and sprouting; the entire analysis being performed in blind conditions.

Sphere formation assay

Cells were stained with an orange fluorescent dye (CMRA orange, Molecular Probe) to facilitate monitoring of individual cell and sphere counting. Cells were grown into a 96-well plate at a density of 30 cells per well containing 50 μ l of culture medium (containing MTP-PlexA1 at a concentration of 10⁻⁹ M or 0.072 μ M vehicle) during 4 days. The sphere formation rate was established by counting the number of spheres per well. Cellular edifices were considered as spheres only when composed of at least 8 cells. The sphere forming rate was calculated by dividing the number of sphere at day 4 per the real number of cells at day one in a given well.

Statistics

Statistical analyses were performed using Mann Whitney test (for sample $n < 30$), Chi square analysis (for qualitative data including proportion of phosphorylated/unphosphorylated receptors and co-immunoprecipitation experiments), Extra sum of square test (for curve trend analysis) or Log-rank test (for survival analysis) using GraphPad software (USA). *P*-values are given in the figure legends, and values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Normal distribution of the values was checked using GraphPad software (USA). A minimum of three independent experiments was performed for *in vitro* assays.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pedro Campinho and Rita Ferreira who performed morpholino experiments in Julien Vermot lab. We dedicate this work to our regretted colleagues Roseline Lesecq and Pierre Kehrlé.

CONFLICTS OF INTEREST

Editorial note: This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget

GRANT SUPPORT

This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034_Medalis and received a

financial support from French government managed by "Agence National de la Recherche" under "Programme d'investissement d'avenir", ANR Interference TM and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM/Rotary International) and ANR Interference TM project (ANR-10-BLAN-1507).

REFERENCES

1. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:120–9. doi: 10.1038/35052535
2. Bonavia R, Inda MM, Cavenee WK, Furnari FB. Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res.* 2011; 71:4055–60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0153.
3. Sliwkowski MX, Mellman I. Antibody therapeutics in cancer. *Science.* 2013; 341:1192–8. doi: 10.1126/science.1241145.
4. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat Rev Neurol.* 2009; 5:610–20. doi: 10.1038/nrneuro.2009.159.
5. Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123:3190–200. doi:10.1172/JCI70212.
6. Hubert P, Sawma P, Duneau JP, Khao J, Hénin J, Bagnard D, Sturgis J. Single-spanning transmembrane domains in cell growth and cell-cell interactions: More than meets the eye? *Cell Adh Migr.* 2010; 4:313–24. doi: 10.4161/cam.4.2.12430.
7. Cymer F, Schneider D. Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adh Migr.* 2010; 4:299–312.
8. Ulmer TS. Structural basis of transmembrane domain interactions in integrin signaling. *Cell Adh Migr.* 2010; 4:243–8.
9. Khalifa NB, Van Hees J, Tasiaux B, Huysseune S, Smith SO, Constantinescu SN, Octave JN, Kienlen-Campard P. What is the role of amyloid precursor protein dimerization? *Cell Adh Migr.* 2010; 4:268–72.
10. Manolios N, Ali M, Bender V. T-cell antigen receptor (TCR) transmembrane peptides: A new paradigm for the treatment of autoimmune diseases. *Cell Adh Migr.* 2010; 4:273–83.
11. Roth L, Nasarre C, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Crémel G, Hubert P, Bagnard D. Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol Biol Cell.* 2008; 19:646–54. doi: 10.1091/mbc.E07-06-0625.
12. Nasarre C, Roth M, Jacob L, Roth L, Koncina E, Thien A, Labourdette G, Poulet P, Hubert P, Crémel G, Roussel G, Aunis D, Bagnard D. Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth *in vivo*. *Oncogene.* 2010; 29:2381–92. doi: 10.1038/onc.2010.9.

13. Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, Püschel AW. Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech Dev.* 2000; 93:95–104.
14. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005; 26:1701–18. doi: 10.1002/jcc.20291
15. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput.* 2008; 4:435–47. doi: 10.1021/ct700301q.
16. Marrink S-J, Mark AE. Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membranes. *Biophys J.* 2004; 87:3894–900. doi: 10.1529/biophysj.104.048710.
17. Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov S, Tieleman DP, de Vries AH. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J Phys Chem B.* 2007; 111:7812–24. doi: 10.1021/jp071097f.
18. Monticelli L, Sorin EJ, Tieleman DP, Pande VS, Colombo G. Molecular simulation of multistate peptide dynamics: a comparison between microsecond timescale sampling and multiple shorter trajectories. *J Comput Chem.* 2008; 29:1740–52. doi: 10.1002/jcc.20935.
19. Ton QV, Kathryn Iovine M. Semaphorin3d mediates Cx43-dependent phenotypes during fin regeneration. *Dev Biol.* 2012; 366:195–203. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.03.020.
20. Madhavan S, Zenklusen J-C, Kotliarov Y, Sahni H, Fine HA, Buetow K. Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. *Mol Cancer Res.* 2009; 7:157–67. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0435.
21. Aci-Sèche S, Sawma P, Hubert P, Sturgis JN, Bagnard D, Jacob L, Genest M, Garnier N. Transmembrane recognition of the semaphorin co-receptors neuropilin 1 and plexin A1: coarse-grained simulations. *PLoS ONE.* 2014; 9:e97779. doi: 10.1371/journal.pone.0097779.
22. Sawma P, Roth L, Blanchard C, Bagnard D, Crémel G, Bouveret E, Duneau JP, Sturgis JN, Hubert P. Evidence for new homotypic and heterotypic interactions between transmembrane helices of proteins involved in receptor tyrosine kinase and neuropilin signaling. *J Mol Biol.* 2014; 426:4099–111. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.007.
23. Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Söderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin C-H, Landegren U, Ten Dijke P, van Dam H. Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGFβ-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene.* 2013; 32:3606–15. doi: 10.1038/onc.2012.370.
24. Turner LJ, Nicholls S, Hall A. The activity of the plexin-A1 receptor is regulated by Rac. *J Biol Chem.* 2004; 279:33199–205. doi: 10.1074/jbc.M402943200.
25. Kigel B, Rabinowicz N, Varshavsky A, Kessler O, Neufeld G. Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling. *Blood.* 2011; 118:4285–96. doi: 10.1182/blood-2011-03-341388.
26. Roberts PJ, Usary JE, Darr DB, Dillon PM, Pfefferle AD, Whittle MC, Duncan JS, Johnson SM, Combest AJ, Jin J, Zamboni WC, Johnson GL, Perou CM, et al. Combined PI3K/mTOR and MEK inhibition provides broad antitumor activity in faithful murine cancer models. *Clin Cancer Res.* 2012; 18:5290–303. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0563.
27. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell.* 2012; 10:717–28. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.007.
28. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* 2012; 488:522–6. doi: 10.1038/nature11287.
29. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE, Ahmadi R, Lohr J, Dictus C, Gdynia G, Combs SE, Goidts V, Helmke BM, et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:2715–28. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1800.
30. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.* 2009; 27:4150–4. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832.
31. Aldape KD, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB, James CD. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63:700–7.
32. Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, Hamou M-F, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352:997–1003. doi: 10.1056/NEJMoa043331.
33. Müller MW, Giese NA, Swiercz JM, Ceyhan GO, Esposito I, Hinz U, Büchler P, Giese T, Büchler MW, Offermanns S, Friess H. Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2007; 121:2421–33. doi: 10.1002/ijc.22949.
34. Zhao X, Chen L, Xu Q, Li Y. [Expression of Plexin A1 in gastric carcinoma and its relationship with tumor angiogenesis and proliferation]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi.* 2007; 10:265–8.
35. Nussenbaum F, Herman IM. Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol.* 2010; 2010:132641. doi: 10.1155/2010/132641.
36. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8:610–22. doi: 10.1038/nrn2175.
37. Ball SG, Bayley C, Shuttleworth CA, Kielty CM. Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor

- receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem J.* 2010; 427:29–40. doi: 10.1042/BJ20091512.
38. West DC, Rees CG, Duchesne L, Patey SJ, Terry CJ, Turnbull JE, Delehedde M, Heegaard CW, Allain F, Vanpouille C, Ron D, Fernig DG. Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem.* 2005; 280:13457–64. doi: 10.1074/jbc.M410924200.
39. Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol.* 2008; 84:302–10. doi: 10.1189/jlb.0208090.
40. He L, Hristova K. Physical-chemical principles underlying RTK activation, and their implications for human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1818:995–1005. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.044.
41. Arkhipov A, Shan Y, Das R, Endres NF, Eastwood MP, Wemmer DE, Kuriyan J, Shaw DE. Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell.* 2013; 152:557–69. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.030.
42. Endres NF, Das R, Smith AW, Arkhipov A, Kovacs E, Huang Y, Pelton JG, Shan Y, Shaw DE, Wemmer DE, Groves JT, Kuriyan J. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell.* 2013; 152:543–56. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.032.

Metadata of the chapter that will be visualized online

Chapter Title	Analysis of Semaphorin-Induced Growth Cone Collapse and Axon Growth Inhibition	
Copyright Year	2016	
Copyright Holder	Springer Science+Business Media, LLC	
Author	Family Name	Meyer
	Particle	
	Given Name	Lionel
	Suffix	
	Division	INSERM U1109, MN3t lab, Labex Medalis
	Organization/University	University of Strasbourg
	Address	3 Avenue Molière, Strasbourg, France
	Author	Family Name
Particle		
Given Name		Andrius
Suffix		
Division		Biophysical Research Group, Biology Department
Organization/University		Vytautas Magnus University
Address		Kaunas, Lithuania
Author		Family Name
	Particle	
	Given Name	Saulius
	Suffix	
	Division	Biophysical Research Group, Biology Department
	Organization/University	Vytautas Magnus University
	Address	Kaunas, Lithuania
	Corresponding Author	Family Name
Particle		
Given Name		Dominique
Suffix		
Division		INSERM U1109, MN3t lab, Labex Medalis

Organization/University	University of Strasbourg
Address	3 Avenue Molière, Strasbourg, France
Email	bagnard@unistra.fr

Abstract The axonal growth cone is a specialized structure enabling axon extension and proper guidance to its target by sensing the extracellular environment. A growth cone collapse assay is a popular approach designed to characterize the inhibitory effect of secreted guidance cues in vitro. However, the actin cytoskeleton of the growth cone is very sensitive to various factors like physical impact, temperature, and acidity of environment that may also induce responses resembling those of guidance signals. Herein, we provide an easy and reproducible method to analyze growth cone sensitivity to the prototypic guidance molecule family class 3 semaphorin. This protocol is intended to present a systematic approach that is easy to apply to any soluble factors with a potential to impact axon elongation.

