



**HAL**  
open science

# Le peptide NFL-TBS.40-63 issu des neurofilaments : agent thérapeutique et outil de ciblage des cellules de glioblastome et des cellules souches neurales.

Claire Lepinoux-Chambaud

## ► To cite this version:

Claire Lepinoux-Chambaud. Le peptide NFL-TBS.40-63 issu des neurofilaments : agent thérapeutique et outil de ciblage des cellules de glioblastome et des cellules souches neurales.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0039 . tel-02284909

**HAL Id: tel-02284909**

**<https://theses.hal.science/tel-02284909>**

Submitted on 12 Sep 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.

# Thèse de Doctorat

Claire LÉPINOUX-CHAMBAUD

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie*

Spécialité : *Neurosciences*

Unité de recherche : *Institut de Biologie en Santé,  
Laboratoire de Neurobiologie et Transgénèse, UPRES-EA3143*

Soutenue le *17 novembre 2014*

Thèse N° : *1421*

**Le peptide NFL-TBS.40-63  
issu des neurofilaments:  
agent thérapeutique et outil de ciblage des cellules  
de glioblastome et des cellules souches neurales.**

## JURY

Rapporteurs : **Mme Anne des RIEUX**, Professeur, Université Catholique de Louvain, Belgique  
**Mme Pascale BOMONT**, Chargée de Recherche, Institut des Neurosciences de Montpellier, France

Examineurs : **Mme Frédérique SAVAGNER**, Professeur d'Université, Université Paul Sabatier Toulouse 3, France  
**M. Joël EYER**, Directeur de Recherche, Université d'Angers, France

Directeur de Thèse : **M. Joël EYER**, Directeur de Recherche, Université d'Angers, France



# **Le peptide NFL-TBS.40-63 issu des neurofilaments :**

agent thérapeutique et outil de ciblage des cellules de glioblastome et des cellules souches neurales.

## **Résumé**

**D**es travaux menés au laboratoire sur la biologie des neurofilaments et sur leurs interactions avec les autres constituants du cytosquelette ont montré, sur différents filaments intermédiaires, des sites de fixation de la tubuline libre TBS (« tubulin-binding site »). Parmi les peptides synthétisés correspondants à ces séquences, le peptide NFL-TBS.40-63 issu de la sous-unité légère des neurofilaments (NFL) a révélé *in vitro* et *in vivo* des propriétés de ciblage et une action anti-tumorale sur des cellules de glioblastome, tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive, pour laquelle l'efficacité des traitements actuels reste très limitée. L'intérêt thérapeutique de ce peptide est renforcé par le fait qu'il entre peu et qu'il n'a pas d'effet cytotoxique dans des cellules saines (astrocytes, neurones).

**L**es travaux présentés dans cette thèse décrivent les mécanismes d'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules de glioblastome, pour mieux comprendre sa sélectivité. Sa spécificité d'action dans ces cellules a été complétée en analysant les effets du peptide sur l'organisation et la fonction des mitochondries. Enfin, nous montrons que le peptide cible des cellules souches neurales, qui pourraient être à l'origine du développement des glioblastomes, et qui pourraient servir d'outil thérapeutique dans de nombreuses pathologies cérébrales, telles que des lésions traumatiques et des maladies neurodégénératives.

**C**es travaux indiquent que le peptide NFL-TBS.40-63 représente un outil prometteur dans la stratégie thérapeutique des glioblastomes. Il peut aussi permettre de cibler les cellules souches neurales pour développer de nouveaux traitements des pathologies cérébrales.

## **Mots clés**

peptide pénétrant ; cytosquelette ; glioblastome ; cellules souches neurales ; ciblage

# **The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63 :**

## **therapeutic tool and targeting of glioblastoma cells and neural stem cells.**

### **Abstract**

In the laboratory, investigations on neurofilament biology and on their interactions with other cytoskeleton components showed tubulin-binding sites (TBS) on different intermediate filaments. Among the synthesized peptide corresponding to these sequences, the NFL-TBS.40-63 peptide derived from the neurofilament light subunit (NFL), revealed *in vitro* and *in vivo* targeting properties and anti-tumour effect on glioblastoma cells, the most frequent and aggressive brain tumour, for which current treatments show very limited effects. The therapeutic value of this peptide is reinforced by its lower uptake and the lack of a major cytotoxic effect in healthy cells (astrocytes, neurons).

Works in this thesis describe the uptake mechanisms of the NFL-TBS.40-63 peptide in glioblastoma cells, to better understand its selective internalization. Its specific action on glioblastoma cells has been completed by the analysis of the peptide effects on the mitochondrial organization and function. Finally, we show that the peptide targets neural stem cells, which could be at the origin of glioblastoma, and serve as a therapeutic tool in several brain diseases, such as traumatic injuries and neurodegenerative diseases.

Altogether these works indicate that this NFL-TBS.40-63 peptide is a promising tool for therapeutic strategies of glioblastoma. It can also target neural stem cells in order to develop new treatments for various brain disorders.

### **Key Words**

penetrating peptide ; cytoskeleton ; glioblastoma ;neural stem cells ; targeting

# | Remerciements |

Avant de vous lancer dans la lecture de ce "roman scientifique", je tiens tout d'abord à remercier quelques personnes qui ont pris part de près ou de loin à la réalisation et à l'aboutissement de ce projet de recherche, mais aussi et surtout de ce projet professionnel et personnel.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, et notamment Madame le Professeur Anne des Rieux et Madame le Docteur Pascale Bomont qui m'ont fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant que rapporteurs, de lire et d'évaluer mon manuscrit. Merci pour votre disponibilité.

Je souhaite remercier particulièrement Madame le Professeur Frédérique Savagner pour sa participation à ce jury de thèse en tant qu'examineur, et pour m'avoir permis de participer au projet de recherche de son étudiant, le jeune Docteur Romain Rivalin ! Merci à vous deux pour votre gentillesse.

Je remercie mon directeur de thèse, le Docteur Joël Eyer, directeur du Laboratoire de Neurobiologie et Transgène EA3143, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et encadrée pour réaliser cette thèse, de m'avoir fait confiance et de m'avoir appris beaucoup dans le domaine scientifique et professionnel. Je tiens à le remercier pour sa disponibilité, ses conseils, et toutes ses corrections d'articles, de poster et de manuscrit de thèse. Ces quatre années de thèse ont été très enrichissantes, d'un point de vue professionnel, scientifique et relationnel. Merci pour tout cela !

Je tiens à remercier les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, Madame le Docteur Valérie Coronas et Monsieur le Professeur Patrick Vicart, pour leur disponibilité, leur écoute et leurs conseils précieux.

Pour ces années de thèse je remercie le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur qui a financé mes trois premières années de thèse, ainsi que l'ARC pour avoir financé ma quatrième année.

Enfin, je remercie chaleureusement toutes les personnes du laboratoire, qui m'ont accueillie avec beaucoup de sympathie.

Tout d'abord merci à Madame le Professeur Annick Barthelaix et à Madame le Docteur Catherine Fressinaud pour leur gentillesse.

Je tiens à remercier tout particulièrement le grand et respectable Double Docteur Franck Letournel, notre Calife à tous ! Merci pour les pauses café (surtout pour le vieux café), pour toutes les discussions professionnelles et celles qui l'étaient moins, pour m'avoir prouvé l'existence non fantasmée de cette fameuse scène coupée.... et plus sérieusement merci pour tous tes conseils et toute ton aide au cours de ces années.

Merci à la sympathique et ravissante Pascale Champagne pour sa bonne humeur, son franc-parler, et merci aussi pour les photocopies ! Tu auras été le rayon de soleil du laboratoire.

Je remercie évidemment l'ancien thésard et jeune Docteur Julien Balzeau, qui m'a immédiatement mis au fait des traditions du laboratoire dès mon arrivée. Un grand merci pour ton soutien et tous les conseils que tu m'as apportés, pour les pauses café, les séances de psy, les cadeaux insolites !!! Je te souhaite une belle vie et une super carrière à Houston !

Merci à Maud Pinier, encore un Double Docteur, avec qui j'ai pu travaillé plus d'un an, et qui nous a rendu visite plusieurs fois le midi pour partager le déjeuner et papoter ensemble.

Je remercie les nouveaux arrivants et collègues, Dario Carradori, avec qui j'ai partagé une année au laboratoire, et Kristell Barreau, ma première et dernière stagiaire au laboratoire. Je vous souhaite bon courage pour la suite de vos travaux de thèse. Je remercie aussi Maryne Jaffré, ancienne stagiaire et technicienne du laboratoire. Merci à vous pour votre aide et votre sympathie.

Mes remerciements s'adressent également à l'équipe INSERM U892 et aux membres de l'animalerie SCAHU-IRIS pour leur aide et leur gentillesse, ainsi qu'à Catherine Guillet pour toute l'aide et les conseils qu'elle m'a donnés au FACS, et enfin à Rodolphe Perrot pour les belles photos de confocal.

Enfin, je voudrais aussi dire merci à Ulrich Jarry, Pierre Hibert et Amélie Goislard, pour tous ces bons moments partagés, et pour tous ces "non-anniversaires" souhaités, je n'aurai jamais autant vieilli qu'avec vous !

Et sans oublier tous ceux que j'ai pu oublier ! Merci à vous aussi !

### **Un Merci infini à ma famille et à mes amis ...**

Mes parents, qui m'ont appris les valeurs les plus belles et les plus importantes de la vie, qui m'ont soutenu et me soutiennent à jamais, et à qui j'espère pouvoir rendre tout ça en retour. Et je peux vous le dire, fini les études !!

Ma grande sœur, Nadia, pour son courage et sa folie dans son travail et dans sa vie, pour tous ses conseils, ses exemples, et toute l'aide qu'elle m'a apportée.

Mon grand frère, Pierre, pour toute sa protection et pour nos chamailleries aussi.... un grand frère indispensable, dont on ne peut qu'être fier.

Ma belle-sœur et mon beau-frère, Emilie et David, pour leur affection, ainsi que tous les autres membres de la tribu qu'on appelle la famille. Chacun se reconnaîtra.

Sacha, le p'tit nouveau de la famille, un p'tit bout de grand bonheur qui vous recharge les batteries à bloc !

Et enfin Willy, mon petit ami devenu mari l'an dernier, qui m'a toujours suivi tout au long de mon parcours, qui m'a soutenu, compris et admiré. Parce que la vie n'est pas un long fleuve tranquille, je le remercie de pouvoir naviguer à ses côtés.

Et j'embrasse mes beaux-parents Sophie et Eric.

Merci à Marine, Jennifer, Julia, Emilie, Joseph, Sylvain, Marco, Charles-Antoine, et tous les autres bien sûr... mes Amis sur qui je peux toujours compter, ... des amis déraisonnables, intenable, insupportable, .... et tellement indispensables. Merci de m'avoir supportée, une thèse et un mariage, ce n'est pas rien, mais vous étiez là ! C'est aussi grâce à vous que j'ai pu faire tout ça.

Merci à mes anges... et notamment à Mamie qui serait fière de sa petite-fille, et surtout à toi Thibault, vous me donnez toute la force et le courage dont j'ai besoin.

Et un petit merci à moi-même pour avoir tenu le coup, pour croire et continuer à croire  
aux p'tits bonheurs de la vie !



*"Ce n'est pas parce que  
les choses sont difficiles  
que nous n'osons pas,  
c'est parce que  
nous n'osons pas  
qu'elles sont difficiles."*

Sénèque

# | Table des matières |

<b><u>ABREVIATIONS</u></b> . . . . .	<b><u>p.12</u></b>
<b><u>INTRODUCTION GENERALE</u></b> . . . . .	<b><u>p.15</u></b>
<b>Chapitre 1 : Le cytosquelette</b> . . . . .	<b>p.16</b>
1.1. Généralités . . . . .	p.16
1.2. Microfilaments . . . . .	p.17
1.2.1. Assemblage et dynamique des microfilaments . . . . .	p.17
1.2.2. Fonctions des microfilaments . . . . .	p.18
1.2.3. Protéines et drogues associées aux microfilaments . . . . .	p.18
1.3. Microtubules . . . . .	p.19
1.3.1. Assemblage et dynamique des microtubules . . . . .	p.19
1.3.2. Différents isotopes de tubulines . . . . .	p.21
1.3.3. Modifications post-translationnelles . . . . .	p.22
1.3.4. Protéines associées aux microtubules . . . . .	p.24
1.3.5. Fonctions des microtubules . . . . .	p.25
1.3.6. Drogues des microtubules . . . . .	p.26
1.4. Filaments intermédiaires . . . . .	p.28
1.4.1. Différents types de filaments intermédiaires . . . . .	p.28
1.4.2. Structure et assemblage des filaments intermédiaires . . . . .	p.29
1.4.3. Modifications post-traductionnelles . . . . .	p.30
1.4.4. Fonctions des filaments intermédiaires . . . . .	p.31
1.4.5. Protéines associées aux filaments intermédiaires . . . . .	p.31
1.4.6. Les filaments intermédiaires du système nerveux central . . . . .	p.33
1.4.6.1. Les neurofilaments . . . . .	p.33
1.4.6.2. La GFAP . . . . .	p.35
1.4.6.3. La nestine . . . . .	p.37
1.4.6.4. La vimentine . . . . .	p.38
<b>Chapitre 2 : Maladies neurodégénératives et tumeurs du système nerveux central</b> . . . . .	<b>p.40</b>
2.1. Maladies neurodégénératives et autres altérations neurologiques . . . . .	p.40
2.1.1. Maladies neurodégénératives et dégénérescence axonale . . . . .	p.40
2.1.1.1. Maladie d'Alzheimer . . . . .	p.40
2.1.1.2. Maladie de Parkinson . . . . .	p.41
2.1.1.3. Sclérose latérale amyotrophique . . . . .	p.42
2.1.1.4. Maladie d'Alexander . . . . .	p.43
2.1.1.5. Maladies de Charcot-Marie-Tooth . . . . .	p.44
2.1.1.6. Autres altérations neurologiques . . . . .	p.44
2.1.2. Filaments intermédiaires comme biomarqueurs d'altérations neurologiques . . . . .	p.47
2.1.2.1. Les neurofilaments . . . . .	p.47
2.1.2.2. Les gliofilaments . . . . .	p.48

2.2. Tumeurs du système nerveux central . . . . .	p.50
2.2.1. Quelques chiffres . . . . .	p.50
2.2.2. Classification des tumeurs du système nerveux central . . . . .	p.50
2.2.3. Les gliomes . . . . .	p.53
2.2.3.1. Symptômes et diagnostics . . . . .	p.54
2.2.3.2. Les filaments intermédiaires comme biomarqueurs . . . . .	p.55
2.2.3.3. Facteurs de risque . . . . .	p.57
2.2.3.3.1. Récepteurs et voies de signalisation . . . . .	p.57
2.2.3.3.2. Activité mitochondriale . . . . .	p.60
2.2.3.4. Traitements et enjeux thérapeutiques . . . . .	p.63
<b>Chapitre 3 : Cellules souches neurales comme cibles thérapeutiques . . . . .</b>	<b>p.65</b>
3.1. Généralités sur les cellules souches . . . . .	p.65
3.2. Cellules souches neurales adultes . . . . .	p.67
3.2.1. Localisation des cellules souches neurales . . . . .	p.67
3.2.2. Caractéristiques des cellules souches neurales . . . . .	p.68
3.2.3. Cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire . . . . .	p.69
3.2.4. Régulation des cellules souches neurales : La niche neurogène . . . . .	p.71
3.2.4.1. Facteurs intrinsèques . . . . .	p.71
3.2.4.2. Facteurs extrinsèques . . . . .	p.73
3.2.5. Cellules souches neurales dans les pathologies cérébrales . . . . .	p.75
3.2.5.1. Cellules souches neurales et lésions cérébrales . . . . .	p.76
3.2.5.2. Cellules souches neurales et maladies neurodégénératives . . . . .	p.77
3.2.5.3. Cellules souches neurales et tumeurs cérébrales . . . . .	p.79
3.2.5.3.1. Cellules souches neurales à l'origine des gliomes . . . . .	p.79
3.2.5.3.2. Effet anti-tumorigénique endogène des cellules souches neurales . . . . .	p.81
3.2.5.3.3. Cellules souches neurales comme outils thérapeutiques . . . . .	p.81
<b>Chapitre 4 : Les peptides pénétrants comme nouveaux outils thérapeutiques prometteurs . . . . .</b>	<b>p.83</b>
4.1. Les peptides pénétrants ou « Cell-Penetrating-Peptides » (CPP) . . . . .	p.83
4.1.1. Présentation . . . . .	p.83
4.1.2. Mécanisme d'entrée . . . . .	p.83
4.1.2.1. Translocation directe . . . . .	p.84
4.1.2.2. Endocytose . . . . .	p.85
4.1.3. Les CPP comme systèmes de délivrance moléculaire intracellulaire . . . . .	p.87
4.1.3.1. Couplage CPP-protéines/peptides . . . . .	p.87
4.1.3.2. Couplage CPP-acides nucléiques . . . . .	p.87
4.1.3.3. Couplage CPP-nanoparticules . . . . .	p.88
4.2. Les peptides issus des filaments intermédiaires . . . . .	p.90
4.2.1. Leur découverte . . . . .	p.90
4.2.2. Le peptide Vim-TBS.58-81 . . . . .	p.92
4.2.3. Le peptide anti-glioblastome NFL-TBS.40-63 . . . . .	p.93
<b>Chapitre 5: Projets de recherche . . . . .</b>	<b>p.97</b>

<b><u>RESULTATS</u></b> . . . . .	<b><u>p.99</u></b>
<b>Article de revue:</b> Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations.	
<u>Lépinoux-Chambaud C., Eyer J. <i>Histochem Cell Biol.</i> 2013 Jul;140(1):13-22.</u>	
doi: 10.1007/s00418-013-1101-1. Epub 2013 Jun 8. . . . .	<b>p.100</b>
<b>1<sup>er</sup> article scientifique:</b> The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis.	
<u>Lépinoux-Chambaud C., Eyer J. <i>Int J Pharm.</i> 2013 Oct 1;454(2):738-47.</u>	
doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.04.004. Epub 2013 Apr 17. . . . .	<b>p.111</b>
<b>2<sup>ème</sup> article scientifique:</b> The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide disrupts microtubule and mitochondrial networks in the T98G glioma cell line.	
Rivalin R., <u>Lépinoux-Chambaud C., Eyer J., Savagner F. <i>PLoS One.</i> 2014 Jun 4;9(6):e98473.</u>	
doi: 10.1371/journal.pone.0098473. eCollection 2014. . . . .	<b>p.126</b>
<b>3<sup>ème</sup> article scientifique:</b> The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63 targets neural stem cells and increases their attachment.	
<u>Lépinoux-Chambaud C., Eyer J. Soumis . . . . .</u>	
	<b>p.144</b>
<b><u>DISCUSSION GENERALE</u></b> . . . . .	<b><u>p.171</u></b>
1. Entrée sélective du peptide NFL-TBS.40-63 . . . . .	<b>p.173</b>
2. Spécificité d'action du peptide NFL-TBS.40-63 . . . . .	<b>p.176</b>
3. Conclusion générale : Le peptide NFL-TBS.40-63 comme agent thérapeutique et outil de ciblage des cellules de glioblastome et des cellules souches neurales. . . . .	<b>p.180</b>
<b><u>ANNEXES</u></b> . . . . .	<b><u>p.182</u></b>
<b><u>REFERENCES</u></b> . . . . .	<b><u>p.185</u></b>

---

# ABBREVIATIONS

---

<b>ADP :</b>	adénosine di-phosphate
<b>Akt :</b>	protéine kinase B
<b>AMS :</b>	atrophie multisystématisée
<b>Ara-C :</b>	cytosine- $\beta$ -D-arabinofuranoside
<b>ATP :</b>	adénosine tri-phosphate
<b>BDNF :</b>	“brain-derived neurotrophic factor”
<b>BMP :</b>	“bone morphogenetic protein”
<b>CBTRUS :</b>	“Central Brain Tumor Registry of the United States”
<b>CDK4/6 :</b>	“cyclin-dependent kinase 4/6”
<b>CMT :</b>	Charcot-Marie-Tooth
<b>CNTF :</b>	“ciliary neurotrophic factor”
<b>COX4 :</b>	cytochrome c oxydase 4
<b>CPP :</b>	“cell-penetrating peptide”
<b>CSN :</b>	cellule souche neurale
<b>CYCS :</b>	“cytochrome c somatic”
<b>DCX :</b>	doublecortine
<b>DG :</b>	“dentate gyrus”
<b>DiD :</b>	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine
<b>EB1/3 :</b>	“end-binding 1/3”
<b>EGF(R) :</b>	“epidermal growth factor (receptor)”
<b>ESC :</b>	“embryonic stem cell”
<b>FCS :</b>	fluide cérébrospinal
<b>FGF :</b>	“fibroblast growth factor”
<b>FI :</b>	filament intermédiaire
<b>FIS1 :</b>	gène codant pour la protéine “mitochondrial fission 1”
<b>FITC :</b>	“fluorescein isothiocyanate”
<b><math>\gamma</math>-TuRC :</b>	“ $\gamma$ -tubulin ring complex”
<b>GAN :</b>	“giant axonal neuropathy”
<b>GDNF :</b>	“glial cell line-derived neurotrophic factor”
<b>GFAP :</b>	“glial fibrillary acidic protein”

<b>GLP-1 :</b>	“glucagon-like peptide-1”
<b>GPMV :</b>	“giant plasma membrane vesicle”
<b>GTP :</b>	guanosine tri-phosphate
<b>HGF :</b>	“hepatocyte growth factor”
<b>Hsp27 :</b>	“heat shock protein 27”
<b>HSPG :</b>	héparane sulfate protéoglycane
<b>IDH :</b>	isocitrate déshydrogénase
<b>IFAP :</b>	“intermediate filament-associated protein”
<b>IFN-<math>\gamma</math> :</b>	interferon-gamma
<b>iPS :</b>	“induced pluripotent stem”
<b>IRM :</b>	imagerie par résonance magnétique
<b>LIF :</b>	“leukemia inhibitory factor”
<b>LIS1 :</b>	“lissencephaly-1”
<b>LNC :</b>	“lipidic nanocapsule”
<b>lncRNA :</b>	“long non-coding RNA”
<b>LUV :</b>	“ large unilamellar vesicle”
<b>MAP :</b>	“microtubule-associated protein”
<b>MAPK :</b>	“mitogen-activated protein kinase”
<b>MARK :</b>	“microtubule affinity regulating kinase”
<b>MBD :</b>	“methyl-CpG-binding domain”
<b>MDM2 :</b>	“murine double minute 2”
<b>MF :</b>	microfilament
<b>MFN2 :</b>	myofusine 2
<b>MGMT :</b>	“O6-methylguanine-DNA methyltransferase”
<b>miRNA :</b>	microARN
<b>MT :</b>	microtubule
<b>MTOC :</b>	“microtubule-organizing factor”
<b>mTOR :</b>	“mammalian target of rapamycin”
<b>NF :</b>	neurofilament
<b>NFH :</b>	“neurofilament heavy (high molecular weight neurofilament subunit)”
<b>NFL :</b>	“neurofilament light (low molecular weight neurofilament subunit)”
<b>NFM :</b>	“neurofilament medium (medium molecular weight neurofilament subunit)”
<b>NFT :</b>	“neurofibrillary tangles”
<b>NGF :</b>	“nerve growth factor”
<b>NIFID :</b>	“neuronal intermediate filament inclusion disease”

<b>NRF-1 :</b>	“nuclear respiratory factor-1”
<b>PDGF(R) :</b>	“platelet-derived growth factor (receptor)”
<b>PECAM :</b>	“platelet endothelial cell adhesion molecule”
<b>PEDF :</b>	“pigment epithelium-derived factor”
<b>PEG :</b>	“polyethylene glycol”
<b>PIP2 / PIP3 :</b>	phosphatidylinositol bi-phosphate / tri-phosphate
<b>PI3K :</b>	phosphatidylinositol 3-kinase
<b>+TIP :</b>	“plus-end-tracking proteins”
<b>pRB :</b>	protéine du rétinoblastome
<b>PTEN :</b>	“phosphatase and TENsin homolog”
<b>PSA-NCAM :</b>	“polysialylated-neural cell adhesion molecule”
<b>PSP :</b>	paralysie supranucléaire progressive
<b>RTK :</b>	récepteur tyrosine kinase
<b>SDHB :</b>	sous-unité B du complexe II succinate déshydrogénase
<b>shh :</b>	“sonic hedgehog”
<b>siRNA :</b>	“small interfering RNA”
<b>SLA :</b>	sclérose latérale amyotrophique
<b>SOD1 :</b>	“superoxide dismutase 1”
<b>SVZ :</b>	“sub-ventricular zone”
<b>TAT :</b>	“trans-activator of transcription”
<b>TERT :</b>	“telomerase reverse transcriptase”
<b>TBS :</b>	“tubulin-binding site”
<b>TNF-<math>\alpha</math> :</b>	“tumor necrosis factor-alpha”
<b>VDAC :</b>	canal ionique voltage-dépendant
<b>VEGF(R) :</b>	“vascular endothelial growth factor (receptor)”
<b>VIH :</b>	virus de l’immunodéficience humaine

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

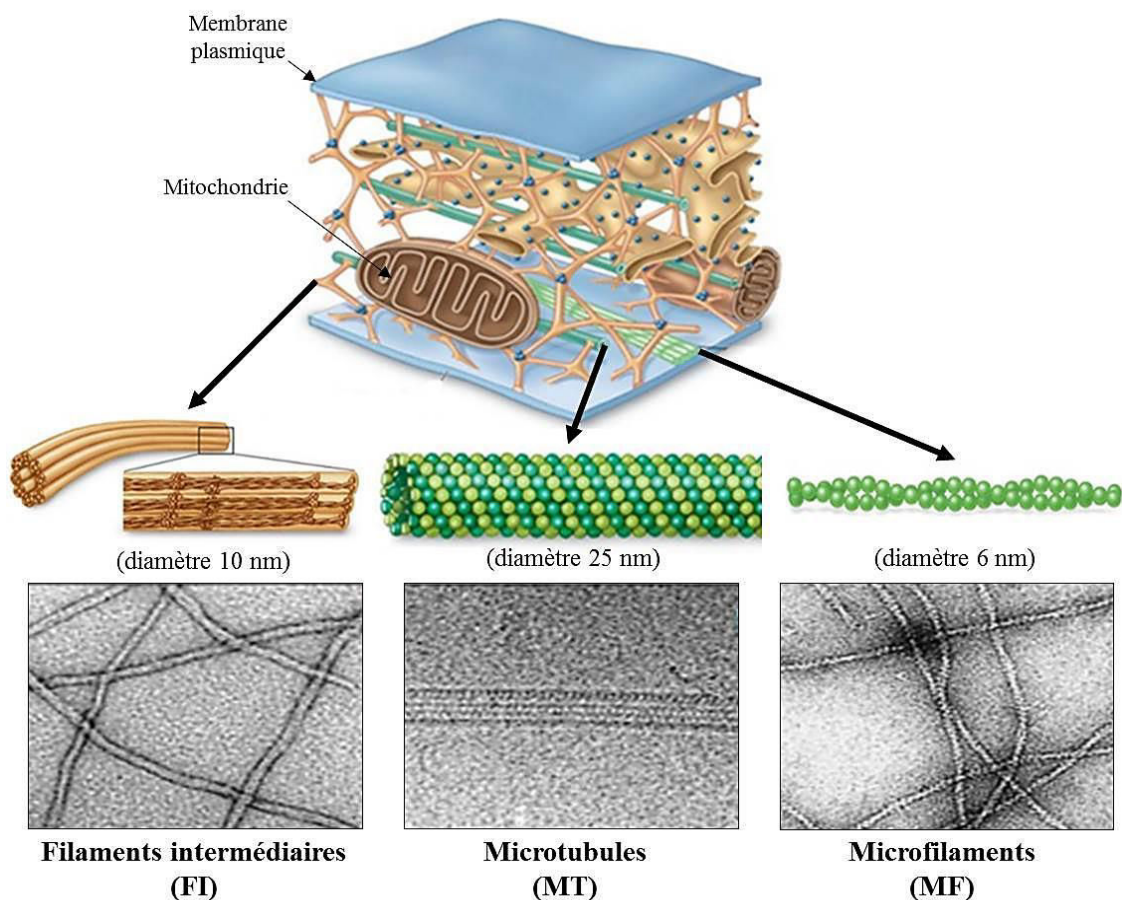


# Chapitre 1 : Le cytosquelette

## 1.1. Généralités

Le cytosquelette est une structure intracellulaire organisée en un réseau filamenteux dense et dynamique. Il est constitué de trois composants interconnectés : les microfilaments (MF), les microtubules (MT) et les filaments intermédiaires (FI) (**Figure 1**). Les MF et les MT sont exprimés de façon ubiquitaires dans l'organisme, alors que les FI sont tissu-spécifiques.

Le cytosquelette est impliqué dans de nombreuses fonctions, telles que le maintien de la forme de la cellule, les mouvements cellulaires, les déplacements des organites, ou encore la séparation des chromosomes lors de la division cellulaire. Dans les neurones, les éléments du cytosquelette sont plus abondants. Ils participent notamment au guidage axonal et au transport des organites dans les prolongements neuronaux (axone et dendrites).



**Figure 1 : Organisation et structure des différents constituants du cytosquelette.**

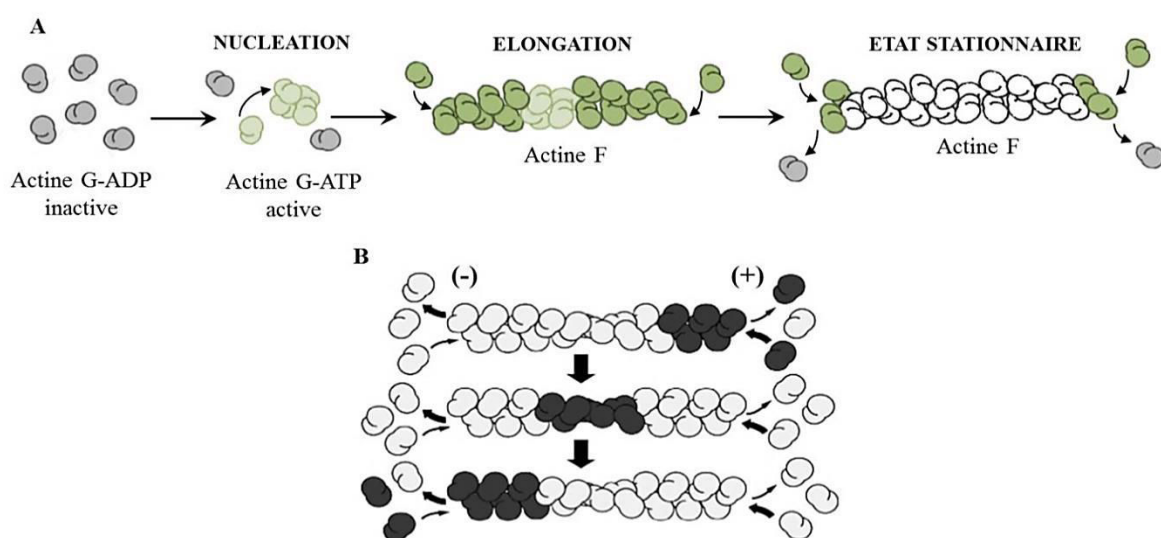
([http://www.yellowtang.org/images/three\\_protein\\_fi\\_be\\_c\\_la\\_784.jpg](http://www.yellowtang.org/images/three_protein_fi_be_c_la_784.jpg);  
Copyright © 2001 by Harcourt, Inc. All rights reserved.)

## 1.2. Microfilaments

Les MF sont les plus petits éléments du cytosquelette, avec un diamètre d'environ 6 nm, et se présentent sous la forme d'une double hélice. Ils sont constitués de monomères d'actine, une protéine très abondante dans l'ensemble des cellules, d'environ 43 kDa, qui existe sous trois isoformes ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Alors que les actines  $\beta$  et  $\gamma$  sont exprimées de façon ubiquitaire et en abondance dans le tissu nerveux, l' $\alpha$ -actine est spécifiquement exprimée dans les cellules musculaires. Une fois polymérisée sous forme de microfilaments, l'actine globulaire (actine G) prend le nom d'actine fibrillaire (actine F) (Korn, 1982 ; Carlier, 1991).

### 1.2.1. Assemblage et dynamique des microfilaments

L'actine G possède un site de fixation de l'ATP (adénosine tri-phosphate) qui la rend active. La formation d'un microfilament débute par la nucléation d'actine G-ATP, puis par la polymérisation d'actine G-ATP via un mécanisme d'élongation. Progressivement, l'ATP est hydrolysée en ADP (adénosine di-phosphate) au sein des actines F qui sont libérées et rendues de nouveau disponibles dans le cytoplasme sous forme globulaire. Les microfilaments acquièrent un état stationnaire sous forme polarisée, avec une polymérisation de l'actine G plus rapide à l'extrémité positive et lente au niveau de l'extrémité négative, caractérisant une polymérisation par un phénomène de « tapis roulant » ou « treadmilling » (**Figure 2**) (Korn, 1982 ; Carlier, 1991).

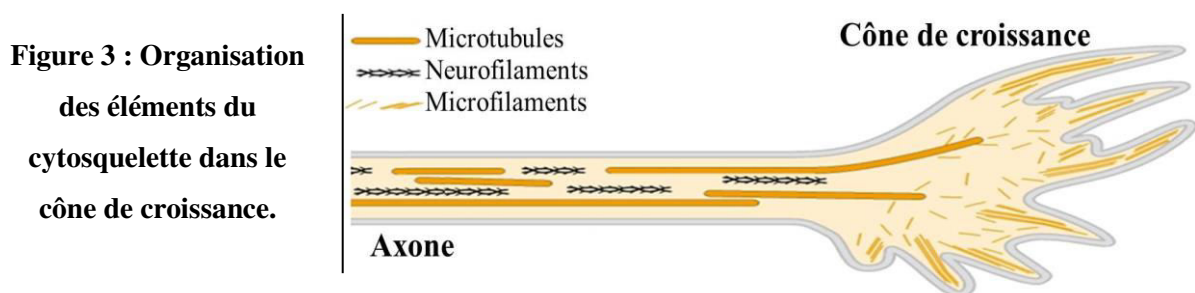


**Figure 2 : Formation des microfilaments par différentes étapes de polymérisation de l'actine (A) puis par le phénomène de « tapis roulant » ou « treadmilling » (B).**

(modifiée d'après la source : Université de Laval, Canada)

### 1.2.2. Fonctions des microfilaments

Dans le système nerveux, les MF sont les principaux composants du cytosquelette membranaire, et sont notamment en abondance au niveau des terminaisons pré-synaptiques, des épines dendritiques, ou encore des cônes de croissance dans les neurones (**Figure 3**). Ils jouent de multiples fonctions, telles que la distribution des protéines membranaires, axonales ou dendritiques, ainsi que la morphologie, les mouvements et les déplacements des cellules. Les MF participent également à la formation des filopodes et des lamellipodes, essentiels à la migration cellulaire, à la motilité du cône de croissance et à la myélinisation (Sobue, 1993).



(modifiée d'après la Figure 8-5de : Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects, Philadelphia, "Lippincott-Raven", 6th edition, 1999)

### 1.2.3. Protéines et drogues associées aux microfilaments

De nombreuses protéines associées aux MF ont été décrites dans le système nerveux. Ces protéines permettent de réguler la polymérisation des MF, et leur organisation en réseau dans la cellule, comme des protéines de fragmentation ADF/Cofilin, qui contrôlent l'assemblage des MF (Sarmiere et Bamberg, 2004). La fimbrine (ou plastine), est une protéine de réticulation des MF qui joue un rôle dans la différenciation neuronale et dans la motilité du cône de croissance (Shinomiya, 2012). L'association de la « debrin » aux MF est impliquée dans la morphogénèse neuronale et dans la structure et le maintien des épines dendritiques (Shirao, 1995). Une protéine de réticulation, Arp2/3, contribue à la formation des filopodes dans les neurones (Korobova et Svitkina, 2008).

Des drogues des MF, comme la cytochalasine D et la phalloïdine, capables de fixer l'actine et d'altérer sa dynamique, ont permis d'étudier le rôle des MF dans les processus biologiques et les mécanismes de la polymérisation de l'actine. La cytochalasine D déstabilise les MF en bloquant la polymérisation, tandis que la phalloïdine bloque la dépolymérisation et stabilise les MF (Cooper, 1987).

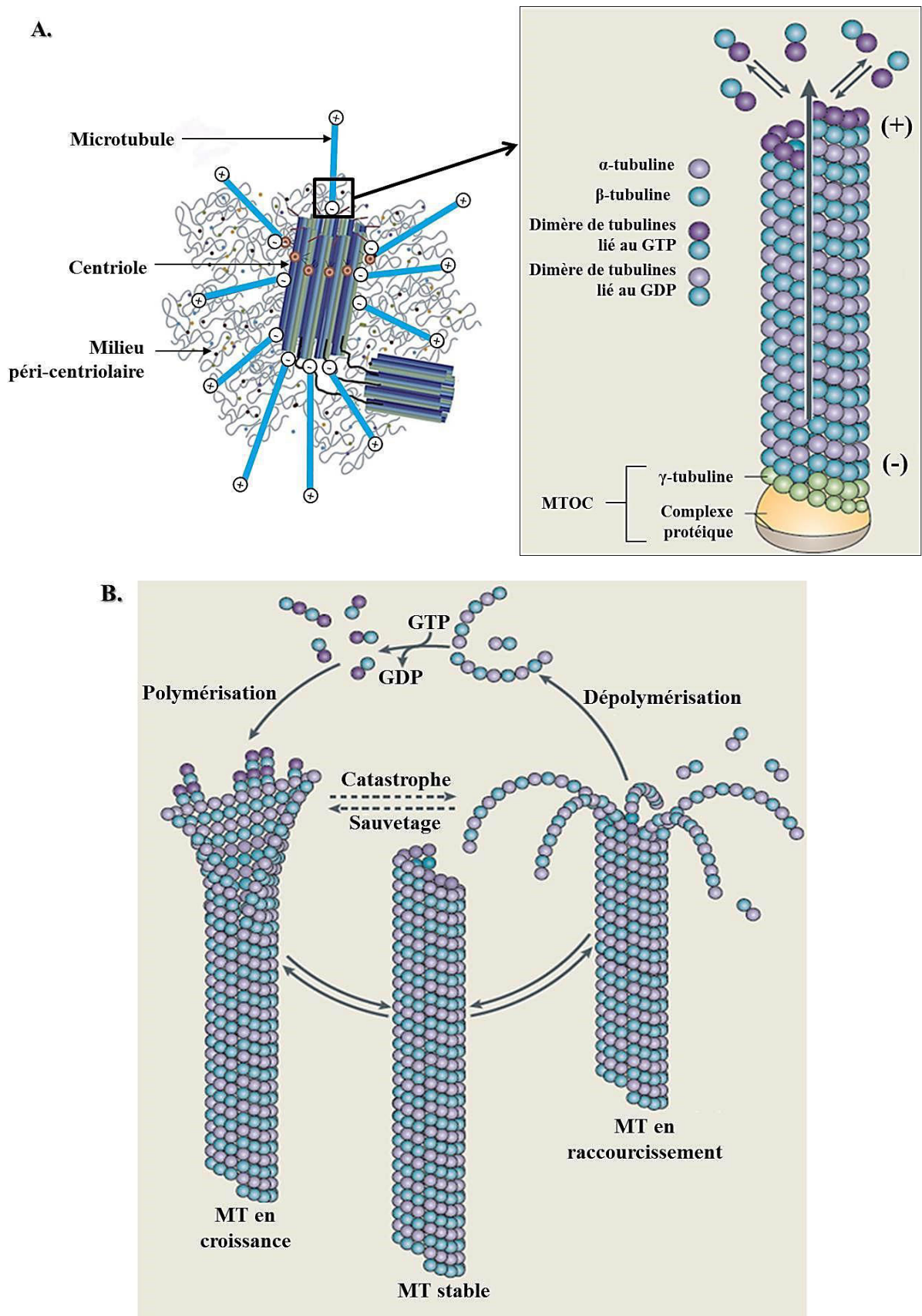
### 1.3. Microtubules

Les MT sont les plus gros éléments du cytosquelette, avec un diamètre d'environ 25 nm, et se présentent sous la forme d'un tube creux polarisé et constitué de 13 protofilaments linéaires, eux-mêmes formés d'hétérodimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , d'environ 50 kDa chacune. Après nucléation, les MT, qui sont des structures dynamiques, subissent un cycle de polymérisation/dépolymérisation.

#### 1.3.1. Assemblage et dynamique des microtubules

L'assemblage des MT commence au niveau du centre organisateur des MT (MTOC) souvent localisé proche du noyau. Le MTOC est caractérisé par deux centrioles, composées de différentes sous-unités de tubulines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ), entourées d'un milieu péri-centriolaire, et sur lesquelles repose le centrosome. Le complexe protéique du centrosome, appelé «  $\gamma$ -TuRC » («  $\gamma$ -tubulin ring complex »), est essentiellement composé de  $\gamma$ -tubuline, et sert de gabarit pour la formation des MT. Des dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  libres s'ajoutent au niveau du centrosome pour former les protofilaments qui s'assemblent entre eux pour former un MT. Ce point d'ancrage constitue l'extrémité (-) du MT, alors que la polymérisation se fait au niveau de l'extrémité (+) (**Figure 4A**).

La dynamique des MT est caractérisée par des cycles rapides de polymérisation/dépolymérisation, qui est liée à l'activité GTPase (guanosine tri-phosphatase) de la  $\beta$ -tubuline. Sur les MT, les hétérodimères  $\alpha\beta$  sont toujours orientés avec la tubuline  $\beta$  vers l'extrémité (+). La fixation de GTP (guanosine tri-phosphate) favorise la polymérisation des MT, qui portent alors une coiffe de GTP favorisant leur croissance. L'hydrolyse du GTP se fait au cœur des MT. En revanche lorsque le GTP est hydrolysé à l'extrémité positive, les MT sont rendus instables et se dépolymérisent. Le passage de polymérisation à dépolymérisation est appelé « catastrophe », et, pour le phénomène inverse, « sauvetage » (**Figure 4B**) (Müller-Reichert et al., 1998 ; Conde et Cáceres, 2009).



**Figure 4 : Dynamique des microtubules :** (A) Assemblage des microtubules au niveau du MTOC.

(B) Cycle de polymérisation et dépolymérisation des MT (Conde et Căceres, 2009).

(<http://www.studyblue.com/notes/note/n/chapter-9-the-cytoskeleton-9a/deck/2301475>)

### 1.3.2. Différents isotypes de tubulines

Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  qui constituent les MT appartiennent à une superfamille de 7 membres, aux fonctions et expressions différentes selon les cellules, qui regroupe les tubulines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  et  $\iota$ . Contrairement aux tubulines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , les autres tubulines ne sont pas retrouvées chez tous les eucaryotes.

Les tubulines  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\eta$  sont impliquées dans l'organisation et la fonction des centrioles et des centrosomes. En revanche, la localisation et le rôle des tubulines  $\zeta$ ,  $\theta$  et  $\iota$ , seulement identifiées chez les protistes *Trypanosoma brucei* ( $\zeta$ -tubuline) et *Paramecium tetraurelia* ( $\theta$  et  $\iota$ -tubulines), n'ont pas encore été étudiés (Dutcher, 2001 et 2003).

Pour les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , il existe plusieurs isotypes qui diffèrent selon le domaine C-terminal, et dont l'expression varie en fonction de la localisation tissulaire et cellulaire, et en fonction du développement (**Tableau 1**) (Khodiyar et al., 2007 ; Leandro-García et al., 2010).