Keywords (separated by “ - ”) Cytoskeleton - Sensory neurons - Plexin - Dorsal root ganglia - Signaling - Gradients

Analysis of Semaphorin-Induced Growth Cone Collapse and Axon Growth Inhibition 2 3

Lionel Meyer, Andrius Kaselis, Saulius Satkauskas, 4
and Dominique Bagnard 5

Abstract 6

The axonal growth cone is a specialized structure enabling axon extension and proper guidance to its target by sensing the extracellular environment. A growth cone collapse assay is a popular approach designed to characterize the inhibitory effect of secreted guidance cues *in vitro*. However, the actin cytoskeleton of the growth cone is very sensitive to various factors like physical impact, temperature, and acidity of environment that may also induce responses resembling those of guidance signals. Herein, we provide an easy and reproducible method to analyze growth cone sensitivity to the prototypic guidance molecule family class 3 semaphorin. This protocol is intended to present a systematic approach that is easy to apply to any soluble factors with a potential to impact axon elongation. 7
8
9
10
11
12
13
14

Key words Cytoskeleton, Sensory neurons, Plexin, Dorsal root ganglia, Signaling, Gradients 15

1 Introduction 16

Growth cone guidance is a critical step for nervous system wiring. 17
Several families of guidance molecules sharing common molecular 18
and functional characteristics have been described over the last 20 19
years. The expression of secreted or membrane-bound factors 20
defines permissive or inhibitory territories contributing to the for- 21
mation of axonal tracts in a very precise and ordered manner [1]. 22
The understanding of the mechanisms controlling axon growth 23
and guidance relies on previous development of several *in vitro* 24
assays requiring primary culture of neurons. While 3D assays 25
including explant growth in collagen or plasma clot matrices [2] 26
and slice overlay assays [3] are undoubtedly providing the most 27
relevant *in vivo*-like microenvironment, they suffer from long and 28
somewhat difficult technical procedures impeding systematic or 29
high-throughput analysis. Here we describe a simple protocol 30
allowing rapid evaluation of a guidance signal using dissociated 31
neuronal cells or explants grown on 2D substrates made of laminin 32

33 and poly-L-lysine mixtures. This combination of basic amino-acid
34 polymer and extracellular matrix molecule allows strong adhesion
35 and rapid axon growth for most types of neuronal cells [4, 5].
36 Because guidance molecules are bi-functional factors that promote
37 or inhibit axon growth as a function of receptor content [6],
38 through modulation of cyclic nucleotide [7] and calcium levels [8, 9]
39 and due to the existence of gradients [10], 2D assays require analy-
40 sis that integrates both axon length measurement and growth cone
41 integrity to avoid false conclusions on the inhibitory property of a
42 guidance molecule. The protocol presented here is designed to
43 characterize the impact of one member of the semaphorin family
44 [11] Sema3A on sensory neurons from dorsal root ganglia (DRG)
45 but can be easily adapted to evaluate the influence of other guid-
46 ance molecules and types of neurons.

47 2 Materials

48 2.1 Solutions 49 and Consumables

- 50 1. 100 % Ethanol.
- 51 2. Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4: Dissolve 60.6 g of Tris and
52 87.6 g of NaCl in 800 mL H₂O. Adjust pH to 7.4 with HCl
53 1 N. Complete with H₂O to 1 L.
- 54 3. Poly-L-lysine/laminin working solution (*see Note 1*): Solubilize
55 poly-L-lysine (PLL) (Sigma) in sterile ultrapure water to a final
56 concentration of 1 mg/mL. Dilute laminin (Sigma) in TBS
57 pH 7.4 to a final concentration of 1 mg/mL. For the two mol-
58 ecules, prepare 10 μ L aliquots of the stock solution and store
59 at -20°C until use. Avoid thawing/freezing cycles. To prepare
60 the recommended working solution of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PLL + 10 $\mu\text{g}/$
61 mL laminin, use a 10 μ L aliquot of each stock solution in
62 980 mL of sterile Gey's balanced salt solution (GBSS) (Gibco).
63 Keep working solution on ice (4°C).
- 64 4. Neuronal culture medium: Supplement neurobasal medium
65 (Gibco) with 4 mg/mL methyl-cellulose by overnight stirring
66 in $+4^{\circ}\text{C}$. Prepared medium should be sterilized by filtration
67 through a 0.22 μm pore size syringe filter. After filtration,
68 medium should be supplemented with 5% heat-inactivated
69 fetal bovine serum (FBS), 0.5 mM L-glutamine, 2% B27
70 (Gibco), 1% penicillin/streptomycin solution (Gibco), and
71 50 ng/mL NGF (Gibco). 20–40 mL should be prepared for a
72 typical experiment with 750 μ L for a single DRG explant dish
73 or 2 mL for a dissociated sensory neuron culture dish.
- 74 5. Dissection medium: Sterile GBSS supplemented with filter
75 sterilized 6.5% glucose.
- 76 6. Phosphate-buffered saline (PBS): Fresh PBS solution should
be prepared by adding 1 part of 10 times (10 \times) concentrated
PBS stock solution (Sigma, # P5493) and 9 parts of ultrapure

water. Sterilization should be performed by filtering solution through 0.22 μm syringe filter in sterile laminar flow hood (<i>see Note 2</i>).	77 78 79
7. 0.1% Trypsin solution: Dilute 400 μL of 2.5% trypsin stock solution (Life Technologies) in 9.6 mL of PBS.	80 81
8. 0.25% Trypsin-1 \times EDTA (Life Technologies).	82
9. Human embryonic kidney 293 cells (HEK293, ATTC).	83
10. Complete medium for HEK293 cells: MEM (Life Technologies) with 1% penicillin/streptomycin solution (Gibco), 1% of 200 mM L-glutamine (Biowest), 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Life Technologies), and 1 mg/mL of geneticin sulfate G418 (Life Technologies).	84 85 86 87 88
11. Complete medium for HEK293 cells without geneticin: MEM (Life Technologies) with 1% penicillin/streptomycin solution (Gibco), 1% of 200 mM L-glutamine (Biowest), 10% heat-inactivated FCS (Life Technologies).	89 90 91 92
12. JetPEI transfection solution (PolyPlus Transfection).	93
13. Anti-Flag M2 affinity gel (Sigma).	94
14. Plastic column XL (Agarose Bead Technologies).	95
15. Flag elution peptide: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Flag peptide (Sigma) in TBS.	96
16. 0.1 M Glycine HCl pH 3.5: Dissolve 0.75 g of glycine in 80 mL of H ₂ O. Adjust the pH to 3.5 with HCl 12 N. Adjust the volume of water to 100 mL.	97 98 99
17. Glycerol.	100
18. 0.02% Sodium azide: Diluted in TBS.	101
19. 4% Formaldehyde fixative solution: Dissolve stock solution of formaldehyde (usually 40%) in PBS; adjust the pH of formaldehyde solution to 7.4 by using 1 N NaOH and 1 N HCl.	102 103 104
20. 150 mM NaCl: Use 25 mL measuring flask to dissolve 0.219 g of cell culture-grade NaCl in 5 mL ultrapure water. When dissolved add ultrapure water up to 25 mL. Use 22 μm filter in the sterile laminar flow hood to sterilize the solution. Aliquot as necessary and store in the freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).	105 106 107 108 109
2.2 Glass Cover Slips and Plastic Dishes	
1. 100 mm Plastic Petri dishes.	110
2. 24 \times 12 mm Rectangular cover slips.	111
3. Nylon mesh filter (48 μm pore size diameter).	112
2.3 Equipment	
1. Water bath.	113
2. Laminar flow hood.	114
3. Dissection tools: Blunt-tip forceps (Fine Science tools, # 11002) and sharp-tip scissors (Fine Science tools, # 14068) for embryo extraction; two pairs of fine-tip forceps (Fine Science	115 116 117

- 118 tools, # 11231) for spinal cord with DRG extraction from
119 embryonic tissue and DRG dissection; 22.5°-angled micro
120 scalpel (Fine Science tools, # 10316).
- 121 4. Spectrophotometer.
122 5. QuantiPro BCA kit (Sigma).
123 6. Inverted light microscope with 10× or 20× objectives.
124 7. ImageJ software.
125 8. Calibration slide.
126 9. Cell counter chamber (Neubauer).

127 3 Methods

128 3.1 Preparation 129 of Substrates

All steps should be performed in sterile conditions using laminar flow cabinet.

- 130 1. Clean and degrease glass cover slips by placing 50–100 cover
131 slips in a 50 mL beaker filled with 20 mL 100% ethanol.
132 Transfer the beaker to a 90 °C water bath for 15 min.
- 133 2. Remove alcohol and let the cover slips dry at room tempera-
134 ture. Then autoclave (20 min at 121 °C and 3 bars pressure)
135 the batch of cover slips for sterilization.
- 136 3. Place the sterilized cover slips directly in a 100 mm diameter
137 Petri dish assuring that they do not contact one another.
- 138 4. Add 100 µL of poly-L-lysine/laminin working solution per
139 cover slip.
- 140 5. Place a second cover slip on the first one to make a sandwich—
141 like stack of two cover slips containing the substrate. Close the
142 dish and incubate for at least 1 h at 37 °C.
- 143 6. Open the cover slip sandwich using thin forceps and rinse each
144 cover slip with ultrapure sterile water.
- 145 7. Remove the excess of water and place individual cover slips in
146 a 60 mm diameter Petri dish (one cover slip per dish) with the
147 coated side facing upwards.
- 148 8. When culturing dissociated neurons, immediately add 2 mL of
149 neuronal culture medium on top of the cover slip in the 60 mm
150 diameter Petri dish.
- 151 9. If culturing explants, add 750 µL neuronal culture medium
152 and spread homogeneously by gentle manual circular move-
153 ments of the dish. Store at 37 °C until the end of neuronal cell
154 preparation.

155 3.2 Preparation 156 of Neuronal Cells

Dissection of embryos should be performed in a clean (preferably sterile) environment either in a horizontal laminar air cabinet or in a sterile UV-pretreated room. For dissection procedures, ice and

ice-cold media are needed at all times to improve tissue preservation. All dissection tools should be heat sterilized and cooled in dissection medium prior to dissection. 158
159
160

1. For obtaining the spinal cord with the DRG, mothers should be anesthetized using standard approaches and subjected to surgery to access the embryonic sac [12]. 161
162
163
2. Open the embryonic sac and remove the embryos using two fine-tip forceps. Immediately decapitate the embryos by using forceps at the base of the skull. Then cut the umbilical cord with forceps or by using 22.5°-angled micro scalpel. 164
165
166
167
3. Transfer decapitated embryos into ice-cold dissection medium. Use forceps to cut through the thorax along the body of the embryo to remove all the organs. 168
169
170
4. Carefully cut the vertebral column at the neck and tail levels. Open the vertebral column by cutting along the ribs and by carefully opening bones of vertebral column. Axonal projections going to the periphery from the DRG should be loosened and cut by moving tweezers along the spine in between the DRG and the periphery. Collect the spinal cord with the DRG attached and use forceps to transfer it to fresh dissection medium. 171
172
173
174
175
176
177
5. For DRG explant culture, the DRG is separated from the spinal cord by using a 22.5°-angled micro scalpel. Remove all residual axons going both directions to the spinal cord and to the periphery. Transfer the “whole” DRG to a prepared cover slip (Subheading 3.1, step 9) by using a 20 μ L micropipette with a suitable tip. Avoid pipetting/transferring excess dissection medium. 178
179
180
181
182
183
184
6. For DRG neuronal culture, transfer “whole” DRGs from Subheading 3.2, step 5, to a 1.5 mL microcentrifuge tube. The DRG is dissociated by adding 1 mL of 0.1 % trypsin solution for 20 min at 37 °C and gently mixing the solution every 5 min. Centrifuge for 5 min at 100 $\times g$ to remove supernatant and add 1 mL of fresh neuronal culture medium. Use gentle mechanical dissociation with a 100–200 μ L micropipette and then filter cell suspension through a nylon mesh filter to the new sterile microcentrifuge tube. Count live cells by using standard cell counting techniques (Neubauer chamber). Dissociated cells are then added on the prepared (Subheading 3.1, step 7) cover slips (5×10^5 cells per cover slip) and culture dish and then gently filled with 2 mL of neuronal culture medium (Subheading 3.1, step 8). 185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198

3.3 Preparation of Purified Semaphorin

Purified semaphorin 3A can be purchased from Millipore (Sema3A recombinant protein, # GF240) or prepared as follows. 199
200

1. Culture HEK293 cells in a 100 mm culture dish with 8 mL of complete medium for HEK293 cells without geneticin until cells are 70% confluent (roughly 5×10^6 cells). 201
202
203

- 204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
2. In a microcentrifuge tube, dilute ~10 µg of circular AP-Sema3A-P1b-Flag plasmid DNA [13] in 250 µL of sterile 150 mM NaCl. In another microcentrifuge tube, dilute 16–20 µL of JetPEI transfection solution into 250 µL of 150 mM NaCl. Quickly vortex (~2 s) and centrifuge both tubes. Add the JetPEI solution to the DNA solution, vortex for 10 s, quickly centrifuge, and then incubate 20 min at room temperature. Gently add 500 µL of the JetPEI/DNA mix onto the cells in one 100 mm culture dish from **step 1**.
 3. Incubate cells for 48 h in a CO₂ incubator at 37 °C.
 4. Remove culture medium of HEK cells and add 2 mL of 0.25 % trypsin–1× EDTA for 2–3 min. Neutralize trypsin by adding 2 mL of complete medium for HEK cells. Spin down the cells at 110×*g*, remove the supernatant, harvest the cells, and count them.
 5. Plate the cells at a density of 2×10⁵ in a new 100 mm dish containing 8 mL of complete medium for HEK cells (which contains geneticin G418 and allows for selection of successfully transfected cells). Plating six to eight dishes will give a sufficient volume of Sema3A-containing medium. Incubate cells in a CO₂ incubator at 37 °C.
 6. After 1 week, a stable transfected colony of cells should be obtained. Wait for another week before preparing to collect the conditioned medium. During those 2 weeks, refresh the whole medium for HEK cells (which contains G418) every 2–3 days by changing half of the growth media (*see Note 3*).
 7. After 2 weeks, passage the cells as in **step 4** and plate 10⁶ cells per 100 mm dish with complete medium for HEK cells without G418.
 8. Three to four days later, cells should reach 90 % confluence. Harvest the medium and filter it with a 0.22 µm syringe filter.
 9. Place a Plastic Column XL or equivalent on a support and rinse it twice with 5–10 mL PBS.
 10. Place anti-Flag M2 affinity gel in the Plastic Column XL. Note that the anti-Flag M2 affinity gel is stored in 50 % glycerol buffer. We recommend using an aliquot of 1 mL of M2 gel for each 50 mL of conditioned medium to purify.
 11. Wash the anti-Flag M2 affinity gel in the Plastic Column XL with large volumes of PBS (use a minimum of 15–20 mL) to allow the glycerol to drain. Wash again with three sequential column volumes of 0.1 M glycine HCl pH 3.5. Wash with an equivalent of a five gel-column volumes with PBS.
 12. Remove the gel from the column with two rounds of 10 mL PBS and by inverting the plastic column XL into a 50 mL tube. Then incubate the gel+PBS with the whole amount of conditioned

	medium for at least overnight at 4 °C with mild agitation to optimize the binding of the AP-Sema3A-P1b-Flag to the anti-Flag-coated gel (<i>see Note 4</i>).	249 250 251
13.	Working at 4 °C to limit protein degradation, pack the M2 gel and the whole medium in the empty column XL. Elute the AP-Sema3A-P1b-Flag with five-column volumes of Flag elution peptide. Collect every 500 µL fractions separately.	252 253 254 255
14.	Measure protein content of the aliquots using a spectrophotometer or BCA protein concentration determination assay of each fraction and pool those containing maximal concentration of AP-Sema3A-P1b-Flag. Adjust your storage concentration with TBS to 100 µg/mL. Store at -20 °C.	256 257 258 259 260
3.4 Growth Cone Collapse Assay		
1.	Incubate prepared DRG explants or dissociated sensory neurons on cover slips in neuronal culture medium (as described in Subheading 3.2, step 5 or 6) for 23 h in an incubator (37 °C; 5 % CO ₂ ; humidified atmosphere).	261 262 263 264
2.	Prepare Sema3A working solution in sterile conditions 1 h in advance of experimental procedures by diluting 10 µL of a 100 µg/mL Sema3A aliquot in 990 µL of neuronal culture medium at room temperature. Preheat prepared Sema3A working solution in the cell incubator (37 °C; 5 % CO ₂ ; humidified atmosphere) before use.	265 266 267 268 269 270
3.	Remove Petri dishes with DRG explants or dissociated sensory neurons on cover slips from incubator one by one, and carefully remove 75 µL of 750 µL culture medium for DRG explants (200 µL of 2 mL culture medium for dissociated sensory neurons). Replace the discarded volume of culture media with an equal volume of preheated Sema3A working solution (for a final concentration of 100 ng/mL purified Sema3A). Put the dish with neurons/explants back at 37 °C and 5 % CO ₂ humidified atmosphere incubator. Appropriate negative controls should be used at all times (<i>see Note 5</i>). Each dish should be supplemented with Sema3A in a timely manner leaving time gaps of 1 min between every dish. Keep track of the time required to perform this step for each dish.	271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283
4.	Incubate dissociated neurons or explants for 60 min (<i>see Note 6</i>) in a 37 °C; 5 % CO ₂ humidified atmosphere incubator.	284 285
5.	During incubation, prepare 4 % formaldehyde fixative solution and preheat to 37 °C in a water bath.	286 287
6.	Remove Petri dishes with neurons from the incubator in a timely manner (one at a time). Carefully aspirate culture medium and exchange it with an equal volume of preheated 4 % formaldehyde fixative solution. After 1 min, repeat this step with the next dish. Incubate every dish with 4 % formaldehyde solution at room temperature for 15 min.	288 289 290 291 292 293

- 294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
7. Carefully aspirate the 4% formaldehyde solution from each dish and exchange it with an equal volume of sterile PBS.
 8. Carefully aspirate PBS and exchange it again with an equal volume of PBS. At this point fixed DRG or neurons can be kept at +4 °C for 2–3 days until used for further procedures. Seal the Petri dishes with Parafilm to avoid evaporation.
 9. Petri dishes with fixed DRG are withdrawn from +4 °C and Parafilm seal is removed. Dish is placed under an inverted light microscope in suitable dish holder (*see Note 7*).
 10. Take photomicrographs of each DRG using 10–20× magnification objectives at four sides of the DRG. A 20× or higher magnification objective should be used for dissociated neurons to evaluate their morphology (Fig. 2) (*see Note 8*).
 11. Name your pictures as XX_Y where XX is the DRG number and Y is the number of the photomicrograph of the DRG (store the series of images for the dissociated neurons in a similar manner). Name the folders for the different conditions employed (e.g., “0 Sema3A_50 NGF”). Note all the details of the experiment in a separate text file. At this step, condition blindness should be introduced by asking a colleague to rename the folders in randomized manner. Keep track of all folder name changes.

316 **3.5 Neurite Length**
317 **Analysis**

To analyze neurite length (*see Note 9*) you need the ImageJ plug-in NeuronJ. Download NeuronJ.jar and Imagescience.jar files from <http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/> and put them to the plug-ins folder and restart ImageJ (*see Note 10*).

- 320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
1. Take a photomicrograph of a calibration slide and save the image. Alternatively use a cell counter chamber (Neubauer) to obtain a calibration grid (each side of a large cell counter square equals 1 mm).
 2. Start ImageJ and open the image of the calibration grid with known distances (from **step 1**). Note that the photo of the grid should be taken at the same magnification and resolution as the images to be analyzed.
 3. From the tool box line select the line tool “Straight” and draw a line with the ends connecting bars of the grid of known distance. This calculates how many pixels lie on the line. From the Toolbox Analyze select “Set Scale.” In the boxes of “Known distance” and “Unit of length” enter the line length (the known distance between the bars of the grid) and units. Tick “Global” box.
 4. From the command line select “Plugins” and then NeuronJ. Open an image with neurons to be analyzed. An example is presented in Fig. 1a.