**Tableau 1 : Isotypes des tubulines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et gènes codant.**

Sous-unité	Isotype	Classe	Gène	Localisation chromosomique	Gene ID
<b>Tubuline <math>\alpha</math></b>	alpha 1A	Ia	TUBA1A	12q13.12	7846
	alpha 1B	Ib	TUBA1B	12q13.12	10376
	alpha 1C	Ic	TUBA1C	12q13.12	84790
	alpha 3C	IIIc	TUBA3C	13q12.11	7278
	alpha 3D	IIIId	TUBA3D	2q21.1	113457
	alpha 3E	IIIe	TUBA3E	2q21.1	112714
	alpha 4A	IVa	TUBA4A	2q35	7277
	alpha 8	VIII	TUBA8	22q11.1	51807
<b>Tubuline <math>\beta</math></b>	beta	I	TUBB	6p21.33	203068
	beta 2A	IIa	TUBB2A	6p25	7280
	beta 2B	IIb	TUBB2B	6p25	347733
	beta 3	III	TUBB3	16q24.3	10381
	beta 4A	IVa	TUBB4A	19p13.3	10382
	beta 4B	IVb	TUBB4B	9q34	10383
	beta 6	V	TUBB6	18p11.21	84617
	beta 1	VI	TUBB1	20q13.32	81027
beta 8	VIII	TUBB8	10p15.3	347688	
<b>Tubuline <math>\gamma</math></b>	gamma 1	I	TUBG1	17q21	7283
	gamma 2	II	TUBG2	17q21	27175



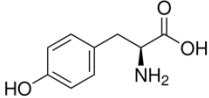
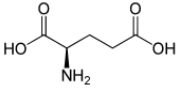
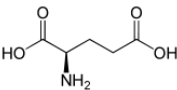

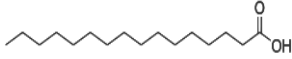
L'expression des tubulines beta, beta-4B et beta-6 est ubiquitaire, alors que beta-1 est spécifique des cellules hématopoïétiques. Dans le tissu cérébral, les tubulines beta-2A/B, beta-3, beta-4A/B, alpha-1A/B/C, alpha-4A et alpha-8 sont fortement exprimées (Fukushima et al., 2009 ; Leandro-García et al., 2010). L'expression des différents isotypes de tubuline  $\beta$  est souvent altérée dans la plupart des tissus tumoraux, avec une surexpression de TUBB3 (III), et à l'inverse une sous-expression de TUBB6 (V) (Katsetos et al., 2003 ; Leandro-García et al., 2010).

### 1.3.3. Modifications post-translacionnelles

Plusieurs modifications post-translacionnelles ont été identifiées sur les dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , telles que la phosphorylation, l'ubiquitylation, la sumoylation, la palmitoylation, l'acétylation, la détyrosination, la polyglutamylaton, ou encore la polyglycylation (**Tableau 2**). Ces modifications apparaissent après la polymérisation, et diversifient ainsi la surface externe et la surface luminale des MT. Les modifications post-translacionnelles génèrent ainsi un « code » qui peut être « lu » par des facteurs interagissant avec les MT, et qui régle les fonctions des MT.

**Tableau 2 : Modifications post-translacionnelles de la tubuline**

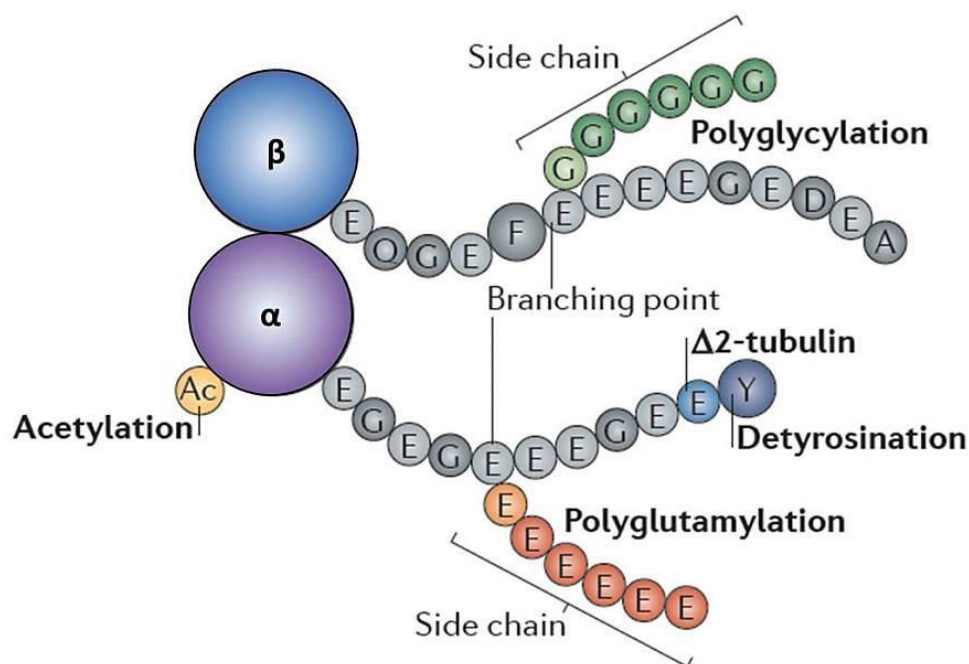
(d'après Redeker, 2010 ; Wloga et Gaertig, 2010).

Modifications post-translacionnelles	Structure	Description	Sous-unité	Sites
Phosphorylation		Ajout d'un groupement phosphate	$\alpha\beta$	Ser444, Tyr437, Ser441, Ser172
Acétylation		Ajout d'un groupement acétyle sur l' $\alpha$ -tubuline en N-terminal	$\alpha$	Lys40, Lys60, Lys112, Lys163, Lys164, Lys311, Lys326, Lys370, Lys394, Lys401, Lys 58
Détyrosination		Suppression d'une tyrosine en C-terminal	$\alpha$	(en C-terminal)
$\Delta 2$		Suppression de l'avant-dernier glutamate de l' $\alpha$ -tubuline détyrosinée	$\alpha$	(en C-terminal)
(Poly) Glutamylaton		Ajout d'un ou plusieurs glutamates (jusqu'à 12 ou 20) formant des chaînes latérales	$\alpha\beta$	Glu445, Glu443, 445, Glu441, Glu435, Glu438, Glu433
(Poly) Glycylation		Ajout d'une ou plusieurs glycines (jusqu'à 30 ou 40) formant des chaînes latérales	$\alpha\beta$	Glu445, Glu437
Palmitoylation		Ajout de palmitate sur l' $\alpha$ -tubuline	$\alpha\beta$	Cys376
Sumoylation	Protéine SUMO (« small ubiquitin-like modifier ») d'une centaine d'acides aminés	Ajout de protéines SUMO sur une lysine	$\alpha$	n.d.
Ubiquitylation	Protéine ubiquitine de 76 acides aminés	Ajout d'ubiquitines sur une lysine	$\alpha$	n.d.

n.d.: non défini

Toutes ces modifications, à l'exception de l'acétylation, ont lieu sur les domaines C-terminaux des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La distribution et le rôle des modifications des MT par phosphorylation, ubiquitylation, sumoylation et palmitoylation sont peu connus. En revanche, les autres modifications post-translotionnelles, qui sont schématisées sur la **figure 5**, sont mieux caractérisées, et sont impliquées dans la régulation de la dynamique et de la stabilité des MT, et dans l'interaction d'autres protéines avec les MT (Wloga et Gaertig, 2010 ; Janke et Bulinski, 2011).

Des aberrations dans la distribution des modifications post-translotionnelles pourraient directement ou indirectement conduire à diverses pathologies. Dans le cas de cancers par exemple, il a été mis en évidence une augmentation du taux de tubulines détyrosinées et polyglutamylées (Mialhe et al., 2001 ; Soucek et al., 2006). Des taux élevés de modifications post-translotionnelles de la  $\beta$ III-tubuline, par phosphorylation et glycosylation, sont associés à la chimiorésistance de certaines cellules tumorales (Cicchillitti et al., 2008).



**Figure 5 : Modifications post-translotionnelles des dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sur leur domaine C-terminal** (à l'exception de l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline sur le domaine N-terminal). Les modifications par polyglycylation et polyglutamylatation peuvent concerner à la fois l' $\alpha$ -tubuline et la  $\beta$ -tubuline (Janke et Bulinski, 2011).



#### 1.3.4. Protéines associées aux microtubules

Les protéines associées aux MT, ou MAP (« Microtubule-Associated Proteins »), représentent une grande famille de protéines, exprimées dans la région péricentriolaire et dans le cytoplasme pour interagir avec les extrémités (+) ou (-), ou le long des MT. Ces protéines regroupent les MAP structurales et motrices, dont l'interaction et l'activité dépend de leur état de phosphorylation et des modifications post-translotionnelles des MT (Janke et Bulinski, 2011 ; Sirajuddin et al., 2014).

Les MAP structurales interagissent avec les MT pour stabiliser et faciliter leur assemblage. Elles regroupent les MAP1A, MAP1B, MAP2, MAP4 et tau. Les MAP sont exprimées de façon asymétrique dans les neurones matures, et la protéine tau est préférentiellement exprimée dans les axones pour réguler le transport axonal. L'interaction des MAP avec les MT dépend de leur état de phosphorylation. Les kinases régulant l'affinité au MT (ou MARK) sont des kinases sérine/thréonine qui phosphorylent les MAP sur leur domaine de fixation à la tubuline. La phosphorylation des MAP réduit leur interaction avec les MT et augmente la dynamique de ces derniers. Une altération de la phosphorylation ou de l'expression des MAP peut être impliquée dans certaines pathologies. Par exemple, la protéine tau est hyperphosphorylée et retrouvée sous forme d'agrégats dans la maladie d'Alzheimer (Binder et al., 1985 ; Drewes et al., 1998 ; Halpain et Dehmelt, 2006 ; Conde et Căceres, 2009).

Le transport de molécules le long des MT est assuré par deux types de MAP motrices, les kinésines et les dynéines, qui se déplacent le long des MT grâce à leur activité ATPase (adénosine tri-phosphatase). Couplées à l'ATP, ces protéines motrices se fixent fortement aux MT, alors que l'hydrolyse de l'ATP entraîne leur détachement. Les kinésines permettent un transport vers l'extrémité (+) des MT (transport antérograde), et inversement les dynéines assurent un transport vers l'extrémité (-) des MT (transport rétrograde) (Kull et Endow, 2002 ; Roberts et al., 2013).

D'autres protéines s'associent aux MT pour réguler leur dynamique. Il a été identifié des protéines localisées à l'extrémité (+) des MT (ou protéines +TIP, pour « plus-end-tracking proteins »), comme les protéines EB1 et EB3 (« end-binding 1 et 3 »), LIS1 (« lissencephaly-1 »), ou la doublecortine (DCX) qui jouent un rôle important dans la formation des axones.

Des protéines de dissociation (katanine, spastine) et des protéines de déstabilisation des MT (stathmine) ont également été mises en évidence (Conde et Cáceres, 2009).

#### 1.3.5. Fonctions des microtubules

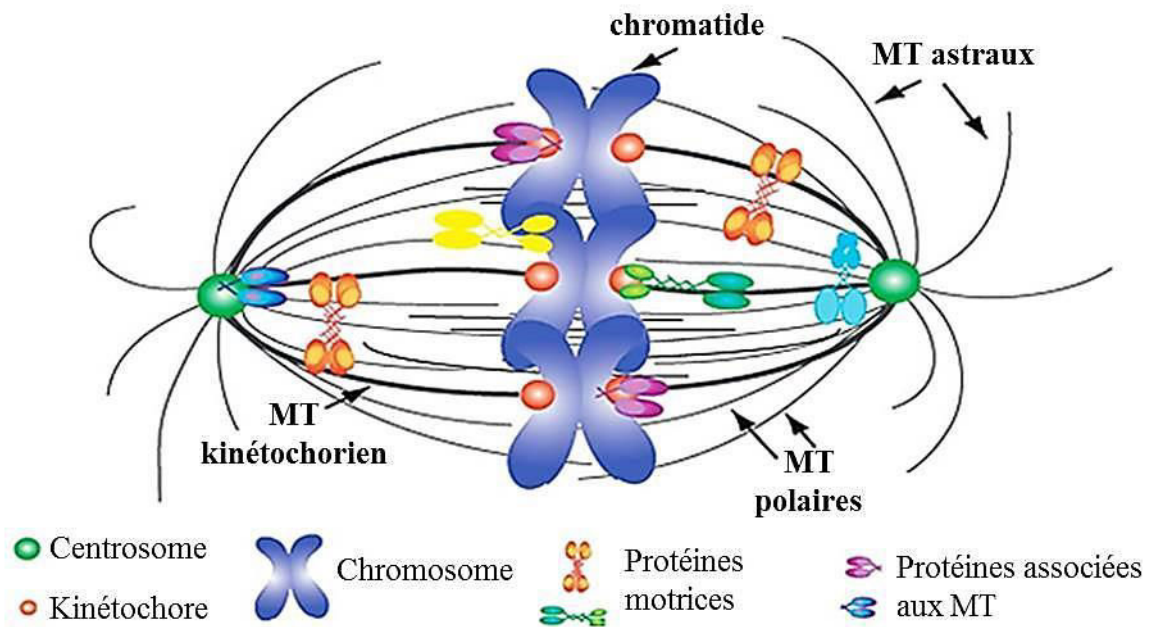
Les MT sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires, du fait de leur organisation étendue dans l'ensemble du cytoplasme et de leur instabilité dynamique. Les MT participent à la division, la migration, la forme et la polarité des cellules, ainsi qu'au transport et à la localisation des différents organites intracellulaires.

Lors de la migration cellulaire, le rôle des MT sur la polarité des cellules et la capacité de ces derniers à s'orienter dans le sens de migration, sont des propriétés importantes pour moduler la motilité cellulaire. Les MT ont également des rôles opposés dans la régulation des adhérences cellulaires, en jouant sur leur formation et leur désassemblage. Les intégrines transportées par les MT et l'activation de Rac dépendante des MT favorisent la formation de nouveaux contacts focaux. A l'inverse lorsque les MT transportent des protéases, comme les métalloprotéases, l'interaction des intégrines avec la matrice extracellulaire est altérée et réduit ainsi les contacts focaux (Etienne-Manneville, 2013).

Dans les neurones, les MT jouent un rôle important dans la croissance et le maintien des neurites, avec une organisation différente entre les dendrites et l'axone. Les dendrites reçoivent des informations d'autres cellules tandis que les axones permettent de transmettre un signal à une autre cellule. Ces différences expliquent l'organisation distincte des MT dans ces deux structures neuronales, notamment par l'orientation des MT qui est uniforme dans les axones avec l'extrémité (+) vers la pointe de l'axone, alors qu'elle est hétérogène dans les dendrites. La composition en MAP est également différente, avec une expression majoritaire de MAP2 dans les dendrites et de tau dans les axones. Enfin, certains organites retrouvés dans les dendrites, comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et des polyribosomes, sont absents dans les axones (Conde et Cáceres, 2009).

Lors de la division cellulaire, la réorganisation des MT est indispensable pour former le fuseau mitotique qui est composé des MT kinétochoriens, polaires et astraux, à partir des centrosomes situés de part et d'autre de la cellule. Les extrémités (+) des MT interagissent avec les kinétochores, la région centromérique de chaque chromatide (**Figure 6**). Cette réorganisation des MT permet d'assurer, grâce à des protéines motrices et des protéines

associées aux MT, l'alignement et la séparation des chromosomes durant respectivement les phases de métaphase et d'anaphase (Walczak et Heald, 2008 ; Meunier et Vernos, 2012). Le caractère hautement dynamique de cette structure indispensable à la mitose, fait des MT une cible majeure dans le développement de thérapies anti-cancéreuses.



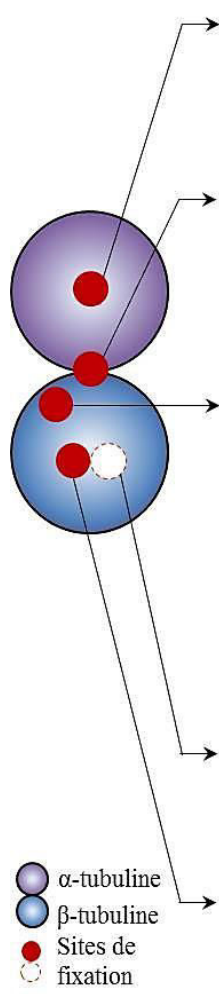
**Figure 6 : Composants clés du fuseau mitotique (Walczak et Heald, 2008).**

### 1.3.6. Drogues des microtubules


Essentiels à la division cellulaire, les MT sont la cible d'agents anti-cancéreux, capables de les stabiliser ou de les déstabiliser. Ces agents, aux propriétés antimitotiques, sont classés en 5 groupes selon leur site de fixation sur la tubuline. Les agents déstabilisant les MT sont les vinca-alkaloïdes et la colchicine, alors que ceux stabilisant les MT regroupent les taxanes, les épothilones et la laulimalide (**Tableau 3**). Les agents déstabilisant les MT favorisent la dépolymérisation et empêchent la polymérisation des dimères de tubulines  $\alpha/\beta$ , alors que les agents stabilisant les MT ont l'effet inverse.

Bien que ces agents soient des candidats prometteurs dans le traitement de divers cancers, des limites s'opposent à leur efficacité, comme leur faible solubilité, leur sévère toxicité, et leur pharmacorésistance (Liu et al., 2014).

**Tableau 3 : Les principaux agents ciblant la tubuline (modifié d'après Liu et al., 2014).**



Groupe	Origine	Site de fixation de la tubuline	Effet
<b>LAULIMALIDE</b>			
Laulimalide	<i>Cacospongia mycofijiensis</i> (éponge marine)	$\alpha$ -tubuline	stabilisation des MT
Peloruside A	<i>Mycale hentscheli</i> (éponge marine)		
<b>COLCHICINE</b>			
Colchicine	<i>Colchicum autumnale</i> (plante)	domaine "colchicine" (interface $\alpha/\beta$ -tubuline, proche du site de fixation du GTP de l' $\alpha$ -tubuline)	déstabilisation des MT
Combrestatines et dérivés	<i>Combretum caffrum</i> (plante)		
<b>VINCA-ALCALOÏDES</b>			
Vinblastine, Vincristine, Vindesine, Vinorelbine, Vinflunine	<i>Catharanthus roseus</i> (plante)	domaine "vinca" (sur la $\beta$ -tubuline, proche du site de fixation du GTP)	déstabilisation des MT
Halicondrin B, Eribulin	<i>Halichondria okadaï</i> (éponge marine)		
Hemiassterlines	<i>Hemiassterella minor</i> et <i>Cymbastela sp.</i> (éponges marines)		
Tubulysin A	<i>Archangium geophyra</i> (myxobactérie)		
<b>TAXANES</b>			
Paclitaxel, Docetaxel, Cabazitaxel, Larotaxel	<i>Taxus</i> (conifères)	domaine "taxane" (sur la $\beta$ -tubuline, domaine luminal dans la cavité interne des MT)	stabilisation des MT
<b>EPOTHILONES</b>			
Epothilone B, Ixabepilone, Sagopilone	<i>Sorangium cellulosum</i> (myxobactérie)	proche du domaine "taxane"	stabilisation des MT


  
 $\alpha$ -tubuline  
 $\beta$ -tubuline  
 Sites de fixation  
 fixation

## 1.4. Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires (FI) sont tissu-spécifiques et ont un diamètre intermédiaire entre les MF et les MT, d'environ 10 nm. Ceux sont les constituants majeurs du cytosquelette, qui contrairement aux deux autres structures polarisées du cytosquelette, ont une forme non-polarisée, lisse et flexible. Les FI diffèrent également des MF et des MT par leurs structures primaires et leurs tailles variables (Szeverenyi et al., 2008).

### 1.4.1. Différents types de filaments intermédiaires

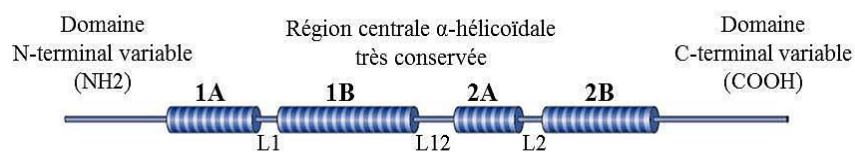
Les FI représentent un groupe hétérogène de protéines codées par 70 gènes différents dans le génome humain, et sont classés en 6 types selon leur séquence, et leur profil d'expression cellulaire. Les types I et II sont les kératines (dans les cellules épithéliales), le type III regroupe des FI mésodermiques (la desmine dans les cellules musculaires, la GFAP (« glial fibrillary acidic protein ») dans les cellules gliales, la périphérine dans des cellules neuronales, et la vimentine dans les cellules mésenchymateuses, endothéliales et hématopoïétiques). Les FI de type IV, tels que les neurofilaments (NF), la nestine, la synémine, et l' $\alpha$ -internexine, sont des protéines essentiellement exprimées dans les cellules nerveuses. Les FI spécifiques du cristallin, la filensine et la phakinine, appartiennent au type VI. Enfin, les laminines qui constituent le type V sont présentes dans toutes les cellules et sont exclusivement intranucléaire, contrairement aux autres FI cytoplasmiques qui sont tissu-spécifiques (Szeverenyi et al., 2008).

Les FI sont exprimés différemment pendant le développement embryonnaire, en raison de voies de différenciation et de fonctions tissu-spécifiques bien distinctes (Herrmann et al., 2009). Par exemple, la nestine et la vimentine sont exprimées tôt pendant le développement embryonnaire, alors que les neurofilaments apparaissent plus tard et sont associés à la différenciation neuronale (Cochard et Paulin, 1984 ; Lendahl et al., 1990 ; Nixon et Shea, 1992).

Des altérations dans l'expression des FI, hautement tissu-spécifiques et essentiels aux fonctions cellulaires, sont responsables d'au moins 72 pathologies humaines répertoriées par Szeverenyi et collaborateurs en 2008 dans une base de données, intitulée « Human Intermediate Filament Database » (HIFD) (Szeverenyi et al., 2008).

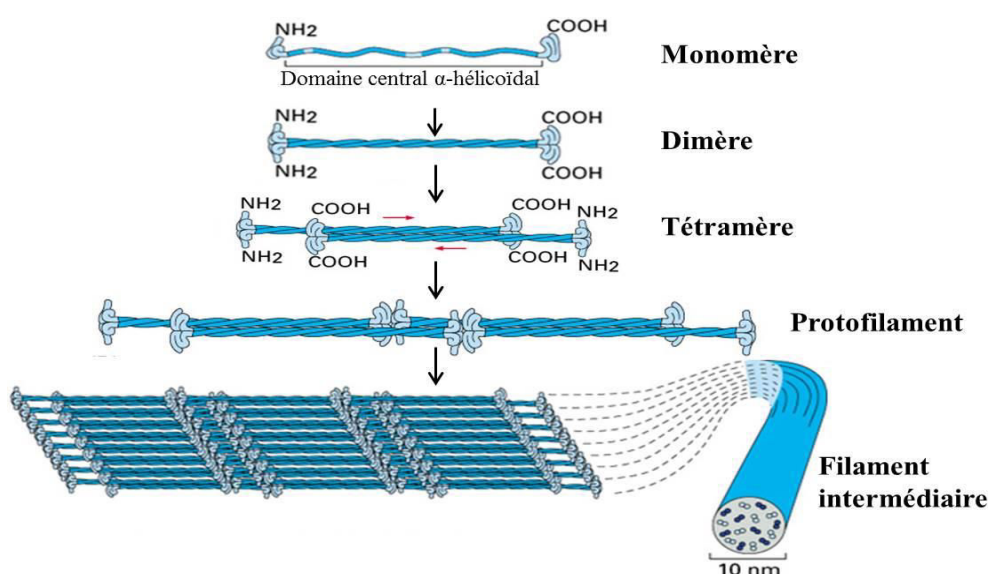
## 1.4.2. Structure et assemblage des filaments intermédiaires

Contrairement aux MF et aux MT qui sont composés de protéines globulaires, les FI sont fibrillaires. Ils sont composés d'une région centrale  $\alpha$ -hélicoïdale très conservée, constituée de quatre sous-domaines (1A, 1B, 2A et 2B) reliés par des « linkers » (L1, L12 et L2), et qui contient en général entre 300 et 330 acides aminés. Ce domaine central est entouré des domaines N et C-terminaux dont la taille est variable et plus flexible, selon les différents types de FI cytoplasmiques (**Figure 7**).



**Figure 7 : Structure des filaments intermédiaires** (Snider et Omary, 2014).

L'assemblage des FI commence par l'association spiralée et parallèle de monomères via leur région centrale  $\alpha$ -hélicoïdale, pour former des dimères qui s'associent de façon antiparallèle et décalée, constituant ainsi les tétramères. Ces derniers s'unissent en protofilaments pour former les FI (**Figure 8**). L'assemblage des FI peut se faire *in vitro* de façon hiérarchique et en absence de source d'énergie (ATP ou GTP), contrairement aux autres structures du cytosquelette (MT et MF) (Herrmann et al., 2009).



**Figure 8 : Assemblage des filaments intermédiaires** (modifiée d'après : Figure 16-16 de Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., 2002. The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments, Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science).

### 1.4.3. Modifications post-traductionnelles

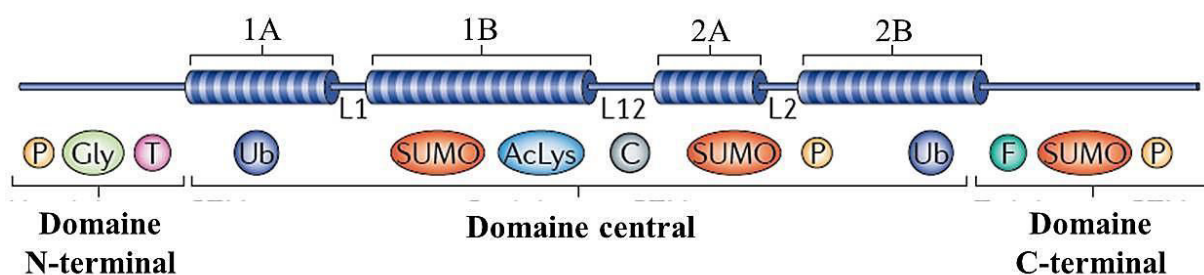
Les modifications post-traductionnelles qui touchent les FI, et qui incluent la phosphorylation, la glycosylation, la sumoylation, l'acétylation, ou encore la prénylation, jouent un rôle central en régulant les propriétés fonctionnelles des FI (**Figure 9**).

Le rôle principal de la phosphorylation des FI est de faciliter leur réorganisation et de favoriser leur solubilité, qui est essentielle pour le maintien de leur dynamique structurale. Dans les neurones par exemple, la phosphorylation des neurofilaments permet d'augmenter la stabilité et le calibre des axones, et diminue la vitesse du transport axonal. L'organisation et la solubilité des FI sont aussi régulées par la sumoylation.

Les interactions des FI cytoplasmiques avec d'autres protéines sont modulées par phosphorylation et glycosylation, alors que l'interaction des FI nucléaires (lamines) avec la membrane nucléaire est régulée par farnésylation.

En réponse à des changements métaboliques, les propriétés des FI peuvent être modulées par acétylation de résidus lysine, et par glycosylation (dont les cibles les plus connues sont les kératines, la vimentine et les neurofilaments).

Chez l'Homme, de nombreuses pathologies sont associées à des altérations des modifications post-traductionnelles des FI, comme par exemple l'hyper-phosphorylation des neurofilaments qui est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives (Snider et Omary, 2014).



**Figure 9 : Modifications post-traductionnelles ciblant les différents domaines des filaments intermédiaires.** *AcLys* : acétylation de la lysine ; *C* : caspase clivage ; *F* : farnésylation ; *Gly* : *O*-linked glycosylation ; *P* : phosphorylation; *SUMO* : sumoylation; *T* : transamidation; *Ub* : ubiquitylation (Snider et Omary, 2014).

#### 1.4.4. Fonctions des filaments intermédiaires

Les FI, dont l'organisation est hautement dynamique, jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité mécanique et la morphologie des cellules, grâce à leur interaction avec les autres éléments du cytosquelette. Ils sont également impliqués dans la croissance cellulaire et la distribution des organites dans la cellule, notamment celle des mitochondries. Les FI participent à la régulation de la morphologie, de la fusion et du transport des mitochondries dans les cellules, en interagissant avec des molécules responsables de la plasticité du réseau mitochondrial (Nekrasova et al., 2011 ; Gentil et al., 2012).

Les FI sont aussi impliqués dans la réponse au stress. Les cellules sont en effet confrontées à divers types de stress (stress mécanique, métabolique, osmotique,...) auxquels les FI peuvent répondre différemment (inclusions, sur-expression ou réorganisation des FI).

En interagissant avec les desmosomes au niveau de la membrane plasmique, les FI participent à l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire et aux autres cellules. Les lamines, qui sont nucléaires, servent de maintien à l'enveloppe nucléaire.

L'émergence de mutations des FI a également permis de mettre en évidence leurs fonctions physiologiques spécifiques d'un type cellulaire. Les symptômes des maladies épidermolytiques sont causés par des mutations de la kératine. Des mutations de la desmine et de la laminine sont responsables de dystrophies musculaires et de cardiomyopathies. (Herrmann et al., 2007 ; Chung et al., 2013 ; Snider et Omary, 2014).

Contrairement aux autres structures du cytosquelette, aucune drogue ne peut fixer spécifiquement les FI (Snider et Omary, 2014).

#### 1.4.5. Protéines associées aux filaments intermédiaires

L'interaction des FI avec les deux autres structures du cytosquelette et avec les organites est coordonnée par des protéines associées aux FI, ou IFAP (« intermediate filament-associated proteins »). Les IFAP regroupent des protéines d'ancrage et de liaison (**Tableau 4**), des protéines chaperonnes, des enzymes, des récepteurs, ainsi que des protéines adaptatrices et motrices.



L'interaction des lamines avec des IFAP est nécessaire à l'organisation des FI, mais est aussi impliquée dans la régulation de la transcription et de la prolifération cellulaire (Green et al., 2005).

**Tableau 4 : Principales protéines associées aux filaments intermédiaires (IFAP).**

Fonctions	Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Interaction avec les FI	Localisation cellulaire	Références
Protéines d'ancrage	<b>Plectine</b>	190	kératines, desmine, GFAP, périphérine, vimentine, NF	Desmosomes, hémidesmosomes, contacts focaux, costamères et disques Z	<i>Wiche et al., 1983 ; Hermann et Wiche, 1987</i>
	<b>Desmoplakines I et II</b>	332 (I) et 260 (II)	kératines, desmine, vimentine	Constituants majeurs des desmosomes et au niveau des jonctions endothéliales spécialisées.	<i>Skerrow et Matoltsy, 1974; Schmelz et Franke, 1993</i>
	<b>BPAG1-e</b>	230	kératines, périphérine, NF	Hémidesmosomes	<i>Westgate et al., 1985</i>
	<b>Envoplakine</b>	210	kératines	Desmosomes	<i>Ruhrberg et al., 1996</i>
	<b>Periplakine</b>	195	kératines, vimentine	Desmosomes	<i>Ruhrberg et al., 1997; Kazerounian et al., 2002</i>
	<b>Epiplakine</b>	450	kératines, vimentine	Desmosomes	<i>Fujiwara et al., 2001; Jang et al., 2005</i>
	<b>Plakoglobine</b>	83	kératines	Desmosomes et jonctions adhérentes	<i>Knudsen et Wheelock, 1992; Smith et Fuchs, 1998</i>
	<b>Plakophilines 1, 2 et 3</b>	75, 100 et 87	kératines, vimentine, desmine	Desmosomes	<i>Hofmann et al., 2000; Neuber et al., 2010</i>
	<b>Pinine</b>	140	kératines	Desmosomes	<i>Ouyang et Sugrue, 1996</i>
	<b>Spectrine</b>	260	desmine, vimentine, NF	Surface interne des membranes	<i>Langley et Cohen, 1986 et 1987</i>
	<b>4.1R</b>	80	$\alpha$ -internexine, NF	Membranes post-synaptiques	<i>Scott et al., 2001</i>
Protéines de liaison	<b>Filaggrine</b>	37	kératines	Grains de kératohyalines des kératinocytes (couche granuleuse)	<i>Sandilands et al., 2009</i>
	<b>Trichohyaline</b>	248	kératines (cheveux)	Gaine interne de la racine du follicule pileux	<i>Lee et al., 1993</i>
	<b>Calponine</b>	33	desmine	Corps denses des cellules musculaires lisses	<i>Mabuchi et al., 1997</i>
	<b>Fimbrine (ou plastine)</b>	68	vimentine	Podosomes, filopodes, fibres de stress (pour l'adhérence cellulaire)	<i>Correia et al., 1999</i>
	<b>Nebuline</b>	600-900	desmine	Disques Z	<i>Bang et al., 2002</i>
	<b>Alpha-actinine</b>	100	synémimine	Disques Z	<i>Bellin et al., 1999</i>

#### 1.4.6. Les filaments intermédiaires du système nerveux central

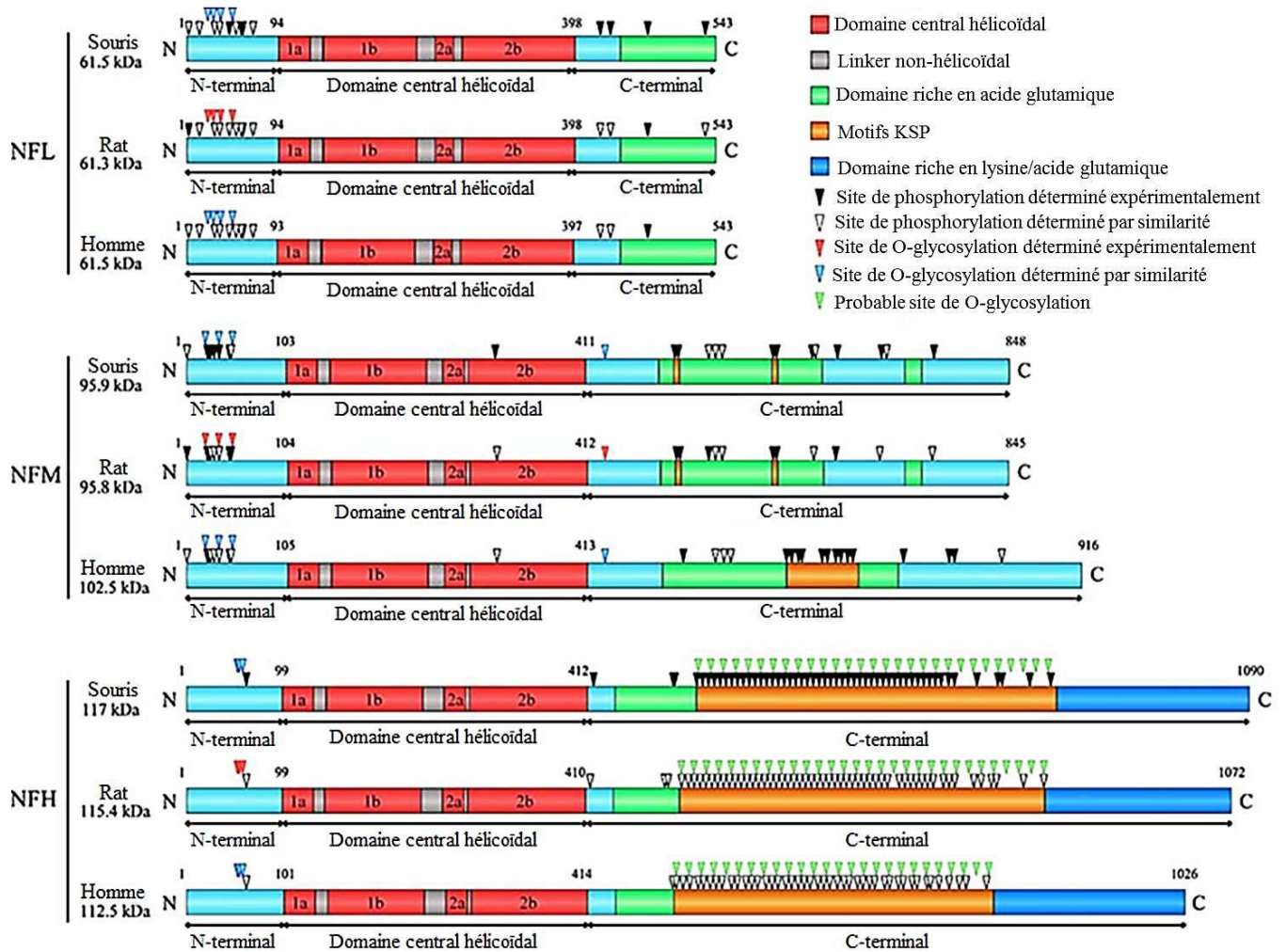
Dans les cellules du système nerveux central, plusieurs FI sont exprimés selon le développement et la localisation des cellules, tels que la GFAP et la vimentine (de type III), la nestine, l' $\alpha$ -internexine, la synémine, et les NF (de type IV).

##### 1.4.6.1. Les neurofilaments

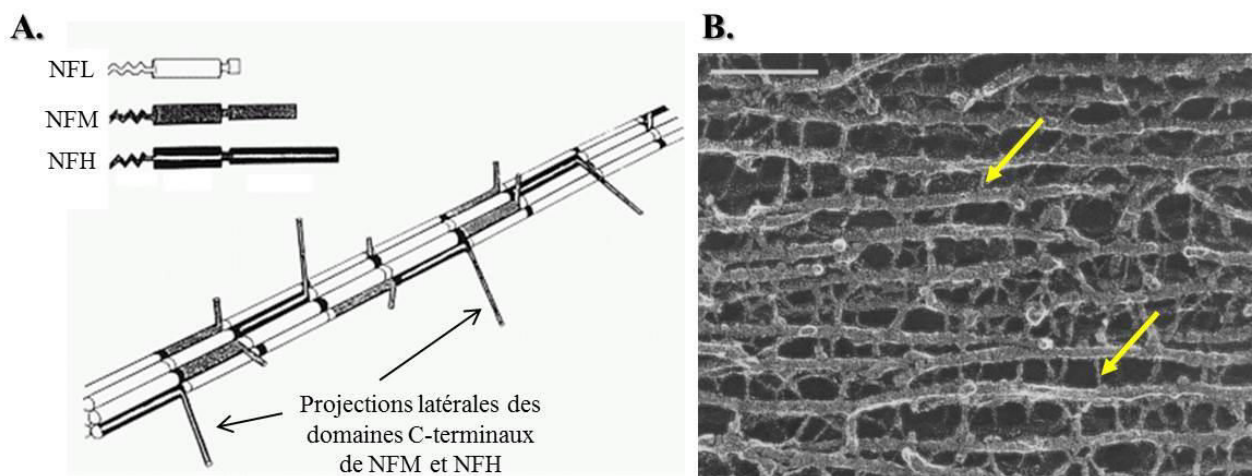
Dans les neurones adultes, les NF sont les FI les plus abondants. Ils sont composés de trois sous-unités, légère, moyenne et lourde (NFL (68 kDa), NFM (160 kDa) et NFH (205 kDa), respectivement) (**Figure 10**). Chez l'Homme, les gènes codant pour NFL et NFM (*NEFL* et *NEFM*) sont étroitement liés sur le chromosome 8 (8p21), alors que le gène codant pour NFH (*NEFH*) est localisé sur le chromosome 22 (22q12.2). L'expression des trois sous-unités des NF est régulée pendant le développement du système nerveux, et est spécifiquement associée à la différenciation neuronale. Après formation des axones, NFL est la première sous-unité à être exprimée, avec l' $\alpha$ -internexine et la périphérine, puis est rapidement suivie de l'expression de NFM. Après la synaptogenèse, l'expression de NFH est associée à une augmentation de l'expression de NFL et NFM (Carden et al., 1987 ; Nixon et Shea, 1992).

Après leur synthèse dans le corps cellulaire des neurones matures, l'assemblage des sous-unités des NF débute par la dimérisation de NFL, avec NFM ou NFH, au niveau des domaines centraux. Puis la polymérisation des NF se poursuit par la formation de tétramères antiparallèles et de protofilaments qui s'unissent pour former un NF, comme présenté précédemment (**Figure 8**) (Czosnek et al., 1980 ; Heins et al., 1993). Les domaines C-terminaux de NFM et NFH se projettent latéralement par rapport au NF, pour interagir avec d'autres éléments du cytosquelette, des organites ou des protéines, et ainsi permettre la stabilisation du réseau de NF (**Figure 11**) (Hirokawa et al., 1984).

Comme tous les FI, les NF subissent des modifications post-traductionnelles, notamment par phosphorylation ou glycosylation (**Figure 10**). L'état de phosphorylation des NF permet de réguler leur assemblage, leur interaction avec les MT et permet de contrôler la vitesse du transport axonal et le calibre des axones (Sihag et al., 2007). La glycosylation des NF régule leur stabilité, leur localisation cellulaire et les interactions protéiques (Slawson et Hart, 2003).



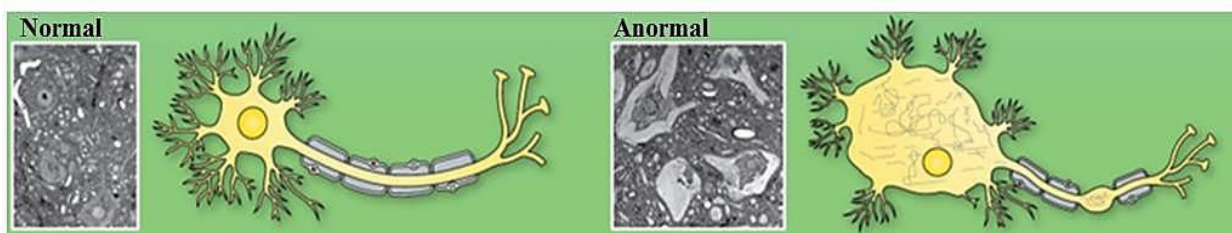
**Figure 10 : Représentation schématique des différentes sous-unités des neurofilaments (NFL, NFM et NFH), chez la souris, le rat et l'Homme (source : Perrot et al., 2008).**



**Figure 11 : Neurofilaments : (A) Assemblage des trois sous-unités des neurofilaments. (B) Réseau de neurofilaments axonaux et leurs ponts transversaux, observés en microscopie électronique (modifiées d'après les sources : Nixon et Sihag, 1991 ; Hirokawa et al., 1984).**

Les NF sont les constituants majeurs des cellules du système nerveux et plus particulièrement des neurones dans lesquels ils jouent de multiples rôles. Les NF sont essentiels à la croissance et au maintien du calibre des axones. Chez un modèle de souris transgéniques NFH-LacZ, qui expriment une protéine de fusion NFH- $\beta$ -galactosidase, les NF sont sous forme d'agrégats dans le péricaryon, et induisent une réduction de 50% du calibre des axones (Eyer et Peterson, 1994). En favorisant la croissance axonale, les NF régulent également la conduction axonale, en augmentant la vitesse de l'influx nerveux, et en contrôlant la longueur entre les nœuds de Ranvier (Perrot et al., 2007).

Des mutations et une accumulation anormale des NF, dans le corps cellulaire et ou les axones, sont associées à de multiples pathologies humaines neurodégénératives, dans lesquelles la dynamique du cytosquelette des axones et le transport axonal peuvent être affectés (**Figure 12**).



**Figure 12 : Agrégation de neurofilaments dans le corps cellulaire d'un neurone dans des conditions pathologiques, comparé à un neurone normal** (Yuan et al., 2012).

#### 1.4.6.2. La GFAP

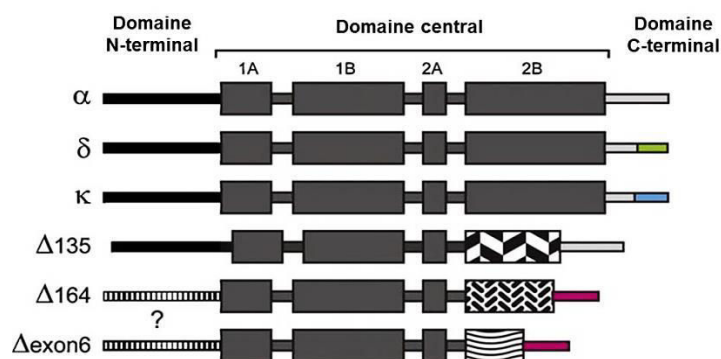
La GFAP (50 kDa) est le principal FI des astrocytes, en plus de la vimentine, de la nestine et de la synémine. Elle est codée chez l'Homme par le gène *GFAP* localisé sur le chromosome 17 (17q21). Le domaine central de la GFAP est plus court (environ 35 acides aminés) et contient moins d'acides aminés basiques (arginine) et acides (acide glutamique) que les autres FI de type III (Szeverenyi et al., 2008).