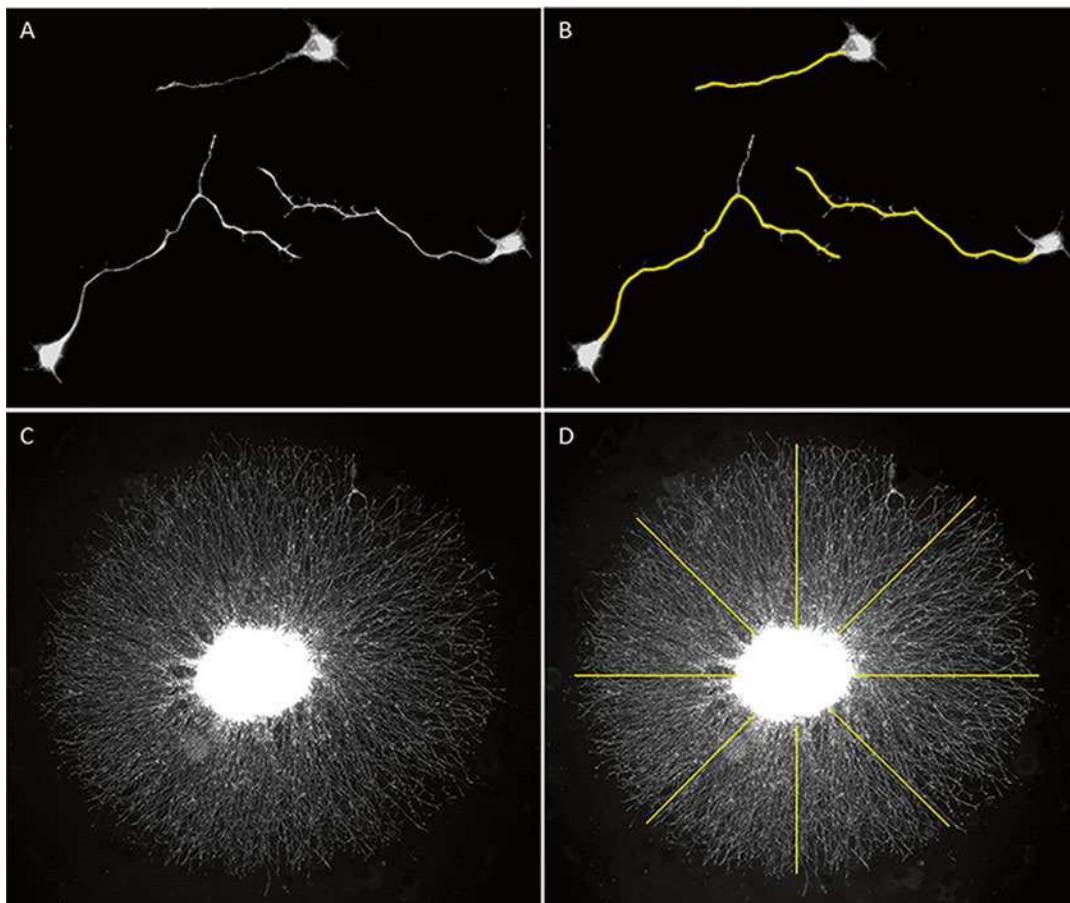


Fig. 1 Representative microphotograph showing three sensory neurons with axons (a), and the same image with traced axons using the ImageJ plug-in NeuronJ (b). When culturing DRG as explants (c), tracings should be performed in eight directions to measure the distance of the axon outgrowth (d)

5. From the tools line select tool “Add tracings” and use it to trace a line along an axon or any other outgrowth. Tracing should be as precise as possible. One mouse left button click starts tracing, and double-click ends it. If the axon is long or curved you might need to click once or several times along the axon. Repeat this with other axons. A minimum of 100 randomly selected individual neurons should be traced per experimental condition. This will result in an image similar to Fig. 1b.
6. From the tool line select “Measure tracings.” In the dialog box opened, untick all boxes except “Display tracing measurements” and “Calibrate measurements.” Press “Run.” In the “NeuronJ: Tracings” window, the measurement will appear. Open a new image and repeat all the tracing and measurement steps. Save the “NeuronJ: Tracings” window measurements and use it to analyze axon lengths of your experiment.

338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352

- 353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
7. To measure axon lengths from DRG explants (Fig. 1c, d) it is not possible to trace individual axons. Therefore instead of measuring mean axon length we measure mean distance of the axon outgrowth.
 8. Open an image with explant or explants to be analyzed. A representative image of DRG explant grown in vitro for 24 h is presented in Fig. 1c.
 9. Select line tool “Straight” and draw a line from the border of the explant to the border of an axon ending. Save the measurement by selecting “Analyze” from the command line and pressing “Measure” (the same can be done using “Ctrl+M”). Repeat these steps for axons projecting in other directions (Fig. 1d). We use eight measurement directions per explant; however if needed the distance can be measured in more directions.
 10. Save the “Results” window measurements and use it to calculate mean distance of the axon outgrowth.

370 **3.6 Analysis** 371 **of Growth Cone** 372 **Collapse** 373 374

Growth cone collapse analysis should be performed using ImageJ software Cell Counter plug-in separately for each single microphotograph (*see Note 11*). A growth cone is considered to be in a collapsed status when forming a varicosity devoid of lamellipodia and exhibiting no more than two fillopodia [14].

- 375
376
377
378
379
380
381
382
1. Count the number of collapsed growth cones for a minimum of 100 DRG axons (Fig. 2).
 2. Calculate the amount of growth cone collapse for each experimental condition.
 3. Perform statistical analysis using two-sided Students *t*-test to compare axon length of two groups (or two-way ANOVA to compare more than two groups) and Chi-square analysis for growth cone collapse.

383 **4 Notes**

- 384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
1. Alternative coating substrates: Poly-L-ornithine (PLO) is another polymer of amino acids, and gives roughly the same results as those of poly-L-lysine. A ready-to-use 0.01 % solution (Sigma, # P4957) can be directly used. Fibronectin, a widely expressed ECM adhesion molecule, is a ligand of integrins that can similarly replace the poly-L-lysine–laminin mixture. Beware that ECM molecules affect the intracellular level of calcium and may modify axon responsiveness (risk of conversion of the effect from attraction to repulsion).
 2. Fresh PBS solution can be kept in refrigerator (+4 °C) for up to 2 weeks.

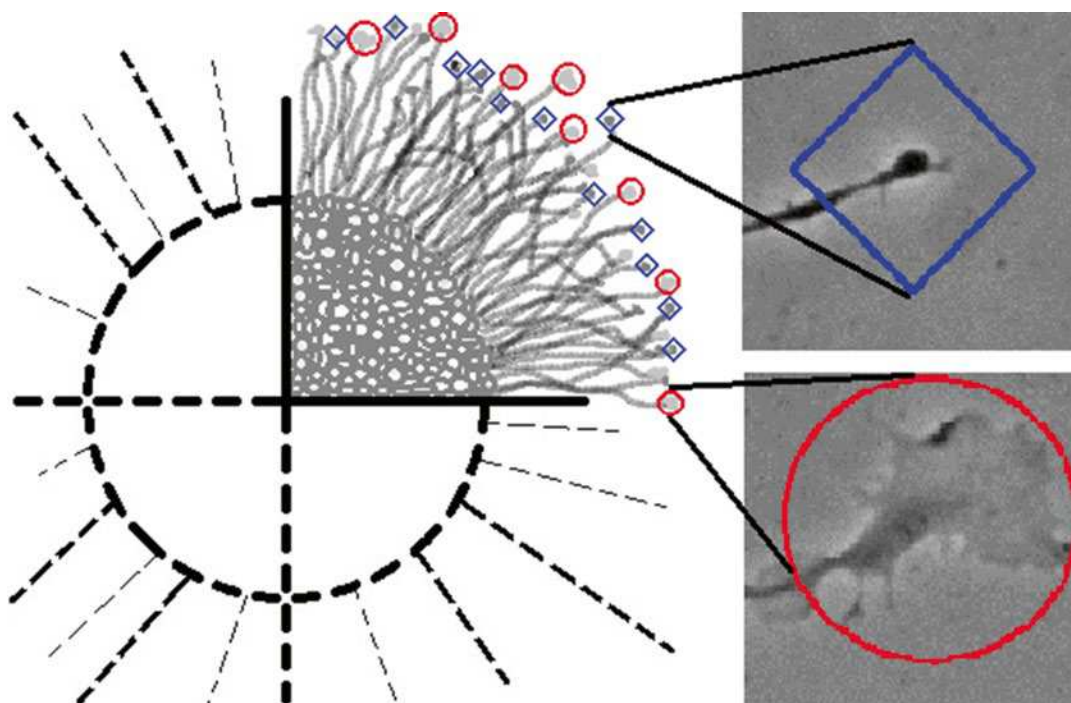


Fig. 2 Schematic representation of a quarter of DRG with examples of growth cones. In this scheme, *red circles* represent intact growth cones while *blue diamonds* represent collapsed growth cones. Only identifiable growth cones are evaluated. Growth cone collapse rate of E15 mouse embryo axons (60% in this figure) in the presence of 100 ng/mL Sema3A is calculated by dividing the number of collapsed growth cones by the number of all growth cones evaluated. The growth cone collapse rate of a single DRG is assessed by dividing all the collapsed growth cones by the evaluated growth cones in all four quarters of the DRG

3. HEK293 cell cultures should be monitored every 3–4 days for viability and possible contaminations. In case of contamination, culture should not be used any further and should be discarded. 395
396
397
398
4. Alternatively, the gel should be packed in the column and conditioned medium progressively added. In this case be sure not to let the column dry. 399
400
401
5. Control conditions should completely correspond to the ones with Sema3A. For example, since 10 μL of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ stock Sema3A solution (suspended in PBS) was used for achieving working concentrations, the same amount (10 μL) of PBS should be added to the negative control conditions. Conditioned medium from mock-transfected (empty plasmid) cells should be used as a control medium when not using purified Sema3A. 402
403
404
405
406
407
408
409
6. Growth cone collapse rate is concentration dependent [15] and complete growth cone collapse rate should be evaluated in 60 min. In our hands, 100 ng/mL Sema3A usually triggers 50–60% growth cone collapse. 410
411
412
413

- 414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
7. Fixed DRG and dissociated sensory neurons at this point can be evaluated by an inverted light microscope in phase-contrast conditions or alternatively can be stained with antibodies or chemical agents (e.g., SMI312 for axonal neurofilaments and FITC- or RITC-phalloidin for F-actin staining), thereby requiring fluorescence microscopy.
 8. While 20× magnification gives better resolution of growth cones, 10× magnification can also be used as it covers a larger area, but lacks the high-resolution images of growth cones and thus makes it difficult to analyze growth cone collapse.
 9. The inhibitory property of Sema3A is inducing reduction of axonal length and growth cone collapse. When characterizing a novel factor, always be sure to measure growth cone collapse rate in parallel to axon length as some positive guidance signal may trigger apparent reduction of axonal length when lacking a gradient [12]. In this case, the coexistence of reduced axon length and normal growth cones would strongly suggest a gradient dependent growth promotion that should be verified using a 3D assay as described elsewhere [2, 12].
 10. ImageJ can be obtained at <http://imagej.nih.gov/ij> and is a free experimental Java platform for image analysis and processing.
 11. For growth cone analysis start ImageJ; open microphotograph (File >> Open...); start cell counter plug-in (Plugins >> Analyze >> Cell counter); initialize the analysis (Initialize button); tick the “Keep Original” box; remove all but two counters by pressing “Remove” button; tick “Type 1” button and on the microphotograph screen tick every identifiable intact growth cone; tick “Type 2” button on the microphotograph screen and tick every identifiable collapsed growth cone; transfer numbers of collapsed and intact growth cones to any suitable number processing software (e.g., Microsoft Excel); markers can now be saved by pressing “Save Markers” button; close processed image and proceed with next microphotograph.

Acknowledgment

449
450
451
452
453
454

This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034 Medalis and received a financial support from French Government managed by “Agence Nationale de la Recherche” under “Programme d’investissement d’avenir” and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM/Rotary International).

References

455

- 456 1. Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123–1133
- 457
- 458
- 459 2. Satkauskas S, Muller A, Roth M et al (2010) Molecular substrates for growing neurons in culture. In: Doering LC (ed) *Protocols for neural cell culture*. Humana Press, New York, pp 313–327
- 460
- 461
- 462
- 463
- 464 3. Polleux F, Ghosh A (2002) The slice overlay assay: a versatile tool to study the influence of extracellular signals on neuronal development. *Sci STKE* 136:pl9
- 465
- 466
- 467
- 468 4. Rivas RJ, Burmeister DW, Goldberg DJ (1992) Rapid effects of laminin on the growth cone. *Neuron* 8:107–115
- 469
- 470
- 471 5. Tang D, Goldberg DJ (2000) Bundling of microtubules in the growth cone induced by laminin. *Mol Cell Neurosci* 15:303–313
- 472
- 473
- 474 6. Roth L, Koncina E, Satkauskas S et al (2009) The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci* 66:649–666
- 475
- 476
- 477
- 478 7. Piper M, van Horck F, Holt C (2007) The role of cyclic nucleotides in axon guidance. *Adv Exp Med Biol* 621:134–143
- 479
- 480
- 481 8. Petersen OH, Cancela JM (2000) Attraction or repulsion by local Ca²⁺ signals. *Curr Biol* 10:311–314
- 482
- 483
- 484 9. Gomez TM, Zheng JQ (2006) The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci* 7:115–125
- 485
- 486
10. Goodhill GJ, Baier H (1998) Axon guidance: stretching gradients to the limit. *Neural Comput* 10:521–527
- 487
- 488
- 489
11. Fujisawa H (2004) Discovery of semaphorin receptors, neuropilin and plexin, and their functions in neural development. *J Neurobiol* 59:24–33
- 490
- 491
- 492
- 493
12. Bagnard D, Lohrum M, Uziel D et al (1998) Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125:5043–5053
- 494
- 495
- 496
- 497
- 498
13. Adams RH, Lohrum M, Klostermann A et al (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J* 16:6077–6086
- 499
- 500
- 501
- 502
14. Fan J, Mansfield SG, Redmond T et al (1993) The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol* 121:867–878
- 503
- 504
- 505
- 506
15. Behar O, Mizuno K, Badminton M et al (1999) Semaphorin 3A growth cone collapse requires a sequence homologous to tarantula hanatoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13501–13505
- 507
- 508
- 509
- 510
- 511
16. Bagnard D, Vaillant C, Khuth S-T et al (2001) Semaphorin 3A—vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J Neurosci* 21:3332–3341
- 512
- 513
- 514
- 515
- 516
- 517

Current drug design to target the Semaphorins/Neuropilins/Plexins complexes

Lionel A.T. Meyer, Justine Fritz, Marie Pierdant-Mancera and Dominique Bagnard

INSERM U1109 – MN3T Lab. Fédération de Médecine Translationnelle, Labex Medalis, University of Strasbourg, France.

Corresponding author:

Dr D. Bagnard

INSERM U1109, Therapeutic Peptides lab

Pôle API, 300 Bvd S. Brant

67400 Illkirch

Tel: +33-(0)3 68 85 71 50

Email: bagnard@unistra.fr

Abstract:

The Semaphorins/Neuropilins/Plexins (SNP) complexes control a wide range of biological processes. Consistently, deregulations of these complexes are associated with many diseases. The increasing knowledge on SNP had in turn validated these molecular partners as novel therapeutic targets. Small molecules, antibodies, peptides or Semaphorins themselves have been proposed as new drugs. This review is focusing on the latest demonstrations of this potential and addresses some of the key questions that need to be addressed before translation of this opportunity into clinically relevant therapeutic approaches.

Introduction:

The first Semaphorin (at that time called collapsin) has been discovered in 1993 by the group of JA Raper ¹. This secreted protein turned out to be a strong inhibitor of axon growth by inducing rapid depolymerization of the actin cytoskeleton. This property consequently was shown to transiently destabilize the axonal growth cone thereby impeding proper axonal guidance. From this discovery, a profusion of data has been generated over the last two decades to identify and characterize the so called Semaphorin family and its pleiotropic functions. Almost all organs and tissues express combinations of Semaphorins from early developmental stages to adult in both healthy and damaged tissues. The many faces of Semaphorins ² can explain the diversity of functions they are involved in such as cell proliferation, cell migration, cell differentiation or cell death. Consequently, the dysregulation of Semaphorins expression or signaling is associated with a variety of diseases in the central nervous system (CNS), the cardio-vascular system (CV), the immune system (IS) or in cancer.

However, the main challenge when studying the Semaphorin functions is their extraordinary versatility inherent to their signaling pathways. Many Semaphorins can exhibit promoting or inhibiting effects depending on the receptor complex being recruited ³⁻⁶. Indeed, the class 3 Semaphorins (secreted molecules) binds to Neuropilins that in turn associate with co-receptors to trigger cell signaling. Neuropilin-1 (NRP1), initially identified as a cell surface receptor in the neuropilin ⁷, is the primary class 3 Semaphorins binding receptor ⁸. NRP1 lacks direct signaling activities and therefore needs to associate with co-receptors to transduce the Semaphorin signal. It has been largely described that Plexins are the main co-receptors of NRP1 to transduce class 3 Semaphorins signal while transmembrane Semaphorins can directly interact with Plexins ^{9,10}. Additionally, NRP1 and its homologue Neuropilin-2 (NRP2) not only

binds Semaphorins but is also able to bind VEGF isoforms and several other growth factors ¹¹. These interactions are evidently important to control normal and tumor associated angiogenesis ¹². Moreover, NRPs interacts with many other growth factors such as FGF, PDGF or TGF- β 1 and their cognate tyrosine kinase receptors (RTKs, ¹³. NRPs are therefore entering the complex hub of RTKs and their intricate network of signaling pathways. This already large interaction capability is finally wider because other studies report the coupling of NRPs with integrins ¹⁴ and is able to modify extracellular matrix components such as fibronectin fibrils assembly ¹⁵. Hence, besides transmembrane Semaphorins which do not seem to require NRPs to signal ⁹ most of the secreted Semaphorins are facing the difficulty to compete with several other ligands directly or indirectly involving NRPS for their own signaling pathways.

This obvious complexity is undoubtedly explaining the diversity of the Semaphorins functions. Hence, the functional versatility which is intimately linked to the signaling receptor complexes justifies asking the question whether the Semaphorin/Neuropilin/Plexin (SNP) complexes are good therapeutic targets as more and more proposed ¹⁶. Indeed, several approaches have been tested to develop inhibitors of Semaphorin receptors or actually suggest using Semaphorins as therapeutic agents. To discuss this question, this review focuses on in vivo studies having challenged drugs targeting the SNP complexes in relevant pre-clinical models of various pathologies. Indeed, the probably best way to validate SNPs as therapeutic targets is to evaluate the benefice/risk balance in preclinical settings to consolidate the strength and interest of such a large new space for drug design. An excellent review by Mishra and colleagues ¹⁷ is providing a detailed analysis of Semaphorin and NRPs contributions. Here, we focused on additional studies or novel concepts to further discuss the relevance of the SNP complexes as both therapeutic target and therapeutic agents.

Using Semaphorins as therapeutic agents

Numerous studies have shown that Semaphorins can acts as inhibitors of cell migration, cell proliferation or in some instances could induce apoptosis. This role is particularly interesting in the context of cancer because favoring such Semaphorin functions would favor cancer growth inhibition. Another good reason to focus on Semaphorins' roles during tumor development is the clear anti-angiogenic activity exhibited by class 3 semaphorins in several models ¹⁸⁻²⁰. Thus, it is tempting to use the natural properties of Semaphorins to trigger inhibition of tumor cells by stimulating them with purified or modified synthetic versions of Semaphorins. Indeed, intraocular injection of Sema3E displays anti-angiogenic activity on