La GFAP est le FI majeur des astrocytes matures. Pendant le développement embryonnaire, l'expression initiale de la GFAP commence dans la glie radiaire au niveau de la zone ventriculaire, où sont aussi exprimées la vimentine et la nestine. Après formation de la zone sous-ventriculaire, les progéniteurs continuent d'exprimer la GFAP jusqu'à l'âge adulte, alors que dans la zone ventriculaire l'expression de la GFAP disparaît avant la naissance. Son

expression augmente pendant la maturation et la différenciation des progéniteurs tandis que celle de la vimentine et de la nestine diminue dans la plupart des astrocytes. Chez l'Homme, l'expression de la GFAP augmente progressivement avec l'âge. L'expression augmente fortement lorsque les astrocytes s'élargissent, signes d'une réaction astrocytaire due à des lésions cérébrales et à une neurodégénérescence associées au vieillissement.

Comme tous les FI, la GFAP peut subir plusieurs modifications post-translationnelles. Il a été identifié 6 sites de phosphorylation (Thr7, Ser8, Ser13, Ser1 et Ser 34) sur le domaine central et un site de phosphorylation sur le domaine C-terminal, qui régulent l'assemblage de la GFAP et sa redistribution pendant le cycle cellulaire. La glycosylation a également été décrite comme pouvant influencer la structure et les propriétés de la GFAP.

Différentes sous-populations d'astrocytes ont été identifiées et classées selon leur expression spatio-temporelle et selon l'expression spécifique d'isotypes de GFAP, qui diffèrent par leur domaine C-terminal. Chez l'Homme, 8 isotypes ont été identifiés : GFAP $\alpha$ , GFAP $\delta$ , GFAP $\kappa$ , GFAP $\Delta$ 135, GFAP $\Delta$ 164 et GFAP $\Delta$ exon6 (**Figure 13**).



**Figure 13 : Structure des différents isotypes de GFAP**

(d'après Middeldorp et Hol, 2011).

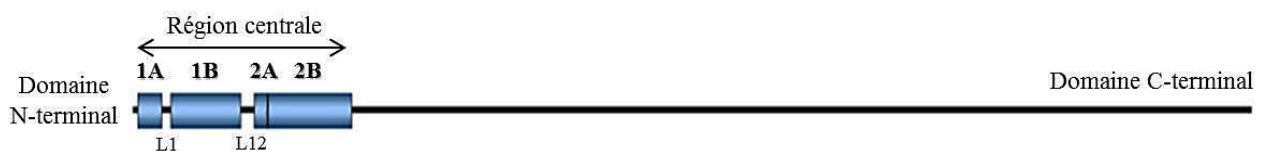
A part la GFAP $\alpha$ , les autres isotypes sont incapables de s'auto-assembler. Les formes les plus étudiées sont la GFAP $\alpha$ , l'isotype prédominant, et la GFAP $\delta$  qui est exprimée de façon spécifique par les astrocytes de la zone sous-ventriculaire, qui sont qualifiés de cellules souches neurales dans le cerveau adulte. Cet isotype est également exprimé au niveau du flux rostral migratoire et des bulbes olfactifs, deux régions qui font partir de la voie neurogénique mise en évidence dans le cerveau de rongeurs. Les gliomes, tumeurs cérébrales dérivant d'astrocytes et qui se développent souvent à proximité de régions neurogènes, expriment aussi la GFAP $\delta$ . Dans une autre niche neurogène, au niveau du canal épendymaire de la moelle

épinière, les astrocytes bordant ce canal expriment la GFAP $\delta$ , qui serait donc caractéristique de cellules souches ou progéniteurs.

La GFAP comme d'autres FI jouent un rôle dans de multiples processus cellulaires au sein du système nerveux central, comme la motilité/migration, la prolifération, le trafic vésiculaire, l'autophagie, les interactions et les échanges entre astrocytes et neurones (croissance neuronale, plasticité synaptique, myélinisation, métabolisme glutamate-glutamine), l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, ou encore la neuroprotection (Middeldorp et Hol, 2011 ; Thomsen et al., 2013).

#### 1.4.6.3. La nestine

La nestine (177 kDa) est codée par le gène *NES* identique chez la souris, le rat et l'Homme. Elle est caractérisée par un domaine N-terminal très court (8 acides aminés) et un domaine C-terminal long (1308 acides aminés) qui est la cible de phosphorylation, notamment sur le résidu Thr316 (**Figure 14**) (Szeverenyi et al., 2008 ; Gilyarov, 2008). Le court domaine N-terminal ne permet pas à la nestine seule de former des filaments. L'assemblage de la nestine se fait avec d'autres FI, comme la vimentine et l' $\alpha$ -internexine. Sur le domaine C-terminal, un faible taux de phosphorylation est associé à l'assemblage des filaments, alors qu'un taux élevé est lié au désassemblage des filaments, comme pendant la mitose. Le domaine C-terminal participe également aux interactions de la nestine avec les autres constituants du cytosquelette, qui peuvent être altérées par phosphorylation sur des résidus sérine. La nestine stabilise ainsi la structure cellulaire et participe à la dynamique intracellulaire, notamment dans le cas de cellules en migration ou qui se divisent (Gilyarov, 2008).



**Figure 14 : Structure de la nestine** (d'après Szeverenyi et al., 2008).

La nestine est un marqueur des cellules souches et des progéniteurs dans le système nerveux central. Pendant le développement embryonnaire, elle est exprimée par différents types cellulaires, puis son expression diminue pendant la période post-natale. Dans le cerveau adulte, la nestine est peu détectée puisqu'elle n'est exprimée que dans certaines régions, dites

neurogènes, comme la zone sous-ventriculaire et le gyrus denté de l'hippocampe, où sont logées les cellules souches neurales. Chez l'adulte, une augmentation de l'expression de la nestine a été observée dans différentes conditions pathologiques (épilepsie, inflammation, lésions cérébrales traumatiques, ischémies, tumeurs, ...), notamment dans les astrocytes réactifs qui sont impliqués dans la neuroprotection (Gilyarov, 2008).

Récemment, Nes-S, la première isoforme de la nestine a été découverte chez le rat dans les neurones ganglionnaires de la racine dorsale, au stade post-natal et jusqu'à l'âge adulte. Cette isoforme s'assemble avec la périphérine et les NF, essentiellement dans les neurones sensoriels et moteurs (Su et al., 2013).

#### 1.4.6.4. La vimentine

La vimentine (54 kDa) est codée par le gène *VIM*. Pendant le développement embryonnaire, la vimentine est exprimée dans toutes les cellules épithéliales puis, dans les neurones elle est progressivement remplacée par les NF. Chez l'adulte, les NF et la vimentine ne co-existent que dans les cellules horizontales de la rétine. Dans le cerveau adulte, la vimentine est exprimée dans les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épendymaires et les astrocytes (Schnitzer et al., 1981 ; Cochard et Paulin, 1984 ; Minin et Moldaver, 2008).

La partie N-terminale de la vimentine joue un rôle important dans l'assemblage et la stabilisation des filaments. Il a été montré que la vimentine, assemblée ou non, est capable de se déplacer dans le cytoplasme à la fois vers la membrane cellulaire et vers le noyau. Les mouvements de la vimentine se font le long des MT. Associée à la kinésine, la vimentine se déplace vers l'extrémité (+) des MT et vers la membrane cellulaire, alors que lorsqu'elle est associée à la dynéine et à la dynactine, la vimentine se déplace vers l'extrémité (-) des MT et vers le noyau.

Ses interactions avec les autres constituants du cytosquelette se font également par l'intermédiaire d'IFAP (« intermediate filament-associated proteins »), comme la plectine. La vimentine interagit également avec des organelles pour réguler leur distribution intracellulaire, comme l'appareil de Golgi ou les vésicules d'endosomes via la protéine adaptatrice AP-3.

Comme pour la plupart des FI, l'assemblage et la fonction de la vimentine sont régulés par phosphorylation. Pour la vimentine, un même acide aminé peut être phosphorylé par différentes protéines kinases. Pendant la division cellulaire, la phosphorylation de la vimentine par la protéine kinase cdc2 (« cyclin-dependent kinase2 ») induit le désassemblage des filaments. La séparation des deux cellules filles requière la phosphorylation de la vimentine sur les résidus Ser38 et Ser71 par la kinase Rho, et sur la Ser72 par la kinase Aurora B. De plus, la phosphorylation des résidus Ser38 et Ser72 par la protéine kinase A permet de maintenir l'équilibre entre les formes polymérisées et solubles de la vimentine (Minin et Moldaver, 2008).



## **Chapitre 2: Maladies neurodégénératives et tumeurs du système nerveux central**

### **2.1. Maladies neurodégénératives et autres altérations neurologiques**

Dans les systèmes nerveux central et périphérique, les composants du cytosquelette les plus abondants sont les filaments intermédiaires, notamment dans les axones myélinisés, puisqu'ils jouent un rôle important dans la physiologie et la dynamique axonales. Plusieurs maladies neurodégénératives humaines sont caractérisées par une altération du transport axonal et une accumulation anormale de ces filaments intermédiaires (**Tableau 5**). Ainsi, les altérations du métabolisme, de l'organisation et de l'expression des filaments intermédiaires sont fréquemment associées à des neuropathologies et à des cancers, de façon directe ou indirecte. En effet, les altérations des filaments intermédiaires pourraient représenter une conséquence pathologique du dysfonctionnement neuronal, mais pourraient aussi être la cause du processus de neurodégénérescence. Dans le but de mieux diagnostiquer les atteintes neurologiques, plusieurs études montrent que les altérations de l'expression ou de l'état de phosphorylation des filaments intermédiaires peuvent servir de biomarqueurs pour évaluer la progression des traumatismes neurologiques et identifier les cellules affectées.

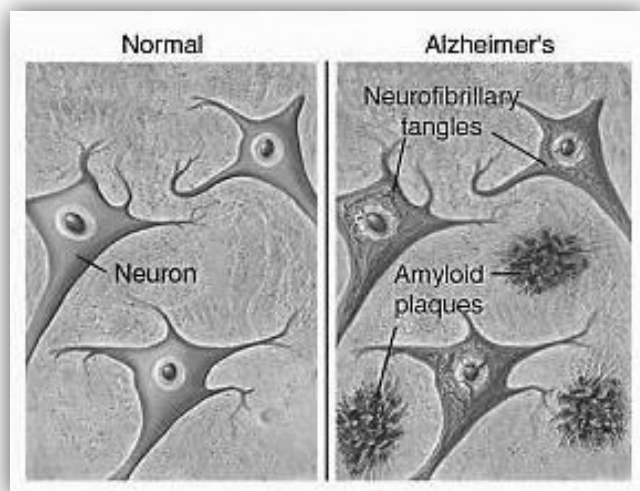
#### 2.1.1. Maladies neurodégénératives et dégénérescence axonale

##### 2.1.1.1. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus commune, avec en France une prévalence d'environ 0.5% avant 65 ans, 2-4% entre 65 et 80 ans, et 15% après 80 ans (**Tableau 5**). La maladie d'Alzheimer représente la forme de démence la plus répandue, associée à une neurodégénérescence responsable d'une détérioration cognitive progressive et d'une perte excessive de la mémoire.

Elle est caractérisée par la présence de plaques d'amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires (« neurofibrillary tangles » NFT) dans le corps cellulaire des neurones (Hardy, 2006) (**Figure 15**). Ces NFT sont des agrégats intracellulaires de la protéine tau hyper-phosphorylée impliquée dans la stabilisation des MT, et des NF hyper-phosphorylés (Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Wang et al., 2001 ; Rudrabhatla et al., 2010). La phosphorylation anormale des NF et leur accumulation pourraient être dues à une augmentation de la

phosphorylation des domaines KSP (lysine-sérine-proline) et à une diminution de la O-N-acétylglucosaminylation de la sous-unité NFM. Ces phénomènes pourraient être liés à une déficience du métabolisme et de l'entrée du glucose dans le tissu cérébral (Deng et al., 2008).



**Figure 15 : Représentation des plaques d'amyloïdes et des NFT de neurones dans le cas de la maladie d'Alzheimer, comparé aux neurones dans un tissu sain.**

<http://www.brightfocus.org/alzheimers>

De plus, dans les régions neurogéniques du cerveau, des changements dans l'expression de la nestine et d'autres marqueurs neurogéniques seraient associés à des stades tardifs de la maladie d'Alzheimer (Perry et al., 2012). Enfin, de récentes études ont montré une augmentation des isotypes de GFAP  $\alpha$  et  $\delta$  dans les astrocytes proches des plaques d'amyloïdes, associée à la progression de la maladie (Kamphuis et al., 2014).

#### 2.1.1.2. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire. Les trois principaux symptômes sont une akinésie, une hypertonie musculaire, et des tremblements au repos. La caractéristique pathologique est la formation de corps de Lewy dans les neurones dégénérés. Ces agrégats sont composés d' $\alpha$ -synucléine, de sous-unités des NF, d'ubiquitine et de sous-unités du protéasome (**Tableau 5**) (Galloway et al., 1992 ; Spillantini et al., 1998). Dans ces agrégats, les NF sont anormalement phosphorylés, comme dans la maladie d'Alzheimer, et sont associés à une diminution du taux d'ARNm et des protéines des sous-unités NFL et NFH (Baner et al., 1989 ; Hill et al., 1993 ; Basso et al., 2004). Des mutations du gène *NEFM*, codant pour la sous-unité NFM, ont été mises en évidence chez des patients franco-canadiens ayant développé la maladie très jeune (vers 16 ans) (Lavedan et al., 2002). Cependant, cette mutation n'affecte pas

l'assemblage et la distribution des NF *in vitro* (Pérez-Ollé et al., 2004). De plus, dans des formes sporadiques et familiales de patients d'origine germanique et atteints de Parkinson, aucune mutation des gènes *NEFM* et *NEFL* n'a été identifiée (Kruger et al., 2003). Ainsi, les mutations des gènes codant pour les NF ne semblent pas être la première cause de la maladie.

De plus, il a été démontré que la maladie de Parkinson ne touche pas seulement le système nerveux central mais aussi le système nerveux entérique, avec la présence de corps de Lewy dans les neurones entériques chez la plupart des patients atteints. De récents travaux ont montré une augmentation anormale de la GFAP $\kappa$  (principale isotype exprimé dans ces cellules), et une réduction de la phosphorylation sur le résidu Ser13 dans les cellules gliales entériques qui avoisinent les neurones. Ces résultats suggèrent une réactivité des cellules gliales entériques chez les patients souffrant de Parkinson, qui n'est pas observée dans d'autres syndromes parkinsoniens (paralysie supranucléaire progressive « PSP », atrophie multisystémique « AMS ») (Clairembault et al., 2014).

#### 2.1.1.3. Sclérose latérale amyotrophique

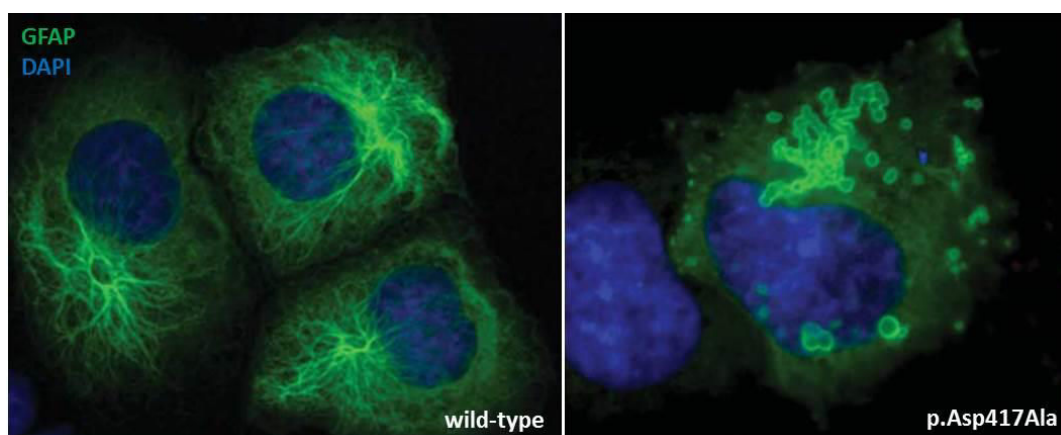
La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie des motoneurones la plus fréquente chez l'adulte, avec une prévalence de 5.2 pour 100 000 habitants, en Europe. Elle est caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurones centraux et périphériques, associée à un déficit moteur avec paralysie partielle ou totale, mais sans altération des fonctions cognitives (**Tableau 5**) (Strong et al., 1991 ; Corbo et Hays, 1992). La SLA est de forme sporadique dans 90% des cas, ou familiale. En l'absence de traitement, la mort survient 3 à 5 ans après le début des symptômes.

La SLA est caractérisée par des agrégats de filaments intermédiaires, avec formation de sphéroïdes axonaux et accumulation péri-karyale de périphérine et de NF hyper-phosphorylés (Manetto et al., 1988). Malgré la mise en évidence de mutations du gène *NEFH* et du gène codant pour la périphérine dans des formes de SLA, il semble que l'accumulation axonale des NF ne soit pas la cause directe de la dégénérescence des motoneurones (Figlewicz et al., 1994 ; Eyer et al., 1998 ; Gros-Louis et al., 2004). Les agrégats de filaments intermédiaires pourraient être dus à leurs modifications post-translationnelles anormales, leur stœchiométrie altérée, ou à l'altération du transport axonal (Perrot et Eyer, 2009).

#### 2.1.1.4. Maladie d'Alexander

La maladie d'Alexander est un trouble neurologique caractérisé chez les nourrissons par des crises, un retard de développement psychomoteur et une macrocéphalie (type I), et chez l'adulte par une ataxie cérébelleuse, un syndrome bulbaire et une spasticité (type II).

La caractéristique pathologique de cette maladie est la présence de fibres de Rosenthal dans les astrocytes, qui correspondent à des inclusions cytoplasmiques contenant la GFAP, la Hsp27 (« heat shock protein 27 »), et l' $\alpha\beta$ -crystalline (**Tableau 5**). A ce jour, environ 100 mutations du gène codant pour GFAP ont été recensées chez des patients atteints de la maladie d'Alexander. Ces mutations sont responsables de l'altération de l'assemblage et de la solubilité des filaments, elles favorisent la formation des agrégats de GFAP, et dégradent la fonction des protéasomes dans les astrocytes et le métabolisme du glutamate entre les neurones et les astrocytes (Brenner et al., 2001 ; Chen et al., 2011 ; Yoshida et Nakagawa, 2012). De récents travaux montrent les agrégats de GFAP dans des cellules dépourvues de filaments intermédiaires endogènes (SW13vim<sup>-</sup>), après transfection d'une forme mutée de GFAP, alors qu'en absence de mutation, le réseau de GFAP est bien organisé (**Figure 16**) (Messing et al., 2012). Récemment des études ont mis en évidence la présence de synémine dans les fibres de Rosenthal ainsi que dans les astrocytes réactifs environnants (Pekny et al., 2014).



**Figure 16 : Expression de la GFAP dans des cellules SW13vim<sup>-</sup> transfectées avec un vecteur exprimant la forme sauvage de la GFAP humaine (wild-type) ou une forme mutée de la GFAP (p.Asp417Ala) identifiée chez des patients atteints de la maladie d'Alexander (Messing et al., 2012).**

#### 2.1.1.5. Maladies de Charcot-Marie-Tooth

Les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) regroupent un ensemble hétérogène de pathologies neurologiques génétiques, qui affectent à la fois les neurones moteurs et sensitifs. Elles sont caractérisées par une neuropathie chronique progressive, une faiblesse et une atrophie des muscles distaux, et une perte sensorielle légère (**Tableau 5**).

Les maladies de CMT sont divisées en deux groupes selon des critères cliniques. Le groupe CMT1 représente une myélinopathie avec une diminution de la vitesse de conduction nerveuse motrice, alors que le groupe CMT2 correspond à une axonopathie avec une vitesse de conduction nerveuse normale (Züchner et Vance, 2006).

Plusieurs mutations du gène *NEFL*, codant pour NFL, ont été identifiées chez des patients atteints. Une mutation perte de fonction de ce gène serait responsable de CMT de forme autosomale récessive, alors qu'une mutation gain de fonction serait associée à une forme autosomale dominante (Reilly, 2009). Les mutations du gène *NEFL* sont liées à une altération de l'assemblage et du transport des neurofilaments, qui s'accumulent anormalement dans le corps cellulaire des neurones, mais également à une altération du transport axonal des mitochondries (Brownlee et al., 2002 ; Pérez-Ollé et al., 2005 ; Gentil et al., 2012).

#### 2.1.1.6. Autres altérations neurologiques

Des variations de l'expression des filaments intermédiaires peuvent aussi être associées à d'autres altérations neurologiques.

Dans le cas de la neuropathie à axones géants (GAN), une accumulation anormale de filaments intermédiaires a été observée. Cette maladie neurodégénérative progressive très rare, qui affecte à la fois les nerfs périphériques et le système nerveux central, débute très jeune avec des déficits moteurs (amyotrophie et faiblesse musculaire), puis évolue à l'adolescence par des déficits intellectuels (trouble de la parole, retard mental, épilepsie). Elle est due à des mutations du gène *GAN*, qui code pour la gigaxonine, une protéine ubiquitaire du cytosquelette, de la famille des BTB/kelch (**Tableau 5**) (Bomont et al., 2000 ; Dequen et al., 2008 ; Ganay et al., 2011 ; Mahammad et al., 2013).

De larges inclusions de filaments intermédiaires neuronaux de classe IV, et plus particulièrement l' $\alpha$ -internexine, ont été mises en évidence dans le corps cellulaire des neurones. Ces observations cytopathologiques sont caractéristiques de la maladie à inclusions neuronales de filaments intermédiaires (NIFID), définie par des changements du comportement et de la personnalité, une perte de mémoire, des troubles de la parole, une hyperréflexie, et une faiblesse motrice (**Tableau 5**) (Cairns et al., 2004 ; Uchikado et al., 2005).

Dans le cas d'une cataracte pulvérulente, caractérisée par une opacification du cristallin de l'œil, une augmentation anormale de l'expression de la vimentine a été observée chez certains patients (Joo et al., 1999). D'autres atteintes neurologiques, caractérisées par une dégénérescence axonale, ont été associées aux filaments intermédiaires. La polyneuropathie démyélinisante inflammatoire chronique, une maladie rare des nerfs périphériques, est associée à une accumulation périkaryale de NFH phosphorylée, et une diminution de la densité des NF (Nagamatsu et al., 1999 ; Fressinaud et Dubas, 2011).

Une étude récente a montré que les NF favorisent la survie, la prolifération et la différenciation des oligodendrocytes. Ces résultats suggèrent que dans le cas de sclérose en plaques, les neurofilaments retrouvés dans le compartiment extracellulaire pourraient participer à la régulation du processus de remyélinisation (Fressinaud et Eyer, 2013).

**Tableau 5 : Maladies neurodégénératives et filaments intermédiaires associés.**

Maladies neurodégénératives et altérations neurologiques	Prévalence européenne (/100 000) ou nombre de cas publiés	Symptômes	Caractéristiques pathologiques	Filaments intermédiaires associés	Mutations des gènes codant les filaments intermédiaires	Références
<b>Maladie d'Alzheimer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 500 (&lt; 65 ans)</li> <li>■ 2000-4000 (&lt; 80 ans)</li> <li>■ 15000 (&gt; 80 ans) (en France)</li> </ul>	Démence, détérioration cognitive progressive, et perte excessive de la mémoire.	Plaques d'amyloïdes et NFT	NF	—	Hardy 2006; Rudrabhatla et al., 2010
<b>Maladie de Parkinson</b>	15 *	Akinésie, hypertonie musculaire, et tremblements au repos.	Corps de Lewy	NF	Cas isolés de mutations du gène NEFM (sans d'implication directe avec la maladie).	Bancher et al., 1989; Lavedan et al., 2002
<b>Sclérose latérale amyotrophique</b>	5,2 *	Déficit moteur avec paralysie partielle ou totale, mais sans altération des fonctions cognitives.	Sphéroïdes axonaux et agrégats périkaryaux	NF, périphérine	Mutations du gène NEFH et du gène codant pour la périphérine NEFM (sans d'implication directe avec la maladie).	Strong et al., 1991; Corbo et Hays 1992; Manetto et al., 1988; Figlewicz et al., 1994; Gros-Louis et al., 2004
<b>Maladie d'Alexander</b>	300 cas *	Type I (nourissons) : crises, retard de développement psychomoteur et macrocéphalie. Type II (adulte) : ataxie cérébelleuse, syndrome bulbaire et spasticité.	Fibres de Rosenthal	GFAP	> 100 mutations du gène codant GFAP	Brenner et al., 2001; Chen et al., 2011; Yoshida et Nakagawa 2012
<b>Charcot-Marie-Tooth</b>	22 *	Neuropathie chronique progressive, faiblesse et atrophie des muscles distaux, et perte sensorielle légère.	Agrégats protéiques	NF	Mutations du gène NEFL	Brownlees et al., 2002; Pérez-Ollé et al., 2005; Gentil et al., 2012
<b>Neuropathie à axones géants (GAN)</b>	20 familles *	Déficits moteurs (amyotrophie et faiblesse musculaire) et déficits intellectuels (trouble de la parole, retard mental, épilepsie)	Agrégats de filaments intermédiaires	NF, vimentine, périphérine, $\alpha$ -internexine	(Mutations du gène <i>GAN</i> qui code pour la gigaxonine → rôle dans la dégradation des filaments intermédiaires)	Dequen et al., 2008; Bonmont et al., 2000; Ganay et al., 2011; Mahammad et al., 2013
<b>Maladie à inclusions neuronales de filaments intermédiaires (NIFID)</b>	—	changements du comportement et de la personnalité, perte de mémoire, troubles de la parole, hyperréflexie, et faiblesse motrice	Inclusions de filaments intermédiaires	$\alpha$ -internexine et autres	—	Cairns et al., 2004; Uchikado et al., 2005

\* « Prévalence des maladies rares : Données bibliographiques », Les cahiers d'Orphanet, Série Maladies Rares, Novembre 2013, Numéro 1 : Classement par ordre alphabétique des maladies ou groupes de maladies  
[http://www.orpha.net/orphanet/cahiers/docs/FR/Prevalence\\_des\\_maladies\\_rares\\_par\\_ordre\\_alphabetique.pdf](http://www.orpha.net/orphanet/cahiers/docs/FR/Prevalence_des_maladies_rares_par_ordre_alphabetique.pdf)

## 2.1.2. Filaments intermédiaires comme biomarqueurs d'altérations neurologiques

Le diagnostic précoce des neuropathologies est souvent difficile (Hughes et al., 2002). En clinique, des études protéomiques du fluide cérébrospinal (FCS) ou appelé aussi liquide céphalo-rachidien, ont permis d'identifier de potentiels biomarqueurs de différentes altérations du système nerveux (inflammations, infections, processus de neurodégénérescence et de croissance tumorale). Le FCS est produit par les plexus choroïdes dans les ventricules cérébraux, et contient les protéines sécrétées par les cellules, potentielles sources de biomarqueurs. C'est aussi le liquide par lequel sont évacuées les molécules et les "déchets" provenant du cerveau (Zougman et al., 2008). Spécifiques d'un type cellulaire, ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour déterminer les différents stades des neuropathologies et le type de cellules affectées, en mesurant les taux de filaments intermédiaires dans le FCS et le sérum, représentatifs de lésions neuronales (Omary et al., 2004 ; Petzold et al., 2005).

### 2.1.2.1. Les neurofilaments

Plusieurs études montrent que les NF, et notamment leurs formes hyper-phosphorylées, sont des indicateurs de lésions axonales, de dégénérescence ou de perte neuronales (Petzold et al., 2005 ; Shaw et al., 2005). En effet, lors d'une dégénérescence axonale, le taux de NF libéré dans le FCS peut être quantifié, permettant ainsi d'évaluer le type et l'avancement de la neuropathologie impliquée (Petzold et al., 2003). Des taux élevés de NFL et NFH dans le FCS ont notamment été rapportés chez des patients atteints d'Alzheimer, de Parkinson, de sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou de sclérose en plaque, comparés à des patients sains (Petzold et al., 2007 ; Brettschneider et al., 2006 ; Abdo et al., 2007 ; Tortelli et al., 2012 ; Boylan et al., 2013 ; Malmeström et al., 2003) (**Tableau 6**).

La présence de NF dans le FCS permet également de différencier certains syndromes parkinsoniens atypiques avec la maladie de Parkinson classique. Par exemple, le taux de NFH dans le FCS est plus important chez des patients atteints de paralysie supranucléaire progressive (PSP, 2780 ng/L) ou d'atrophie multisystématisée (AMS, 3110 ng/L) que chez des patients parkinsoniens classiques (200 ng/L) (Brettschneider et al., 2006). Il en est de même pour le taux de NFL qui est plus élevé dans le cas d'AMS comparé à la maladie de Parkinson (Abdo et al., 2007). Les taux de NFL dans le FCS sont également variables entre différentes atteintes neurologiques. En effet, les taux de NFL sont plus importants chez des patients atteints de SLA (avec environ 5000 ng/L), que chez des patients atteints d'autres



maladies neurodégénératives (avec environ 1400 ng/L), comme la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence cortico-basale ou l'AMS (Tortelli et al., 2012) (**Tableau 6**).

Même si les variations des taux de NF dans le FCS ne sont pas suffisamment spécifiques à une maladie, ils représentent des indicateurs utiles de la sévérité et de la progression des lésions. Les taux de NF, retrouvés dans le sérum, sont notamment en relation avec l'âge et la progression de la maladie de Parkinson (Su et al., 2012). Dans le cas de SLA, les taux de NFL dans le FCS sont plus importants dans des formes progressives rapides que dans des formes progressives lentes de la maladie (Tortelli et al., 2012). Des résultats similaires ont été rapportés pour NFH, et notamment pour sa forme hyperphosphorylée, dont les taux élevés sont associés à une progression plus rapide de la SLA (Boylan et al., 2013) (**Tableau 6**).

La mesure des taux de NF dans le FCS peuvent également servir d'indicateurs intéressants lors d'un traitement chronique, par stimulations du noyau sous-thalamique, chez des patients atteints de Parkinson, dans le but de vérifier l'absence de lésions suite à de telles stimulations (Constantinescu et al., 2011).

L'ensemble de ces travaux suggèrent ainsi l'intérêt clinique et thérapeutique de ces biomarqueurs pour améliorer le diagnostic et les traitements de maladies neurodégénératives.

#### 2.1.2.2. Les gliofilaments

Un autre biomarqueur, la GFAP, a été retrouvé en quantité plus importante dans le sérum de patients parkinsoniens comparé à un groupe de patients sains, sans corrélation avec l'âge ou la progression de la maladie (Su et al., 2012). En revanche, dans le cas de la sclérose en plaque, le taux de GFAP est un potentiel indicateur de la progression de la maladie, puisque son élévation est corrélée à l'âge et aux handicaps neurologiques qu'engendre cette maladie (Axelsson et al., 2011). La GFAP pourrait également représenter un marqueur potentiel du degré de sévérité de la maladie d'Alexander. Dans des modèles de souris de cette maladie ( $Gfap^{R236H/+}$ ,  $Gfap^{R76H/+}$ ,  $Gfap^{Tg}$ ), des taux élevés de GFAP dans le FCS ont été mesurés comparés à des animaux contrôles (Jany et al., 2013) (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Neurofilaments et GFAP comme biomarqueurs de maladies neurodégénératives**  
(modifié d'après revue : Lépinoux-Chambaud et Eyer, 2013).

Filaments intermédiaires		Neuropathologies associées		Filaments intermédiaires comme biomarqueurs		Méthodes	Valeurs	Références
<b>Neurofilaments (NFL, NFM, NFH)</b>								
	Alzheimer	Augmentation du taux de NFL et NFH dans le FCS.	ELISA (anticorps monoclonaux de souris anti-NFL et anti-NFH)	Taux NFL > 241 ng/L Taux NFH > 170 ng/L			Petzold (2007)	
Syndromes parkinsoniens		Taux de NFH dans le FCS plus élevée dans PSP et AMS que dans la maladie de Parkinson.	ELISA (anti-NFHphospho-épitope SMI 135)	Taux NFH (médianes) : AMS = 3110 ng/L > PSP = 2780 ng/L Parkinson = 200 ng/L > groupe contrôle = 100 ng/L			Brettschneider (2006a); Abdo (2007)	
		Augmentation du taux de neurofilaments dans le sérum liée à l'âge et à la durée de la maladie.	ELISA	Coefficient de corrélation de 0,739 avec la durée de la maladie et de 0,433 avec l'âge			Su (2012)	
Sclérose latérale amyotrophique (SLA)		Augmentation du taux de NFL et NFH dans le FCS (plus dans la SLA que dans la maladie d'Alzheimer), associée à une progression plus rapide de la maladie.	ELISA (anti-NFL et anti-NFH phosphorylé)	Taux de NFL : forme progressive lente = 2399 ng/L forme progressive rapide = 9285 ng/L Taux NFHp = 4380 ng/L			Tortelli (2012); Boylan (2013)	
Sclérose en plaque		Augmentation du taux de NFL dans le FCS, associée à des rechutes aigües.	ELISA	Taux de NFL : Groupe contrôle < 125 ng/L Patients atteints = 265 ng/L et > 1700 ng/L avec rechutes aigües			Lycke (1998); Semra (2002); Malmeström (2003)	
<b>GFAP</b>								
Parkinson		Augmentation du taux de GFAP dans le sérum, non corrélée avec l'âge et la progression.	ELISA	Taux de NF : Groupe contrôle = 25 ng/L Patients atteints = 1628 ng/L			Su (2012)	
Maladie d'Alexander		Augmentation du taux de GFAP dans le FCS, comme indicateur de sévérité.	ELISA (à partir de FCS de modèles animaux)	Taux de GFAP : Groupe contrôle = 354 ng/L Modèles animaux de la maladie : de 1200 ng/L à plus de 46000 ng/L			Jany (2013)	
Sclérose en plaque		Augmentation du taux de GFAP dans le FCS, associée à l'âge, au handicap neurologique et à la progression de la maladie.	ELISA	Taux de GFAP : Groupe contrôle = 358 ng/L Patients atteints = 561 ng/L			Axelsson (2011)	

FCS: fluide cérébrospinal ; PSP: paralysie supranucléaire progressive ; AMS: atrophie multisystématisée ; SLA: sclérose latérale amyotrophique.

## 2.2. Tumeurs du système nerveux central

### 2.2.1. Quelques chiffres

Selon l'Institut National du Cancer, les tumeurs du système nerveux central sont classées aux 13<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> rangs chez l'adulte, avec une incidence de 1.4 % des nouveaux cas de cancers en France en 2012. Chez l'adulte, les cancers les plus fréquents sont les cancers de la prostate (28.4 %) et du sein (31.5 %), le cancer du poumon (14.1 % chez l'homme et 7.3 % chez la femme), et le cancer du côlon/rectum (11.6 % chez l'homme et 12.2 % chez la femme).

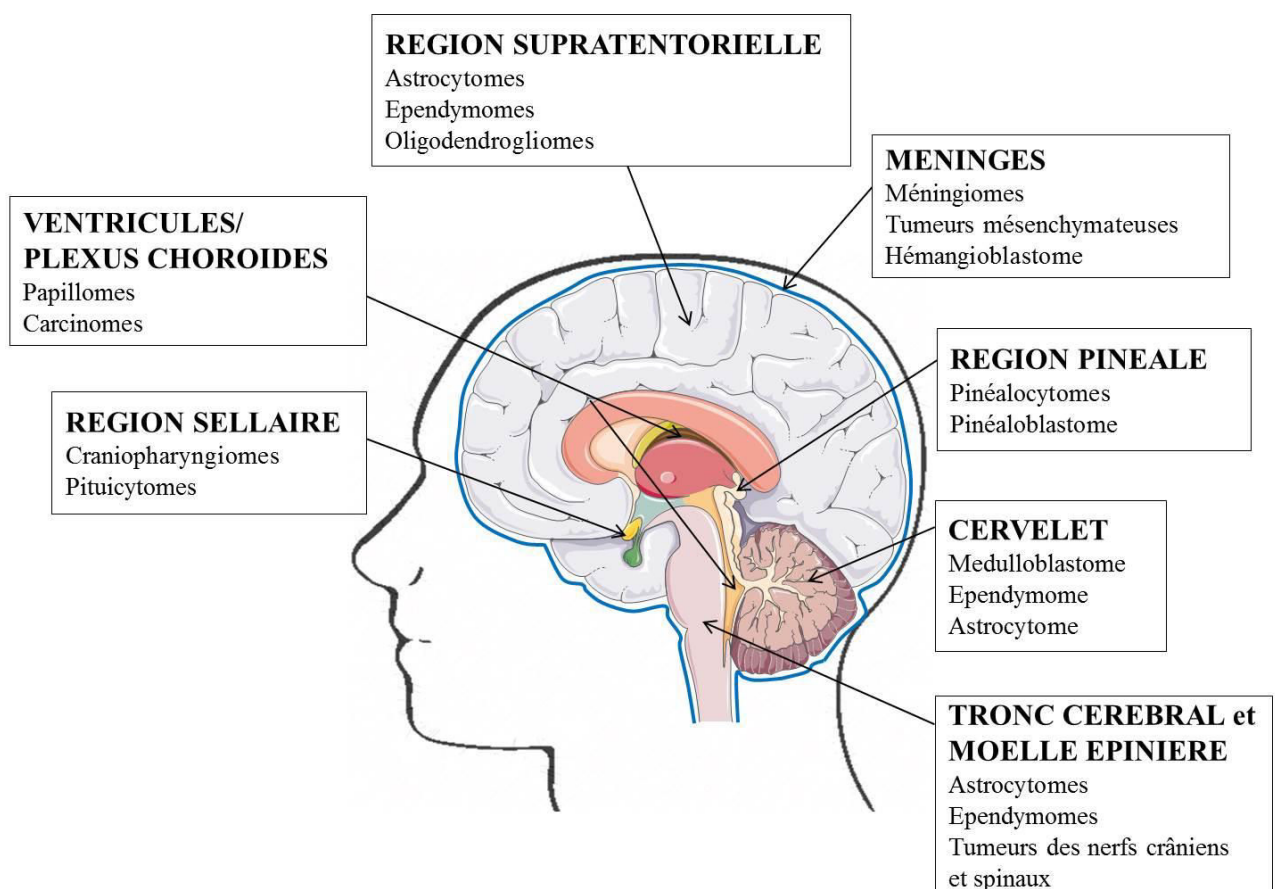
Chez les adolescents (15-19 ans), les tumeurs du système nerveux central représentent 8 % des cancers après les lymphomes hodgkiniens (22 %), les leucémies aiguës (12 %), et les cancers de la thyroïde (9 %). Cependant, dans cette tranche d'âge, elles font partie des tumeurs de plus mauvais pronostic avec les leucémies aiguës et les tumeurs osseuses.

Les tumeurs du système nerveux central sont le type de cancer le 2<sup>ème</sup> plus fréquent chez les enfants de moins de 15 ans (24 % des cas) après les leucémies (29 % des cas), et représentent le principal responsable de décès chez les enfants (38 % de décès), avant la leucémie (19 %) et les sarcomes des os et des tissus mous (12%) (INCa, ©Les cancers en France en 2013).

### 2.2.2. Classification des tumeurs du système nerveux central

La classification histologique de référence des tumeurs du système nerveux central est celle établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), dont la première édition date de 1979-80, révisée depuis 2007 (Zülch, 1980 ; Louis et al., 2007). Cette classification internationale regroupe les tumeurs selon leur grade de malignité (de 0 à IV). Le grade 0 correspond au tissu sain, le grade I à des tumeurs bénignes, le grade II à des tumeurs de bas grade ou pré-malignes, et les grades III et IV à des tumeurs anaplasiques malignes et très malignes, respectivement.

L'ensemble des tumeurs du système nerveux central est également classé par l'OMS, en fonction de la localisation tumorale et des structures touchées. Les différentes catégories répertoriées sont les tumeurs neuroépithéliales, les tumeurs des nerfs crâniens et spinaux, les tumeurs des méninges, les lymphomes et tumeurs hématopoiétiques, les tumeurs des cellules germinales, les tumeurs de la région sellaire, et enfin les tumeurs métastatiques (**Tableau 7 et Figure 17**). La plupart des tumeurs du cerveau sont dites primaires car elles sont issues de cellules saines du système nerveux, qui se multiplient de façon anarchique, à l'exception des tumeurs métastatiques, dites secondaires, qui sont issues de métastases provenant d'un autre organe atteint.



**Figure 17 : Localisation des tumeurs du système nerveux central selon différentes régions cérébrales.**

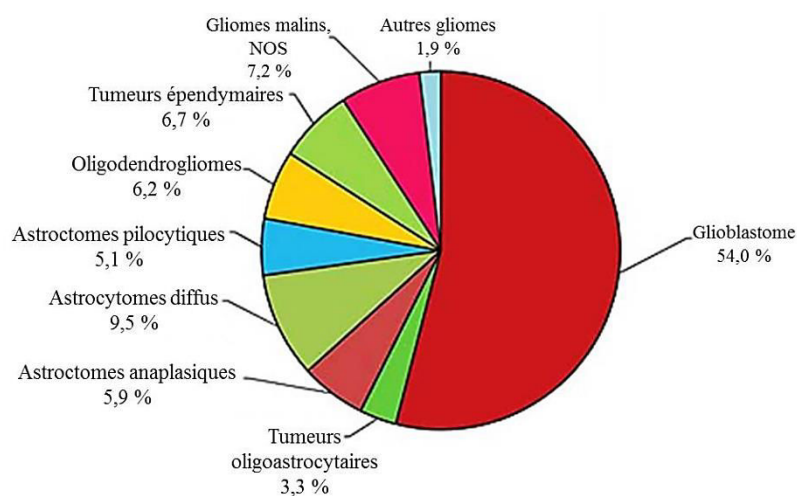


### 2.2.3. Les gliomes

Parmi les tumeurs du système nerveux central, les plus fréquentes sont les gliomes, puisqu'ils représentent plus de 50% des tumeurs primaires cérébrales chez l'adulte. Les gliomes sont issus du tissu de soutien et regroupent les tumeurs astrocytaires, oligodendrogiales, oligoastrocytaires, et épendymaires (**Tableau 7**). En opposition aux gliomes bénins, les gliomes de bas grade (II) ou malins (grades III et IV) sont infiltrants et siègent essentiellement dans les hémisphères cérébraux. Les facteurs de risque sont mal connus, mais plusieurs anomalies génétiques associées à des facteurs environnementaux (dont les ondes électromagnétiques) seraient responsables du développement de ces tumeurs. Les gliomes malins sont des tumeurs hétérogènes à la fois dans l'apparence et dans l'expression génique. L'incidence annuelle chez les caucasiens et les asiatiques est d'environ 6 pour 100 000. Les gliomes sont plus fréquents chez les hommes que chez les femmes.

La survie moyenne de gliomes de haut grade est de 35 % chez des enfants de moins de 15 ans, celle des astrocytomes (le plus souvent pilocytiques) est de 87 %, et celle des médulloblastomes de 65 %.

Selon CBTRUS (« Central brain tumor registry of the United States »), la forme de gliome la plus fréquente est le glioblastome (grade IV) (**Figure 18**). C'est aussi la forme la plus agressive avec une médiane de survie entre 12 et 15 mois. Il est caractérisé par une activité mitotique importante, une vascularisation anormale et de la nécrose (Figarella-Branger et al., 2008 ; Hofer et al., 2014 ; INCa, ©Les cancers en France en 2013).