developing normal vessels ²¹. While affecting also tumor associated vessels, this impact on normal vessels mediated by a direct binding of Sema 3E to Plexin D1 may represent a major risk of side effects. However, intravitreal administration of Sema3E protein selectively suppressed extraretinal vascular outgrowth without affecting the regeneration of the retinal vasculature in a model of ischemic retinopathy ²². The use of Semaphorins as therapeutic agents to treat abnormal vessel development is again strengthened by the demonstration that Sema3C inhibits pathological angiogenesis in an oxygen-induced retinopathy model in mice ²³. In these studies, recombinant proteins were locally administrated. It would be interesting to know whether systemic administrations could provide similar beneficial effects. The continuing effort devoted to analyze the therapeutic potential of Semaphorins is also fruitful in other diseases. The transmembrane Sema4B inhibits non-small cell lung cancer growth in vivo when overexpressed in the cells ²⁴. Because gene delivery-based therapies are still under debate and somehow still difficult to achieve, it remains to be shown whether administration of a soluble form of the protein would be sufficient to recapitulate the effects measured when forcing the expression of Sema4B in the cells. The same comment applies to the inhibition of glioblastoma growth in vivo when expressing Sema3D or Sema3E in tumor cells using lentivirus-based strategies ²⁵. It would be interesting to see whether local or systemic administrations of recombinant Sema3D and Sema3E are able to block glioblastoma growth, depending on their capacity to cross the blood brain barrier, although this property may not be absolutely required considering the leakiness of tumor blood vessels. Alternatively, lentivirus delivery in vivo (by direct intracerebral injection) on existing tumors should be tested because a similar strategy showed that AAV-mediated cortical expression of Sema6A favored post-ischemic recovery of animals ²⁶. This study showed that at least membrane Semaphorins can be produced at the right place, in the right cells and at the right concentration to exert therapeutic effects. This will anyway be more difficult with secreted semaphorins because depending on the cells expressing it, autocrine effects or gradient mediated-effects would eventually produce opposite results. This additional complexity is illustrated with the role of Sema3A, stimulating glioma cell dispersion when being overexpressed by the tumor cells ²⁷ while inhibiting breast tumor growth via systemic or tumor-targeted delivery ²⁸. A similar beneficial effect has also been reported for head and neck squamous cell carcinoma when producing Sema3A in the tumor by multiple local injections of Sema3A-encoding adenoviruses ²⁹. Another interesting option comes from the description of the Sema3C-dependent promotion of dopaminergic axons in view of cell therapy for Parkinson disease ³⁰. In this in vitro study, Sema3C was incorporated in a hydrogel (PuraMatrix) to ensure stable long term release in the microenvironment. The observed promotion of axon outgrowth strongly supports the idea to use such biocompatible hydrogels to deliver

Semaphorins *in vivo*. This should be done in several models including those destined to use Semaphorins as inhibitors such as in cancer.

Thus, it appears that Semaphorins can be reasonably considered as therapeutic agents pending clarification of the delivery mode. Moreover, the biodistribution profiles should be determined as a function of the administration mode. A special attention should be given to the Semaphorins that are not involved in the maintenance and integrity of adult tissues. Indeed, a recent study showed that an excess of Sema3A causes severe diabetic nephropathy³¹ and a neuronal toxicity may be induced as suggested by a study describing Sema3A-dependent axon damage and neuronal apoptosis³². Future development should also explore the way to generate modified Semaphorins leading to increased binding to their targets and better stability while being vectorized to only target abnormal tissues. Indeed, a work from the Tamagnone's Lab investigated the inhibition of tumor angiogenesis in pancreatic RT2 model with Alzet osmotic mini-pumps locally delivering an uncleavable version of Sema3E³³.

Using small molecules to inhibit Semaphorin signaling

Small molecules represent a very classical drug design approach. In the case of the SNP complexes, very few studies have however tried or succeeded with this strategy. Xanthofulvine and Vinaxanthone, are natural products being specific inhibitors of Sema3A^(34, 35; 36) with strong regenerative properties in model of spinal cord lesions³⁷. Recent work identified a synthesis procedure helping to characterize the structures of the compounds^{38,39}. This should lead to better understanding of the action mode, a prerequisite to further develop these compounds as therapeutics. Another form of Semaphorin inhibitor is shown with ligand-caging systems mainly based on the use of soluble forms of the receptor NRP1 or NRP2^(40, 41). Expression by tumor cells of a Sema3E ligand trap derived from Plexin D1 (SD1, containing the Sema domain of Plexin D1) also reduced tumor growth⁴². Following a more classical drug design approach, a multistep *in silico* / *in vitro* screening procedure recently led to the identification of a non-peptidic VEGF-A165/NRPs protein-protein interaction antagonist⁴³. From this original compound, several other antagonists derived from this first compound have been designed⁴⁴. While designed to selectively affect VEGF binding, it would be interesting to test whether such antagonists are also affecting Semaphorin binding and signaling. Any compound antagonizing both Semaphorins and VEGF ligand binding would certainly be interesting in the context of cancer. Having the whole picture would indeed clarify what is the best option for a clinical use of these compounds.

Using function blocking antibodies to inhibit Semaphorin signaling

Monoclonal antibodies are with small molecules the most important targeted therapies. Consistently, several antibodies have been generated to block Semaphorins or their receptors. The group of Y. Goshima obtained a monoclonal antibody targeting Sema3A⁴⁵. This neutralizing monoclonal antibody prevents sepsis in lipopolysaccharide-treated mice by counteracting Sema3A deleterious effects. Considering the numerous situations involving abnormal Sema3A signaling, this antibody may represent a very interesting therapeutic tool with a large spectrum of indications. The transmembrane Sema4D is also the subject of neutralizing antibody development. A first antibody was shown to markedly prevent bone loss in a model of postmenopausal osteoporosis when administered every three days for three weeks⁴⁶. Additional Sema4D blocking antibodies have been developed and characterized in various disease such as in cancer^{47,48}, in Huntington disease⁴⁹, in Experimental autoimmune encephalomyelitis⁵⁰ and in rheumatoid arthritis⁵¹. The VX15/2503 antibody is currently in clinical studies (conducted by Vaccinex Inc. in Huntington disease and non-small cell lung cancer) after successful preclinical characterization and thanks to a good tolerance profile in humans⁵². The structural analysis of the extracellular domains of NRPs provided few years ago (Appleton EMBO 2007) an interesting rationale for the design of function blocking antibodies. NRP1 is the most advanced target for antibody development. The MNRP11685-A targeting the VEGF-binding domain has been evaluated in a promising phase 1 study⁵³ followed by a phase 1B study showing unexpected side effect (high proteinuria) in combination with Bevacizumab (anti-VEGF) with or without paclitaxel⁵⁴. An interesting study recently showed that the Fab' fragment of a mouse NRP1 antibody can be used to functionalize cytotoxic drugs-containing liposomes. This turned out to be an efficient method to concentrate the drug at the tumor site. The confirmation of such results with a humanized antibody could represent an interesting therapeutic potential by strengthening the anti-tumor activity of existing drugs and potentially reducing the side effects related to widespread distribution of therapeutic compounds. Additionally, the description of an anti-NRP2 antibody⁵⁵ with strong anti-metastatic properties was appealing but was not so far elaborated further. A new anti-NRP2 antibody targeting the b1b2 domain has been characterized in vitro⁵⁶ but it needs further development to evaluate its clinical potential. The development of function blocking antibodies is not restricted to Neuropilins but is also undergoing for some Plexin members. Indeed, based on Plexin C1 involvement in acute inflammation⁵⁷, it has been proposed to be an interesting therapeutic target in this particular context. The same group obtained a function blocking antibody against Plexin-C1 and showed

in vivo that it reduced hepatic ischemia-reperfusion injury presumably by modulating the transmigration of neutrophils in a mouse model ⁵⁸. One major difficulty when targeting the SNP complexes remains the redundancy of Semaphorins and the multiplicity of the receptors which are moreover shared with several other ligands. This implies to develop smart compounds overcoming this bottleneck to produce selective but very potent compounds bypassing the competition of ligands and blocking the multiple receptors involved in the signaling.

Using antagonist peptides to target or inhibit the SNP complexes

The development of therapeutic peptides is incredibly growing fast in the pharmaceutical race ⁵⁹ insulin. If therapeutic peptides such as Insulin have undoubtedly showed their efficacy and safety ⁶⁰, the classical challenges of immunogenicity ⁶¹ or delivery ⁶² of peptides and proteins slow down the emergence of new drugs compared with small molecules. Peptides can be used to mimic ligands to antagonize receptor binding sites or can be used to mirror the ligand biological activity. Consistently a wide range of agonist or antagonist peptides can be developed by partially or totally mimicking natural sequences. Chemical modifications can also be applied to stabilize the structure and/or the stability of therapeutic peptides. In the case of SNP complexes, one of first peptide-based strategy has been proposed by Doherty and colleagues who characterized a peptide targeting the MAM domain of Neuropilin-1. Another interesting approach designed a peptide with a motif recognizing the VEGF binding domain of Neuropilin-1 ⁶³. The latest development of this approach led to the design of multifunctional nanoplateforms exhibiting strong potential for major interest for photodynamic therapy of brain tumors ⁶⁴. Cationic peptides and and peptidomimetics have also been developed to antagonize Sema3A functions presumably by interfering with Sema binding to glycoaminoglycans ⁶⁵. A peptide recognizing the VEGF binding domain of NRP1 showed interesting inhibitory properties in the context of blocked experimental arthritis ⁶⁶.

An unexpected alternative approach emerged from studies of the so far largely ignored transmembrane domain (TMD) of Neuropilin-1 ⁶⁷. Indeed, the transmembrane domain of bitopic receptors is usually considered as a membrane anchoring element without further functions. However, the TMDs play crucial role in receptor dimerization and together with juxta membrane domain they are able to control and modulate extracellular domains ligand-binding capacity or structure ^{68,69}. Several mutations in TMD are associated with severe human diseases in cancer ⁷⁰. The existence of dimerizing motives such as the GAS motives ⁷¹ is known to be the source of selective TMD interactions either for homo- or hetero-

dimerization. The TMDs of Neuropilins and Plexins are indeed now well characterized and several studies have shown the specificity of interactions ⁷². The systematic analysis of TMD / TMD interactions is progressively contributing to the demonstration of a TMD interaction code defining very precise and specific rules of receptor dimerization and heterodimerization. Consistently, peptides targeting the TMD of NRP1 act as receptor dimerization interferon leading to the blockade of related biological functions ⁶⁷. This property turned out to be an efficient strategy to fight against glioblastoma growth *in vivo* with Membrane Targeting Peptide (MTP-NRP1, ⁷³. The strength of such therapeutic peptides is their relative independency toward ligand binding and their intrinsic capability to selectively and specifically interfere concomitantly with several receptors. Strikingly, such TMD targeting peptides can exhibit biological effects in preclinical *in vivo* models with 1 µg / kg (or 10 µg / kg for peptides targeting Neu / ErbB2 receptor, ⁷⁴ doses delivered every three days. Such treatments are well tolerated even when administrated for several weeks ⁷⁵. Another exciting feature is the recent demonstration of the anti-metastatic effect of MTP-NRP1 in a triple negative breast cancer preclinical model ⁷⁵. In this study, it was also shown that MTP-NRP1 could exert a protective effect by reducing metastases growth if administrated before grafting of metastasizing cells. This result suggests the possibility to design preventive treatments attacking the metastasis process in its earliest stage, upon detection of a primary tumor with high risk of metastasis.