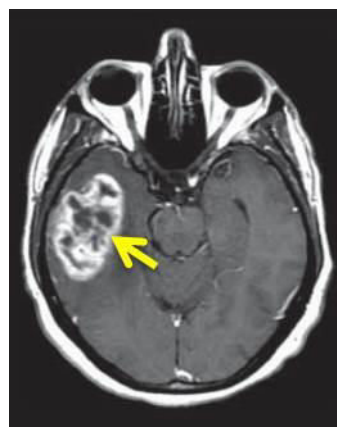
**Figure 18 : Distribution des gliomes selon les données de CBTRUS entre 2005 et 2009**

(Dolecek et al., 2012).

### 2.2.3.1. Symptômes et diagnostics

Les principaux symptômes qui permettent de suspecter le développement d'une tumeur cérébrale sont le plus souvent des maux de tête, dont la sévérité et la fréquence augmentent progressivement, qui peuvent réveiller les patients pendant leur sommeil, et dont la douleur est souvent unilatérale. Chez les personnes âgées, des troubles du comportement et des difficultés cognitives peuvent aussi survenir, et sont souvent associées à des troubles psychologiques ou à des démences. Le développement de la tumeur engendre également une augmentation de la pression intracrânienne qui est associée à un œdème papillaire, aux maux de tête, ainsi qu'à des convulsions, des nausées et des crises d'épilepsie dans certains cas. En général dans le cas de tumeurs volumineuses, une démarche déséquilibrée et des problèmes d'incontinence peuvent être présents. Enfin selon la localisation de la tumeur, des signes neurologiques focaux peuvent apparaître, tels que des troubles de la vision, de l'audition, de la parole, ou encore une hémiparésie. Cependant, ces signes annonciateurs seuls ne suffisent pas à différencier les gliomes, d'autres tumeurs cérébrales ou d'autres troubles neurologiques. Un examen des antécédents médicaux du patient doit également être pris en compte.

Suite à l'examen clinique et neurologique complet, lorsque qu'une tumeur maligne est suspectée, le diagnostic se poursuit avec un examen par imagerie médicale, grâce à de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (**Figure 19**). Puis un prélèvement de la tumeur est réalisé après biopsie par stéréotaxie, ou après résection chirurgicale, dans le but de poser le diagnostic final grâce à des analyses histopathologiques du tissu tumoral (Omuro et DeAngelis, 2013).



**Figure 19** : Coupe axiale d'un patient atteint d'un glioblastome dans le lobe temporal droit, mis en évidence par IRM (Omuro et DeAngelis, 2013).

### 2.2.3.2. Les filaments intermédiaires comme biomarqueurs

Le diagnostic et la classification des gliomes pourraient être complétés et améliorés en associant les diagnostics actuels avec l'évaluation des filaments intermédiaires, anormalement exprimés dans les gliomes. La compréhension de l'expression de différents filaments intermédiaires et de leur fonction dans les gliomes est également cruciale pour améliorer et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Un biomarqueur potentiel pour diagnostiquer les gliomes est l'expression de l' $\alpha$ -internexine, qui diffère significativement selon la gravité des gliomes, et qui est associée à une altération génomique, la délétion 1p19q. Cette mutation est responsable d'un changement global de l'expression génique des cellules tumorales, qui acquièrent un statut pro-neural limitant leur migration et leur prolifération. L'expression de l' $\alpha$ -internexine et la délétion 1p19q sont également associées à une survie plus importante. Plusieurs études montrent une diminution de l'expression de l' $\alpha$ -internexine avec le degré de gravité des gliomes, jusqu'à une absence d'expression dans les gliomes de haut grade (grade IV) (**Tableau 8**) (Aldape et al., 2007 ; Giannini et al., 2008 ; Ducray et al., 2011 ; Durand et al., 2010 et 2011).


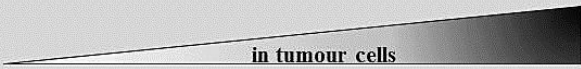
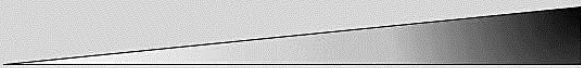






Un autre filament intermédiaire neuronal, la synémine, est retrouvé fortement exprimé dans les glioblastomes comparé au tissu cérébral sain ou à d'autres types de tumeur. Dans les gliomes, la synémine augmente la motilité des cellules cancéreuses en modulant la dynamique du cytosquelette d'actine, et augmente la prolifération en inhibant la protéine phosphatase de type 2A (PP2A) qui contrôle l'activité de la protéine Akt. Ainsi, dans les gliomes de haut grade, la surexpression de la synémine est associée à une sur-activation de la voie de signalisation Akt qui favorise l'activation du cycle cellulaire (**Tableau 8**) (Jing et al., 2005 ; Pan et al., 2008 ; Pitre et al., 2012).

Récemment, il a été mis en évidence la présence de GFAP sérique chez 20% et 56% de patients porteurs de gliomes de grades II et III respectivement, alors que chez des patients sains le taux de GFAP dans le sérum n'est pas détectable. De plus, tous les patients porteurs d'un glioblastome (grade IV) ont une concentration sérique de GFAP très élevée (>100 ng/L). Ce taux élevé de GFAP est associé au volume tumoral ainsi qu'au volume de nécrose tumorale. Cependant, aucune corrélation n'a été faite entre l'expression de la GFAP et le taux sérique de GFAP (Jung et al., 2007 ; Brommeland et al., 2007 ; Husain et al., 2012).



Afin d'améliorer le diagnostic et le traitement des tumeurs cérébrales malignes, il a également été proposé d'analyser les marqueurs cellulaires de surface des cellules souches cancéreuses, une sous-population cellulaire agressive responsable de l'invasion et de la récurrence tumorales (Nakano et Kornblum, 2006 ; Johannessen et al., 2008). L'expression de la nestine augmente avec la gravité de la tumeur, à la fois dans les cellules souches tumorales et dans les cellules endothéliales, suggérant l'implication de la nestine dans l'angiogenèse et la prolifération tumorale (Hlobilkova et al., 2009 ; Hoffman, 2011 ; Jin et al., 2013). Des travaux ont récemment développé un peptide capable de cibler les cellules souches de glioblastome nestine-positives dans un tissu de glioblastome humain, suggérant l'utilité de la nestine comme possible agent de diagnostic des gliomes (Beck et al., 2011).

**Tableau 8 : Filaments intermédiaires comme biomarqueurs de gliomes**  
(d'après revue : Lépinoux-Chambaud et Eyer, 2013).

	WHO grade II (A, OG, OA)	WHO grade III (AA, AG)	WHO grade IV (GBM)	References
Severity and frequency				<i>Louis et al. 2007; Wen and Kesari 2008</i>
<b>Synemin expression</b>				<i>Jing et al. 2005; Pan et al. 2008; Pitre et al. 2012</i>
Proliferation ability				
<b>INA expression and 1p19q deletion</b>				<i>Ducray et al. 2011; Durand et al. 2011</i>
Median survival				
<b>Serum GFAP level</b>				<i>Jung et al. 2007; Brommeland et al. 2007; Husain et al. 2012</i>
Tumour volume				
<b>Nestin expression</b>				<i>Hlobilkova et al. 2009; Jin et al. 2013</i>
Tumour angiogenesis				

A: astrocytome ; OG: oligodendrogliome ; OA: oligoastrocytome ; AA: astrocytome anaplastique; AG: gliome anaplastique; GBM: glioblastome multiforme.

### 2.2.3.3. Facteurs de risque

Les causes de l'apparition d'une tumeur sont encore mal connues. Cependant les recherches mettent en cause de multiples altérations génétiques, et des facteurs de risque environnementaux, tels qu'une exposition à des rayonnements ionisants. De rares cas de syndromes héréditaires ont également été associés avec le risque accru de développer des gliomes, notamment les syndromes de Cowen, de Turcot, de Li-Fraumeni, les neurofibromatoses de types 1 et 2, ou encore la sclérose tubéreuse.

Les recherches ont permis de déterminer les principales altérations moléculaires et génétiques responsables de la formation des tumeurs, qui représentent des cibles thérapeutiques potentielles pour développer de nouveaux traitements (Omuro et DeAngelis, 2013).

#### 2.2.3.3.1. Récepteurs et voies de signalisation

Dans le cas des gliomes, les altérations les plus communes touchent des récepteurs membranaires et des molécules de voies de signalisation intracellulaire associées. Des récepteurs tyrosines kinases (RTK) activés par des facteurs de croissance sont impliqués dans la gliomagenèse, tels que les récepteurs à l'EGF, ou EGFR (« epidermal growth factor receptor »), au PDGF, ou PDGFR (« platelet-derived growth factor receptor »), au VEGF, ou VEGFR (« vascular endothelial growth factor receptor »), et au HGF (« hepatocyte growth factor »), ou c-Met. Les intégrines, des récepteurs d'adhérence cellulaire, activées par des protéines de la matrice extracellulaire, jouent également un rôle dans la progression tumorale. Ces récepteurs sont très souvent surexprimés dans les gliomes malins, en particulier dans les glioblastomes. Pour l'ensemble de ces récepteurs, leur activation, après fixation du ligand, active différentes voies de signalisation, telles que les voies PI3K/Akt/mTOR (« phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/ mammalian target of rapamycin ») et MAPK (« mitogen-activated protein kinase »), qui favorisent la prolifération, la migration, la survie cellulaire, ou encore l'angiogenèse (Hamza et Gilbert, 2014).

Il existe également différentes altérations génétiques entre les glioblastomes primaires, ou *de novo*, et les glioblastomes secondaires, qui dérivent en général d'astrocytomes de bas-grade. La surexpression de l'EGFR est plus commune dans les glioblastomes primaires,

(>60%) que dans les glioblastomes secondaires (<10%). La mutation la plus fréquente de l'EGFR est celle du variant III, EGFRvIII, qui entraîne l'activation constitutive du récepteur.

Le gène *PTEN* (« Phosphatase and TENsin homolog »), un gène suppresseur de tumeur, est également plus fréquemment muté dans les glioblastomes primaires, comme l'amplification de MDM2 (« murine double minute 2 »), exclusivement présente dans les glioblastomes primaires (<10%).

En revanche, dans les glioblastomes secondaires, des mutations de TP53, un gène suppresseur de tumeur, sont plus fréquemment retrouvées (**Figure 20**).

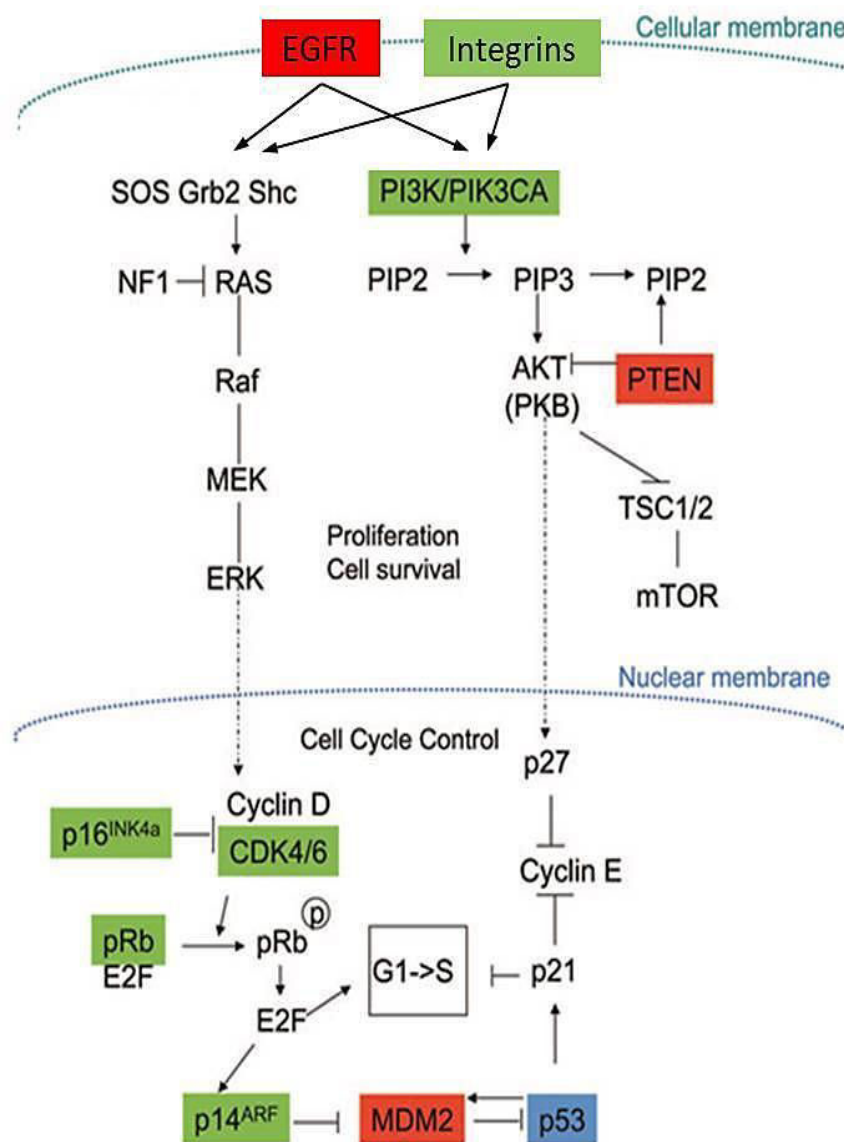
De plus, des mutations des gènes codant pour les enzymes isocitrates déshydrogénases, IDH1 et IDH2, ont également été identifiées majoritairement dans les gliomes de bas-grade et dans les glioblastomes secondaires, mais sont largement absentes dans les primaires. Les profils typiques des glioblastomes primaires et secondaires sont respectivement IDH-1(-)/EGFR(+)/p53(-) et IDH-1(+)/EGFR(-)/p53(+).

Au contraire, le promoteur du gène codant pour la sous-unité protéique, à activité transcriptase inverse de la télomérase (TERT), est muté dans 74,2 % des glioblastomes, contre 18,2 % dans les astrocytomes de grades II-III (Ohgaki et Kleihues, 2007 ; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008 ; Huse et Holland, 2010 ; Lee et al., 2013 ; Killela et al., 2014).

Enfin, certaines altérations génétiques sont retrouvées dans les deux types de glioblastomes, primaires et secondaires. Dans la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, la sous-unité catalytique de PI3K, p110 $\alpha$ , est altérée par mutation du gène *PIK3CA*. D'autres gènes sont altérés dans les gliomes, comme dans la voie p16<sup>INK4a</sup>/pRB, dans laquelle le gène codant pour la protéine du rétinoblastome (pRB), une protéine suppresseur de tumeur, est muté dans 20 % des gliomes malins. Des altérations de p16<sup>INK4a</sup> et CDK4/6 (« cyclin-dependent kinase 4/6 ») ont également été observées à la fois dans les glioblastomes primaires et secondaires.

Dans la voie TP53/MDM2/p14<sup>ARF</sup>, 76 % des glioblastomes comportent une délétion ou une méthylation du promoteur du gène codant pour p14<sup>ARF</sup>, entraînant une diminution de son

expression et une altération de la fonction normale de TP53 (**Figure 20**) (Ohgaki et Kleihues, 2007 ; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008 ; Cimini et Ippoliti, 2011).



Altérations génétiques typiques des GBMp ■, GBMs ■, des deux types ■

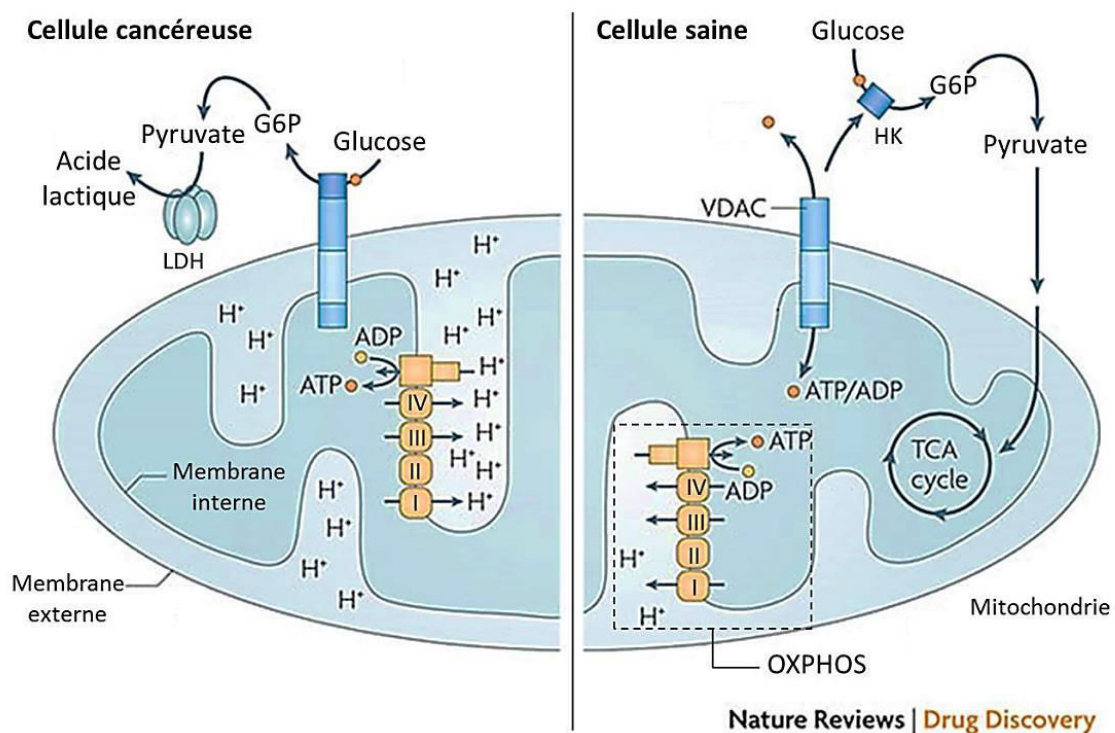
**Figure 20 : Voies de signalisation majeures impliquées dans la genèse des glioblastomes.**

*GBMp : glioblastomes primaires ; GBMs : glioblastomes secondaires*

(modifiée d'après Ohgaki et Kleihues, 2007).

### 2.2.3.3.2. Activité mitochondriale

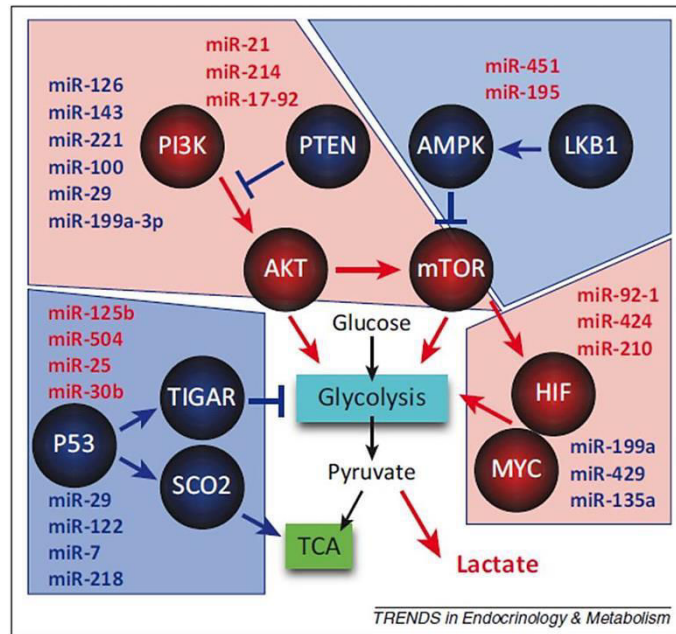
Dans les tumeurs malignes telles que les gliomes, le dysfonctionnement mitochondrial est lié à des anomalies dans le métabolisme énergétique mitochondrial qui favorise une production anormale d'énergie (ATP) via la glycolyse aérobie (effet Warburg), au détriment de la chaîne respiratoire des mitochondries (phosphorylation oxydative OXPHOS), et qui augmente la survie des cellules tumorales. Ce changement métabolique est également accompagné d'une hyperpolarisation des mitochondries, qui est un signe spécifique du changement métabolique dans les cellules de glioblastome (**Figure 21**) (Fulda et al., 2010 ; Boland et al., 2013 ; Katsetos et al., 2013).



**Figure 21 : Métabolisme mitochondrial entre une cellule cancéreuse et une cellule saine.**

*G6P : Glucose-6-phosphate ; HK : hexokinase ; LDH : lactate déshydrogénase ; OXPHOS : phosphorylation oxydative ; VDAC : canal anionique voltage-dépendant (Fulda et al., 2010).*

La biogenèse et la dynamique des mitochondries dépendent de la régulation épigénétique, par des microRNA (miRNA), de gènes nucléaires et mitochondriaux, dont la dérégulation est associée au développement tumoral. Les miRNA régulent en effet directement ou indirectement différentes voies de signalisation ou facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme mitochondrial, perturbé dans les cellules cancéreuses suite à la dérégulation de nombreux miRNA (**Figure 22**) (Hatzia Apostolou et al., 2013).



**Figure 22 : Régulation par les miRNA des voies de signalisation impliquées dans le métabolisme mitochondrial.** En rouge : surexpression ; en bleu : sous-expression (dans le cas de cancers).

(Hatzia Apostolou et al., 2013)

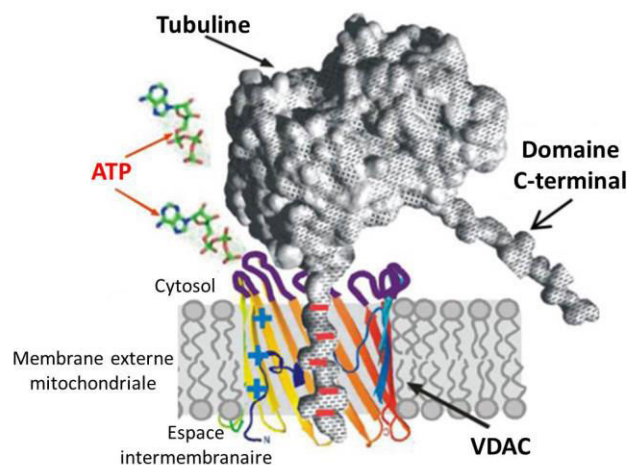
De nombreux facteurs transcriptionnels ont également leur importance dans la régulation de la biogenèse et de la dynamique des mitochondries, notamment les co-activateurs transcriptionnels de la famille PGC, tels que PGC1- $\alpha$  (« peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha », codée par le gène *PPARGC1A*), PGC-1 $\beta$  et PRC (« PGC-related coactivator »). Ces protéines régulatrices permettent notamment d'activer le facteur de transcription NRF-1 (« nuclear respiratory factor-1 »), qui module la transcription d'autres gènes impliqués dans la réplication du génome mitochondrial (comme Tfam « mitochondrial transcription factor A ») et dans la chaîne respiratoire (comme le cytochrome c, codé par le gène *CYCS*). Dans des cellules cancéreuses, il a été montré une surexpression de PRC, NRF-1 et Tfam, associée à une augmentation de la biogenèse mitochondriale (Savagner et al., 2003).

Les gènes suppresseurs de tumeur, comme p53, et les oncogènes, comme c-Myc régulent la biogénèse et la fonction des mitochondries. Dans les glioblastomes, la mutation de p53 est associée à l'inhibition transcriptionnelle de la protéine PGC1- $\alpha$ . Dans des conditions normales, p53 limite la glycolyse aérobie en faveur de OXPHOS, et favorise la libération de cytochrome c, et l'apoptose. Dans les cellules cancéreuses, la survie des cellules est associée à la mutation de p53 mais aussi à la surexpression de Bcl2, une protéine anti-apoptotique associée à la membrane mitochondriale (Boland et al., 2013 ; Katsetos et al., 2013). Les gènes

et protéines de régulation transcriptionnelle qui régulent la biogenèse et la dynamique des mitochondries, représentent donc des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des tumeurs.

Le canal le plus abondant de la membrane externe des mitochondries, le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) qui compose le pore de perméabilité mitochondriale, joue un rôle important dans le métabolisme mitochondrial (**Figure 21**). Le métabolisme des mitochondries représente également une nouvelle cible thérapeutique, par inhibition de la glycolyse ou de la lactate déshydrogénase, ou par inhibition de l'interaction de VDAC avec l'hexokinase, pour rétablir l'exportation d'ATP de la mitochondrie (Fulda et al., 2010).

Il a également été montré que la tubuline est un composant des membranes mitochondriales, qui est associé à VDAC pour réguler sa perméabilité (**Figure 23**). La membrane mitochondriale possède la particularité d'être enrichie en tubuline  $\alpha$  acétylée et tyrosinée, et en tubuline  $\beta$ III. Dans les cellules cancéreuses, il a été montré que des agents déstabilisant les microtubules (colchicine, nocodazole) augmentent la tubuline libre, qui inhibe ainsi VDAC et réduit le potentiel de membrane pour limiter le métabolisme mitochondrial lié à l'effet Warburg (Katsetos et al., 2013).

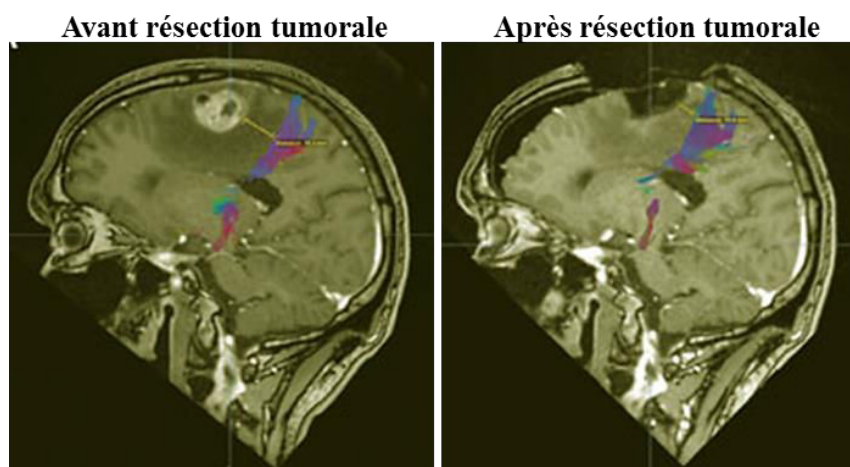


**Figure 23 : Représentation schématique du blocage de VDAC par la tubuline libre**  
(Rostovtseva et Bezrukov, 2012).

#### 2.2.3.4. Traitements et enjeux thérapeutiques

Actuellement, le traitement de référence pour lutter contre les gliomes associe la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

L'intervention chirurgicale consiste, après craniotomie, en une exérèse totale ou partielle de la tumeur selon sa localisation (**Figure 24**). Une résection complète est possible pour des tumeurs peu profondes, alors que les tumeurs infiltrant des zones sensibles, comme le corps calleux ou le tronc cérébral, rendent la chirurgie très difficile, voire impossible. De plus, il est rare de pouvoir retirer la totalité des cellules tumorales qui s'étendent dans le tissu sain, comme c'est le cas des glioblastomes. Cependant, la pratique chirurgicale est une première étape importante lors du traitement puisqu'elle permet d'augmenter la survie des patients porteurs de ce type de tumeurs. Mais en raison du caractère très invasif de ces tumeurs, la chirurgie seule ne suffit pas, et elle est souvent suivie par des séances de radiothérapie, associées à la chimiothérapie (Tutt, 2011 ; Omuro et DeAngelis, 2013).



**Figure 24** : IRM avant et après craniotomie et résection d'un glioblastome situé à proximité de régions motrices (*zones colorées*) (Tutt, 2011).

La radiothérapie consiste en général en une dose totale de 60 grays (Gy) divisée en trente fractions, réparties sur plusieurs semaines consécutives. Une autre technique récemment mise en place, la radiothérapie stéréotaxique ou radiochirurgie, consiste à détruire la tumeur en l'encerclant grâce à un faisceau de rayons. Cette technique est réservée pour les tumeurs profondes de petite taille mais n'est pas adaptée pour les tumeurs étendues, infiltrantes et hypoxiques, comme les glioblastomes. Une exposition aux rayonnements peut également



provoquer des effets secondaires, comme de la fatigue, des nausées, une irritation de la peau du crâne et une perte de cheveux.

Le traitement par radiothérapie est souvent couplé à une administration orale journalière de Témazolomide (Temodal®), la chimiothérapie de référence dans le cas des gliomes, suivie d'une administration mensuelle adjuvante. Cet agent alkylant provoque des cassures dans l'ADN et induit la mort des cellules tumorales (Stupp et al., 2005 et 2009 ; Tutt, 2011).

Malgré ces traitements, une récurrence tumorale est fréquente. Ces dernières années, le nombre d'essais cliniques a fortement augmenté pour pallier au manque de spécificité et d'efficacité des traitements actuels. D'autres agents anti-tumoraux sont utilisés en soutien au Témazolomide. Parmi ces molécules sont testés le Bévacizumab (un anticorps dirigé spécifiquement contre le VEGFR) qui bloque l'angiogenèse tumorale, l'Irinotecan (inhibiteurs des topo-isomérases), la Carmustine (BCNU) et le Lomustine (CCNU) qui sont des agents alkylants anti-néoplasiques. Cependant, l'ensemble de ces molécules sont des traitements lourds, fréquemment responsables de complications (nausées, vomissements, diarrhée, hypertension, hématotoxicité...) et dont l'efficacité reste limitée (Omuro et DeAngelis, 2013; Hamza et Gilbert, 2014).

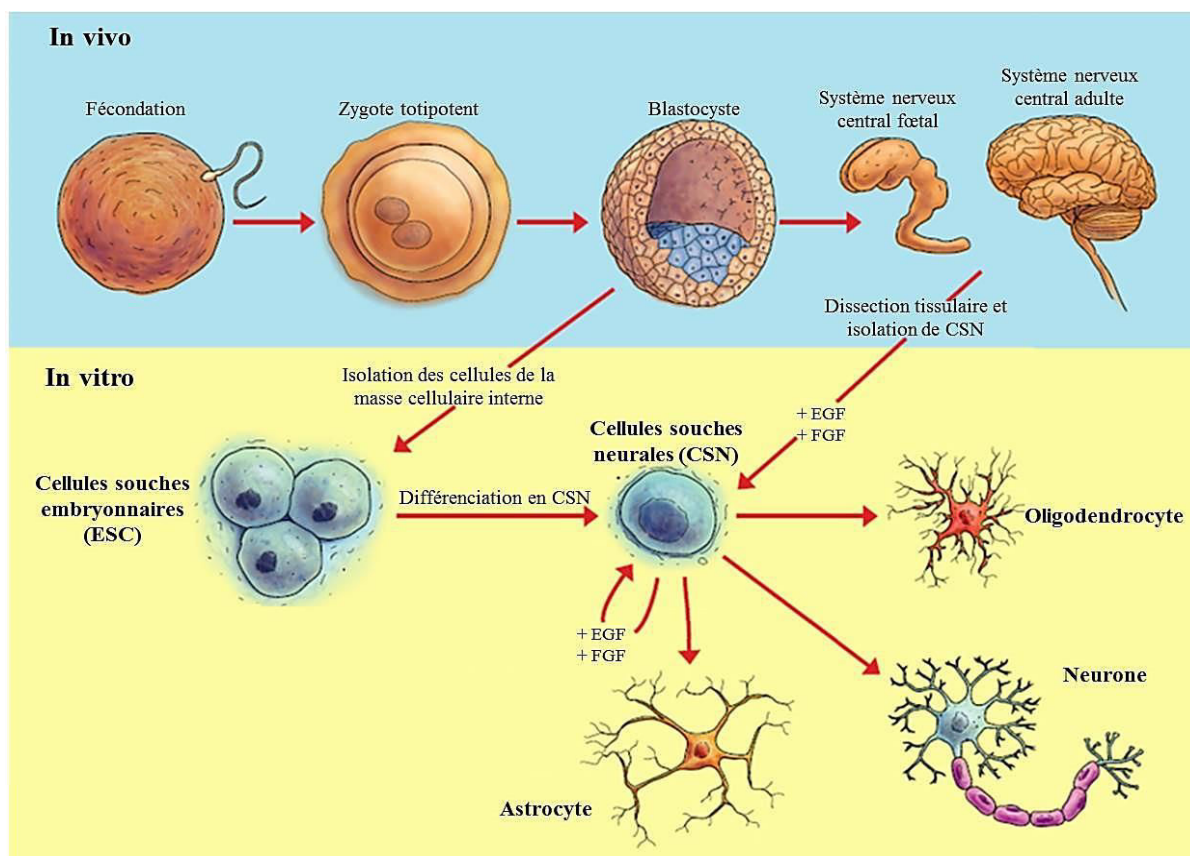
Un autre problème qui se pose est le phénomène de chimiorésistance des gliomes, comme la résistance aux agents alkylants. Ce mécanisme est lié au statut de l'enzyme O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase (MGMT). Les cellules tumorales possédant un promoteur *MGMT* méthylé sont plus sensibles aux agents alkylants. En revanche, les tumeurs avec un promoteur *MGMT* non-méthylé ont une forte expression de l'enzyme de réparation de l'ADN qui bloque l'action des agents alkylants. Le mécanisme de chimiorésistance est également lié à la dérégulation de gènes ou de protéines régulant l'apoptose (p53, Bcl2, EGFR) (Esteller et al., 2000; Sarkaria et al., 2008).

Enfin, les phénomènes de récurrence et de chimiorésistance des gliomes, et en particulier des glioblastomes, est également lié à l'existence d'une petite sous-population de cellules souches cancéreuses résistantes aux traitements actuels, et qui représentent de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre les gliomes malins (Lima et al., 2012).

## Chapitre 3: Cellules souches neurales comme cibles thérapeutiques

### 3.1. Généralités sur les cellules souches

Les cellules souches sont des candidats très prisés pour la recherche actuelle dans une perspective thérapeutique. Ces cellules sont dites souches, car elles sont non différenciées, et sont caractérisées par leur capacité de proliférer, de s'auto-renouveler, et de générer de nouveaux types cellulaires. Après la fécondation, au stade zygote, les cellules souches sont dites totipotentes, puisqu'elles sont capables de générer tous les types cellulaires de l'organisme. Puis au stade blastocyste, ces cellules sont appelées cellules souches embryonnaires (« embryonic stem cells », ou ESC) pluripotentes, qui peuvent générer tous les lignages de l'organisme. Chez l'adulte, les potentialités des cellules souches se restreignent aux tissus dans lesquelles elles résident. On parle alors de cellules souches adultes multipotentes, avec une capacité de différenciation plus limitée (**Figure 25**) (Hall et Wall, 1989). Le principal rôle des cellules souches adultes est de remplacer des cellules matures perdues suite au renouvellement physiologique, ou des cellules endommagées après à une lésion tissulaire.



**Figure 25 : Cellules embryonnaires (ESC) pluripotentes et cellules souches neurales (CSN) multipotentes (modifiée d'après Olynik et Rastegar, 2012).**

Les différents types de cellules souches les plus étudiées sont les ESC, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches neurales (CSN), les cellules souches pluripotentes induites (« induced pluripotent stem (iPS) cells »), et les cellules souches mésenchymateuses, parmi lesquelles les cellules souches dentaires qui font l'objet de nombreuses études depuis leur découverte (Stuckey et Shah, 2014 ; Sonoyama et al., 2008 ; Vanacker et al., 2014).

Les cellules souches neurales (CSN) adultes ont été mises en évidence dans le système nerveux central à partir des travaux d'Altman et son équipe. Ils ont montré la genèse de nouveaux neurones dans le cerveau adulte de rats au niveau de l'hippocampe et des bulbes olfactifs (Altman et Das, 1965 ; Altman, 1969). Dans le cerveau humain adulte, des régions neurogènes comparables ont été identifiées. Les CSN et la genèse de nouveaux neurones ont été mises en évidence dans l'hippocampe de patients atteints de cancer, qui avaient reçu une injection de bromodéoxyuridine, pour leur suivi thérapeutique (Eriksson et al., 1998). Ces cellules ont également été observées dans la zone sous-ventriculaire qui longe les ventricules latéraux, dans le cerveau humain adulte (Sanai et al., 2004).

Des CSN humaines adultes, issues de la zone sous-ventriculaire, ont pu être isolées lors d'une chirurgie cérébrale de routine chez des patients atteints d'épilepsie, et ont généré des neurones et des astrocytes *in vitro*. Ces travaux ont permis de démontrer qu'il est possible d'isoler et de maintenir des CSN pour étudier leurs mécanismes biologiques, ou pour des applications thérapeutiques (Ayuso-Sacido et al., 2008).

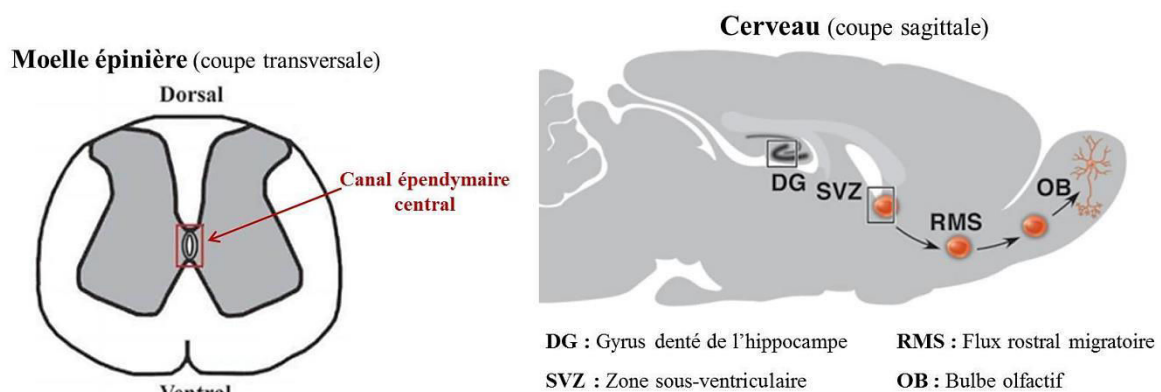
De nombreux travaux ont d'ailleurs mis en évidence l'intérêt thérapeutique de telles cellules dans la réparation tissulaire, par recrutement des cellules souches endogènes ou par transplantation de cellules souches. Dans le cas des maladies neurodégénératives liées à une perte de neurones et de cellules gliales, de nombreuses études développent des thérapies géniques ou cellulaires basées sur l'utilisation des CSN (Kim et al., 2013).

L'implication des cellules souches a également été discutée dans le cas de tumeurs cérébrales. Au sein des tumeurs, une petite population de cellules résistantes aux traitements actuels, possède des propriétés similaires aux CSN, et sont appelées cellules souches cancéreuses (Sanai et al., 2005). Développer de nouveaux traitements, basés sur l'utilisation ou le ciblage de ces cellules, permettrait de lutter plus efficacement contre des tumeurs cérébrales souvent très agressives.

## 3.2. Cellules souches neurales adultes

### 3.2.1. Localisation des cellules souches neurales

Dans le système nerveux, plusieurs zones neurogéniques ont été mises en évidence chez l'adulte. Une niche de CSN latentes est présente au niveau du canal épendymaire central de la moelle épinière (Hamilton et al., 2009). Dans le cerveau, les deux niches neurogéniques se situent dans la zone sous-ventriculaire (« sub-ventricular zone » ou SVZ) qui bordent les ventricules latéraux, et dans le gyrus denté (« dentate gyrus » ou DG) de l'hippocampe (**Figure 26**). Chez l'adulte, les CSN du DG sont capables de générer des progéniteurs neuronaux et gliaux au niveau de la zone sous-granulaire, qui se différencient en neurones et cellules gliales dans la zone granulaire de l'hippocampe. Les CSN de la SVZ sont également capables de générer des nouveaux neurones et des cellules gliales. Les travaux d'Altman ont montré la formation de neuroblastes à partir de la SVZ, qui migrent en chaîne vers le bulbe olfactif, via le flux rostral migratoire, dans le cerveau post-natal de rats (**Figure 26**) (Altman et Das, 1965 ; Altman, 1969 ; Reynolds et Weiss, 1992 ; Taupin et Gage, 2002).



**Figure 26 : Régions neurogéniques de la moelle épinière et du cerveau de mammifère adulte.**

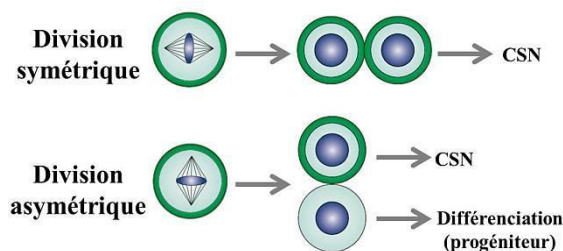
(modifiée d'après Taupin et Gage, 2002 ; Hamilton et al., 2009)

En dehors de ces zones neurogènes, d'autres régions du système nerveux possèdent des cellules aux propriétés de progéniteurs, voire de cellules souches, au niveau de la rétine et de la substance noire (Tropepe et al., 2000 ; Lie et al., 2002).

Des études récentes suggèrent l'existence d'une troisième niche neurogène stable dans le cerveau adulte, dans la zone sous-ventriculaire hypothalamique du troisième ventricule. La neurogenèse serait impliquée dans les mécanismes de régulation hypothalamique, notamment dans la régulation de la balance énergétique (Kokoeva et al., 2005 ; Rojczyk-Gołębiewska et al., 2014).

### 3.2.2. Caractéristiques des cellules souches neurales

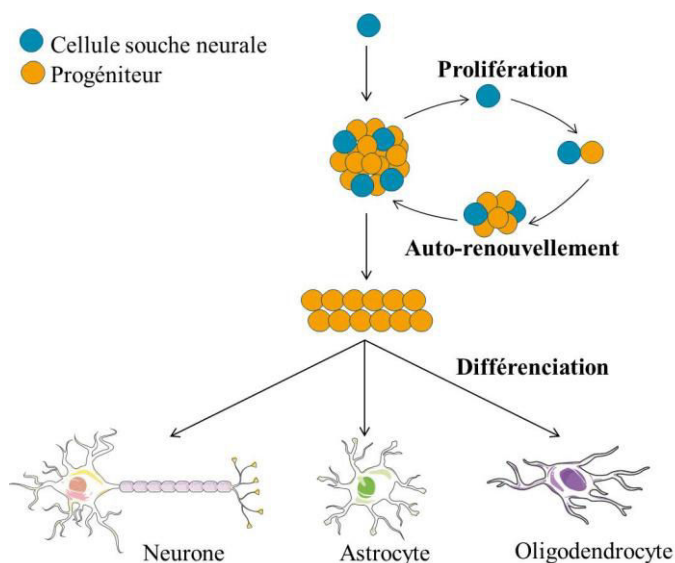
La division cellulaire des CSN se fait de façon symétrique ou asymétrique, pour favoriser respectivement leur expansion clonale ou la neurogenèse. L'orientation et la localisation du fuseau mitotique définissent soit la division symétrique qui donne naissance à deux CSN, soit la division asymétrique qui donne naissance à une CSN et à une cellule différenciée (**Figure 27**) (Knoblich, 2001).



**Figure 27 : Divisions symétriques et asymétriques des cellules souches neurales**

(d'après Knoblich, 2001).

*In vitro*, en présence d'EGF et de FGF (« fibroblast growth factor »), les CSN forment des neurosphères qui sont principalement constituées de cellules immatures exprimant la nestine. Une neurosphère, qui est formée par multiplication d'une seule CSN, peut former de nouvelles neurosphères après dissociation. Cette propriété des CSN leur permet de s'auto-renouveler (Reynolds et Weiss, 1992 ; Coronas, 2009). Ces cellules sont également caractérisées par leur capacité à générer les trois types de cellules du système nerveux central : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (**Figure 28**).



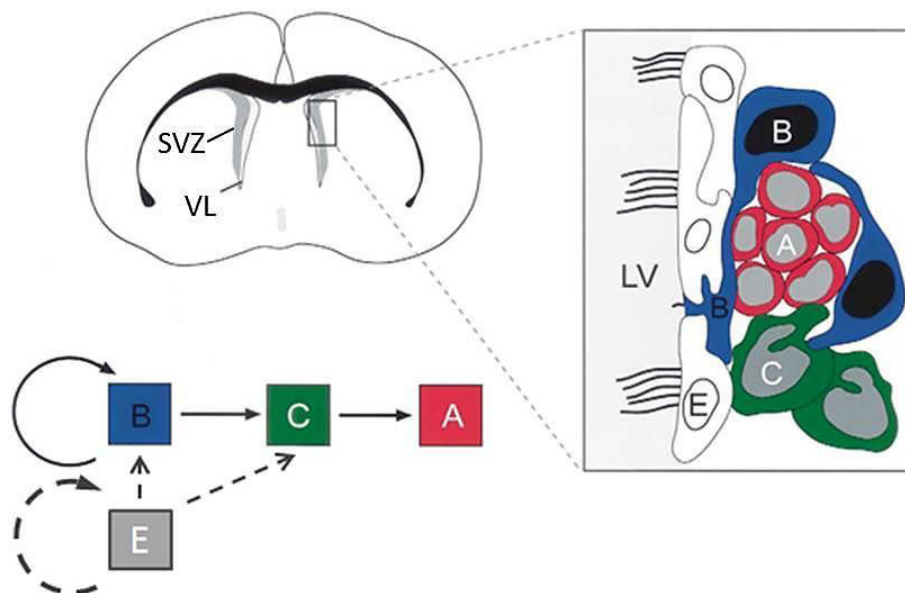
**Figure 28 : Caractéristiques des cellules souches neurales** (d'après Coronas, 2009).

### 3.2.3. Cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire

La zone sous-ventriculaire est la principale zone neurogène, qui s'étend le long des ventricules latéraux, et qui est composée d'une monocouche de cellules épendymaires, appelées cellules de type E, et d'une couche sous-épendymaire constituée de trois types cellulaires majeurs, appelées cellules de type A, B et C (**Figure 29**). Au sein de la SVZ, deux populations de CSN ont été décrites : les cellules de type B et les cellules épendymaires (Doetsch et al., 1997 et 1999a). En effet, après lésions de la SVZ, par infusion intraventriculaire de l'anti-mitotique Ara-C (cytosine-β-D-arabino-furanoside), seules les cellules de type A et C ont été tuées, alors que les cellules de type B et les cellules épendymaires ont été épargnées et sont devenues actives pour proliférer et régénérer la SVZ (Doetsch et al., 1999b ; Coskun et al., 2008).

Dans la SVZ, les cellules de type A sont des neuroblastes organisés en chaîne, qui expriment des marqueurs spécifiques du lignage neuronal. Les neuroblastes sont entourés des cellules de type B, d'aspect plus clair, qui expriment la GFAP et ont un faible taux de prolifération. Les cellules de type B donnent naissance aux cellules de type C, d'aspect plus globuleux, qui n'expriment ni marqueur gliaux, ni marqueurs neuronaux. Ces cellules hautement prolifératives représentent des précurseurs immatures des cellules de type A (Doetsch et al., 1999b).

Les cellules épendymaires ciliées de la SVZ expriment le marqueur CD133/prominin-1, une glycoprotéine transmembranaire, qui est aussi retrouvée dans les cellules souches embryonnaires et les cellules de glioblastome (Pfenninger et al., 2007). Dans la SVZ, ce marqueur est exclusivement localisé au niveau de la couche épendymaire. Il a été montré que les cellules CD133+ de la SVZ, même si elles se divisent rarement *in vivo*, ont les mêmes propriétés que les CSN *in vitro*, et sont capables de générer de nouveaux neurones *in vivo* (Doetsch et al., 1999b ; Johansson et al., 1999 ; Coskun et al., 2008). En plus de leur caractère souche, les cellules épendymaires sont capables de réguler le potentiel neurogénique des cellules de type B (Lim et al., 2000).



#### Population cellulaire

Cellules de type B

Cellules de type C

Cellules de type A

Cellules de type E

#### Profil cellulaire

Cellules souches neurales quiescentes

Précurseurs immatures prolifératifs

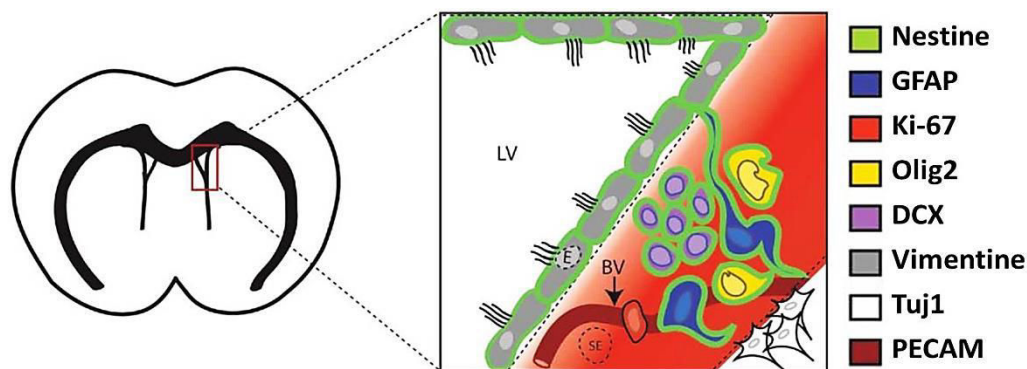
Neuroblastes en migration

Cellules épendymaires (au potentiel souche)

**Figure 29 : Composition et organisation cellulaire de la zone sous-ventriculaire de mammifère adulte.** VL : ventricule latéral ; SVZ : zone sous-ventriculaire.

(Alvarez-Buylla et al., 2002 ; Coskun et al., 2008)

Pour distinguer les différentes cellules au sein de la SVZ, il existe plusieurs marqueurs spécifiques de chaque type cellulaire, alors que la nestine est exprimée par toutes les cellules de la SVZ. Pour exemple, les cellules épendymaires se distinguent par l'expression des protéines CD133 et vimentine. Dans la couche sous-épendymaire, les cellules de type B et les progéniteurs gliaux sont GFAP-positifs. Les progéniteurs d'oligodendrocytes expriment le facteur de transcription Olig2, alors que les progéniteurs neuronaux, les neuroblastes, expriment la molécule d'adhésion PSA-NCAM (« polysialylated-neural cell adhesion molecule »), DCX, et une fois différenciés Tuj1 (marqueur de la  $\beta$ III-tubuline). Les cellules qui se divisent sont Ki-67-positives et sont souvent à proximité de vaisseaux sanguins, exprimant PECAM/CD31 (« platelet endothelial cell adhesion molecule/CD31 ») (**Figure 30**) (Hamilton et al., 2009 ; Beckervordersandforth et al., 2010).



**Figure 30 : Marqueurs spécifiques des différents types de cellules de la zone sous-ventriculaire.**

(d'après Hamilton et al., 2009)

### 3.2.4. Régulation des cellules souches neurales : La niche neurogène

L'existence d'une activité neurogénique restreinte à certaines régions du cerveau suggère l'influence de différents mécanismes de contrôle interdépendants, qui regroupent des facteurs intrinsèques et des signaux provenant des cellules environnantes, de la matrice extracellulaire ou du liquide céphalo-rachidien.

#### 3.2.4.1. Facteurs intrinsèques

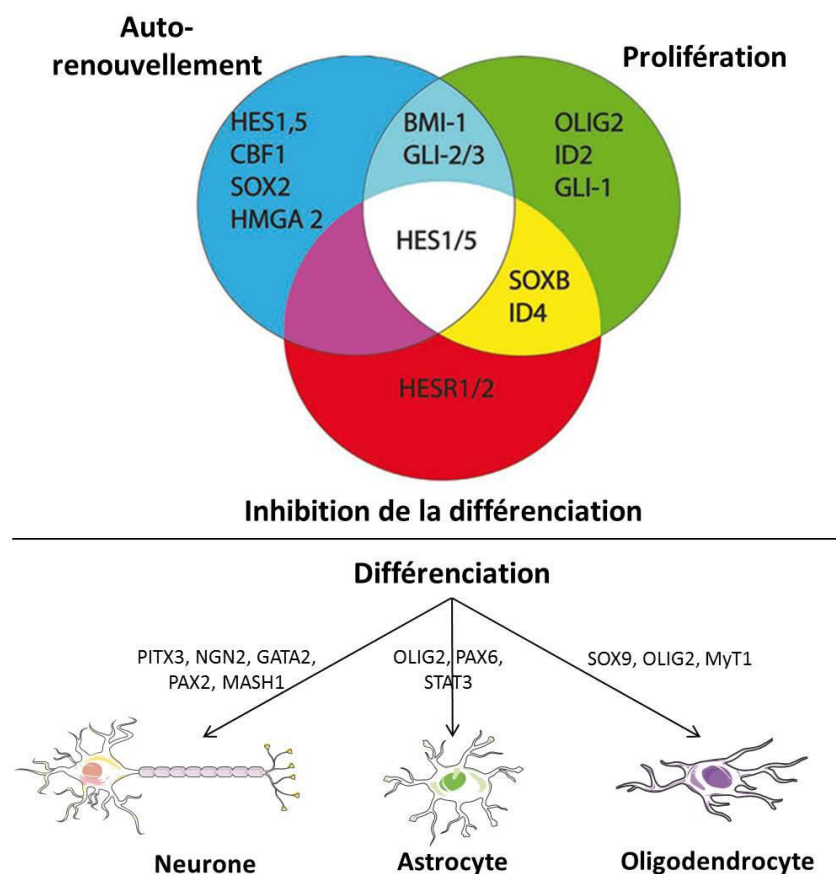
Plusieurs facteurs intrinsèques contrôlent l'activité des CSN, comme les facteurs de transcription, les ARN non-codants et la régulation épigénétique, qui régulent l'expression des gènes. Des altérations de l'ADN par méthylation, via les protéines MBD ou MeCP (pour « methyl-CpG-binding domain »), ou par modifications des histones influent sur l'accessibilité de l'ADN aux complexes transcriptionnels. Ces modifications de la structure chromatinienne jouent un rôle important dans la différenciation des CSN. L'état de la chromatine est également régulé par des protéines de la famille Polycomb, qui agissent comme des répresseurs transcriptionnels, dont Bmi-1 qui est impliqué dans la prolifération et l'auto-renouvellement des CSN. Chez des souris invalidées pour le gène codant Bmi-1, la prolifération et la population de CSN ont été réduites (Zencak et al., 2005 ; Mohamed Ariff et al., 2012).

La régulation de l'expression des gènes dans les CSN est aussi contrôlée par des ARN non-codants, comme par exemple les « miRNA » (pour « microRNA ») et les « lncRNA » (pour « long non-coding RNA »). Parmi les « miRNA », miR-184 et miR-124 régulent



respectivement la prolifération et la différenciation des CSN (Liu et al., 2010 ; Cheng et al., 2009). Les « lncRNA » sont une nouvelle classe d'ARN non-codants, qui régulent la balance entre prolifération et différenciation. Par exemple, le « lncRNA » Dlx1AS est nécessaire pour induire l'expression des facteurs de transcription Dlx1 et Dlx2, lors de la différenciation neuronale des CSN adultes de la SVZ (Gonzales-Roybal et Lim, 2013 ; Mohamed Ariff et al., 2012).

Les facteurs de transcription jouent un rôle important dans la biologie des CSN. Parmi ces facteurs, HES1/5, CBF-1, SOX2, HMGA2, BMI-1, GLI-2/3, et TLX sont impliqués dans l'auto-renouvellement des CSN. La capacité de prolifération des CSN est sous le contrôle des facteurs OLIG2, ID2, GLI-1, BMI-1 et GLI-2/3. D'autres facteurs permettent de restreindre la différenciation des CSN, comme HES1/5, HESR1/2, ID4, SOXB1, REST, POU3F2/F3. La spécification du lignage des CSN est sous l'influence de PITX3, NGN2, GATA2, PAX2 ou encore MASH1 pour le lignage neuronal. La genèse d'astrocytes matures est contrôlée par PAX6, NF1A et STAT3, alors que celle des oligodendrocytes est régulée par SOX9, OLIG2 et MyT1 (**Figure 31**) (Ahmed et al., 2009 ; Yun et al., 2010).



**Figure 31 : Facteurs de transcription impliqués dans l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales (d'après Ahmed et al., 2009).**

### 3.2.4.2. Facteurs extrinsèques

L'ensemble des facteurs intrinsèques de régulation transcriptionnelle, associée à l'auto-renouvellement et à la différenciation des CSN, est également étroitement lié à des facteurs extrinsèques. Ces derniers sont des signaux provenant de cellules environnantes (astrocytes, cellules épendymaires, cellules endothéliales), de la matrice extracellulaire et du liquide céphalo-rachidien.

Dans la niche neurogène, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire se font via les molécules d'adhérence cellulaire (CAM), qui regroupent la famille des immunoglobulines CAM (L1-CAM, VCAM-1, PSA-NCAM, TAG-1, MAG, nectines), les cadhérines (E-cadherin, N-cadherin, P-cadherin) et protocadhérines (Pcdh), les intégrines, et les sélectines (E-selectin, L-selectin, P-selectin). Ces molécules permettent de transférer les informations provenant du microenvironnement et des cellules voisines au sein de la SVZ, et ainsi de déclencher diverses voies de signalisation pour réguler l'état des CSN. Ces molécules d'adhérence jouent des rôles essentiels sur la prolifération, la différenciation et la migration des CSN (**figure 32**) (Bian, 2013).

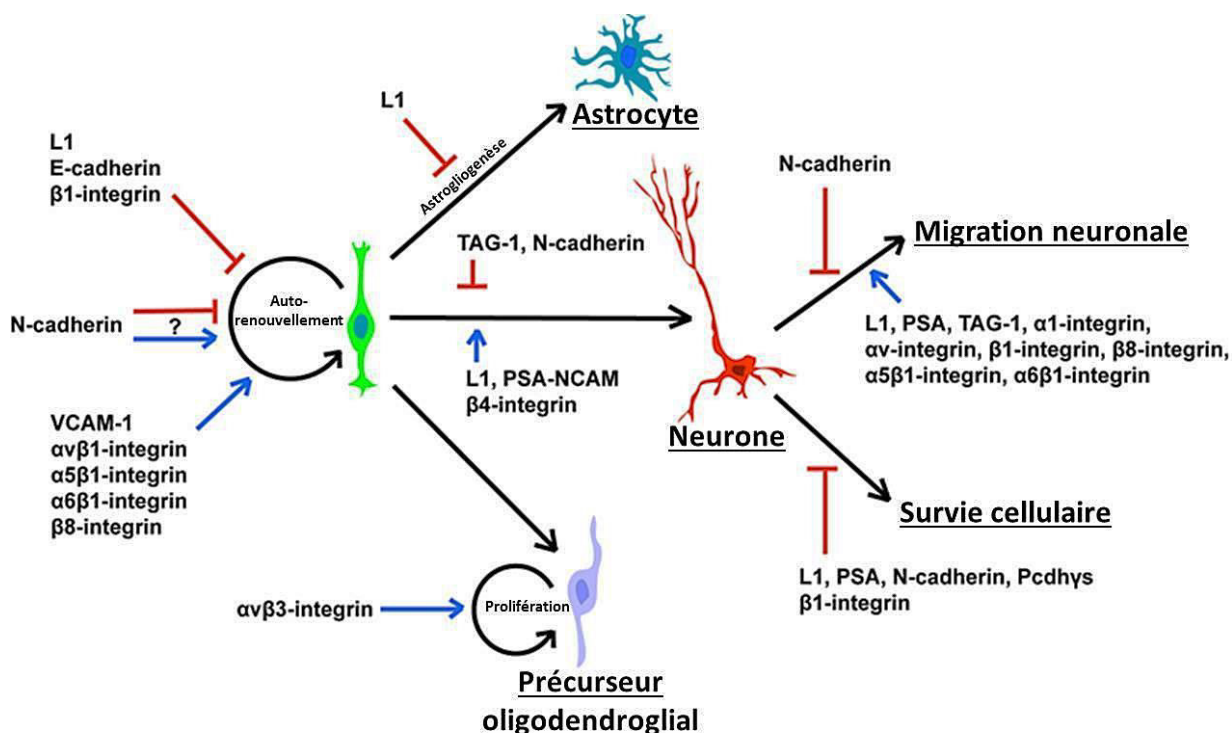


Figure 32 : Rôles des molécules d'adhérence sur l'auto-renouvellement, la différenciation, la migration et la survie des cellules souches neurales (Bian, 2013).

Les autres facteurs extrinsèques de régulation regroupent quatre voies de signalisation majeures interconnectées : les voies Wnt/ $\beta$ -caténine, Notch, sonic hedgehog (shh) et les facteurs de croissance qui participent au contrôle de la biologie des CSN (Ahmed et al., 2009 ; Yun et al., 2010). La prolifération des progéniteurs est contrôlée par de multiples facteurs de croissance. EGF et bFGF (« basic FGF ») régulent la prolifération et la neurogenèse (Richards et al., 1992 ; Gritti et al., 1995). Les interactions cellule-cellule, entre les CSN et les progéniteurs, via le récepteur à l'EGF (EGFR) et la voie de signalisation Notch, sont cruciales pour maintenir la population de cellules au sein de la SVZ. Notch régule l'auto-renouvellement, alors qu'EGFR joue sur la prolifération et la migration des cellules progénitrices (Aguirre et al., 2010). Les CSN de la SVZ sont aussi en contact avec les cellules épendymaires et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, qui sécrètent le facteur de croissance PEDF (« pigment epithelium-derived factor ») qui favorise l'auto-renouvellement des CSN, en augmentant la signalisation de Notch. La Betacellulin, un membre de la famille EGF, exprimé par les cellules endothéliales et les cellules épithéliales des plexus choroïdes, favorise la prolifération au sein de la SVZ. Les cellules endothéliales sécrètent également BDNF (« brain-derived neurotrophic factor ») et VEGF qui stimulent la neurogenèse et la survie cellulaire (Gómez-Gaviro et al., 2012).

Les cellules GFAP+ sécrètent des cytokines BMP (« bone morphogenetic proteins »), qui inhibent la neurogenèse. La sécrétion de noggin, une molécule de signalisation, par les cellules épendymaires permet d'inactiver les BMP et ainsi de favoriser la différenciation des cellules de type B (Lim et al., 2000).

Au sein de la SVZ, il existe une autre population de cellules, proche des cellules de type B, les cellules de la microglie. Ces cellules immunitaires, lorsqu'elles sont activées suite à une inflammation par exemple, libèrent des cytokines telles que les interleukines, le TNF- $\alpha$  (« tumor necrosis factor-alpha »), l'IFN- $\gamma$  (interferon-gamma), le LIF (« leukemia inhibitory factor »), ou encore le CNTF (« ciliary neurotrophic factor »). La microglie peut ainsi moduler l'auto-renouvellement, la prolifération, la différenciation, la migration, l'adhérence, et la survie des CSN (Gonzalez-Perez et al., 2012).

### 3.2.5. Cellules souches neurales dans les pathologies cérébrales

Les cellules souches sont nécessaires au maintien des organes et à la réparation de lésions tissulaires. Leurs caractéristiques particulières en font des cibles et des outils thérapeutiques prometteurs dans le cas de médecine régénératrice et dans le cas de tumeurs cérébrales. Cependant, il existe encore de nombreuses limites à leur utilisation en thérapie cellulaire, qui nécessitent d'améliorer nos connaissances sur la biologie des cellules souches et de trouver des moyens efficaces pour mobiliser ces cellules.

De nombreux travaux se sont intéressés aux cellules souches embryonnaires, puisqu'elles sont pluripotentes et sont hautement prolifératives. Cependant ces cellules s'opposent à plusieurs problèmes, comme un risque élevé d'engendrer des tumeurs, un problème éthique puisqu'elles proviennent d'embryons avortés, et un risque de rejet de greffe.

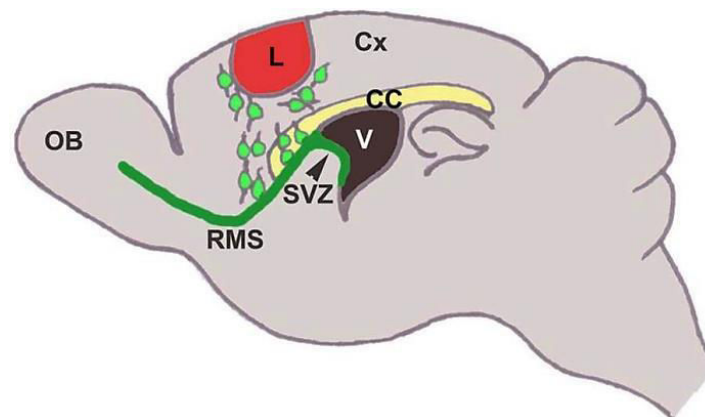
Une alternative serait l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPS) obtenues par reprogrammation génétique de cellules adultes. Ces cellules ont des propriétés proches des cellules embryonnaires, qui en font des candidats innovants pour la thérapie cellulaire. Cependant, le pourcentage de cellules adultes converties avec succès en cellules iPS est généralement faible, et les cellules résultantes conservent souvent des traces de leur vie antérieure comme cellules spécialisées (Qin et al., 2014).

Enfin, les caractéristiques et la disponibilité endogène des CSN adultes en font un enjeu majeur de recherche actuelle en vue de thérapie cellulaire. Ces cellules ont également montré leurs limites, comme une capacité de différenciation plus restreinte que les cellules souches embryonnaires et les cellules iPS, et une faible accessibilité au sein des tissus. Cependant, même si leur capacité de prolifération est moins élevée que les cellules souches embryonnaires, elles ne posent aucun problème éthique et permettent de pallier les problèmes de rejets. De plus, ces cellules peuvent être récupérées après biopsies chez l'Homme, maintenues plus d'un an *in vitro*, et être cryoconservées sans perdre leurs propriétés (Westerlund et al., 2005 ; Ayuso-Sacido et al., 2008).

Plusieurs études ont montré le rôle et l'intérêt des CSN dans diverses pathologies cérébrales. Il existe un recrutement endogène des CSN suite à une atteinte cérébrale, mais les nouvelles cellules fournies au site lésionnel ne suffisent pas à réparer la lésion. Cette réparation nécessite une mobilisation plus importante et une orientation phénotypique des CSN.

### 3.2.5.1. Cellules souches neurales et lésions cérébrales

Différents modèles expérimentaux de lésions corticales ont mis en évidence une augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ, une migration ectopique de progéniteurs et la genèse de nouveaux neurones et d'astrocytes au niveau du site endommagé. Les neuroblastes qui migrent vers le site lésionnel dérivent de la SVZ et du flux rostral migratoire (**Figure 33**) (Saha et al., 2012 et 2013).



**Figure 33 : Migration de progéniteurs de la zone sous-ventriculaire vers le site lésionnel cortical.**

*CC: corps calleux ; Cx: cortex ; L: lésion ; OB: bulbes olfactifs ; RMS: flux rostral migratoire ; SVZ: zone sous-ventriculaire ; V: ventricule latéral (Saha et al., 2012).*

La prolifération et la migration des neuroblastes vers un site lésionnel sont régulées par des facteurs chemoattractifs et chemorépulseurs, et par les cellules endothéliales. En effet, une augmentation de la vascularisation au niveau du site lésionnel facilite la migration des neuroblastes, qui longent les vaisseaux nouvellement formés (Saha et al., 2012 et 2013).

Suite à une ischémie cérébrale, la prolifération des CSN est augmentée pour produire des neuroblastes qui migrent vers la région lésée (Jin et al., 2001). Une telle mobilisation endogène des CSN après une ischémie a également été observée sur des tissus post-mortem chez l'Homme (Greenberg et Jin, 2007). L'augmentation de la neurogenèse endogène après une lésion ischémique n'est cependant pas suffisante pour réparer les tissus endommagés. En effet, même si certaines CSN sont capables de proliférer, de migrer et de générer des neurones fonctionnels, la plupart de ces cellules meurent prématurément et seules quelques cellules fonctionnelles survivent (~0,2 %) (Tobin et al., 2014).

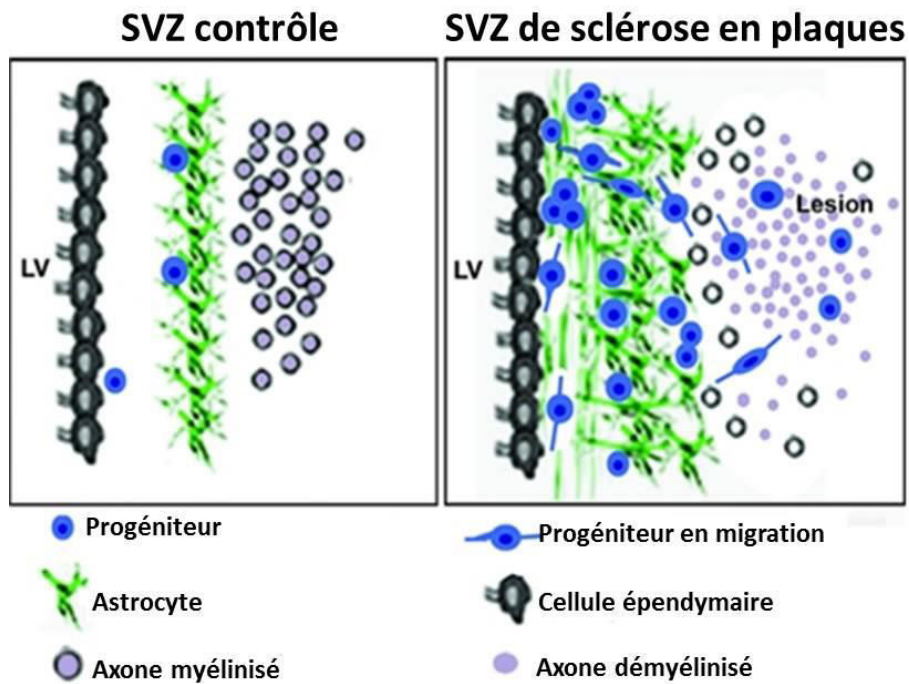
Dans le but d'améliorer la réparation tissulaire grâce aux cellules souches, des études ont développé des thérapies réparatrices basées sur l'utilisation des CSN, notamment par transplantation. Après une lésion ischémique qui provoque la perte de cellules neurales, la transplantation de CSN a démontré l'efficacité régénératrice de ces cellules. Même injectées en intraveineux, les CSN sont capables d'atteindre un cerveau hémorragique, de survivre, de migrer vers le site lésionnel, et de se différencier en neurones (10 %) et en astrocytes (75 %).

Les CSN peuvent aussi être modifiées génétiquement avant transplantation, afin de sur-exprimer des facteurs de survie cellulaire, comme BDNF ou Akt, et ainsi augmenter leur efficacité régénératrice (Yi et al., 2013). La transplantation de CSN permet également de réduire l'apoptose des neurones et le volume de la région lésée, et de favoriser l'angiogenèse et la neurogenèse endogène, grâce à une action neuroprotectrice et neurorégénératrice.

### 3.2.5.2. Cellules souches neurales et maladies neurodégénératives

Dans le cas des maladies neurodégénératives, la prolifération des CSN de la SVZ est soit augmentée, soit réduite selon les modèles, les espèces et les maladies étudiés (Coronas, 2009 ; Saha et al., 2012). Cette différence entre les modèles et les espèces peut s'expliquer par l'utilisation de modèles animaux qui ne sont pas suffisamment représentatifs de la maladie étudiée. La différence de recrutement des CSN endogènes entre les maladies neurodégénératives peut s'expliquer par le fait que certains neurotransmetteurs jouent un rôle sur la prolifération des CSN de la SVZ, comme la dopamine et la sérotonine qui favorisent la prolifération (Coronas, 2009). Développer une médecine régénératrice en augmentant la mobilisation des CSN est un enjeu majeur dans le cas de neurodégénérescence, afin d'améliorer ou d'activer le processus régénérateur des CSN endogènes ou de CSN transplantées.

Le phénomène de régénération endogène a été observé sur des coupes de cerveau post-mortem de patients atteints de sclérose en plaques, par une nette augmentation de la prolifération des cellules de la SVZ. Ces travaux ont montré la mobilisation péri-ventriculaire de progéniteurs gliaux vers les lésions striatales, qui pourraient donner naissance à des oligodendrocytes pour favoriser le processus de remyélinisation (**Figure 34**) (Nait-Oumesmar et al., 2007).



**Figure 34 : Illustration de l'activation de la zone sous-ventriculaire dans le cas de sclérose en plaques.** *LV: ventricule latéral ; SVZ: zone sous-ventriculaire* (Nait-Oumesmar et al., 2007).

Dans la maladie de Huntington, une augmentation de l'activité mitotique des CSN endogènes a également été observée dans la SVZ de rats, ayant subi une lésion mimant cette maladie neurodégénérative, suite à l'injection d'acide quinolinique dans le striatum (Tattersfield et al., 2004). Cependant, ce processus endogène seul ne suffit pas à réparer les lésions. Des modèles de transplantation de CSN humaines, par injections stéréotaxiques ou intraveineuses, ont révélé une amélioration des performances motrices et une neuroprotection associée à la libération de BDNF par les CSN transplantées, dans des modèles animaux de la maladie de Huntington (Kim et al., 2013).

Chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, la prolifération dans la SVZ est altérée alors que chez des modèles animaux, l'inverse se produit (Coronas et al., 2009). Dans des modèles animaux parkinsoniens, induits par injection stéréotaxique de 6-hydroxydopamine (6-OHDA), des CSN « naïves » ou génétiquement modifiées sont capables de survivre après transplantation, et de se différencier en neurones dopaminergiques dans la région lésée pour atténuer les déficits anatomiques et fonctionnels (Yi et al., 2013).

Dans la maladie d'Alzheimer, la neurogenèse serait augmentée au niveau de l'hippocampe de cerveau adulte humain, alors que cet effet reste contradictoire dans des modèles animaux (Taupin, 2010). Plusieurs études ont décrit des modèles de transplantation de CSN humaines chez des animaux présentant des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (pour revue Kim et al., 2013). Ces CSN sont capables de sécréter des facteurs neurotrophiques, comme NGF (« nerve growth factor ») et BDNF, ou de sur-exprimer par modification génétique le gène codant pour la choline acétyltransférase, qui permet la synthèse d'acétylcholine. Les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer présentent en effet des dysfonctions du système cholinergique qui est une des causes des désordres cognitifs. La transplantation de ces CSN, chez des animaux atteints, a finalement permis une amélioration notable des fonctions cognitives, d'apprentissage et de mémorisation, et ces cellules ont été capables de se différencier en neurones et astrocytes.

Dans des modèles animaux de sclérose latérale amyotrophique, la transplantation de CSN humaines non modifiées n'a pas permis d'améliorer les symptômes et la progression de la maladie. En revanche, chez des animaux ayant reçu des CSN humaines modifiées avant transplantation pour sur-exprimer le VEGFR, il a été observé une amélioration des fonctions motrices, une augmentation de la survie, et un retard dans l'apparition des premiers symptômes. Les mêmes effets ont été observés après transplantation intrathécale de motoneurones générés à partir de CSN humaines chez des modèles animaux de SLA (Kim et al., 2013).

### 3.2.5.3. Cellules souches neurales et tumeurs cérébrales

Dans le cas des tumeurs cérébrales, l'implication des CSN reste controversée et se révèle complexe. Certaines études suggèrent un effet anti-tumorigénique des CSN, alors que d'autres études proposent que les CSN soient à l'origine du développement de certaines tumeurs, notamment dans le cas des gliomes.

#### 3.2.5.3.1. Cellules souches neurales à l'origine des gliomes

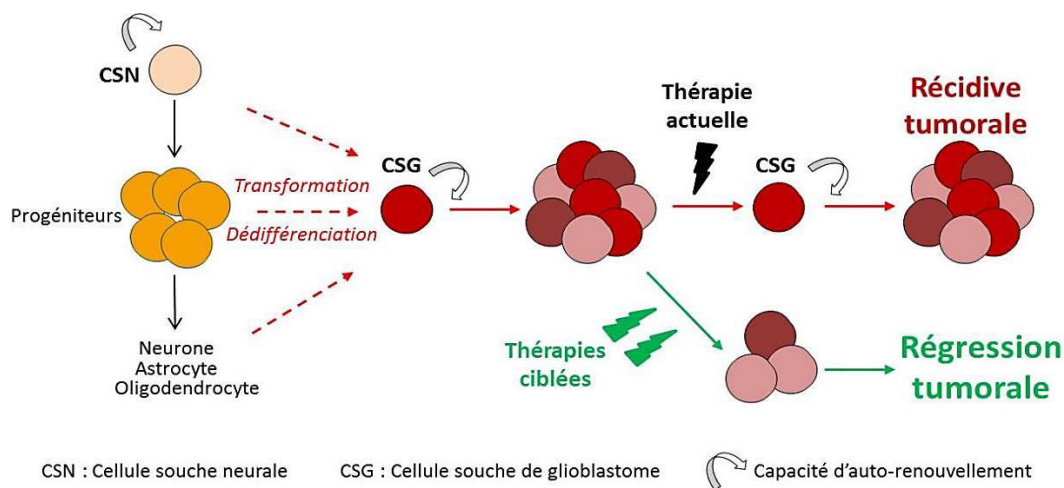
Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer l'origine des cellules cancéreuses. La première est la dédifférenciation de cellules saines différenciées par de multiples altérations génétiques. La seconde propose que des CSN transformées puissent devenir tumorigènes.



Des observations par IRM sur 100 patients présentant un gliome ont montré que la plupart des tumeurs est intimement associée à la SVZ. Dans 93 % des cas le tissu tumoral est en contact avec au moins une région de la SVZ (Barami et al., 2009). Au sein des gliomes, il a été mis en évidence une petite sous-population de cellules qui ont les mêmes propriétés que les CSN, et qui expriment des molécules semblables. Ces cellules, appelées cellules souches cancéreuses, sont capables de migrer et de s'auto-renouveler, sont multipotentes, et sont hautement prolifératives. Elles partagent avec les CSN les mêmes mécanismes de régulation, les mêmes marqueurs et molécules de signalisation, qui lorsqu'ils sont génétiquement dérégulés sont responsables du caractère tumorigène (Sanai et al., 2005 ; Quiñones-Hinojosa et Chaichana, 2007 ; Goffart et al., 2013).

Les autres cellules qui ont été mises en cause dans la formation tumorale, et notamment dans les glioblastomes, sont les progéniteurs oligodendrocytaires qui dérivent des CSN. Leur capacité proliférative importante dans le cerveau adulte, et leur distribution dans la substance blanche et dans la substance grise en font de potentiels responsables du développement tumoral. Le PDGFR $\alpha$ , qui contrôle la prolifération et la migration des progéniteurs oligodendrocytaires, est souvent altéré dans les glioblastomes. Enfin, une étude a montré que l'inhibition du récepteur Grp17, impliqué dans la différenciation des progéniteurs oligodendrocytaires, entraîne une diminution du développement tumoral dans un modèle murin de glioblastome (Goffart et al., 2013).

La transformation des CSN ou de leurs progéniteurs pourraient ainsi être à l'origine du développement tumoral. Dans le cas des glioblastomes, la transformation des CSN ou la dédifférenciation de progéniteurs, ou de cellules différenciées, pourraient engendrer des cellules souches de glioblastome responsables du développement tumoral. Ces cellules sont également chimiorésistantes et sont souvent responsables de la récurrence tumorale. Pour lutter efficacement contre les glioblastomes, il est important de développer des thérapies ciblant à la fois les cellules cancéreuses et les cellules souches de glioblastome pour permettre une régression totale de la tumeur (**Figure 35**) (Sanai et al., 2005 ; Quiñones-Hinojosa et Chaichana, 2007 ; Goffart et al., 2013).



**Figure 35 : Origine des cellules souches de glioblastome et thérapies des glioblastomes.**

### 3.2.5.3.2. Effet anti-tumorigénique endogène des cellules souches neurales

Un phénomène de chimiotropisme des CSN a été mis en évidence dans le cas des tumeurs cérébrales, notamment dans le cas des gliomes. *In vitro*, les CSN sont capables de migrer vers les gliomes, et ce phénomène est 5 fois plus important lorsque les cellules sont cultivées dans le milieu conditionné des gliomes. En effet, le microenvironnement des tumeurs joue un rôle déterminant dans l'attraction des CSN, tel que le HGF qui est le facteur de croissance le plus chemoattractant pour les CSN (Heese et al., 2005). Le tropisme et le recrutement des CSN vers les cellules tumorales sont favorisés par l'hypoxie, qui est caractéristique des tumeurs, via l'augmentation de la régulation de cytokines chimiotactiques et l'activation de différentes voies de signalisation (Zhang et al., 2012).

*In vivo*, des études ont montré que les CSN de la SVZ possèdent des propriétés anti-tumorigéniques en migrant vers le glioblastome pour réduire la croissance de la tumeur et améliorer la survie. De plus, il a été constaté que chez des souris adultes porteuses de glioblastome, la prolifération dans la SVZ est plus faible et la taille des tumeurs plus importante, que chez de jeunes souris (Glass et al., 2005 ; Walzlein et al., 2008).

### 3.2.5.3.3. Cellules souches neurales comme outils thérapeutiques

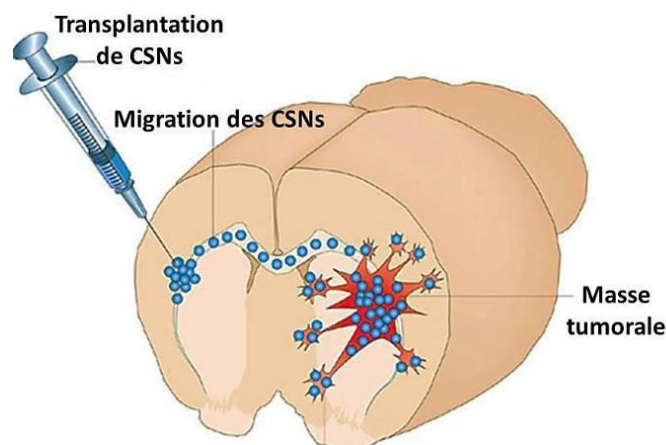
La capacité de migration endogène des CSN/précurseurs vers les gliomes, et leur capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, en font des outils thérapeutiques prometteurs pour la

délivrance de molécules ou de gènes visant à détruire les cellules tumorales (Müller et al., 2006).

Une lignée de CSN humaines a été modifiée pour exprimer la cytosine deaminase, qui est capable d'activer une molécule anti-tumorale (la fluorouracil). Transplantées par stéréotaxie chez des animaux porteurs de gliome, ces CSN sont capables de migrer vers la tumeur, sans effet toxique sur le tissu sain, et de réduire de façon importante le volume tumoral (Aboody et al., 2013).

Dans une autre étude récente, une lignée de CSN humaines a été modifiée pour exprimer les enzymes carboxylesterases, qui permettent d'activer l'irinotecan, une molécule anti-tumorale utilisée pour traiter des tumeurs malignes du cerveau. Que ces CSN soient transplantées par stéréotaxie ou par voie intraveineuse, elles conservent leur propriété de tropisme et permettent d'augmenter la cytotoxicité du traitement anti-tumoral envers les cellules cancéreuses (Metz et al., 2013).

Le volume tumoral de souris porteuses de glioblastome a été réduit de 77 %, et la survie des animaux augmentée de 75 %, après transplantation de CSN modifiées pour exprimer un gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine Gas1, qui inhibe la croissance cellulaire. Ces CSN, injectées dans l'hémisphère controlatéral au glioblastome, sont capables de migrer vers le tissu tumoral par chimiotropisme (**Figure 36**) (López-Ornelas et al., 2014).



**Figure 36 : Tropisme des cellules souches neurales vers la tumeur** (Müller et al., 2006).

Enfin, une étude récente et originale a décrit une nouvelle technique d'administration de CSN par injection intranasale, qui est une technique alternative non invasive, contrairement aux injections intracérébrales. Cette technique s'est révélée très efficace puisque 6 h après leur injection, les CSN ont rapidement ciblé le gliome (Reitz et al., 2012).

## Chapitre 4: Les peptides pénétrants comme nouveaux outils thérapeutiques prometteurs

### 4.1. Les peptides pénétrants ou « Cell-Penetrating Peptides » (CPP)

#### 4.1.1. Présentation

La capacité de pénétration cellulaire a été décrite pour la première fois par Frankel et Pabo en 1988, pour la protéine TAT (« trans-activator of transcription »), issue du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), puis par Joliot et al. en 1991, pour l'homéodomaine *Antennapedia* de la Drosophile. Suite à ces travaux, le tout premier peptide de pénétration cellulaire (CPP pour « Cell-Penetrating Peptide ») à être décrit est la pénétratine, ou *Antp*, qui dérive de la troisième hélice de l'homéodomaine *Antennapedia* de la Drosophile. Par la suite, de nombreux CPP naturels ou synthétiques ont été développés. Ces peptides sont caractérisés par une courte séquence peptidique (5-30 acides aminés), une solubilité dans l'eau, et une charge nette positive à pH physiologique due à la présence de plusieurs résidus arginines et/ou lysines. Ils sont classés selon leur nombre de résidus et leur hydrophobicité. Deux grandes familles de CPP ont ainsi été décrites, les CPP amphipathiques, et les CPP non amphipathiques ou cationiques, avec une charge nette positive élevée, et formés de quelques acides aminés (**Tableau 9**) (Madani et al., 2011 ; Wang et al., 2014).

La capacité de ces CPP à traverser la membrane plasmique de la majorité des cellules en font des candidats prometteurs pour la délivrance cellulaire. De nombreuses études utilisent les CPP pour véhiculer de façon non-invasive diverses molécules thérapeutiques. Les CPP sont considérés comme de nouveaux systèmes thérapeutiques pour la délivrance intracellulaire et/ou intranucléaire de différents composés, à la fois *in vitro* et *in vivo*, incluant des nanoparticules, d'autres peptides, des protéines, des acides nucléiques (oligonucléotides, ADNc, ARN, siRNA), ou encore des agents de contraste pour l'imagerie (**Tableau 9**) (Wang et al., 2014).

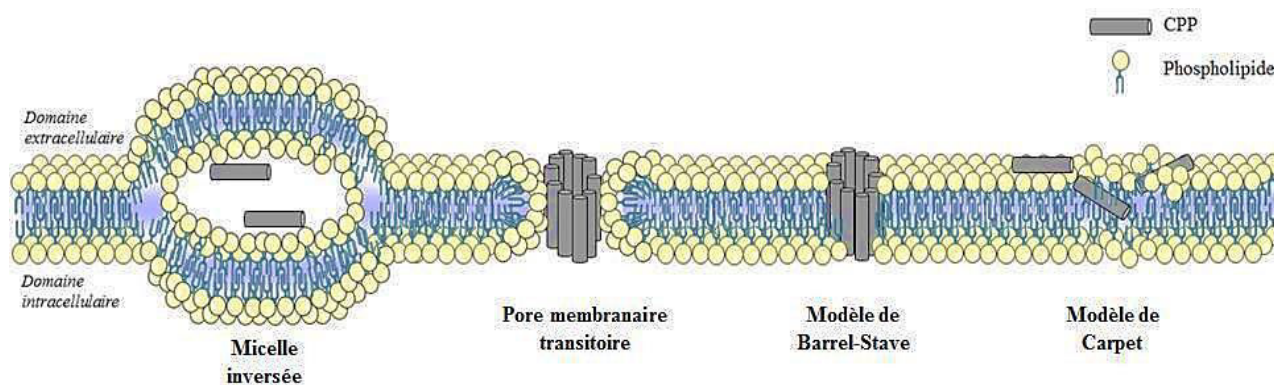
#### 4.1.2. Mécanismes d'entrée

De nombreuses études ont été menées sur les mécanismes moléculaires responsables de l'internalisation des CPP dans les cellules. Il existerait une balance entre la translocation directe à travers la membrane et le transport actif via l'endocytose. Plusieurs facteurs

influencent l'implication de l'une ou l'autre de ces voies, notamment la concentration extracellulaire en CPP, leur charge positive nette, leur hydrophobicité, leur conformation et leur taille, mais également le type cellulaire, et la présence et le type de « cargo » que transportent les CPP. Chargés positivement, les CPP interagissent avec des composants de la membrane chargés négativement, comme les glycosaminoglycans (héparanes et chondroïtines sulfates) et les phospholipides (Ziegler, 2008). Plusieurs études indiquent que pour de faibles concentrations en CPP la voie d'entrée majeure serait l'endocytose, alors que pour des concentrations élevées, la translocation directe serait majoritaire (Mueller et al., 2008 ; Madani et al., 2011 ; Jones et Sayers, 2012 ; Wang et al., 2014).