Conclusion:

The SNP complexes obviously define an exquisite molecular space for drug design. The way to produce drugs tackling this space is however unclear because of the functional versatility of the SNP complexes. Promoting the natural inhibitory effects of Semaphorins in one condition may have deleterious effects in another organ while blocking the Semaphorin receptors may counteract positive effects of Semaphorins in certain disease contexts. The existence of gradients of soluble Semaphorins and the highly diverse and dynamic composition of the receptors recruited to signal are creating additional complexity. A detailed analysis of the biodistribution and safety profiles is required for all types of drugs that are being currently under investigation is needed. The next step will be to study the combination of SNP targeting drugs with other drugs particularly in the context of cancer to address the question of compensatory mechanisms and acquired resistance. Hence, the dual targeting and inhibitory properties of SNP drugs could be better explored by designing smart compounds such as nanoparticles to ensure carrier-mediated specific delivery to damaged tissues while preserving normal ones. If the last decade was asking the question

whether SNP complexes were potential therapeutic targets, the next decade will be the one to clarify what is/are the best drug design strategy (ies).

Grant support: This work has been published within the LABEX ANR-10-LABX-0034_Medalis and received a financial support from French government managed by "Agence National de la Recherche" under "Programme d'investissement d'avenir".

Bibliographie :

1. Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75:217–27.
2. Roth L, Koncina E, Satkauskas S, Crémel G, Aunis D, Bagnard D. The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2009; 66:649–66.
3. Bagnard D, Lohrum M, Uziel D, Püschel AW, Bolz J. Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Dev Camb Engl* 1998; 125:5043–53.
4. Gurrapu S, Tamagnone L. Transmembrane semaphorins: Multimodal signaling cues in development and cancer. *Cell Adhes Migr* 2016; :1–17.
5. Kantor DB, Chivatakarn O, Peer KL, Oster SF, Inatani M, Hansen MJ, Flanagan JG, Yamaguchi Y, Sretavan DW, Giger RJ, et al. Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue regulated by heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. *Neuron* 2004; 44:961–75.
6. Kolk SM, Gunput R-AF, Tran TS, van den Heuvel DMA, Prasad AA, Hellemons AJCGM, Adolfs Y, Ginty DD, Kolodkin AL, Burbach JPH, et al. Semaphorin 3F is a bifunctional guidance cue for dopaminergic axons and controls their fasciculation, channeling, rostral growth, and intracortical targeting. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2009; 29:12542–57.
7. Takagi S, Hirata T, Agata K, Mochii M, Eguchi G, Fujisawa H. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 1991; 7:295–307.
8. He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin Is a Receptor for the Axonal Chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90:739–51.
9. Battistini C, Tamagnone L. Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: have a look both ways. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2016; 73:1609–22.

10. Cagnoni G, Tamagnone L. Semaphorin receptors meet receptor tyrosine kinases on the way of tumor progression. *Oncogene* 2014; 33:4795–802.
11. Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012; 3:921–39.
12. Goel HL, Mercurio AM. VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:871–82.
13. Zachary IC. How neuropilin-1 regulates receptor tyrosine kinase signalling: the knowns and known unknowns. *Biochem Soc Trans* 2011; 39:1583–91.
14. Valdembrì D, Caswell PT, Anderson KI, Schwarz JP, König I, Astanina E, Caccavari F, Norman JC, Humphries MJ, Bussolino F, et al. Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol* 2009; 7:e25.
15. Yaqoob U, Cao S, Shergill U, Jagavelu K, Geng Z, Yin M, de Assuncao TM, Cao Y, Szabolcs A, Thorgeirsson S, et al. Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2012; 72:4047–59.
16. Worzfeld T, Offermanns S. Semaphorins and plexins as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13:603–21.
17. Mishra R, Kumar D, Tomar D, Chakraborty G, Kumar S, Kundu GC. The potential of class 3 semaphorins as both targets and therapeutics in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2015; 19:427–42.
18. Guo H-F, Li X, Parker MW, Waltenberger J, Becker PM, Vander Kooi CW. Mechanistic basis for the potent anti-angiogenic activity of semaphorin 3F. *Biochemistry (Mosc)* 2013; 52:7551–8.
19. Nakayama H, Huang L, Kelly RP, Oudenaarden CRL, Dagher A, Hofmann NA, Moses MA, Bischoff J, Klagsbrun M. Infantile hemangioma-derived stem cells and endothelial cells are inhibited by class 3 semaphorins. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 464:126–32.
20. Serini G, Bussolino F, Maione F, Giraudo E. Class 3 semaphorins: physiological vascular normalizing agents for anti-cancer therapy. *J Intern Med* 2013; 273:138–55.
21. Sakurai A, Gavard J, Annas-Linhares Y, Basile JR, Amornphimoltham P, Palmby TR, Yagi H, Zhang F, Randazzo PA, Li X, et al. Semaphorin 3E initiates antiangiogenic signaling through plexin D1 by regulating Arf6 and R-Ras. *Mol Cell Biol* 2010; 30:3086–98.
22. Fukushima Y, Okada M, Kataoka H, Hirashima M, Yoshida Y, Mann F, Gomi F, Nishida K, Nishikawa S-I, Uemura A. Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:1974–85.
23. Yang W-J, Hu J, Uemura A, Tetzlaff F, Augustin HG, Fischer A. Semaphorin-3C signals through Neuropilin-1 and PlexinD1 receptors to inhibit pathological angiogenesis. *EMBO Mol Med* 2015; 7:1267–84.
24. Jian H, Zhao Y, Liu B, Lu S. SEMA4B inhibits growth of non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Cell Signal* 2015; 27:1208–13.

25. Sabag AD, Bode J, Fink D, Kigel B, Kugler W, Neufeld G. Semaphorin-3D and Semaphorin-3E Inhibit the Development of Tumors from Glioblastoma Cells Implanted in the Cortex of the Brain. *PLoS ONE* 2012; 7:e42912.
26. Rogalewski A, Dittgen T, Klugmann M, Kirsch F, Krüger C, Pitzer C, Minnerup J, Schäbitz W-R, Schneider A. Semaphorin 6A Improves Functional Recovery in Conjunction with Motor Training after Cerebral Ischemia. *PLoS ONE* 2010; 5:e10737.
27. Bagci T, Wu JK, Pfannl R, Ilag LL, Jay DG. Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene* 2009; 28:3537–50.
28. Casazza A, Fu X, Johansson I, Capparuccia L, Andersson F, Giustacchini A, Squadrito ML, Venneri MA, Mazzone M, Larsson E, et al. Systemic and Targeted Delivery of Semaphorin 3A Inhibits Tumor Angiogenesis and Progression in Mouse Tumor Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31:741–9.
29. Wang Z, Chen J, Zhang W, Zheng Y, Wang Z, Liu L, Wu H, Ye J, Zhang W, Qi B, et al. Axon guidance molecule semaphorin3A is a novel tumor suppressor in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7:6048–62.
30. Carballo-Molina OA, Sánchez-Navarro A, López-Ornelas A, Lara-Rodarte EJR, Salazar P, Campos-Romo A, Ramos-Mejia V, Velasco I. Semaphorin 3C released from a biocompatible hydrogel guides and promotes axonal growth of rodent and human dopaminergic neurons. *Tissue Eng Part A* 2016;
31. Aggarwal PK, Veron D, Thomas DB, Siegel D, Moeckel G, Kashgarian M, Tufro A. Semaphorin3a promotes advanced diabetic nephropathy. *Diabetes* 2015; 64:1743–59.
32. Shirvan A, Shina R, Ziv I, Melamed E, Barzilai A. Induction of neuronal apoptosis by Semaphorin3A-derived peptide. *Mol Brain Res* 2000; 83:81–93.
33. Casazza A, Kigel B, Maione F, Capparuccia L, Kessler O, Giraudo E, Mazzone M, Neufeld G, Tamagnone L. Tumour growth inhibition and anti-metastatic activity of a mutated furin-resistant Semaphorin 3E isoform. *EMBO Mol Med* 2012; 4:234–50.
34. Kikuchi K, Kishino A, Konishi O, Kumagai K, Hosotani N, Saji I, Nakayama C, Kimura T. In Vitro and in Vivo Characterization of a Novel Semaphorin 3A Inhibitor, SM-216289 or Xanthofulvin. *J Biol Chem* 2003; 278:42985–91.
35. Zheng CJ, Sohn M-J, Kim W-G. Vinaxanthone, a new FabI inhibitor from *Penicillium* sp. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:949–53.
36. Zhang L, Kaneko S, Kikuchi K, Sano A, Maeda M, Kishino A, Shibata S, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, et al. Rewiring of regenerated axons by combining treadmill training with semaphorin3A inhibition. *Mol Brain* 2014; 7:14.
37. Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, et al. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 2006; 12:1380–9.