#### 4.1.2.1. Translocation directe

Le transport passif à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique, ou translocation directe, a été le premier mécanisme d'entrée énergie-indépendant mis en évidence pour les CPP. Plusieurs modèles ont été décrits, comme la formation de micelles inversées, la formation de pores membranaires, les modèles de Barrel-Stave et de Carpet (**Figure 37**) (Derossi et al., 1994 et 1996 ; Yeaman et Yount, 2003 ; Herbig et al., 2005 ; Deshayes et al., 2006).



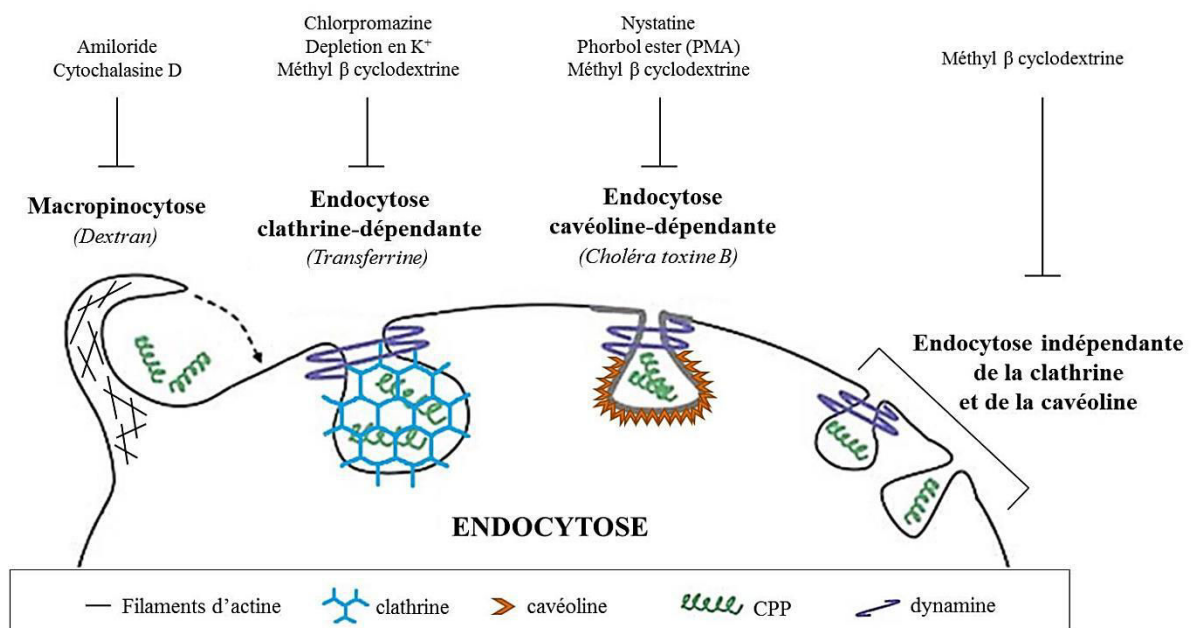
**Figure 37 : Modèles de translocation directe des CPP à travers la membrane plasmique: micelle inversée, pore membranaire transitoire, modèles de Barrel-Save et de Carpet.**

Différentes méthodes permettent de mettre en évidence le mécanisme de translocation directe, comme l'appauvrissement en ATP intracellulaire ou une faible température (4°C) (Richard et al., 2003 ; Madani et al., 2011). Ce phénomène de translocation passive par interaction peptide/phospholipides membranaires, a également été mis en évidence grâce à des modèles de vésicules larges unilamellaires (LUV, pour « large unilamellar vesicle ») ou

de vésicules géantes de membrane plasmique (GPMV, pour « giant plasma membrane vesicle »). L'avantage de ce type de vésicules réside dans le fait qu'elles sont dépourvues de cytosquelette et de mécanismes dépendant de l'énergie. Les GPMV représentent le modèle d'étude membranaire le plus naturel, puisque leur composition lipidique et leur contenu (cytoplasme) dérivent directement des cellules dont elles sont issues (Ziegler, 2008 ; Säälük et al., 2011 ; Amand et al., 2011).

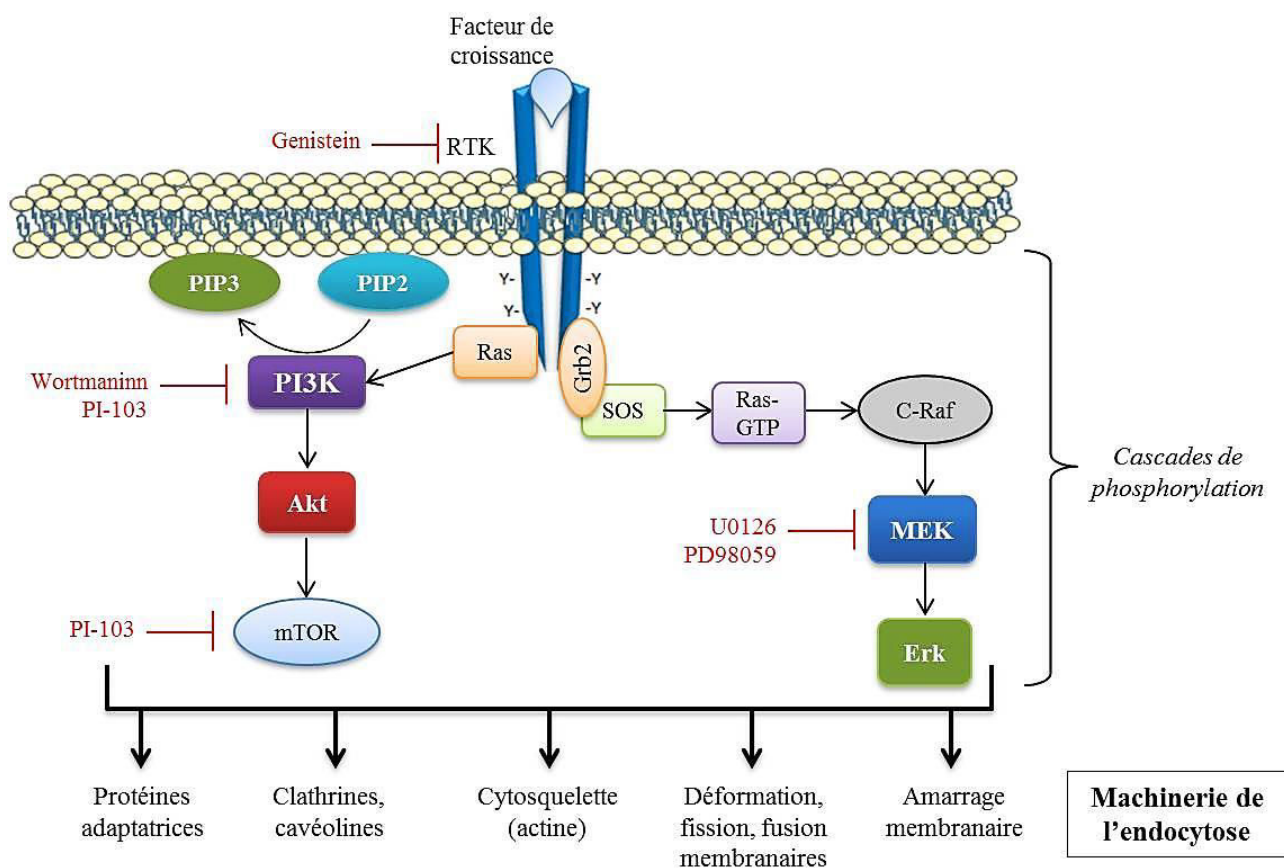
#### 4.1.2.2. Endocytose

La pénétration des CPP à l'intérieur des cellules s'effectue également via un transport actif, appelé endocytose, qui permet par invagination de la membrane, d'internaliser des molécules extracellulaires dans des vésicules endosomales. L'endocytose regroupe la phagocytose, et la pinocytose qui elle-même est composée de la macropinocytose et des endocytoses dépendantes et indépendantes de la clathrine et de la cavéoline (**Figure 38**). L'implication de ce mécanisme d'internalisation température et énergie-dépendant a été montrée en traitant les cellules à 4°C ou en appauvrissant le milieu en ATP (Richard et al., 2003). La plupart des études menées sur l'entrée des CPP a montré l'implication de la pinocytose, via l'utilisation d'inhibiteurs et de marqueurs spécifiques de ces voies d'entrée, comme illustré sur la **figure 38** (Richard et al., 2003 et 2005 ; Duchardt et al., 2007 ; Madani et al., 2011).



**Figure 38 : Voies d'endocytose impliquées dans l'entrée des CPP et les différents inhibiteurs et marqueurs spécifiques (modifié de Stewart et al., 2008).**

Les mécanismes d'endocytose requièrent une machinerie cellulaire diverse (déformation, fission, trafic, amarrage, et fusion membranaires, protéines adaptatrices...), mise en place et régulée par différents composants cellulaires tels que les protéines kinases. L'ensemble de ces kinases constitue de larges réseaux de signalisation cellulaire qui interagissent entre eux, et qui sont liés directement ou par des intermédiaires à la machinerie de l'endocytose (Liberali et al., 2008). Par exemple, la phosphorylation des phosphatidylinositol bi-phosphate et tri-phosphate (PIP2 et PIP3), enrichis au niveau de la membrane plasmique, favorise le trafic membranaire, la maturation et la motilité des endosomes, ainsi que l'organisation du cytosquelette membranaire. Leur implication a notamment été mise en évidence dans la formation des vésicules recouvertes de clathrine, ainsi que dans l'organisation des microfilaments d'actine pendant la macropinocytose (Jost et al., 1998 ; Zhou et al., 1998 ; Haucke, 2005). Ces phosphatidylinositols sont phosphorylés par PI3K qui est activée par les RTK. L'activation de ces récepteurs, notamment l'EGFR, entraîne des cascades de signalisation spécifique, comme la voie PI3K/Akt et la voie des MAPK au niveau de la membrane plasmique, qui favorisent les mécanismes d'endocytose (**Figure 39**) (Wilde et al., 1999 ; McPherson et al., 2001).



**Figure 39 : Exemple de voies de signalisation régulant la machinerie de l'endocytose et sites d'action des inhibiteurs spécifiques de ces voies.**

#### 4.1.3. Les CPP comme systèmes de délivrance moléculaire intracellulaire

La capacité de pénétration intracellulaire des CPP en fait des candidats intéressants de délivrance de molécules thérapeutiques dans divers domaines cliniques. Depuis une vingtaine d'années, des centaines d'études ont été réalisées, dont certaines sont en phases d'essais cliniques (Heitz et al., 2009). En effet, ces peptides sont capables de transporter des « cargos » qui naturellement ne peuvent pas accéder aux compartiments cellulaires, ni même à certaines régions de l'organisme, lorsqu'il s'agit par exemple de traverser la barrière hémato-encéphalique. Les « cargos », couplés de façon covalente ou non, sont de nature très diverses puisqu'ils regroupent des oligonucléotides (ADNc (ADN complémentaire), ARN, siRNA (petits ARN interférents)), des fluorochromes, des nanoparticules, des agents de contraste pour l'imagerie à résonance magnétique, ou encore des drogues ou d'autres peptides (**Tableau 9**). Quelques exemples de couplage sont présentés par la suite pour illustrer les multiples utilisations des CPP comme système de délivrance.

##### 4.1.3.1. Couplage CPP-protéines/peptides

La délivrance de protéines couplées aux CPP a été mise en évidence *in vivo* par Schwarze et al., en 1999 en montrant le transport de la  $\beta$ -galactosidase couplée au peptide TAT, dans la plupart des tissus, et notamment dans le cerveau, après une injection intrapéritonéale chez la souris. En 2004, une équipe a identifié un peptide cyclique proapoptotique, appelé P15, qui couplé au CPP TAT, induit la mort des cellules tumorales et exerce des effets anti-tumoraux *in vivo* (Perea et al., 2004). Suite à une ischémie cérébrale, les lésions ont pu être réduites grâce au couplage TAT-GDNF (« glial cell line-derived neurotrophic factor »), une protéine favorisant la survie neuronale (Kilic et al., 2005). Une étude a également montré que le couplage à la pénétatine du « glucagon-like peptide-1 » (GLP-1) et de l'exendine-4, deux peptides utilisés dans le traitement du diabète de type 2, facilitent leur absorption nasale et intestinale (Khafagy et al., 2009) (**Tableau 9**).

##### 4.1.3.2. Couplage CPP-acides nucléiques

Une application de siRNA couplés à la pénétatine a permis d'augmenter l'efficacité d'entrée des siRNA dans des neurones sympathiques et d'hippocampe, dans le but de réprimer l'expression de la SOD1 (« superoxide dismutase 1 ») et de la caspase-3 (Davidson et al., 2004). Une autre étude a montré l'efficacité de pénétration et les effets anti-tumoraux



de siRNA, dirigés contre la cycline B1 pour arrêter le cycle cellulaire, en les couplant au CPP MPG-8 (peptide dérivé de VIH-1 et de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T du virus SV40) (Crombez et al., 2009b). Un complexe siRNA-R9 (peptide de synthèse polyarginine) permet également de réduire la croissance et la vascularisation tumorales, en bloquant l'expression de VEGF (Kim et al., 2006). D'autres travaux ont montré l'efficacité de la transfection d'un plasmide lorsqu'il est couplé à TAT-10H (conjugué à des résidus histidine) (Lo et Wang, 2008). De récentes études ont montré que la fusion d'un CPP polyarginine à un ADN codant pour un co-activateur de divers facteurs de transcription, a permis d'élever la différenciation potentielle de cellules souches mésenchymateuses humaines dans différents types cellulaires (Jo et al., 2012) (**Tableau 9**).

#### 4.1.3.3. Couplage CPP-nanoparticules

Les nanoparticules sont très étudiées comme outil diagnostique et thérapeutique, mais leur capacité à traverser les membranes reste limitée. De plus en plus de nanoparticules sont de ce fait complexées à des CPP pour faciliter leur internalisation dans les cellules. Des CPP comme TAT, R9 ou encore la pénétratine ont permis de délivrer des micelles, des liposomes, des nanoparticules d'or, des quantum dots, ou encore des dendrimères pour des applications thérapeutiques et d'imagerie cellulaire (Torchilin, 2008). Des liposomes fonctionnalisés avec TAT, et remplis de paclitaxel, une drogue du cytosquelette inhibitrice de la mitose, ont révélé des effets anti-tumoraux prometteurs (Niu et al., 2011). Une étude a montré les aires de lésion aortique dans un modèle d'athérosclérose de souris, en marquant de différentes couleurs les monocytes/macrophages et les lymphocytes T, grâce à des quantum dots fonctionnalisés avec de la maurocalcine (Jayagopal et al., 2009) (**Tableau 9**).

**Tableau 9 : Caractéristiques de quelques CPP utilisés comme système de délivrance.**

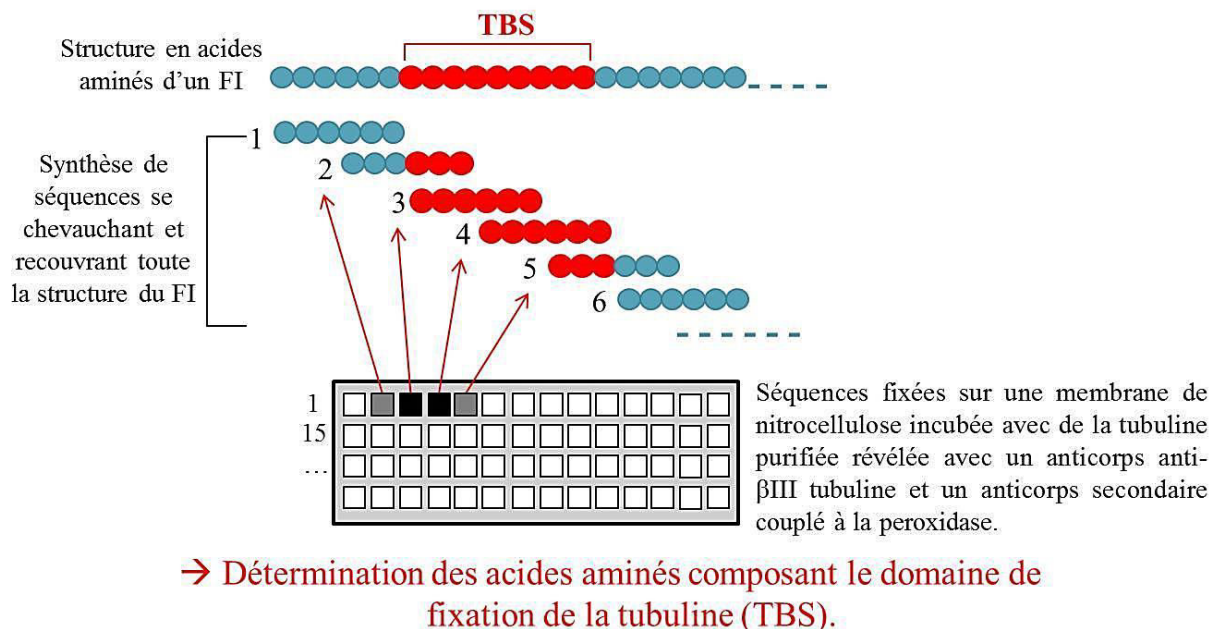
Nom	Séquence	Nombre de résidus	Origine	Cargos	Références
TAT	GRKKRRQRRRPQ	13	protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	protéines / peptides / plasmide / nanoparticules	Vivès 1997; Schwarze 1999; Klicic 2005; Perea 2004; Lo 2008; Nin 2011
R9	RRRRRRRR	9	synthèse	siRNA	Wender 2000; Kim 2006
Pénétratine (Anip)	RQIKIWFQNRRMKWKK	16	homéodomaine Antennapedia chez la Drosophile	peptides / siRNA	Derossi 1994; Prochiantz 1996; Khafagy 2009; Davidson 2004
pVEC	LLILRRIRKQAHASK	18	cadhérine de l'endothélium vasculaire	peptides	Elmqvist 2001; Eriste 2013
MPG	GALFLGFLGAAAGSTMGAWSQPKKRKV	27	motif dérivé de VIH-1 gp41 lié au domaine dérivé de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T du virus SV40	siRNA	Morris 1997; Crombez 2009b
CADY	GLWRALWRLRLSLWRLWRA	20	dérivé du peptide PPTG1, variant du peptide de fusion JTS1	siRNA	Crombez 2009a
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	21	transportan	RNA	Soomets 2000; Mae 2009
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKRKV	21	motif hydrophobique riche en tryptophane + spacer + domaine dérivé de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T du virus SV40	enzyme	Morris 2001; Deshayes 2004; Kim 2009
S413-PV	ALWKTLKKVLKAPKKRRKVC	13	Dermaseptine-S4 liée à la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T du virus SV40	plasmides / siRNA	Mano 2006; Cardoso 2013
Maurocalcine	GDCLPHLKLCKENKDCCKKCKRRGTNEKRCR	33	venin d'un scorpion tunisien Scorpio maurus plamatus	doxorubicine / quantum dots	Fajoun 2000; Esteve 2005; Aroui 2009; Jyagopal 2009
Crotamine	YKQCCHKGGHCFPKKIKLPPSSDFGKMDGRWRWKCC KKGSG	42	protéine du venin du crotale	DNA	Kerfais 2004; Chen 2012

## 4.2. Les peptides issus des filaments intermédiaires

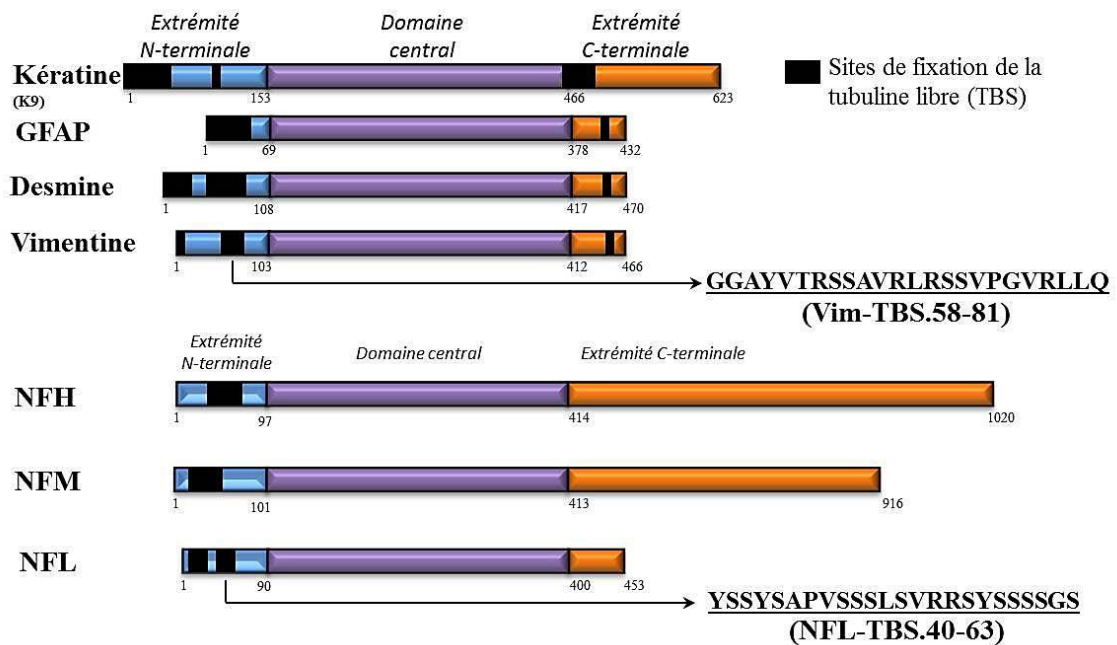
### 4.2.1. Leur découverte

Au laboratoire, des études menées sur la biologie des différents éléments du cytosquelette ont permis de mettre en évidence des interactions entre les filaments intermédiaires (FI) et la tubuline. *In vivo*, la tubuline  $\beta$ III a été mise en évidence au sein des agrégats de neurofilaments (NF) présents dans le corps cellulaire des neurones de souris transgéniques NFH-LacZ, tandis que dans les axones, les NF sont absents et le nombre de MT est nettement augmenté, comparé à des souris contrôles. Ce modèle suggère la capacité des NF à moduler l'assemblage des MT, en agissant comme des réservoirs de tubuline libre (Eyer et Peterson, 1994). Il a récemment été montré que les NF, tout comme d'autres FI (vimentine, desmine, kératine, GFAP), possèdent des sites de fixation de la tubuline libre, appelés domaines TBS pour « Tubulin Binding Sites » (Bocquet et al., 2009).

La technique de « peptide array » a permis de mettre en évidence les séquences en acides aminés, dans les domaines N- ou C-terminaux des FI, capables de fixer la tubuline non polymérisée (**Figures 40 et 41**).



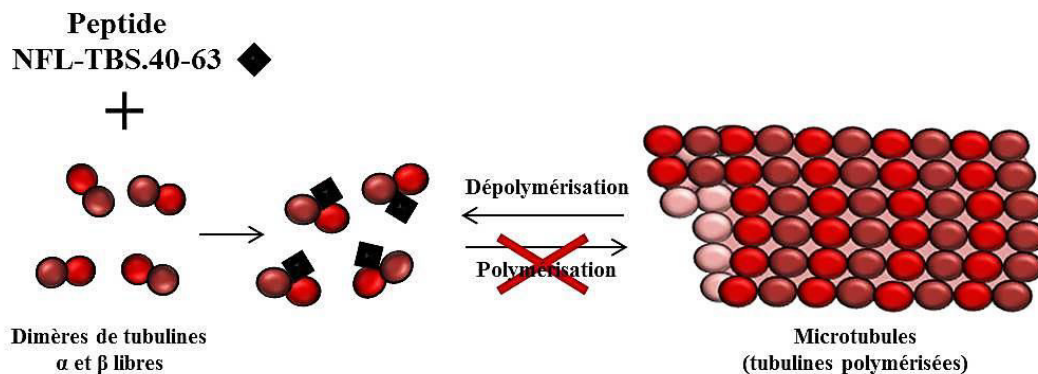
**Figure 40 : Principe de la technique de « peptide array ».**



**Figure 41 : Localisation des sites de fixation de la tubuline libre (TBS) sur différents filaments intermédiaires, et de deux peptides correspondants, Vim-TBS.58-81 et NFL-TBS.40-63.**

(Longueur en acides aminés schématisée d'après Szeverenyi et al., 2008).

Certains des peptides correspondant aux domaines TBS sont capables d'inhiber la polymérisation des MT. C'est notamment le cas du peptide NFL-TBS.40-63, issu de la sous-unité légère des NF (NFL), et composé de 24 acides aminés. Ce peptide réduit de façon importante la polymérisation des MT, jusqu'à l'abolir totalement pour de fortes concentrations (Figure 42). Ces effets ont aussi été observés dans des cellules de glioblastome humain T98G, qui après internalisation du peptide, ont leur réseau de MT détruit (Bocquet et al., 2009).



**Figure 42 : Représentation schématique des effets du peptide NFL-TBS.40-63 sur la polymérisation des microtubules.**

Un autre peptide issu de la vimentine, le peptide Vim-TBS.58-81 (**Figure 41**), est capable d'entrer dans les cellules T98G, sans altérer le réseau de MT, et de se localiser dans le noyau des cellules (Balzeau et al., 2012).

La capacité de pénétration cellulaire de ces peptides, semblable aux CPP, en font des candidats thérapeutiques innovants et prometteurs, notamment dans le domaine de la cancérologie.

#### 4.2.2. Le peptide Vim-TBS.58-81

La séquence en acides aminés 58 à 81 correspond à un domaine de fixation de la tubuline libre sur la partie N-terminale de la protéine vimentine, exprimée dans les cellules mésenchymateuses et retrouvée dans les fibroblastes (Bocquet et al., 2009 ; Szeverenyi et al., 2008). Le peptide correspondant à ce domaine TBS, appelé Vim-TBS.58-81, est capable d'entrer dans les cellules de glioblastome humain T98G, sans altérer le réseau de MT, contrairement au peptide NFL-TBS.40-63. L'internalisation de ce peptide dans les cellules est dose-dépendante et se fait de façon massive, puisque dès 15  $\mu\text{mol/L}$  la quasi-totalité des cellules analysées ont incorporé le peptide. Il a également été montré que l'entrée de Vim-TBS.58-81 dans les cellules se fait via la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline. De manière intéressante, le peptide Vim-TBS.58-81 est retrouvé dans le cytoplasme et le noyau des cellules T98G, et possède une structure secondaire stable en hélice  $\alpha$ , tout comme un CPP bien connu, TAT.48-60 (Balzeau et al., 2012 ; Saini et al., 2013).

La capacité de ciblage nucléaire de ces deux peptides a été étudiée et comparée en les couplant au peptide pro-apoptotique P10, qui est un fragment de la protéine p21/WAF1 (protéine médiatrice de l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant les complexes cyclines). Dans le noyau, le peptide P10 va inhiber la prolifération des cellules en bloquant la réplication de l'ADN (Warbrick et al., 1995). Alors que le peptide de fusion Vim-TBS.58-81-P10 est capable de se localiser essentiellement dans le noyau des cellules T98G, le peptide de fusion TAT.48-60-P10 n'est retrouvé qu'au niveau cytoplasmique. Seul Vim-TBS.58-81-P10 est capable de réduire la prolifération des cellules de glioblastome (Balzeau et al., 2012). Ces travaux montrent l'intérêt du peptide Vim-TBS.58-81 dans le ciblage et la délivrance de différentes molécules dans le noyau des cellules.

#### 4.2.3. Le peptide anti-glioblastome NFL-TBS.40-63

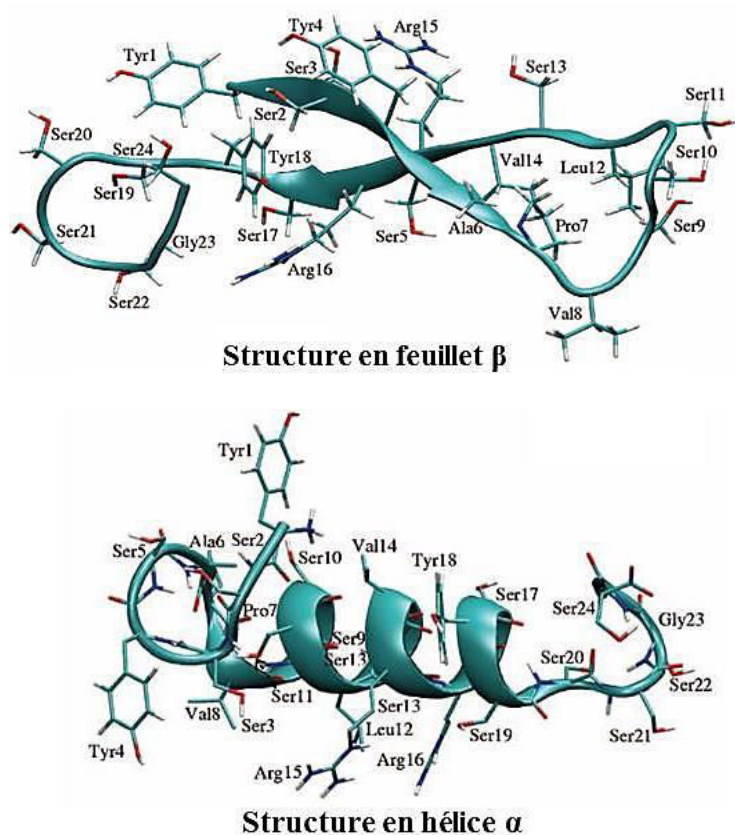
Il a été montré que le peptide NFL-TBS.40-63 entre de façon massive et dose-dépendante dans plusieurs lignées de cellules de gliome humain, de rat et de souris, via un mécanisme de transport actif, température et énergie-dépendant, caractéristique de l'endocytose. L'incorporation du peptide dans les cellules de gliome détruit leur réseau de MT, bloquant ainsi la division cellulaire, la prolifération et la migration des cellules tumorales qui entrent alors en apoptose. Même si le peptide entre peu dans les cellules saines, de type neurones ou astrocytes, il n'a pas d'effet toxique sur ces cellules, dont le réseau de MT reste intact (**Figure 43**).

En revanche, le peptide a révélé des caractéristiques variables sur d'autres lignées cellulaires. Alors qu'il entre dans des cellules issues d'une lignée d'adénocarcinome épithélial humain (HeLa) et d'une lignée de fibroblastes (NIH-3T3), sans altérer leur réseau de MT, il entre peu dans des cellules d'adénocarcinome prostatique (LNCap). En revanche, le peptide a un effet sur les MT de cellules issues de cancer du sein (MCF-7), de cancer colorectal (LS187) et de neuroblastome (NGP) (Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a). Ces travaux suggèrent une entrée sélective et un effet spécifique du peptide sur certains types de cellules.



**Figure 43 : Internalisation du peptide NFL-TBS.40-63 et effet sur le réseau de microtubules, dans des cellules de gliome F98 et des cellules saines de rat (tubuline en rouge ; peptide en vert ; noyaux en bleu) (Bergès et al., 2012a).**

Les propriétés de pénétration et d'action du peptide NFL-TBS.40-63 dépendent de sa composition et de l'ordre en acides aminés, ainsi que de son état de phosphorylation. En effet, l'internalisation d'un peptide « scramble », NFL-TBS.Scr (séquence en acides aminés 40 à 63 dans le désordre) dans les cellules de glioblastome T98G est moins importante, et il n'y a pas d'effet sur le réseau de MT (Bergès et al., 2012a). De plus, la substitution séquentielle des acides aminés, par une alanine ou par des acides aminés phosphorylés, entraînent une diminution de l'internalisation et de l'effet du peptide sur les cellules T98G. Des travaux ont en effet montré que la substitution de chaque acide aminé par une alanine réduit l'altération des MT. De la même façon, tous les acides aminés, sauf les sérines en position 21 et 24, réduisent l'entrée du peptide dans les cellules. L'importance de la structure primaire du peptide NFL-TBS.40-63 a permis de prédire deux structures secondaires différentes, une en feuillet  $\beta$  antiparallèle et une en hélice  $\alpha$  (**Figure 44**). L'ensemble de ces travaux met en évidence des relations structure/fonction importantes pour le peptide NFL-TBS.40-63, et indique des repliements spécifiques qui pourraient être en lien avec l'entrée dans la cellule et l'interaction avec la tubuline (Bergès et al., 2012b).



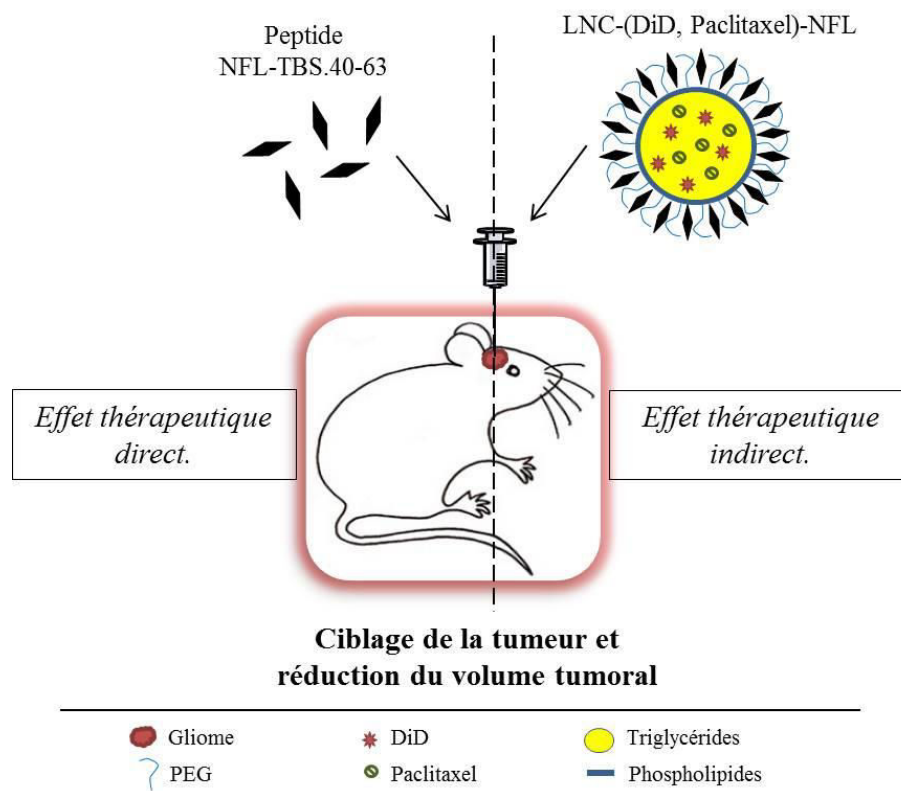
**Figure 44 : Repléments suggérés du peptide NFL-TBS.40-63** (Bergès et al., 2012b).

Des études menées *in vivo*, chez des animaux porteurs de gliome, ont montré une réduction significative de la croissance tumorale d'environ 70 % après injection intratumorale du peptide NFL-TBS.40-63, comparé à des animaux contrôles non traités (**Figure 45**). De plus, injecté chez des animaux sains, le peptide n'est pas retrouvé dans le tissu sain et n'a pas d'effet toxique sur le tissu cérébral (Bergès et al., 2012a).

Il a également été montré que ce peptide peut être utilisé comme vecteur de nanoparticules, de type nanocapsules lipidiques (LNC), remplies d'un agent anti-cancéreux, le paclitaxel. Ces LNC ont été mises au point par l'équipe INSERM UMR 1066 dirigée par le Pr. Jean-Pierre Benoît. Elles sont constituées d'un corps lipidique liquide composé de triglycérides, et d'une enveloppe lipidique solide composée de phospholipides et de chaînes longues de polyéthylène glycol (PEG) hydrophiles. Ces nanocapsules ont une taille comprise entre 20 et 100 nm, et peuvent incorporer dans leur cœur lipidique, différents composés lipophiles. Des travaux ont été réalisés avec des LNC remplies d'un fluorochrome proche infrarouge, le DiD (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-dicarbocyanine), et du paclitaxel. Ces LNC couplées ou non avec le peptide ont été testées *in vitro* sur des cellules de gliome de souris GL261, et *in vivo* chez des animaux porteurs de ces gliomes. Les résultats ont montré que le peptide favorise la délivrance des LNC en ciblant les cellules tumorales. En effet, les LNC-paclitaxel fonctionnalisées avec le peptide réduisent de façon plus importante le volume tumoral d'environ 75%, que des LNC-paclitaxel non fonctionnalisées qui le réduisent d'environ 60 %, comparé à des animaux contrôles non traités (**Figure 45**) (Balzeau et al., 2013).

L'ensemble de ces travaux propose ainsi des applications thérapeutiques dans le domaine de la cancérologie, notamment pour lutter contre les glioblastomes. La capacité de ciblage des cellules de gliome par le peptide NFL-TBS.40-63, seul ou comme vecteur de nanoparticules, ainsi que son action spécifique sur ce type de cellules, font de ce peptide un agent thérapeutique prometteur dans le traitement des tumeurs cérébrales de haut grade (**Figure 45**).





**Figure 45 : Etudes *in vivo* du peptide NFL-TBS.40-63, injecté seul ou couplé à des nanoparticules remplies d'un agent anti-cancéreux, chez des animaux porteurs de gliome.** Les animaux traités avec le peptide, seul ou comme vecteur de nanoparticules remplies de paclitaxel, ont révélé une amélioration de leur état physique et une réduction significative du volume de la tumeur, comparés à des animaux non traités (Bergès et al., 2012a ; Balzeau et al., 2013).

Une autre application du peptide NFL-TBS.40-63, développée récemment au laboratoire, a mis en évidence ses effets neuro-protecteurs lors de pathologies liées à la démyélinisation des axones, comme dans le cas de la sclérose en plaques. En effet, lors de démyélinisations axonales, les NF et la tubuline libérés dans l'espace extracellulaire pourraient réguler le processus de remyélinisation (Fressinaud et Eyer, 2013). *In vitro*, la destruction des cellules myélinisantes, comme les oligodendrocytes, est induite en traitant ces cellules avec la lysophosphatidyl choline (Fressinaud, 2005). Dans ces conditions, le peptide NFL-TBS.40-63 favorise la différenciation et la maturation des oligodendrocytes, sans altérer l'état des astrocytes, et protège partiellement les cellules myélinisantes de la toxicité induite par la lysophosphatidyl choline (Fressinaud et Eyer, 2014). Les études menées jusqu'à présent sur le peptide NFL-TBS.40-63, notamment dans le domaine de neuropathologies liées à la démyélinisation axonale, permettent de mieux comprendre l'implication des neurofilaments dans ce type de pathologies.

## **Chapitre 5: Projets de recherche**

Le cytosquelette joue un rôle important dans la biologie des cellules, pour leur maintien, leur structure, leur prolifération, leur migration, ou encore le transport intracellulaire des organites. Les FI sont les composants du cytosquelette les plus abondants dans le système nerveux. Des perturbations dans leur expression et leur organisation sont associées à de multiples maladies neurodégénératives et à des tumeurs cérébrales, telles que les gliomes de haut grade. Ils représentent d'ailleurs de potentiels marqueurs utiles pour améliorer le diagnostic et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans la revue ci-après, nous avons résumé différents résultats obtenus dans ce domaine (Article de revue : Lépinoux-Chambaud et Eyer, *Histochem Cell Biol* 2013).

Dans des conditions physiologiques normales, les FI sont capables d'interagir avec les autres constituants du cytosquelette. Ainsi, dans le laboratoire, il a été montré que les FI contiennent des sites de fixation de la tubuline libre (sites TBS) sur leurs domaines N- et C-terminaux (Bocquet et al., 2009). Parmi les peptides correspondant à ces sites TBS, le peptide NFL-TBS.40-63, issu de la sous-unité légère des NF (NFL), représente un potentiel agent thérapeutique pour lutter contre les glioblastomes. En effet, ce peptide est capable de détruire *in vitro* le réseau de MT de cellules de glioblastome, de réduire leur prolifération et d'induire leur mort par apoptose. Chez des animaux porteurs de gliome, le peptide permet de réduire de façon importante le volume tumoral. L'intérêt de ce peptide réside dans sa sélectivité d'entrée dans les cellules de glioblastome (en effet il entre peu voire pas dans les cellules saines de type neurones ou astrocytes), et dans sa spécificité d'action sur ces cellules (*in vitro* et *in vivo* le peptide n'a pas d'effet cytotoxique détectable sur les cellules saines) (Bergès et al., 2012a). Les propriétés anti-glioblastomes et la sélectivité d'entrée du peptide en font un candidat thérapeutique prometteur pour traiter les glioblastomes, ces tumeurs cérébrales de haut grade les plus fréquentes et les plus agressives pour lesquelles les traitements actuels manquent d'efficacité et de spécificité.

Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer les mécanismes moléculaires responsables de l'entrée sélective et massive du peptide dans les cellules de glioblastome. Nos travaux se sont basés sur les mécanismes d'entrée connus des peptides de pénétration cellulaire (ou CPP), qui utilisent une balance entre l'endocytose par un transport actif, et la translocation directe à travers la membrane (Madani et al., 2011 ; Wang et al., 2014).

Différents signaux intracellulaires, via l'activation des récepteurs RTK et des voies de signalisation associés à la machinerie de l'endocytose, ont également été analysés pour mieux comprendre la sélectivité d'entrée du peptide dans les cellules de glioblastome (1<sup>er</sup> article scientifique : Lépinoux-Chambaud et Eyer, *Int J Pharm* 2013).

Dans un second temps, nous nous sommes interrogés sur les potentiels effets du peptide sur les mitochondries. En effet, il a été récemment montré que la sous-unité NFL interagit avec des molécules responsables de la dynamique mitochondriale (Gentil et al., 2012). Ainsi, nous avons mené des travaux pour analyser les effets du peptide sur la dynamique et la biogenèse mitochondriale des cellules de glioblastome, en analysant la phosphorylation oxydative, la balance fission-fusion, et les gènes et protéines de régulation transcriptionnelle mitochondriale qui pourraient être affectés (2<sup>ème</sup> article scientifique : Rivalin et al., *PLoS One* 2014).

Enfin, le dernier axe de recherche a porté sur l'étude de l'entrée et des effets du peptide sur les cellules souches neurales (CSN). Ces cellules offrent en effet de nombreuses perspectives thérapeutiques. Elles ont un effet anti-tumorigénique et sont capables de migrer vers le tissu tumoral (Müller et al., 2006). Cette capacité réparatrice a également été observée sur d'autres lésions cérébrales, notamment dans le cas de maladies neurodégénératives (Kim et al., 2013). Cibler ces cellules est un des enjeux actuels de thérapie cellulaire dans le cas de gliome et de neurodégénérescence, dans le but d'augmenter la mobilisation des CSN. Nos travaux ont permis dans un premier temps de mettre en évidence la capacité du peptide à cibler les CSN *in vitro* et *in vivo*, et à y pénétrer massivement selon un mécanisme de translocation directe. Dans un second temps, l'effet du peptide sur les caractéristiques propres aux CSN a été analysé, en particulier sur l'auto-renouvellement, la prolifération, la viabilité et l'adhérence des CSN (3<sup>ème</sup> article scientifique : Lépinoux-Chambaud et Eyer, soumis à *Biomaterials*).

---

# RESULTATS

---

## Article de revue

Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations.

Lépinoux-Chambaud C., Eyer J. *Histochem Cell Biol* (2013) Jul;140(1):13-22.

Le cytosquelette est composé de trois structures interconnectées qui sont les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ces derniers, contrairement aux deux autres composants, sont tissu-spécifiques. Les FI du système nerveux regroupent les neurofilaments, l' $\alpha$ -internexine, la GFAP, la synémine, la nestine, la périphérine et la vimentine, qui sont exprimés différemment selon le développement et le type cellulaire.