38. Axelrod A, Eliassen AM, Chin MR, Zlotkowski K, Siegel D. Syntheses of xanthofulvin and vinaxanthone, natural products enabling spinal cord regeneration. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 52:3421–4.
39. Chin MR, Zlotkowski K, Han M, Patel S, Eliassen AM, Axelrod A, Siegel D. Expedited access to vinaxanthone and chemically edited derivatives possessing neuronal regenerative effects through ynone coupling reactions. *ACS Chem Neurosci* 2015; 6:542–50.
40. Schuch G, Machluf M, Bartsch G, Nomi M, Richard H, Atala A, Soker S. In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood* 2002; 100:4622–8.
41. Geretti E, van Meeteren LA, Shimizu A, Dudley AC, Claesson-Welsh L, Klagsbrun M. A mutated soluble neuropilin-2 B domain antagonizes vascular endothelial growth factor bioactivity and inhibits tumor progression. *Mol Cancer Res MCR* 2010; 8:1063–73.
42. Luchino J, Hocine M, Amoureux M-C, Gibert B, Bernet A, Royet A, Treilleux I, Lécine P, Borg J-P, Mehlen P, et al. Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers. *Cancer Cell* 2013; 24:673–85.
43. Borriello L, Montès M, Lepelletier Y, Leforban B, Liu W-Q, Demange L, Delhomme B, Pavoni S, Jarray R, Boucher JL, et al. Structure-based discovery of a small non-peptidic Neuropilins antagonist exerting in vitro and in vivo anti-tumor activity on breast cancer model. *Cancer Lett* 2014; 349:120–7.
44. Liu W-Q, Megale V, Borriello L, Leforban B, Montès M, Goldwaser E, Gresh N, Piquemal J-P, Hadj-Slimane R, Hermine O, et al. Synthesis and structure-activity relationship of non-peptidic antagonists of neuropilin-1 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24:4254–9.
45. Yamashita N, Jitsuki-Takahashi A, Ogawara M, Ohkubo W, Araki T, Hotta C, Tamura T, Hashimoto S, Yabuki T, Tsuji T, et al. Anti-Semaphorin 3A neutralization monoclonal antibody prevents sepsis development in lipopolysaccharide-treated mice. *Int Immunol* 2015; 27:459–66.
46. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* 2011; 17:1473–80.
47. Evans EE, Jonason AS, Bussler H, Torno S, Veeraraghavan J, Reilly C, Doherty MA, Seils J, Winter LA, Mallow C, et al. Antibody Blockade of Semaphorin 4D Promotes Immune Infiltration into Tumor and Enhances Response to Other Immunomodulatory Therapies. *Cancer Immunol Res* 2015; 3:689–701.
48. Evans EE, Hu-Lieskovan S, Bussler H, Torno S, Mallow C, Reilly C, Scrivens M, Klimatcheva E, Winter LA, Kirk R, et al. Antibody blockade of semaphorin 4D breaks down barriers to enhance tumoricidal immune infiltration and supports rational immunotherapy combinations. *J Immunother Cancer* 2015; 3:P220.
49. Southwell AL, Franciosi S, Villanueva EB, Xie Y, Winter LA, Veeraraghavan J, Jonason A, Felczak B, Zhang W, Kovalik V, et al. Anti-semaphorin 4D immunotherapy ameliorates neuropathology and

some cognitive impairment in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis* 2015; 76:46–56.

50. Smith ES, Jonason A, Reilly C, Veeraraghavan J, Fisher T, Doherty M, Klimatcheva E, Mallow C, Cornelius C, Leonard JE, et al. SEMA4D compromises blood–brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 2015; 73:254–68.
51. Fisher TL, Seils J, Reilly C, Litwin V, Green L, Salkowitz-Bokal J, Walsh R, Harville S, Leonard JE, Smith E, et al. Saturation monitoring of VX15/2503, a novel semaphorin 4D-specific antibody, in clinical trials. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; 90:199–208.
52. Patnaik A, Weiss GJ, Leonard JE, Rasco DW, Sachdev JC, Fisher TL, Winter LA, Reilly C, Parker RB, Mutz D, et al. Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of a Humanized Anti-Semaphorin 4D Antibody, in a First-In-Human Study of Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2016; 22:827–36.
53. Weekes CD, Beeram M, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Gore L, Hegde P, Xin Y, Yu R, Shih LM, Xiang H, et al. A phase I study of the human monoclonal anti-NRP1 antibody MNRP1685A in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 2014; 32:653–60.
54. Patnaik A, LoRusso PM, Messersmith WA, Papadopoulos KP, Gore L, Beeram M, Ramakrishnan V, Kim AH, Beyer JC, Mason Shih L, et al. A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014; 73:951–60.
55. Caunt M, Mak J, Liang W-C, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, et al. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008; 13:331–42.
56. Yang Y, Chen N, Li Z, Wang X-J, Wang S-Y, Tingwu null, Luo F-H, Yan J-H. Preparation, Purification, and Identification of a Monoclonal Antibody Against NRP2 b1b2 Domain. *Monoclon Antibodies Immunodiagn Immunother* 2015; 34:354–9.
57. König K, Marth L, Roissant J, Granja T, Jennewein C, Devanathan V, Schneider M, Köhler D, Zarbock A, Rosenberger P. The plexin C1 receptor promotes acute inflammation. *Eur J Immunol* 2014; 44:2648–58.
58. König K, Granja T, Eckle V-S, Mirakaj V, Köhler D, Schlegel M, Rosenberger P. Inhibition of Plexin C1 Protects Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Crit Care Med* 2016;
59. Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des* 2013; 81:136–47.
60. Pozzilli P, Battelino T, Danne T, Hovorka R, Jarosz-Chobot P, Renard E. Continuous subcutaneous insulin infusion in diabetes: patient populations, safety, efficacy, and pharmacoeconomics. *Diabetes Metab Res Rev* 2016; 32:21–39.
61. Baldo BA. Chimeric fusion proteins used for therapy: indications, mechanisms, and safety. *Drug Saf* 2015; 38:455–79.

62. Bruno BJ, Miller GD, Lim CS. Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Ther Deliv* 2013; 4:1443–67.
63. Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S, Viriot M-L, Guillemin F, Barberi-Heyob M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2006; 111:153–64.
64. Bechet D, Auger F, Couleaud P, Marty E, Ravasi L, Durieux N, Bonnet C, Plénat F, Frochot C, Mordon S, et al. Multifunctional ultrasmall nanoplatfoms for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of brain tumors guided by real-time MRI. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2015; 11:657–70.
65. Corredor M, Bonet R, Moure A, Domingo C, Bujons J, Alfonso I, Pérez Y, Messeguer À. Cationic Peptides and Peptidomimetics Bind Glycosaminoglycans as Potential Sema3A Pathway Inhibitors. *Biophys J* 2016; 110:1291–303.
66. Kong J-S, Yoo S-A, Kim J-W, Yang S-P, Chae C-B, Tarallo V, De Falco S, Ryu S-H, Cho C-S, Kim W-U. Anti-neuropilin-1 peptide inhibition of synoviocyte survival, angiogenesis, and experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62:179–90.
67. Roth L, Nasarre C, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Crémel G, Hubert P, Bagnard D. Transmembrane Domain Interactions Control Biological Functions of Neuropilin-1. *Mol Biol Cell* 2008; 19:646–54.
68. Arkhipov A, Shan Y, Das R, Endres NF, Eastwood MP, Wemmer DE, Kuriyan J, Shaw DE. Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* 2013; 152:557–69.
69. Endres NF, Das R, Smith AW, Arkhipov A, Kovacs E, Huang Y, Pelton JG, Shan Y, Shaw DE, Wemmer DE, et al. Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* 2013; 152:543–56.
70. Hubert P, Sawma P, Duneau J-P, Khao J, Hénin J, Bagnard D, Sturgis J. Single-spanning transmembrane domains in cell growth and cell-cell interactions: More than meets the eye? *Cell Adhes Migr* 2010; 4:313–24.
71. Teese MG, Langosch D. Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry (Mosc)* 2015; 54:5125–35.
72. Aci-Sèche S, Sawma P, Hubert P, Sturgis JN, Bagnard D, Jacob L, Genest M, Garnier N. Transmembrane Recognition of the Semaphorin Co-Receptors Neuropilin 1 and Plexin A1: Coarse-Grained Simulations. *PLOS ONE* 2014; 9:e97779.
73. Nasarre C, Roth M, Jacob L, Roth L, Koncina E, Thien A, Labourdette G, Poulet P, Hubert P, Crémel G, et al. Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene* 2010; 29:2381–92.
74. Arpel A, Sawma P, Spénlé C, Fritz J, Meyer L, Garnier N, Velázquez-Quesada I, Hussenet T, Aci-Sèche S, Baumlin N, et al. Transmembrane Domain Targeting Peptide Antagonizing ErbB2/Neu Inhibits Breast Tumor Growth and Metastasis. *Cell Rep* 2014; 8:1714–21.

75. Arpel A, Gamper C, Spenlé C, Fernandez A, Jacob L, Baumlin N, Laquerriere P, Orend G, Crémel G, Bagnard D, et al. Inhibition of primary breast tumor growth and metastasis using a neuropilin-1 transmembrane domain interfering peptide. *Oncotarget* [Internet] 2016 [cited 2016 Jun 23]; 5. Available from: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=10101>

Figure legends:

Figure 1: Using Semaphorins as therapeutic agents.

This cartoon is illustrating the major pathological conditions in which Semaphorins have been shown to produce a potential therapeutic effect. The delivery mode is mentioned for each experimental in vivo models.

Figure 2: Using SNP as therapeutic targets.

This schematic representation of SNP is integrating the different types of drugs targeting the extracellular or membrane domains.

Contribution des cellules souches de glioblastome à l'hétérogénéité tumorale : implications thérapeutiques et développement d'un système d'expression mosaïque fluorescent

Résumé

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primaire la plus agressive comportant une sous-population de cellules souches tumorales (CSG). Elles sont capables d'auto-renouvellement, de prolifération, de différenciation en cellules exprimant les marqueurs neuraux et de trans-différenciation en cellules de types vasculaires. Dans ce contexte, j'ai dérivé et caractérisé plusieurs lignées de CSG à partir de biopsies de patients. Puis j'ai évalué l'impact des peptides thérapeutiques transmembranaires développés au laboratoire, visant les plateformes de récepteurs de neuropiline-1 et de plexine-A1 surexprimées dans les CSG. Les deux peptides diminuent la croissance des CSG in vitro et in vivo. Finalement, j'ai développé un outil génétique fluorescent permettant de suivre le destin des CSG en direct. Basé sur l'expression de 4 rapporteurs fluorescents contrôlés par des promoteurs spécifiques des types cellulaires, il permet d'identifier l'hétérogénéité de ces cellules en différenciation.

Mots clefs : glioblastome, cellules souches tumorales, peptide thérapeutique transmembranaire, hétérogénéité, outil multicolore de suivi de la différenciation, transdifférenciation

Résumé en anglais

The glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive primary brain tumor and includes a subpopulation of tumoral stem cells (CSG). Those cells can self-renew, proliferate and differentiate by expressing specific neural markers and/or transdifferentiate into vascular-like cells. In this context, my work consisted first to produce and characterize several CSG lines from patient biopsies to constitute a bank of cell lines with different properties. We also evaluated the impact of in house therapeutic transmembrane peptides targeting the neuropilin-1 / plexin-A1 receptor platforms overexpressed in GBM. We thus showed that both targeting peptides decrease the growth of GSC in in vitro and in vivo models. Finally, I developed an inducible mosaic expression system to track the live differentiation of CSG. This system is based on the expression of four different fluorescent reporters controlled by the activity of cell type specific promoters.

Key words : glioblastoma, cancer stem cell, therapeutic transmembrane peptide, heterogeneity, multicolor tool for cell fate tracking, transdifferentiation