Dans plusieurs conditions pathologiques, des perturbations du métabolisme et de l'organisation des FI du système nerveux peuvent être associées à des maladies neurodégénératives ou à des tumeurs cérébrales. Une des caractéristiques communes des maladies neurodégénératives est l'accumulation anormale de FI dans le corps cellulaire et le long des axones, qui est souvent associée à une altération du transport axonal et à une dégénérescence neuronale. Dans cette revue sont présentées des perturbations des FI associés à différents types de maladies neurodégénératives, en particulier la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, les maladies de Charcot-Marie-Tooth, et la maladie d'Alexander. L'altération de l'expression des FI et leur libération dans le fluide cérébro-spinal, après la mort des neurones, peuvent servir de biomarqueurs dans le but d'améliorer le diagnostic clinique et d'évaluer la progression de la maladie. Cependant, le rôle de ces éléments dans le fluide cérébro-spinal reste peu exploré.

De la même façon, cette revue présente l'expression anormale de différents FI du système nerveux dans le cas de gliomes. L'évaluation de leur expression et de leurs concentrations sériques permettraient de compléter les analyses histologiques, dans le but d'améliorer la classification de ces tumeurs. De récentes études révèlent en effet l'intérêt de mieux comprendre les conséquences biologiques de l'expression anormale des FI, afin d'optimiser le diagnostic et les thérapies pour lutter contre les gliomes, en utilisant les FI comme biomarqueurs ou comme outils thérapeutiques.

# Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations

Claire Lépinoux-Chambaud · Joël Eyer

Accepted: 23 May 2013 / Published online: 8 June 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** Intermediate filaments (IFs) of the nervous system, including neurofilaments,  $\alpha$ -internexin, glial fibrillary acidic protein, synemin, nestin, peripherin and vimentin, are finely expressed following elaborated cell, tissue and developmental specific patterns. A common characteristic of several neurodegenerative diseases is the abnormal accumulation of neuronal IFs in cell bodies or along the axon, often associated with impairment of the axonal transport and degeneration of neurons. In this review, we also present several perturbations of IF metabolism and organization associated with neurodegenerative disorders. Such modifications could represent strong markers of neuronal damages. Moreover, recent data suggest that IFs represent potential biomarkers to determine the disease progression or the differential stages of a neuronal disorder. Finally, recent investigations on IF expression and function in cancer provide evidence that they may be useful as markers, or targets of brain tumours, especially high-grade glioma. A better knowledge of the molecular mechanisms of IF alterations, combined to neuroimaging, is essential to improve diagnosis and therapeutic strategies of such neurodegenerative diseases and glioma.

**Keywords** Intermediate filaments · Neurodegenerative disease · Glioma

## Generalities

The intermediate filament (IF) network represents a component of the cytoskeleton, together with microtubules

(MT) and microfilaments. IFs were defined by their diameter (10 nm), which is intermediate between microtubules (15 nm) and microfilaments (6 nm) (Ishikawa et al. 1968). They also differ from these two structures by the various size and primary structure of their constitutive proteins, their non-polar architecture and their relative insolubility. The expression of IFs is finely tuned depending on the cell type and the development. In the nervous system, nestin and vimentin are detected early in embryonic development, while the different subunits of neurofilaments appear later during the development and are associated with neuronal differentiation (Cochard and Paulin 1984; Lendahl et al. 1990; Nixon and Shea 1992).

Each IF protein is composed of a conserved  $\alpha$ -helix central region, called rod domain, flanked by non- $\alpha$ -helical head (amino-terminal) and tail (carboxy-terminal) domains. The rod domain contains between 300 and 330 amino acids, whereas the head and tail domains are of variable size with a more flexible structure. The assembly of IF proteins consists in two anti-parallel dimers, which formed protofilaments. A filament is finally composed of eight protofilaments (Omary et al. 2004; Szeverenyi et al. 2008).

Intermediate filaments are classified into 6 types according to their sequence, gene structure and cell-type-specific expression patterns. In this review, we focused on IFs expressed in the nervous system, such as peripherin (type III) in peripheral neurons, glial fibrillary acidic protein (GFAP: type III) in glial cells, vimentin (type III) in mesenchyme,  $\alpha$ -internexin (INA: type IV) in neurons, neurofilaments (NFs: type IV) in mature neurons, that are composed of three subunits, NFL, NFM and NFH (for low-, medium- and high-molecular-weight NF), nestin (type IV) in endothelial and stem cells, and synemin (type IV) in neurons and immature astrocytes (Table 1).

C. Lépinoux-Chambaud · J. Eyer (✉)  
Laboratoire Neurobiologie and Transgenèse, LUNAM,  
UPRES EA-3143, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment  
IBS-IRIS, Université d'Angers, 49033 Angers, France  
e-mail: joel.eyer@univ-angers.fr

**Table 1** Intermediate filaments characteristics and their pathological alterations

Name of IF	Type	Chromosome localization	Gene	Size (kD)	Localization	IF pathological diseases		References
						Disease	Discovery of IF mutations	
Peripherin	III	12q12-q13	<i>PRPH</i>	54	Peripheral neurons	ALS	2004	Peripherin accumulation and disruption of NF network assembly Gros-Louis et al. (2004)
GFAP	III	17q21	<i>GFAP</i>	50	Astrocytes	AxD	2001	>100 mutations/disruption of GFAP assembly and solubility, GFAP aggregates in Rosenthal fibres in astrocytes Brenner et al. (2001), Chen et al. (2011), Yoshida and Nakagawa (2012)
Vimentin	III	10p13	<i>VIM</i>	54	Mesenchyme	Autosomal dominant cataract	2009	Disruption of vimentin assembly Müller et al. (2009)
$\alpha$ -Internexin	IV	10q24.33	<i>INA</i>	55	Neurons	Oligo-dendro-glioma	2006 (1p19q deletion)	High INA expression with favourable impact on survival Ikota et al. (2006), Ducray et al. (2011)
NFL	IV	8p21	<i>NEFL</i>	62	Mature neurons	ALS, PD	–	NF aggregates abnormally phosphorylated in Lewy bodies Manetto et al. (1988), Bancher et al. (1989)
NFM	IV	8p21	<i>NEF3</i>	102	Mature neurons	CMT	2000	Disruption of NF assembly and transport, NF aggregates in cell body Mersyanova et al. (2000), Brownlees et al. (2002), Pérez-Ollé et al. (2005)
NFH	IV	22q12.2	<i>NEFH</i>	112	Mature neurons	ALS, PD	–	NF aggregates abnormally phosphorylated in Lewy bodies Manetto et al. (1988), Bancher et al. (1989)
Nestin	IV	1q23.1	<i>NES</i>	177	Endothelial cells, stem cells	ALS	1994	Disruption of NF assembly, abnormal NF phosphorylation in aggregates Figlewicz et al. (1994)
Synemin	IV	15q26.3	<i>DMN</i>	173 ( $\alpha$ ) and 140 ( $\beta$ )	Mature neurons, immature and reactive astrocytes	Glioma	–	Increased nestin expression associated with higher tumour grade Hlobilkova et al. (2009)
						Glioma	–	High synemin expression in GBM enhancing cell proliferation and motility Jing et al. (2005), Noetzel et al. (2010)

Common reference: Szeverenyi et al. (2008)

Multiple levels of IF regulation are achieved through post-translational modifications, such as phosphorylation, glycosylation and transglutamination. In the nervous system, peripherin and neurofilaments were shown to interact with MTs through kinesin and dynein that govern their axonal transport (Yabe et al. 1999; Shah et al. 2000; Helfand et al. 2003). In general, it has been shown that IFs play an important role in the cell and tissue integrity. Moreover, their functions are also specific to the tissue. For instance, neurofilaments are involved in the axonal growth, the axonal transport, the dendritic arborization and the plasticity of the cytoskeleton (Eyer and Peterson 1994; Kong et al. 1998; Walker et al. 2001; Zhang et al. 2002).

Several IFs expressed in the nervous system are altered in neurodegenerative diseases, and therefore, they can be used as biomarkers of neuropathologies and cancers. Perturbations of their metabolism and organization were found to be frequently associated with several neurodegenerative diseases, including Alzheimer disease, Parkinson disease and Amyotrophic lateral sclerosis. Many human neurodegenerative disorders are also characterized by impairment of the axonal transport and the abnormal accumulation of IFs, which can be caused by their post-translational modifications (in particular hyper-phosphorylation), or by mutations (e.g. mutations of GFAP in Alexander disease, mutations of NFL in Charcot–Marie–Tooth disease, mutations of NFH and peripherin in sporadic Amyotrophic lateral sclerosis) (Figlewicz et al. 1994; Mersiyanova et al. 2000; Brenner et al. 2001; Gros-Louis et al. 2004; Perrot and Eyer 2009) (Table 1).

Recently, clinical proteomic analysis of the cerebrospinal fluid (CSF) identified potential biomarkers of nervous system perturbations, such as inflammation, infection, neurodegenerative processes and tumour growth. The CSF is produced by plexus choroids in the brain ventricles and contains cell shedding products, which can serve as a potential source of biomarkers (Zougman et al. 2008). In the early stage of a neuronal disorder, the diagnosis is often difficult (Hughes et al. 2002). To improve the clinical diagnosis of such disorders, different levels of cell-type-specific biomarkers, in particular IFs, were used to determine the differential stages of a neuronal disorder and the cells that are affected. Alterations of IF gene expression and protein phosphorylation can serve as markers of tissue injury (Omary et al. 2004). Several studies revealed that the NFs, especially their hyper-phosphorylated forms, represent valuable biomarkers of axonal injury, degeneration and neuronal loss (Petzold et al. 2005; Shaw et al. 2005). During axonal degeneration, the rate of NFs released in the interstitial fluid and into the CSF can be quantified. Thus, this evaluation was proposed to differentiate neuronal disorder or to evaluate the progression of a neuronal injury (Petzold et al. 2003).

## Alzheimer disease

Alzheimer disease (AD) is the most common form of dementia, with neurodegeneration. AD is characterized by the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) in brain tissue (Hardy 2006). The NFTs are composed of microtubule-stabilizing tau proteins and extensively phosphorylated NFs (Grundke-Iqbal et al. 1986; Wang et al. 2001; Rudrabhatla et al. 2012). The abnormal phosphorylation of NFs in AD brain might be caused by the impairment of brain glucose uptake/metabolism via the down-regulation of *O*-GlcNAcylation of NFM (Deng et al. 2008). Moreover, changes in neurogenesis have been reported in AD, with especially higher immunoreactivity of nestin in neurogenesis areas at late stages of the disease. Changes in the expression of nestin and other neurogenesis markers are related to the stage of AD pathology (Perry et al. 2012).

The evaluation of NF levels in CSF as marker for axonal damage was also described in AD. Increased amounts of NFH protein were shown in the CSF samples of AD patients compared to controls (Brettschneider et al. 2006b). Another meta-analysis revealed that the NFH and NFL levels are higher in the CSF of some patients with dementias, such as AD (Petzold et al. 2007) (Table 2). Recently, it was shown that AD patients have elevated intrathecal anti-tau and anti-NFH antibodies, suggesting that the autoimmune processes could be involved in AD, and could offer additional tools for the diagnosis of this neurodegenerative disease, especially in the early stages (Bartos et al. 2012).

## Parkinson disease

Parkinson disease (PD) is a progressive disorder of the nervous system with degeneration of dopaminergic neurons present in the substantia nigra. PD is characterized by the formation of Lewy bodies formed in degenerating neurons and composed of  $\alpha$ -synuclein, NF subunits, ubiquitin and proteasome subunits (Galloway et al. 1992; Spillantini et al. 1998). Like for AD, the aggregated NFs are abnormally phosphorylated (Baner et al. 1989). This accumulation of NFs in Lewy bodies is associated with decreased levels of NFL and NFH mRNA, and decreased protein amounts of NFM and NFL (Hill et al. 1993; Basso et al. 2004).

Brettschneider et al. (2006a) showed that the presence of NFH in the CSF is more important in atypical parkinsonian disorders, such as the progressive supranuclear palsy (PSP, with about 2,780 ng/L) and the multiple-system atrophy (MSA with about 3,110 ng/L), than in classical PD (with about 110 ng/L). Another study demonstrated that CSF



**Table 2** NFs and GFAP as biomarkers of nervous system diseases

Name of IFs	Neuronal disorders	IF as biomarkers of disease progression	References
Neurofilament (NFL, NFM, NFH)	Brain injury	Axonal degeneration associated with hyperphosphorylated forms of NF and increased presence of NF in CSF	Petzold et al. (2003, 2005), Matsushige et al. (2012), Rejdak et al. (2012)
	Alzheimer disease	Increase levels of NFL and NFH levels in the CSF of dementias, such as AD	Petzold et al. (2007)
	Parkinsonian syndromes	CSF NFL and NFH levels higher in PSP and MSA than in PD Increased levels of NF in serum correlated with age and duration of the disease	Brettschneider et al. (2006a), Abdo et al. (2007) Su et al. (2012)
	Amyotrophic lateral sclerosis	Increase of CSF NFL and NFH (higher in ALS than in AD), associated with faster progression of the disease	Tortelli et al. (2012), Boylan et al. (2013)
	Multiple sclerosis	Increase of CSF NFL levels associated with acute relapses	Lycke et al. (1998), Semra et al. (2002), Malmeström et al. (2003)
GFAP	Parkinson disease	Increase of serum GFAP levels, but not correlated with age and duration	Su et al. (2012)
	Alexander disease	Increase of CSF GFAP levels, as indicator of disease severity	Jany et al. (2013)
	Multiple sclerosis	Increase of CSF GFAP levels correlated with age, neurological disability and disease progression (indicator of astrocytic damage)	Axelsson et al. (2011), Misu et al. (2009)

levels of NFL and NFH were significantly increased in MSA compared to PD, possibly reflecting increased axonal degeneration in MSA than in PD (Abdo et al. 2007). The analysis of NFL level alone could be sufficient to differentiate PD from atypical parkinsonian disorders (Hall et al. 2012). Recently, it was shown that the serum levels of GFAP and NFs were significantly increased in PD group compared to healthy group. Moreover, the high level of GFAP in PD group had no correlation with the patients' ages or duration of the disease, whereas the increased level of NFs correlates with the patients' ages and duration of the disease (Table 2). However, the results showed no significant difference between the PD group and a group with an ischaemic stroke. These findings indicate that the NF serum levels could be related to the severity of axonal injuries even if as biomarkers of axonal injury, they have no disease specificity (Su et al. 2012). Another approach using CSF NFs was proposed to evaluate the damage caused after subthalamic nucleus stimulation, a treatment used in PD. Using longitudinal CSF NFL measurements as an indicator of neuronal damage, this study suggests the absence of any neuronal damage in chronically treated patients with PD (Constantinescu et al. 2011).

### Amyotrophic lateral sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the most frequent adult-onset motor neuron disease. This neurodegenerative

disorder is characterized by progressive degeneration of motor neuron and loss of related muscle movements, with a partial or total paralysis, and without affected cognitive functions (Strong et al. 1991; Corbo and Hays 1992). In motor neurons, axonal spheroids and perikaryal accumulations of extensively phosphorylated NF and peripherin were found in both sporadic and familial ALS (Manetto et al. 1988). Mutations in the repeat domain of *NEFH* (which encodes NFH) are associated with the ALS development (Figlewicz et al. 1994). Mutations in peripherin gene have also been reported to disrupt NF assembly in sporadic ALS (Gros-Louis et al. 2004). The aggregations of IF in ALS could result from their abnormal post-translational modifications (e.g. phosphorylation), their altered stoichiometry, or an affected axonal transport via molecular motors (dynein, dynamin) (Perrot and Eyer 2009). However, using transgenic models, it has been shown that axonal NF accumulation is not the direct cause of motor neuron degeneration (Eyer et al. 1998).

Several studies showed that the CSF NFL level is significantly higher in ALS patients (approximately 5,000 ng/L) than in patients with other neurodegenerative diseases including AD, CBD or MSA (approximately 1,400 ng/L) (Tortelli et al. 2012), confirming previously described studies for NFL and NFH (Rosengren et al. 1996; Brettschneider et al. 2006b). Moreover, the CSF NFL level is significantly higher in rapidly progressive ALS than in slowly progressive disease (Tortelli et al. 2012). Similar results were found for levels of NFH in ALS patients.

ELISA measures of phosphorylated NFH (*p*-NFH) concentration in CSF and plasma reveal higher *p*-NFH levels in CSF associated with faster disease progression (Boylan et al. 2013) (Table 2). Similar results were also found in the well-established SOD1<sup>G93A</sup> mouse model of ALS in which the plasma NFH levels correlate with the disease progression and with the loss of muscle force, the decline in motor unit survival, and especially with the extent of motor neuron degeneration that occurs during later stages of this disease (Lu et al. 2012).

### Charcot–Marie–Tooth diseases

Charcot–Marie–Tooth (CMT) diseases are composed of a group of genetic neurological disorders, affecting both motor and sensory neurons, and characterized by a chronic progressive neuropathy, with weakness and atrophy of distal muscles and mild sensory loss. CMT diseases are divided into two clinical subtypes. CMT1 is a myelinopathy with markedly reduced motor nerve conduction velocity, whereas CMT2 is an axonopathy with normal nerve conduction velocity (Züchner and Vance 2006). Numerous mutations have been reported and especially the mutation in *NEFL* (which encodes NFL), which is associated with the axonal neuropathy CMT2 (Mersiyanova et al. 2000). A loss of function caused by non-sense *NEFL* mutations may be responsible for autosomal recessive CMT, whereas a gain of function by missense *NEFL* mutations may cause autosomal dominant CMT (Reilly 2009). These *NEFL* mutants disrupt NF assembly and transport, resulting in NF accumulations (Brownlees et al. 2002; Pérez-Ollé et al. 2005). NF mutations subsequently impaired mitochondrial transport and movements along axons (Gentil et al. 2012) (Table 1).

### Alexander disease

The Alexander disease (AxD) is a fatal neurological disorder characterized in infants with seizures, psychomotor developmental retardation and macrocephaly (type I), and in adults with cerebellar ataxia, bulbar signs and spasticity (type II). The pathological hallmark of AxD is the presence in astrocytes of Rosenthal fibres, which are cytoplasmic inclusions containing GFAP, heat shock protein 27 and  $\alpha\beta$ -crystallin. To date, approximately 100 mutations in the rod and tail domains of GFAP have been reported in patients with AxD. These mutations disrupt filament assembly, alter GFAP solubility and promote GFAP aggregates. In AxD, the GFAP mutation site and the age at onset are important clinical predictors of this disease and its severity. It has also been suggested that GFAP mutations impair

proteasome function in astrocytes and glutamate metabolism, which takes place between astrocytes and neurons (Brenner et al. 2001; Chen et al. 2011; Yoshida and Nakagawa 2012). Moreover, a recent study suggested the participation of synemin in AxD, because of its abnormal presence in Rosenthal fibres characterizing patients with AxD (Pekny et al. 2013).

In different mouse models of the Alexander disease (Gfap<sup>R236H/+</sup>, Gfap<sup>R76H/+</sup>, GFAP<sup>Tg</sup>), abnormally increased levels of GFAP have been measured in the CSF compared to control animals (Gfap<sup>+/+</sup>), suggesting that GFAP could be a potential indicator of disease severity (Jany et al. 2013) (Table 2).

### Brain tumours

Glioma represents brain tumours derived from glial cells (astrocytes, oligodendrocytes). Based on histological features, these heterogeneous tumours are classified by the World Health Organization (WHO) into four prognosis grades. Glioblastoma multiforme (GBM) represents the most frequent, invasive and aggressive tumours of the nervous system (grade IV), with a median survival of only 12–15 months, despite surgical resection of the tumour, radiotherapy and chemotherapy. Glioblastoma represents approximately 60–70 % of malignant glioma, while anaplastic astrocytoma (grade III) for 10–15 % and anaplastic oligoastrocytoma (grade III) approximately 10 % (Louis et al. 2007; Wen and Kesari 2008). Understanding the mechanism of abnormal neuronal IF expression and their function in cancer is crucial for glioma prognosis and defining new therapies.

The alpha internexin (INA) could be a potential biomarker for the prognostic of glioma, as its expression differs significantly according to the grade of glioma. Analysis of INA in 409 glioma showed that 85 % of them express INA with a genomic alteration, the 1p19q deletion. Moreover, several studies indicate that while glioblastoma (grade IV) showed no INA expression, oligoastrocytoma (grade III) showed weak INA expression and oligodendroglioma (grade II) strongly expressed INA (Ikota et al. 2006; Shirahata et al. 2007; Ducray et al. 2011; Durand et al. 2010, 2013). This 1p19q deletion results in global changes in gene expression profile of tumour cells, which acquire a pro-neural status limiting their migration and proliferation. It appears that longer progression-free survival and longer overall survival were associated with INA expression and 1p19q deletion in anaplastic glioma (grade III) as compared to glioblastoma (Ducray et al. 2011). Moreover, according to Durand et al. (2013), the INA expression was not correlated to the age or sex of patients. However, tumours without 1p19q deletion, such as

glioblastoma, reveal the opposite characteristics relative to their more aggressive behaviour (Ducray et al. 2008; Ferrer-Luna et al. 2009). Taken together, these results show that INA expression and its 1p19q deletion represent a strong prognosis factor in oligodendroglioma (Jenkins et al. 2006; Aldape et al. 2007; Giannini et al. 2008; Ducray et al. 2009, 2011; Durand et al. 2013).

A high expression of synemin, another neuronal IF, was found in glioblastoma tumours relative to normal brain and other tumour types, indicating that synemin could enhance glioblastoma cell proliferation (Jing et al. 2005; Noetzel et al. 2010). The localization of synemin in several human glioblastoma cell lines is associated with ruffled membranes, suggesting a role in these cells (Jing et al. 2005). Pan et al. (2008) showed that synemin influences the malignant behaviour of astrocytoma cells, and RNAi experiments revealed that synemin increases the proliferation and the motility of these tumour cells by modulating the dynamics of the actin cytoskeleton. Synemin may affect proliferation through the Akt signalling pathway, as synemin inhibits protein phosphatase type 2A (PP2A) activity, the major phosphatase controlling Akt phosphorylation. Thus, active Akt, the major activator of the G1/S transition, is maintained and overexpressed in glioblastoma (Pitre et al. 2012).

A promising new biomarker could also be the serum concentration of GFAP in patients with high-grade glioma. Indeed, healthy patients have no detectable serum GFAP level, whereas all patients with GBM tumours have elevated serum concentration of GFAP (>100 ng/L). A total of 56 and 20 % of patients with, respectively, glioma grades III and II have detectable serum GFAP level. Moreover, the increased level of GFAP in GBM patients significantly correlates with tumour volume and tumour necrosis volume. However, there is no correlation between GFAP expression and serum GFAP levels (Jung et al. 2007; Brommeland et al. 2007; Husain et al. 2012).

The efficiency of diagnosis and treatment of brain tumour malignancies could also be ameliorated by determining cell surface markers of cancer stem cells (CSCs) that represent an aggressive subpopulation in glioma, responsible for tumour propagation and recurrence, because of their resistance to chemo- and radio-therapies (Nakano and Kornblum 2006; Johannessen et al. 2008). The expression of nestin, in both tumour cells and endothelial cells, is increased with tumour grade, suggesting its role in tumour vascular development and proliferation (Hlobilkova et al. 2009). Recent investigation on nestin as a novel glioblastoma stem cell (GSC) marker indicated that when compared to nestin-negative human GSCs, a larger proportion of nestin-positive human GSCs was able to generate tumour spheres. Thus, the expression of nestin on

GSC cell surface indicates a higher proliferation ability of these stem cells (Jin et al. 2013). Several studies used nestin as biomarker or target of GSC or tumour angiogenesis. Transgenic mouse models expressing the nestin-driven green fluorescent (ND-GFP) protein were used as an imaging marker for nascent blood vessels. After implantation of human glioblastoma cells in ND-GFP transgenic nude mouse, the tumour cells growth is closely associated with the ND-GFP blood vessels (Amoh et al. 2005; Hoffman 2011). Another group isolated a GSC-targeting peptide able to bind nestin-positive GSCs in human glioblastoma tissues (Beck et al. 2011). These studies demonstrate the usefulness of nestin as a possible diagnostic agent in glioma.

Taken together, these findings indicate that the classification of glioma could be significantly increased when histological examination is complemented with the evaluation of the abnormal expression or serum concentration of IFs (Table 3). Moreover, understanding the biological consequences of the affected expression and presence of these IFs is crucial to optimize the therapeutic strategies of glioblastoma.

#### Other pathological situations of the nervous system

Zurek et al. (2011) suggested that the evaluation of the presence of hyperphosphorylated NFH in the CSF is a good indicator of mortality in children with traumatic brain injury. Moreover, when compared to controls, children with prolonged febrile seizure have higher NFH levels, suggesting potential neurological damage (Matsushige et al. 2012). A recent study showed that the NFH levels in CSF increase significantly with the severity of seizure-related brain injury (Rejdak et al. 2012) (Table 2). Clinical analysis also revealed that patients with poor neurological outcome after cardiac arrest have elevated serum NFL compared to patients with good neurological outcome after cardiac arrest (Rana et al. 2012).

High NFL levels in CSF are found in multiple sclerosis (MS) with acute relapses (Lycke et al. 1998; Semra et al. 2002; Malmeström et al. 2003). Another potential biomarker for MS progression is GFAP level, with a significant increase correlated with age, neurological disability and disease progression (Axelsson et al. 2011). GFAP level was also revealed as a useful clinical biomarker in neuromyelitis optica (NMO), reflecting astrocytic damage (Misu et al. 2009) (Table 2).

Recently, a mutation in *VIM*, the gene encoding vimentin, causes a dominant, pulverulent cataract, characterized by an opacification of the eye lens. The severe disruption of vimentin assembly caused by this mutation also reflects an important functional role for vimentin in the

**Table 3** Changes in IF expression and their related function in glioma

	WHO grade II (A, OG, OA)	WHO grade III (AA, AG)	WHO grade IV (GBM)	References
Severity and frequency				<i>Louis et al. 2007; Wen and Kesari 2008</i>
<b>Synemin expression</b>				<i>Jing et al. 2005; Pan et al. 2008; Pitre et al. 2012</i>
Proliferation ability				
<b>INA expression and 1p19q deletion</b>				<i>Ducray et al. 2011; Durand et al. 2013</i>
Median survival				
<b>Serum GFAP level</b>				<i>Jung et al. 2007; Brommeland et al. 2007; Husain et al. 2012</i>
Tumour volume				
<b>Nestin expression</b>				<i>Hlobilkova et al. 2009; Jin et al. 2013</i>
Tumour angiogenesis				

According to WHO, glioblastoma multiform (GBM; grade IV) represents the most aggressive and the most frequent glioma, as compared with grade III glioma [anaplastic astrocytoma (AA) and anaplastic glioma (AG)] and with grade II glioma (astrocytoma (A), oligodendroglioma (OG) and oligoastrocytoma (OA)). In GBM cells, the high synemin expression is related to high proliferation ability, and the low INA expression is related to low median survival. GBM tumours are also characterized by high serum GFAP level, related to important tumour volume. Nestin expression in glioma stem cells (GSC) is higher in GBM tumour than in low-grade glioma and is associated with increased tumour angiogenesis

maintenance of lens integrity (Müller et al. 2009). Finally, a low level of expression of vimentin is found in normal lens epithelial cells, while the expression level of vimentin is significantly increased in lens epithelial cells of cataract patients (Joo et al. 1999) (Table 1).

**Conclusion**

Taken together, these findings show that many if not most pathological situations of the nervous system are characterized by abnormalities of the IF expression, organization or metabolism. Therefore, measuring the levels of IF in CSF represents a powerful biomarker of disease progression in the nervous system when combined to other histopathological examinations. Moreover, a better knowledge of the precise consequences of such alterations of IF is crucial to understand the evolution of the disease and to improve the therapeutical strategies.

**Acknowledgments** This work is supported by AFM (Association Française contre les Myopathies), ARC (Association de Recherche sur le Cancer) and CIMATH (Ciblage Moléculaire et Applications Thérapeutiques). CLC is supported by the Ministère de la Recherche,

and JE is supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

**References**

Abdo WF, Bloem BR, Van Geel WJ, Esselink RA, Verbeek MM (2007) CSF neurofilament light chain and tau differentiate multiple system atrophy from Parkinson’s disease. *Neurobiol Aging* 28(5):742–747

Aldape K, Burger PC, Perry A (2007) Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med* 131(2):242–251

Amoh Y, Yang M, Li L, Reynoso J, Bouvet M, Moossa AR, Katsuoka K, Hoffman RM (2005) Nestin-linked green fluorescent protein transgenic nude mouse for imaging human tumor angiogenesis. *Cancer Res* 65(12):5352–5357

Axelsson M, Malmstrom C, Nilsson S, Haghighi S, Rosengren L, Lycke J (2011) Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 258(5):882–888

Bancher C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wiche G, Seitelberger F, Wisniewski HM (1989) An antigenic profile of Lewy bodies: immunocytochemical indication for protein phosphorylation and ubiquitination. *J Neuropathol Exp Neurol* 48(1):81–93

Bartos A, Fialova L, Svarcova J, Ripova D (2012) Patients with Alzheimer disease have elevated intrathecal synthesis of

- antibodies against tau protein and heavy neurofilament. *J Neuroimmunol* 252(1–2):100–105
- Basso M, Giraudo S, Corpillo D, Bergamasco B, Lopiano L, Fasano M (2004) Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* 4(12):3943–3952
- Beck S, Jin X, Yin J, Kim SH, Lee NK, Oh SY, Jin X, Kim MK, Kim EB, Son JS, Kim SC, Nam DH, Kim SH, Kang SK, Kim H, Choi YJ (2011) Identification of a peptide that interacts with Nestin protein expressed in brain cancer stem cells. *Biomaterials* 32(33):8518–8528
- Boylan KB, Glass JD, Crook JE, Yang C, Thomas CS, Desaro P, Johnston A, Overstreet K, Kelly C, Polak M, Shaw G (2013) Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84(4):467–472
- Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27(1):117–120
- Brettschneider J, Petzold A, Sussmuth SD, Landwehrmeyer GB, Ludolph AC, Kassubek J, Tumani H (2006a) Neurofilament heavy-chain NfH(SMI35) in cerebrospinal fluid supports the differential diagnosis of Parkinsonian syndromes. *Mov Disord* 21(12):2224–2227
- Brettschneider J, Petzold A, Sussmuth SD, Ludolph AC, Tumani H (2006b) Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. *Neurology* 66(6):852–856
- Brommeland T, Rosengren L, Fridlund S, Hennig R, Isaksen V (2007) Serum levels of glial fibrillary acidic protein correlate to tumour volume of high-grade gliomas. *Acta Neurol Scand* 116(6):380–384
- Brownlees J, Ackerley S, Grierson AJ, Jacobsen NJ, Shea K, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC (2002) Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport. *Hum Mol Genet* 11(23):2837–2844
- Chen YS, Lim SC, Chen MH, Quinlan RA, Perng MD (2011) Alexander disease causing mutations in the C-terminal domain of GFAP are deleterious both to assembly and network formation with the potential to both activate caspase 3 and decrease cell viability. *Exp Cell Res* 317(16):2252–2266
- Cochard P, Paulin D (1984) Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci* 4(8):2080–2094
- Constantinescu R, Holmberg B, Rosengren L, Corneliussen O, Johnels B, Zetterberg H (2011) Light subunit of neurofilament triplet protein in the cerebrospinal fluid after subthalamic nucleus stimulation for Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 124(3):206–210
- Corbo M, Hays AP (1992) Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 51(5):531–537
- Deng Y, Li B, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Brandt R, Gong CX (2008) Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *Faseb J* 22(1):138–145
- Ducray F, Idbaih A, de Reynies A, Bieche I, Thillet J, Mokhtari K, Lair S, Marie Y, Paris S, Vidaud M, Hoang-Xuan K, Delattre O, Delattre JY, Sanson M (2008) Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile. *Mol Cancer* 7:41
- Ducray F, Criniere E, Idbaih A, Mokhtari K, Marie Y, Paris S, Navarro S, Laigle-Donadey F, Dehais C, Thillet J, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M (2009) Alpha-interneixin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology* 72(2):156–161
- Ducray F, Mokhtari K, Criniere E, Idbaih A, Marie Y, Dehais C, Paris S, Carpentier C, Dieme MJ, Adam C, Hoang-Xuan K, Duyckaerts C, Delattre JY, Sanson M (2011) Diagnostic and prognostic value of alpha interneixin expression in a series of 409 gliomas. *Eur J Cancer* 47(5):802–808
- Durand KS, Guillaudeau A, Weinbreck N, DeArmas R, Robert S, Chaunavel A, Pommepuy I, Bourthoumie S, Caire F, Sturtz FG, Labrousse FJ (2010) 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol* 23(4):619–628
- Durand K, Guillaudeau A, Pommepuy I, Mesturoux L, Chaunavel A, Gadeaud E, Porcheron M, Moreau JJ, Labrousse F (2013) Alpha-interneixin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status. *J Clin Pathol* 64(9):793–801
- Eyer J, Peterson A (1994) Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12(2):389–405
- Eyer J, Cleveland DW, Wong PC, Peterson AC (1998) Pathogenesis of two axonopathies does not require axonal neurofilaments. *Nature* 391(6667):584–587
- Ferrer-Luna R, Mata M, Nunez L, Calvar J, Dasi F, Arias E, Piquer J, Cerda-Nicolas M, Taratuto AL, Sevlever G, Celda B, Martinetto H (2009) Loss of heterozygosity at 1p–19q induces a global change in oligodendroglial tumor gene expression. *J Neurooncol* 95(3):343–354
- Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP (1994) Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3(10):1757–1761
- Galloway PG, Mulvihill P, Perry G (1992) Filaments of Lewy bodies contain insoluble cytoskeletal elements. *Am J Pathol* 140(4):809–822
- Gentil BJ, Minotti S, Beange M, Baloh RH, Julien JP, Durham HD (2012) Normal role of the low-molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease. *Faseb J* 26(3):1194–1203
- Giannini C, Burger PC, Berkey BA, Cairncross JG, Jenkins RB, Mehta M, Curran WJ, Aldape K (2008) Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in intergroup radiation therapy oncology group trial 9402. *Brain Pathol* 18(3):360–369
- Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G, Laurent S, Camu W, Bouchard JP, Meininger V, Rouleau GA, Julien JP (2004) A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 279(44):45951–45956
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(13):4913–4917
- Hall S, Ohrfelt A, Constantinescu R, Andreasson U, Surova Y, Bostrom F, Nilsson C, Hakan W, Decraemer H, Nagga K, Minthon L, Londos E, Vanmechelen E, Holmberg B, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O (2012) Accuracy of a panel of 5 cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of patients with dementia and/or parkinsonian disorders. *Arch Neurol* 69(11):1445–1452
- Hardy J (2006) A 100 years of Alzheimer's disease research. *Neuron* 52(1):3–13
- Helfand BT, Loomis P, Yoon M, Goldman RD (2003) Rapid transport of neural intermediate filament protein. *J Cell Sci* 116(Pt 11):2345–2359
- Hill WD, Arai M, Cohen JA, Trojanowski JQ (1993) Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson's disease substantia nigra pars compacta neurons. *J Comp Neurol* 329(3):328–336

- Hlobilkova A, Ehrmann J, Knizetova P, Krejci V, Kalita O, Kolar Z (2009) Analysis of VEGF, Flt-1, Flk-1, nestin and MMP-9 in relation to astrocytoma pathogenesis and progression. *Neoplasma* 56(4):284–290
- Hoffman RM (2011) Nestin-driven green fluorescent protein as an imaging marker for nascent blood vessels in mouse models of cancer. *Methods Mol Biol* 689:183–204
- Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ (2002) The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 125(Pt 4):861–870
- Husain H, Savage W, Grossman SA, Ye X, Burger PC, Everett A, Bettgowda C, Diaz LA Jr, Blair C, Romans KE, Holdhoff M (2012) Pre- and post-operative plasma glial fibrillary acidic protein levels in patients with newly diagnosed gliomas. *J Neurooncol* 109(1):123–127
- Ikota H, Kinjo S, Yokoo H, Nakazato Y (2006) Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol* 111(5):475–482
- Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H (1968) Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* 38(3):538–555
- Jany P, Hagemann TL, Messing A (2013) GFAP expression as an indicator of disease severity in mouse models of Alexander disease. *ASN Neuro* 5(2):e00109. doi:10.1042/AN20130003
- Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, Giannini C, Arusell RM, Law M, Flynn H, Passe S, Felten S, Brown PD, Shaw EG, Buckner JC (2006) A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* 66(20):9852–9861
- Jin X, Jin X, Jung JE, Beck S, Kim H (2013) Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 433(4):496–501
- Jing R, Pizzolato G, Robson RM, Gabbiani G, Skalli O (2005) Intermediate filament protein synemin is present in human reactive and malignant astrocytes and associates with ruffled membranes in astrocytoma cells. *Glia* 50(2):107–120
- Johannessen TC, Bjerkvig R, Tysnes BB (2008) DNA repair and cancer stem-like cells—potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev* 34(6):558–567
- Joo CK, Lee EH, Kim JC, Kim YH, Lee JH, Kim JT, Chung KH, Kim J (1999) Degeneration and transdifferentiation of human lens epithelial cells in nuclear and anterior polar cataracts. *J Cataract Refract Surg* 25(5):652–658
- Jung CS, Forch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M (2007) Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain* 130(Pt 12):3336–3341
- Kong J, Tung VW, Aghajanian J, Xu Z (1998) Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons. *J Cell Biol* 140(5):1167–1176
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4):585–595
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2):97–109
- Lu CH, Petzold A, Kalmar B, Dick J, Malaspina A, Greensmith L (2012) Plasma neurofilament heavy chain levels correlate to markers of late stage disease progression and treatment response in SOD1(G93A) mice that model ALS. *PLoS One* 7(7):e40998
- Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE (1998) Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64(3):402–404
- Malmstrom C, Haghghi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J (2003) Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* 61(12):1720–1725
- Manetto V, Sternberger NH, Perry G, Sternberger LA, Gambetti P (1988) Phosphorylation of neurofilaments is altered in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 47(6):642–653
- Matsushige T, Inoue H, Fukunaga S, Hasegawa S, Okuda M, Ichiyama T (2012) Serum neurofilament concentrations in children with prolonged febrile seizures. *J Neurol Sci* 321(1–2):39–42
- Mersyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, Petrin AN, Evgrafov OV (2000) A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* 67(1):37–46
- Misu T, Takano R, Fujihara K, Takahashi T, Sato S, Itoyama Y (2009) Marked increase in cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein in neuromyelitis optica: an astrocytic damage marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(5):575–577
- Müller M, Bhattacharya SS, Moore T, Prescott Q, Wedig T, Herrmann H, Magin TM (2009) Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum Mol Genet* 18(6):1052–1057
- Nakano I, Kornblum HI (2006) Brain tumor stem cells. *Pediatr Res* 59(4 Pt 2):54R–58R
- Nixon RA, Shea TB (1992) Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell Motil Cytoskeleton* 22(2):81–91
- Noetzel E, Rose M, Sevinc E, Hilgers RD, Hartmann A, Naami A, Knuchel R, Dahl E (2010) Intermediate filament dynamics and breast cancer: aberrant promoter methylation of the synemin gene is associated with early tumor relapse. *Oncogene* 29(34):4814–4825
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WH (2004) Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351(20):2087–2100
- Pan Y, Jing R, Pitre A, Williams BJ, Skalli O (2008) Intermediate filament protein synemin contributes to the migratory properties of astrocytoma cells by influencing the dynamics of the actin cytoskeleton. *Faseb J* 22(9):3196–3206
- Pekny T, Faiz M, Wilhelmsson U, Curtis MA, Matej R, Skalli O, Pekny M (2013) Synemin is expressed in reactive astrocytes and Rosenthal fibers in Alexander disease. *Apmis*. doi:10.1111/apm.12088
- Perez-Olle R, Lopez-Toledano MA, Goryunov D, Cabrera-Poch N, Stefanis L, Brown K, Liem RK (2005) Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport. *J Neurochem* 93(4):861–874
- Perrot R, Eyer J (2009) Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 80(4–5):282–295
- Perry EK, Johnson M, Ekonomou A, Perry RH, Ballard C, Attems J (2012) Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. *Neurobiol Dis* 47(2):155–162
- Petzold A, Keir G, Green AJ, Giovannoni G, Thompson EJ (2003) A specific ELISA for measuring neurofilament heavy chain phosphoforms. *J Immunol Methods* 278(1–2):179–190
- Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RH, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G (2005) Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: 3 year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(2):206–211

- Petzold A, Keir G, Warren J, Fox N, Rossor MN (2007) A systematic review and meta-analysis of CSF neurofilament protein levels as biomarkers in dementia. *Neurodegener Dis* 4(2–3):185–194
- Pitre A, Davis N, Paul M, Orr AW, Skalli O (2012) Synemin promotes AKT-dependent glioblastoma cell proliferation by antagonizing PP2A. *Mol Biol Cell* 23(7):1243–1253
- Rana OR, Schroder JW, Baukloh JK, Saygili E, Mischke K, Schiefer J, Weis J, Marx N, Rassaf T, Kelm M, Shin DI, Meyer C, Saygili E (2012) Neurofilament light chain as an early and sensitive predictor of long-term neurological outcome in patients after cardiac arrest. *Int J Cardiol*. doi:10.1016/j.ijcard.2012.12.016
- Reilly MM (2009) NEFL-related Charcot-Marie-tooth disease: an unraveling story. *Ann Neurol* 66(6):714–716
- Rejdak K, Kuhle J, Ruegg S, Lindberg RL, Petzold A, Sulejczak D, Papuc E, Rejdak R, Stelmasiak Z, Grieb P (2012) Neurofilament heavy chain and heat shock protein 70 as markers of seizure-related brain injury. *Epilepsia* 53(5):922–927
- Rosengren LE, Karlsson JE, Karlsson JO, Persson LI, Wikkelso C (1996) Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem* 67(5):2013–2018
- Rudrabhatla P, Grant P, Jaffe H, Strong MJ, Pant HC (2012) Quantitative phosphoproteomic analysis of neuronal intermediate filament proteins (NF-M/H) in Alzheimer's disease by iTRAQ. *Faseb J* 24(11):4396–4407
- Semra YK, Seidi OA, Sharief MK (2002) Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol* 122(1–2):132–139
- Shah JV, Flanagan LA, Janmey PA, Letertier JF (2000) Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol Biol Cell* 11(10):3495–3508
- Shaw G, Yang C, Ellis R, Anderson K, Parker Mickle J, Scheff S, Pike B, Anderson DK, Howland DR (2005) Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 336(4):1268–1277
- Shirahata M, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Takahashi JA, Kato K (2007) Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin Cancer Res* 13(24):7341–7356
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998) Alpha-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11):6469–6473
- Strong MJ, Hudson AJ, Alvord WG (1991) Familial amyotrophic lateral sclerosis, 1850–1989: a statistical analysis of the world literature. *Can J Neurol Sci* 18(1):45–58
- Su W, Chen HB, Li SH, Wu DY (2012) Correlational study of the serum levels of the glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins in Parkinson's disease patients. *Clin Neurol Neurosurg* 114(4):372–375
- Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB (2008) The human intermediate filament database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat* 29(3):351–360
- Tortelli R, Ruggieri M, Cortese R, D'Errico E, Capozzo R, Leo A, Mastrapasqua M, Zoccolella S, Leante R, Livrea P, Logroscino G, Simone IL (2012) Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression. *Eur J Neurol* 19(12):1561–1567
- Walker KL, Yoo HK, Undamatta J, Szaro BG (2001) Loss of neurofilaments alters axonal growth dynamics. *J Neurosci* 21(24):9655–9666
- Wang J, Tung YC, Wang Y, Li XT, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2001) Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells. *FEBS Lett* 507(1):81–87
- Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359(5):492–507
- Yabe JT, Pimenta A, Shea TB (1999) Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. *J Cell Sci* 112(Pt 21):3799–3814
- Yoshida T, Nakagawa M (2012) Clinical aspects and pathology of Alexander disease, and morphological and functional alteration of astrocytes induced by GFAP mutation. *Neuropathology* 32(4):440–446
- Zhang Z, Casey DM, Julien JP, Xu Z (2002) Normal dendritic arborization in spinal motoneurons requires neurofilament subunit L. *J Comp Neurol* 450(2):144–152
- Zougman A, Pilch B, Podtelejnikov A, Kiehnopf M, Schnabel C, Kumar C, Mann M (2008) Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J Proteome Res* 7(1):386–399
- Zuchner S, Vance JM (2006) Mechanisms of disease: a molecular genetic update on hereditary axonal neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol* 2(1):45–53
- Zurek J, Bartlova L, Fedora M (2011) Hyperphosphorylated neurofilament NF-H as a predictor of mortality after brain injury in children. *Brain Inj* 25(2):221–226

## 1<sup>er</sup> article scientifique

The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis.

Lépinoux-Chambaud C., Eyer J. *Int J Pharm* (2013) Oct 1;454(2):738-47.

Les tumeurs du système nerveux les plus fréquentes et les plus agressives sont les glioblastomes multiformes, avec une médiane de survie de 14 à 18 mois malgré les traitements actuels qui associent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

De récents travaux ont montré que le peptide NFL-TBS.40-63, qui correspond au site de fixation de la tubuline libre présent sur la sous-unité légère des NF (NFL), est capable d'agir spécifiquement sur les cellules de glioblastome en altérant la polymérisation des microtubules, en inhibant leur prolifération et leur migration, et en réduisant le développement tumoral chez des animaux porteurs de glioblastome. La spécificité d'action anti-tumorale du peptide est associée à son entrée massive et sélective dans les cellules de glioblastome, alors qu'il entre peu voire pas dans des cellules saines, de type neurones ou astrocytes. Son internalisation dépend principalement d'un mécanisme énergie et température-dépendant, caractéristique de l'endocytose (Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a).

Dans cette étude, le but a été de mieux caractériser les mécanismes moléculaires responsables de l'entrée sélective du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules de glioblastome. Nos travaux se sont basés sur les mécanismes d'entrée connus des peptides de pénétration cellulaire (ou CPP), qui utilisent une balance entre l'endocytose par un transport actif, et la translocation directe à travers la membrane (Madani et al., 2011 ; Wang et al., 2014).

Le transport passif du peptide par translocation directe a été testé sur un modèle membranaire de vésicules géantes de membrane plasmique (ou GPMV), issues d'une lignée de glioblastome humain U87-MG, et dépourvues de mécanisme énergétique (**Fig. 1A**). En présence des GPMV, le peptide NFL-TBS.40-63 couplé à la fluorescéine-isothiocyanate (FITC) est incapable de traverser la bicouche lipidique des GPMV, contrairement au CPP TAT-FITC qui est rapidement retrouvé à l'intérieur de ces vésicules (**Fig. 1B**).



L'implication des différentes voies d'endocytose (les voies clathrine et cavéoline-dépendantes, et la macropinocytose) a été étudiée par microscopie confocale et cytométrie en flux. Lorsque les cellules U87-MG ont été pré-incubées avec des inhibiteurs de chacune des voies d'endocytose (cf. partie 4.1.2.2, Figure 38), l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 a été significativement réduite (**Fig. 2A**). Pour le CPP TAT, seul un inhibiteur de la voie de la macropinocytose réduit son internalisation dans les cellules, suggérant que ce CPP pénètre dans les cellules de glioblastome via la translocation passive et la macropinocytose (**Supplementary fig. S1**). Il a été montré par microscopie confocale qu'une partie du peptide NFL-TBS.40-63 co-localise avec des marqueurs spécifiques de chacune des voies d'endocytose (cf. partie 4.1.2.2, Figure 38) dans les cellules de glioblastome (**Fig. 2B**). L'implication des différentes voies d'endocytose a également été confirmée dans d'autres lignées. Alors que dans les cellules de glioblastomes humains (U87-MG et T98G), les trois principales voies d'endocytose jouent un rôle dans l'internalisation du peptide, dans les astrocytes humains, seule la macropinocytose est impliquée dans l'internalisation du peptide (**Tableau 1**).

De plus, l'utilisation de chacune des voies d'endocytose dans les cellules de glioblastome humain U87-MG dépend aussi des concentrations extracellulaires en peptide. Pour de faibles concentrations en peptide, seule l'endocytose cavéoline-dépendante permet l'entrée du peptide, alors que pour des concentrations plus importantes, le peptide utilise la voie clathrine-dépendante et la macropinocytose (**Fig. 3**).

Pour comprendre la sélectivité du peptide pour les cellules de glioblastome, l'implication de molécules de surface a été analysée, telles que les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) et les intégrines  $\alpha V\beta 3$  qui sont surexprimées dans les glioblastomes (Gladson et Cheresch, 1991 ; Steck et al., 1989; Sallinen et al., 2000). Les intégrines  $\alpha V\beta 3$  et les HSPG jouent un rôle dans la reconnaissance et l'entrée des peptides RGD (peptides composés d'arginine R, de glycine G et d'acide aspartique D) et des CPP respectivement (Alves et al., 2010 ; Letoha et al., 2010 ; Shi et al., 2011). Cependant, ces deux types de récepteurs de surface ne sont pas impliqués dans l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules de glioblastome (**Fig. 4 et 5**). Ces résultats ont été confirmés en analysant l'entrée du peptide par cytométrie en flux après ajout de bleu de trypan pour éteindre une éventuelle fluorescence du peptide à la surface des cellules, et ne mesurer que la fluorescence intracellulaire (**Supplementary fig. S2**).

L'entrée des CPP dans les cellules dépend également d'autres propriétés cellulaires, comme le cycle cellulaire et les voies de signalisation qui régulent la machinerie de l'endocytose. L'influence du cycle cellulaire a déjà été démontrée pour l'entrée de la crotamine, qui est favorisée pendant les phases G1/S du cycle cellulaire (Nascimento et al., 2007). De la même façon, en forçant l'arrêt du cycle cellulaire, nos résultats ont montré que le peptide NFL-TBS.40-63 entre préférentiellement dans les cellules en phases G0/G1/S, comme pour le CPP TAT (**Fig. 6**). Il est intéressant de noter que lorsque la prolifération des cellules est réduite, en bloquant le cycle cellulaire ou en les privant de sérum pendant plus de 3 jours, l'entrée du peptide est significativement diminuée (**Supplementary fig. S3**).

Enfin, les voies d'endocytose utilisées par le peptide sont régulées par différents signaux intracellulaires, via l'activation des récepteurs RTK et des voies de signalisation associées (PI3K/Akt et MAPK) (cf. partie 4.1.2.2, Figure 39). Alors que leur inhibition n'altère pas l'entrée de TAT, elle réduit de façon significative l'entrée du peptide dans les cellules de glioblastome. Parmi les RTK étudiés, seul l'EGFR est impliqué dans l'entrée du peptide, alors que les récepteurs VEGFR et PDGFR n'altère en rien son internalisation (**Fig.7**).

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats montrent que le peptide NFL-TBS.40-63 ne se comporte pas comme les autres CPP pour pénétrer dans les cellules. En effet, le peptide NFL-TBS.40-63 entre dans les cellules de glioblastome uniquement via des mécanismes d'endocytose, quel que soit sa concentration extracellulaire et sans impliquer les HSPG. Cependant, comme pour TAT et la crotamine, il semble que l'entrée du peptide soit favorisée dans des cellules activement prolifératives, et préférentiellement en phase G1/S. Comme l'endocytose, la prolifération cellulaire est régulée par des récepteurs RTK, notamment l'EGFR, qui est le récepteur le plus fréquemment muté dans les cellules de glioblastome (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008 ; Hamza et Gilbert, 2014). L'ensemble de ces données suggère que l'activité proliférative anormalement élevée des cellules de glioblastome, et la sur-activation de l'EGFR et des voies de signalisation associées dans ces cellules, favorisent l'entrée massive et sélective du peptide NFL-TBS.40-63. A l'inverse, dans des cellules saines qui prolifèrent peu, comme les astrocytes, une faible quantité de peptide est internalisée.



# The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis



Claire Lépinoux-Chambaud, Joël Eyer\*

Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, LUNAM, UPRES EA-3143, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment IBS-IRIS, 49033 Angers, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 21 January 2013

Received in revised form 29 March 2013

Accepted 2 April 2013

Available online 17 April 2013

### Keywords:

Peptide  
glioblastoma  
Endocytosis  
Uptake  
Tyrosine kinase receptor

## ABSTRACT

Glioblastoma are the most frequent and aggressive tumour of the nervous system despite surgical resection associated with chemotherapy and radiotherapy. Recently, we showed that the NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the sequence of a tubulin-binding site of neurofilaments, enters selectively in glioblastoma cells where it blocks microtubule polymerization, inhibits their proliferation, and reduces tumour development in rats bearing glioblastoma (Bocquet et al., 2009; Berges et al., 2012a). Here, we characterized the molecular mechanism responsible for the uptake of NFL-TBS.40-63 peptide by glioblastoma cells. Unlike other cell penetrating peptides (CPPs), which use a balance between endocytosis and direct translocation, the NFL-TBS.40-63 peptide is unable to translocate directly through the membrane when incubated with giant plasma membrane vesicles. Then, using a panel of markers and inhibitors, flow cytometry and confocal microscopy investigations showed that the uptake occurs mainly through endocytosis. Moreover, glycosaminoglycans and  $\alpha V\beta 3$  integrins are not involved in the NFL-TBS.40-63 peptide recognition and internalization by glioblastoma cells. Finally, the signalling of tyrosine kinase receptors is involved in the peptide uptake, especially via EGFR overexpressed in tumour cells, indicating that the uptake of NFL-TBS.40-63 peptide by glioblastoma cells is related to their abnormally high proliferative activity.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Intermediate filament proteins, like vimentin, keratin, desmin, GFAP, and the three neurofilament subunits, are capable to bind free unpolymerized tubulin on specific sites named tubulin-binding sites (TBS), and thus can affect microtubule polymerization in vitro

**Abbreviations:** Antp, antennapedia-homeodomain-derived antennapedia; ATP, adenosine triphosphate; BSA, bovine serum albumin; chlorpr., chlorpromazine hydrochloride; CPP, cell penetrating peptide; cytoch. D, cytochalasin D; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DMA, 5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride; DMEM, Dubelcco's modified Eagles medium; DTT, dithiothreitol; EGFR, epidermal growth factor receptor; FACS, fluorescence activated cell sorting; FITC, fluorescein isothiocyanate; GPMV, giant plasma membrane vesicles; HSPGs, heparan sulfate proteoglycans; MAPK, mitogen-activated protein kinase; M $\beta$ CD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin; NFL, neurofilament light subunit; NaClO<sub>3</sub>, sodium chlorate; PBS, phosphate buffered saline; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PFA, paraformaldehyde; PI, propidium iodide; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PTEN, phosphatase and TENsin homolog; RGD, arginine-glycine-aspartic acid; RNase, ribonuclease; RTK, tyrosine kinase receptor; Tat, trans-activator of transcription; TP10, transportan 10; TBS, tubulin-binding site; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

\* Corresponding author. Tel.: +33 244 688 488; fax: +33 244 688 489.

E-mail addresses: [joel.eyer@univ-angers.fr](mailto:joel.eyer@univ-angers.fr), [joel.eyer@inserm.fr](mailto:joel.eyer@inserm.fr) (J. Eyer).

0378-5173/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.004>

and in vivo (Bocquet et al., 2009). One of these peptides, derived from the light neurofilament subunit (NFL-TBS.40-63), is able to enter massively glioblastoma cells, and only poorly in healthy cells from the nervous system, like neurons and astrocytes. This peptide is internalized in the cytoplasm of glioblastoma cells where it disrupts microtubule network, and thus inhibits their cellular proliferation and induces cell death by apoptosis. When the peptide is injected in rats bearing glioma, it is localized mainly in and around the tumour, and inhibits its development (Berges et al., 2012a). This peptide can also improve the in vitro and in vivo targeted uptake of lipid nanocapsules by glioblastoma cells (Balzeau et al., 2013). These data indicate that this NFL-TBS.40-63 peptide behaves like a cell penetrating peptide and show a selective entry in glioblastoma cells. Thus, it could represent a promising therapeutic candidate to selectively treat glioblastoma.

Glioblastoma are brain tumours derived from glial cells, and represent the most frequent (2500 new cases/year in France) and aggressive tumours of the nervous system (grade IV according to World Health Organization and with a median survival around one year). Despite surgical resection associated with chemotherapy and radiotherapy, no specific treatment exists to eradicate such tumours. The therapeutic drugs currently used, like alkylating agents (Temozolomide) (Stupp et al., 2009), also affect healthy cells

particularly in the nervous system. The lack of specificity of current treatments and their side effects urgently needs the development of new therapeutic strategies targeting tumour cells.

The aim of this study is to elucidate the molecular mechanisms involved in the internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide by glioblastoma cells. Previous work showed that the NFL-TBS.40-63 peptide is internalized massively in glioblastoma cells and poorly in other cells from the nervous system, like astrocytes and neurons. This entry is inhibited by low temperature (4 °C) and is energy-dependent, characteristics of endocytosis (Berges et al., 2012a). Here, we further investigate the entry mechanism, and compare it to the known uptake mechanisms of cell penetrating peptides (CPPs). According to their extracellular concentrations, the CPPs (e.g. penetratin, Tat, or TP10) enter cells following a balanced equilibrium between direct translocation through the membrane and endocytosis through intracellular vesicles (Alves et al., 2010; Madani et al., 2011). A well-known CPP, the Tat.48-60 peptide, derived from the trans-activator of transcription (Tat) of human immunodeficiency virus, can translocate through the membrane and accumulate in the cell nucleus (Vives et al., 1997). Recently, the Vim-TBS.58-81 peptide, derived from intermediate filament protein vimentin, was described as a novel CPP that enters glioblastoma cells via endocytosis pathways (Balzeau et al., 2012).

Here, we show that unlike the other CPPs, the NFL-TBS.40-63 peptide is unable to translocate across the plasma membrane of giant plasma membrane vesicles (GPMVs) derived from glioblastoma cells, indicating that it cannot translocate directly in cells. Moreover, using flow cytometry with different inhibitors of endocytosis and confocal imaging analysis with markers of the different endocytic pathways, we also show the involvement of this active transport for the NFL-TBS.40-63 peptide uptake by glioblastoma cells. Finally, we analyzed the possible participation of different cell surface molecules, like heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrins that are both over-expressed in glioblastoma. The  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin was identified in glioblastoma tumours, but was not expressed in normal adult brain (Gladson and Cheresch, 1991). The glioma cells also express increased quantities of heparan sulfate compared to normal brain (Steck et al., 1989; Sallinen et al., 2000). These two types of cell surface receptors were known to participate in the CPP and RGD peptide uptake respectively (Alves et al., 2010; Letoha et al., 2010; Shi et al., 2011). However, glycosaminoglycans and  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrins are not involved in the NFL-TBS.40-63 peptide recognition and internalization by glioblastoma cells.

Finally, as several cellular properties can influence the uptake efficacy of CPPs, we focused our study on cell cycle phase and signalling pathways that can regulate internalization. It is known that the activation of tyrosine kinase receptors (RTKs) regulates numerous components of the endocytic machinery, like the phosphoinositides involved in several signal-transduction and membrane-trafficking systems (Le Roy and Wrana, 2005; Doherty and McMahon, 2009; Czech, 2000). Moreover, the tumour genesis can be related to the overexpression or the up-activation of different components of RTK signalling pathways, including EGFR, VEGFR or PDGFR that are over-expressed in tumours compared to healthy cells, especially in the U87-MG glioblastoma cell line (Sallinen et al., 2000; Dimitropoulos et al., 2010). Here we show that the uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide in glioblastoma cells depends on the cell cycle, and that the peptide penetrates selectively in active proliferative cells depending on signalling pathways over-expressed in tumour cells.

Together, these data indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide uptake occurs only by endocytic routes. The regulation of this active transport by intracellular signalling pathways over-expressed in glioblastoma cells promotes the massive uptake of NFL-TBS.40-63 peptide. The abnormally high proliferative activity of glioblastoma cells facilitates the NFL-TBS.40-63 peptide uptake, while a small

amount of peptide is internalized in lower proliferative cells, like human astrocytes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture and materials

Human U87-MG and T98G glioblastoma cells, as well as rat 9L and F98 glioma cells (obtained from ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in T75 flasks at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>, in DMEM with 1 g/L L-glucose (Lonza, France), supplemented with 10% foetal calf serum, 5% L-glutamine, and 5% penicillin/streptomycin (Lonza, France) and passaged every 2–3 days. Normal human astrocytes (obtained from Lonza) were cultured in T75 flasks at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in AGM<sup>TM</sup> Astrocyte Growth Medium (Lonza).

Peptides were synthesized by Millegen (Toulouse). NFL-TBS.40-63 (YSSYSAPVSSLSVRRSYSSSSGS) and Tat.48-60 (GRKKRRQR-RRPPQ) peptides are biotinylated or coupled to carboxy-fluorescein isothiocyanate (FITC), and dissolved in sterile water.

Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD, 10 mg/mL), chlorpromazine hydrochloride (chlorpr., 50  $\mu$ mol/L), nystatin (25  $\mu$ g/mL), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10  $\mu$ g/mL), cytochalasin D (cytoch. D, 4  $\mu$ mol/L), 5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride (DAM, 1 mmol/L), sodium chlorate (NaClO<sub>3</sub>, 60 mmol/L), wortmannin (100 nmol/L), ara-c (5  $\mu$ g/mL), colchicine (1  $\mu$ g/mL), U0126 (40  $\mu$ mol/L), PD 98059 (50  $\mu$ mol/L), and sunitinib (1  $\mu$ mol/L) were obtained from Sigma. PI-103 (50  $\mu$ mol/L), genistein (400  $\mu$ mol/L), H-7 (100  $\mu$ mol/L) were obtained from Merck. Gefitinib (50  $\mu$ mol/L) was obtained from Santa Cruz Biotechnology. The anti-human CD51/CD61 ( $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin) biotin was obtained from eBioscience. The avidin-alexafluor 488 nm (avidin-AF488) and the transferrin from human serum conjugated to alexafluor 568 nm (transferrin AF568) were obtained from Molecular Probes. The cholera toxin subunit B conjugated to alexafluor 555 nm (cholera toxin B-AF555) and dextran conjugated to alexafluor 568 nm (dextran-AF568) were obtained from Invitrogen.

### 2.2. Flow cytometry

The uptake of the FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide was measured with a FACScan (Becton Dickinson). Cells were seeded in 6 well plates (4–5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well) during 24 h, and then treated with the different inhibitors during 30 min at 37 °C. To investigate the role of heparan sulphates, cells were treated for 48 h with 60 mmol/L NaClO<sub>3</sub>. The involvement of the  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrins was analyzed using a biotinylated anti-human  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin antibody (5  $\mu$ g/mL anti-human CD51/CD61) during 1 h at 37 °C. Then 20  $\mu$ mol/L FITC labelled peptides used at the indicated concentrations were added to the cells for 30 min at 37 °C. Subsequently, cells were washed twice with PBS-1 $\times$  and then detached with trypsin-EDTA-1 $\times$  (Sigma) incubation during 5–10 min. After centrifugation (5 min at 2000 rpm), cells were washed twice with PBS-1 $\times$  and re-suspended in 50  $\mu$ g/mL propidium iodide (PI, Sigma). The fluorescent positive cells that incorporated the FITC labelled peptides were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson).

To analyze the possible effect of the cell cycle on the NFL-TBS.40-63 peptide uptake, cells were seeded in 6 well plates (4–5  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well) and after 24 h they were treated with ara-c or colchicine during 24 h, or without serum during several days at 37 °C. To analyze the effect of the different treatments, following trypsinization and centrifugation (5 min at 2000 rpm), cells were permeabilized with PBS-1 $\times$ -Tween 0.5% and fixed with ethanol 70% before adding RNase 1 mg/mL during 30 min at 37 °C. The cell suspension was diluted in 1  $\mu$ g/mL PI, before determination of the

cell phase by flow cytometry. To measure the NFL-TBS.40-63 peptide uptake, the cells were pretreated with ara-c, colchicine or without serum, as mentioned previously. After these treatments, cells were incubated with 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC-peptide and analyzed by flow cytometry as previously described.

### 2.3. Confocal microscopy

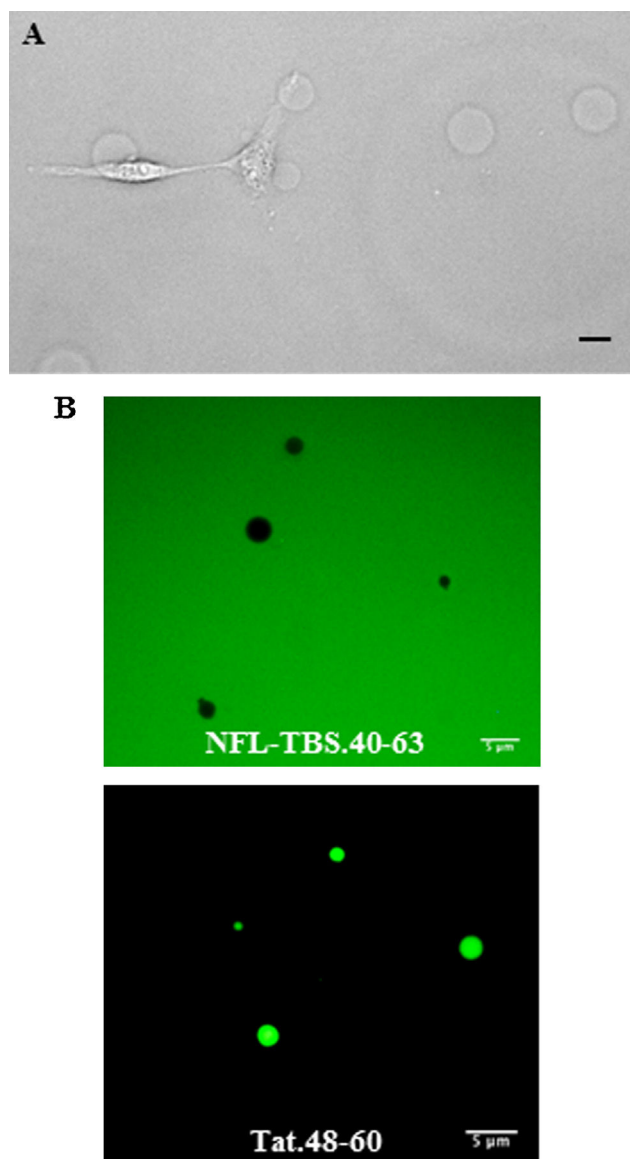
To study the molecular mechanism of the internalization of NFL-TBS.40-63 peptide we used endocytosis markers, transferrin AF-568 internalized in clathrin-coated pits, cholera toxin B-AF555 internalized by caveolin-coated endocytosis vesicles, and dextran-AF568 to stain macropinocytosis vesicles. Cells were seeded in 24 well plates ( $3 \times 10^4$  cells/well) containing coverslips. After 48 h, cells were co-incubated with 25  $\mu\text{g/mL}$  transferrin-AF568, 10  $\mu\text{g/mL}$  cholera toxin B-AF555 or 10 mg/mL dextran-AF568 and 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide during 1 h at 37 °C. After washing with PBS-1 $\times$ , cells were fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min. Cells were then washed three times in PBS-1 $\times$  before adding 3  $\mu\text{mol/L}$  4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) for 5 min. Finally, cells were washed twice in PBS-1 $\times$  and the coverslips were mounted with an anti-fading mounting medium. Stained cells were observed with a LSM 700 Zeiss confocal microscope, and images were analyzed with Zen 2009 software.

### 2.4. Preparation of giant plasma membrane vesicles (GPMVs) treated with FITC labelled peptides

To evaluate the passive transport of the NFL-TBS.40-63 peptide in a natural membrane model without endocytosis processes, we used a protocol previously described for the direct translocation of CPPs (Tat peptide, penetratin, TP10) (Amand et al., 2011; Saalik et al., 2011). The preparation of the GPMVs was performed according to Bauer et al. (2009). Cells were cultured during 48 h and washed twice with GPMV buffer (2 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES, pH 7.4). Then, they were incubated with GPMV buffer supplemented with 25 mmol/L formaldehyde (FA, Sigma) and 2 mmol/L dithiothreitol (DTT, Euromedex) for 4 h. After incubation, the supernatant containing the detached GPMVs was collected and centrifuged at 19,000 rpm for 45 min at 4 °C. The pellet was dissociated in GPMV buffer. The GPMV suspension was used the same day of their preparation. GPMVs were treated with 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled peptides during 1 h. Then, 50  $\mu\text{L}$  of GPMV suspension were deposited onto glass slides and covered with a glass coverslip. Cells with GPMVs were imaged with a Leica DMI6000 inverted microscope and analyzed with Metamorph 7.1.7.0 software. The GPMVs treated with the peptides were visualized with a Leica fluorescent microscope and analyzed with Image J 1.43 software.

### 2.5. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. For FACS analysis, twenty thousand events per sample were analyzed and dead cells stained with PI were excluded (representing for each samples less than 10% of dead cells excluded). Results were presented as mean percentage of fluorescent cells that have incorporated the FITC labelled peptide and data were represented as bar graphs with the standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed with *t* of Student test by using Prism 3.00 (GraphPad software, San Diego, CA). Asterisks indicate significant level versus the control condition: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .



**Fig. 1.** The uptake of NFL-TBS.40-63 and Tat.48-60 peptides in GPMVs derived from U87-MG cells. (A) U87-MG cells treated with vesiculation chemicals produce GPMVs. (B) GPMVs were isolated and incubated with 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled NFL-TBS.40-63 and Tat.48-60 peptides during 60 min. The images of the fluorescent signal of FITC labelled peptides were obtained by fluorescent microscopy. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .

## 3. Results

### 3.1. Unlike the CPPs in general, the NFL-TBS.40-63 peptide is unable to translocate directly across the plasma membrane (Fig. 1)

The CPPs can translocate directly through the membrane and they can use different endocytic pathways as well as nonendocytic uptake routes (Duchardt et al., 2007). A balance between the passive or active entry of such peptides depends on their concentration (Alves et al., 2010; Jiao et al., 2009). Here, to determine if the NFL-TBS.40-63 peptide can passively translocate through the membrane, we used giant plasma membrane vesicles (GPMVs) obtained following the treatment of U87-MG cells with GPMV buffer supplemented with formaldehyde and DTT (Fig. 1A). These GPMVs were then incubated during 60 min with 20  $\mu\text{mol/L}$  NFL-TBS.40-63 and Tat.48-60 peptides labelled with FITC. The peptide penetration was analyzed by fluorescent microscopy. We observed a strong

accumulation of fluorescently labelled Tat.48-60 peptide in GPMVs, confirming the direct and passive translocation of this CPP (Fig. 1B). On the opposite, when the GPMVs were incubated with the FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide, the fluorescence was observed outside the vesicles but no vesicle was labelled (Fig. 1B). Similar results were also obtained when GPMVs were treated with lower concentration of peptides ( $5 \mu\text{mol/L}$ ), at  $4^\circ\text{C}$ , or following different times of incubation (10 min and 30 min) (data not shown). Taken together, these results demonstrate that the NFL-TBS.40-63 peptide cannot penetrate in GPMVs through a passive direct translocation, like other CPPs.

### 3.2. Several endocytosis pathways are involved in the uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide (Fig. 2)

Previous work showed that the internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide is temperature and energy-dependent. Following depletion of adenosine triphosphate (ATP) or incubation at  $4^\circ\text{C}$ , the peptide uptake was strongly reduced in U87-MG cells (Berges et al., 2012a). Such inhibition of the uptake indicates that an endocytosis process is involved. To further confirm this possibility and to define whether a particular pathway (clathrin and caveolin-coated pits, and macropinocytosis) could be used by the peptide to penetrate in glioblastoma cells, we used different inhibitors and markers of the three major endocytosis pathways.

Flow cytometry analysis reveals that the presence of M $\beta$ CD significantly inhibits the peptide uptake by  $41.55 \pm 3.668\%$ . This inhibitor disrupts plasma membrane lipid rafts and perturbs the formation of both clathrin-coated pits and caveolin-coated endocytic vesicles (Rodal et al., 1999; Duchardt et al., 2007).

To further confirm this result and distinguish between these two endocytic pathways, we used a panel of inhibitors for each pathway. Chlorpromazine and potassium depletion inhibit clathrin-dependent endocytosis (Larkin et al., 1983; Duchardt et al., 2007). Nystatin and PMA inhibit caveolin-dependent endocytosis (Anderson et al., 1996). When human glioblastoma cells were treated with these inhibitors, the NFL-TBS.40-63 peptide uptake was affected. Fig. 2A indicates that  $29.45 \pm 2.806\%$  and  $38.50 \pm 3.492\%$  of peptide uptake occurs via respectively clathrin and caveolin-dependent endocytosis. Inhibitors of macropinocytosis were also tested. Cytochalasin D is known to inhibit F-actin polymerization and DAM inhibits  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (Nakase et al., 2004; Koivusalo et al., 2010). Here we show that the macropinocytosis is also involved, with approximately  $31.58 \pm 6.562\%$  of peptide uptake through this pathway (Fig. 2A).

Finally, we used confocal microscopy to determine whether the NFL-TBS.40-63 peptide is co-localized with endocytosis markers. Transferrin, cholera toxin B and dextran were used to stain respectively clathrin-coated endosomes, caveolin-coated endosomes, and vesicles of macropinocytosis. The majority of internalized peptide was observed as endosome-like punctate signals (Fig. 2B). As a part of the internalized peptide co-localizes with each endocytosis marker, it indicates that the peptide uses these three endocytic pathways to enter cells.

### 3.3. Involvement of endocytosis pathways in the NFL-TBS.40-63 peptide uptake depends on the cell line and on extracellular peptide concentration (Table 1 and Fig. 3)

The involvement of endocytosis was also evaluated in other glioma cell lines, originating from two different species, and in a human astrocyte cell line. The results presented in Table 1 confirm that the peptide preferentially penetrates in glioma cells when compared to healthy cells, as previously demonstrated (Berges et al., 2012a).

We also investigated the endocytosis mechanism in these different cell lines by pre-treating cells with endocytosis inhibitors, and then incubating them with the FITC labelled peptide. The results and the statistical analysis showed that the three major endocytic pathways were used by the peptide to penetrate the human glioblastoma cells (U87-MG and T98G) whereas in the rat glioma cells (F98 and 9L) the peptide uptake occurred by the clathrin-dependent endocytosis and the macropinocytosis. Moreover, lower proportions of the peptide internalized in human astrocytes were achieved only through macropinocytosis (Table 1).

It has been shown that endocytosis plays an important role for the internalization of CPPs (Richard et al., 2003). In U87-MG cells, we showed that the Tat.48-60 peptide can translocate passively through the membrane as previously reported (Fig. 1). The uptake of Tat.48-60 peptide by U87-MG cells is not inhibited by cytochalasin D, but is inhibited by DAM, suggesting a partial internalization through macropinocytosis (Supplementary Fig. S1). This endocytic pathway was also described for the Tat.48-60 peptide uptake (Wadia et al., 2004; Gump et al., 2010; Yukawa et al., 2010). The Antennapedia-homeodomain-derived antennapedia (Antp), Tat and R9 peptides use the three endocytic pathways (macropinocytosis, clathrin and caveolae-mediated endocytosis), and the mechanism of their uptake depends on peptide concentration (Duchardt et al., 2007). Therefore, we also analyzed the involvement of these endocytic pathways in the NFL-TBS.40-63 peptide uptake, depending on the extracellular peptide concentration. At low concentrations the peptide uptake is only sensitive to PMA, strongly indicative of an internalization through caveolae-dependent endocytosis. However, at higher concentrations, the uptake decreases in the presence of chlorpromazine, PMA or DAM, which indicates that the peptide uptake occurs through these three endocytic pathways (Fig. 3).

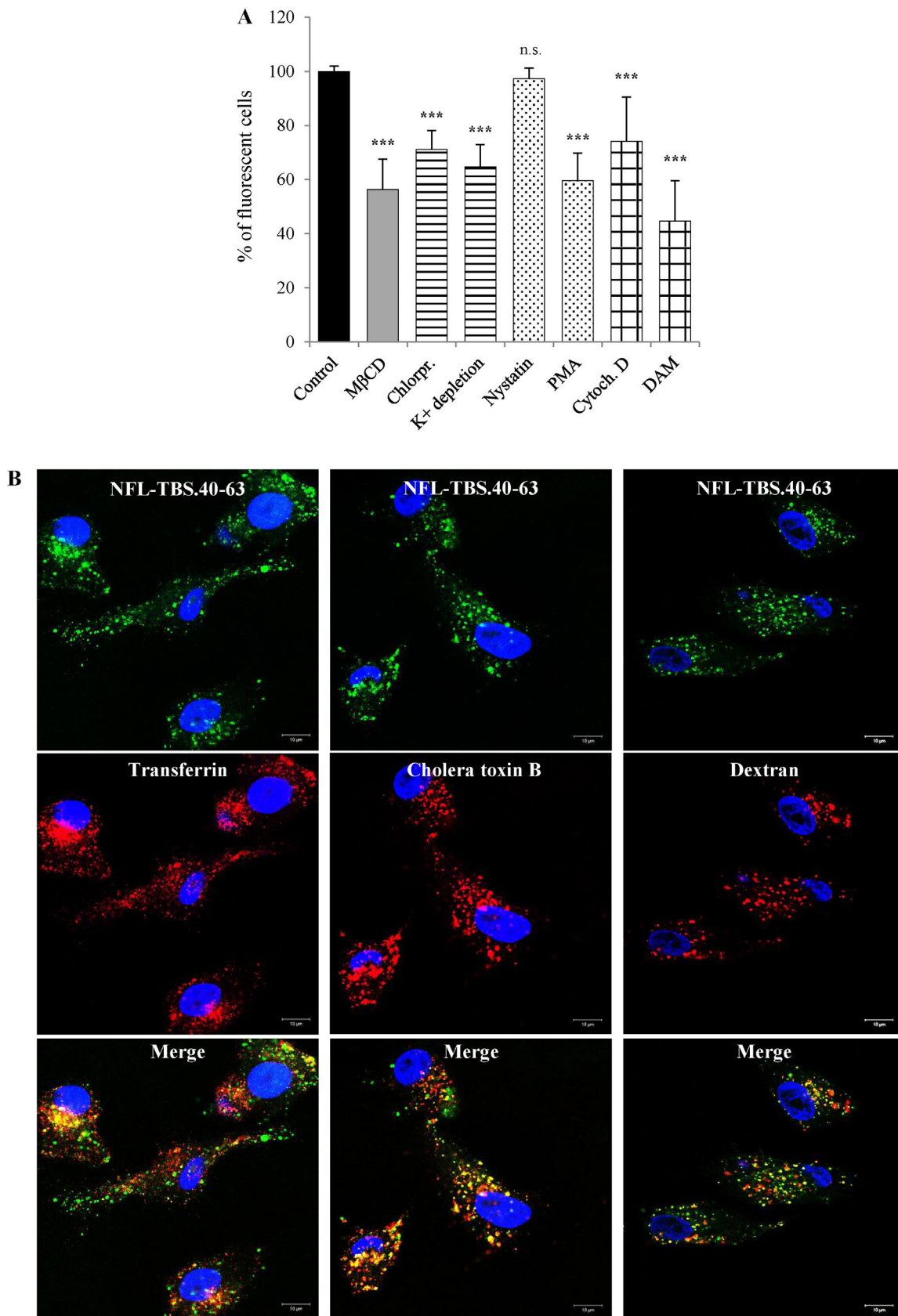
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.004>.

### 3.4. No classical cell surface recognition of the NFL-TBS.40-63 peptide by glioblastoma cells is required for its internalization (Figs. 4 and 5)

Several studies indicated the importance of heparan sulfate proteoglycan (HSPG) receptors for the accumulation and uptake of Tat peptide in CHO cells (Richard et al., 2005), as well as penetratin and Tat peptides in K562 cells (Letoha et al., 2010), and R9 peptide in HeLa cells (Duchardt et al., 2007). Moreover, a marked decrease of CPP uptake occurs following undersulfation of heparan sulfate (Letoha et al., 2010).

We analyzed the role of HSPGs on the uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide in U87-MG cells, by pre-treating these cells with sodium chlorate ( $\text{NaClO}_3$ ), an agent known to reduce the sulfation of HSPGs (Safaiyan et al., 1999). At a low peptide concentration, the sodium chlorate treatment had no effect. But at higher peptide concentration, different effects on the peptide uptake were observed. At  $20 \mu\text{mol/L}$  of peptide, the decreased sulfation of HSPGs affected the uptake of Tat peptide but had no effect on the uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide (Fig. 4). However, the HSPG receptors do not seem to be the major or only way for Tat internalization, and controversies still exist in the literature concerning the involvement of this uptake mechanism of Tat peptide (Subrizi et al., 2011).

We also analyzed the involvement of the  $\alpha\text{V}\beta 3$  integrins, known to be involved in the cell surface recognition of RGD peptides. Moreover, RGD peptides were used for imaging the expression of  $\alpha\text{V}\beta 3$  integrin in tumours (Dijkgraaf et al., 2011). This binding affinity of RGD conjugates for  $\alpha\text{V}\beta 3$  integrins has been shown in U87-MG cells (Shi et al., 2011). Another group demonstrated that peptide derived from  $\alpha 3$  chain of type IV collagen interacts with

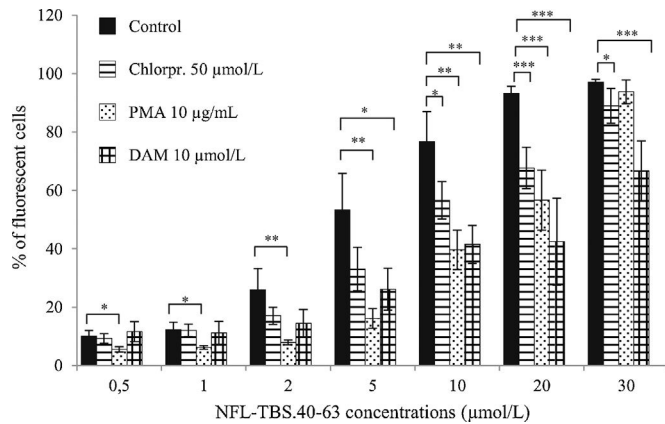


**Fig. 2.** The NFL-TBS.40-63 peptide internalization in U87MG cells. (A) Cells were pre-treated with 10 mg/mL methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), 50  $\mu$ mol/L chlorpromazine (chlorpr.), 25  $\mu$ g/mL nystatin, 10  $\mu$ g/mL PMA, 4  $\mu$ mol/L cytochalasin D (cytoch. D) and 1 mmol/L DAM, during 30 min. Then they were incubated with 20  $\mu$ mol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined comparatively with untreated sample (control). n.s.: not significant; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . (B) Human U87-MG cells were grown with 25  $\mu$ g/mL transferrin-AF568, 10  $\mu$ g/mL cholera toxin B-AF555, or 1 mg/mL dextran-AF568 in the presence of 20  $\mu$ mol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide during 1 h. Nuclei were labelled with DAPI (blue). Fluorescent labelling was analyzed by confocal microscopy. Multiple regions show co-localization of the peptide with the endocytosis markers as revealed by yellow punctate signals. Scale bar: 10  $\mu$ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

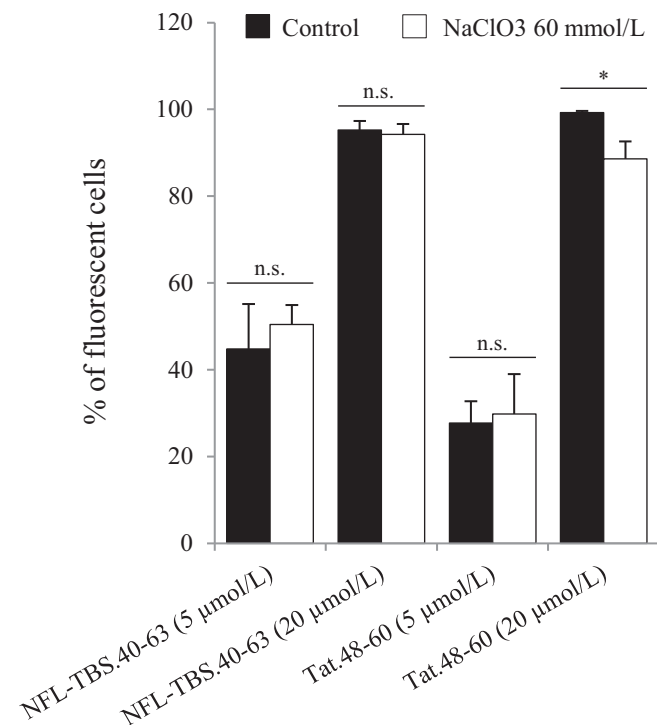
**Table 1**

The NFL-TBS.40-63 peptide uptake and the involvement of the three endocytosis pathways depend on cell lines. The uptake of NFL-TBS.40-63 peptide was compared in human cell lines (U87-MG and T98G), in rat glioma cell lines (F98 and 9L) and in human astrocytes. The cells were pre-treated during 30 min with the inhibitors of the endocytic pathways used in Fig. 1A, and then incubated with 20 μmol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined. Significant results versus control are presented as mean ± SEM.

	Cell line	NFL-TBS.40-63 uptake (%)			
		Total uptake	Clathrin-dependent endocytosis	Caveolin-dependent endocytosis	Macro-pinocytosis
Human GBM cell lines	U87-MG	95.17 ± 0.628	29.45 ± 2.806	38.5 ± 3.492	31.58 ± 6.562
	T98G	85.47 ± 0.983	16.48 ± 3.363	6.38 ± 2.981	16.19 ± 3.714
Rat glioma cell lines	F98	89.48 ± 1.586	19.37 ± 2.589	–	29.98 ± 3.730
	9L	89.59 ± 0.692	12.38 ± 2.789	–	22.99 ± 3.279
Human astrocytes	h. astro	47.13 ± 2.645	–	–	29.58 ± 6.582



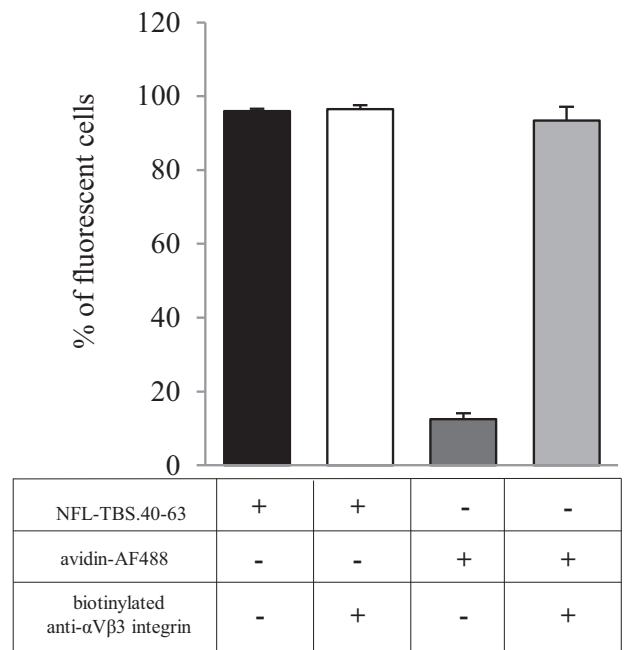
**Fig. 3.** The involvement of the three endocytosis pathways depends on the extracellular NFL-TBS.40-63 peptide concentration. Human U87-MG cells were pre-treated with 50 μmol/L chlorpromazine (chlorpr.), 10 μg/mL PMA or 1 mmol/L DAM, during 30 min and then incubated with 20 μmol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide during 30 min. Cellular uptake was evaluated by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined comparatively with untreated samples (control). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.



**Fig. 4.** Evaluation of glycosaminoglycans on the uptake of NFL-TBS.40-63 and Tat.48-60 peptides in U87-MG cells. Cells were pre-treated with 60 mmol/L NaClO<sub>3</sub> during 48 h. Then cells were incubated with 20 μmol/L FITC labelled peptides during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined comparatively with untreated samples (control). n.s.: not significant; \**P* < 0.05.

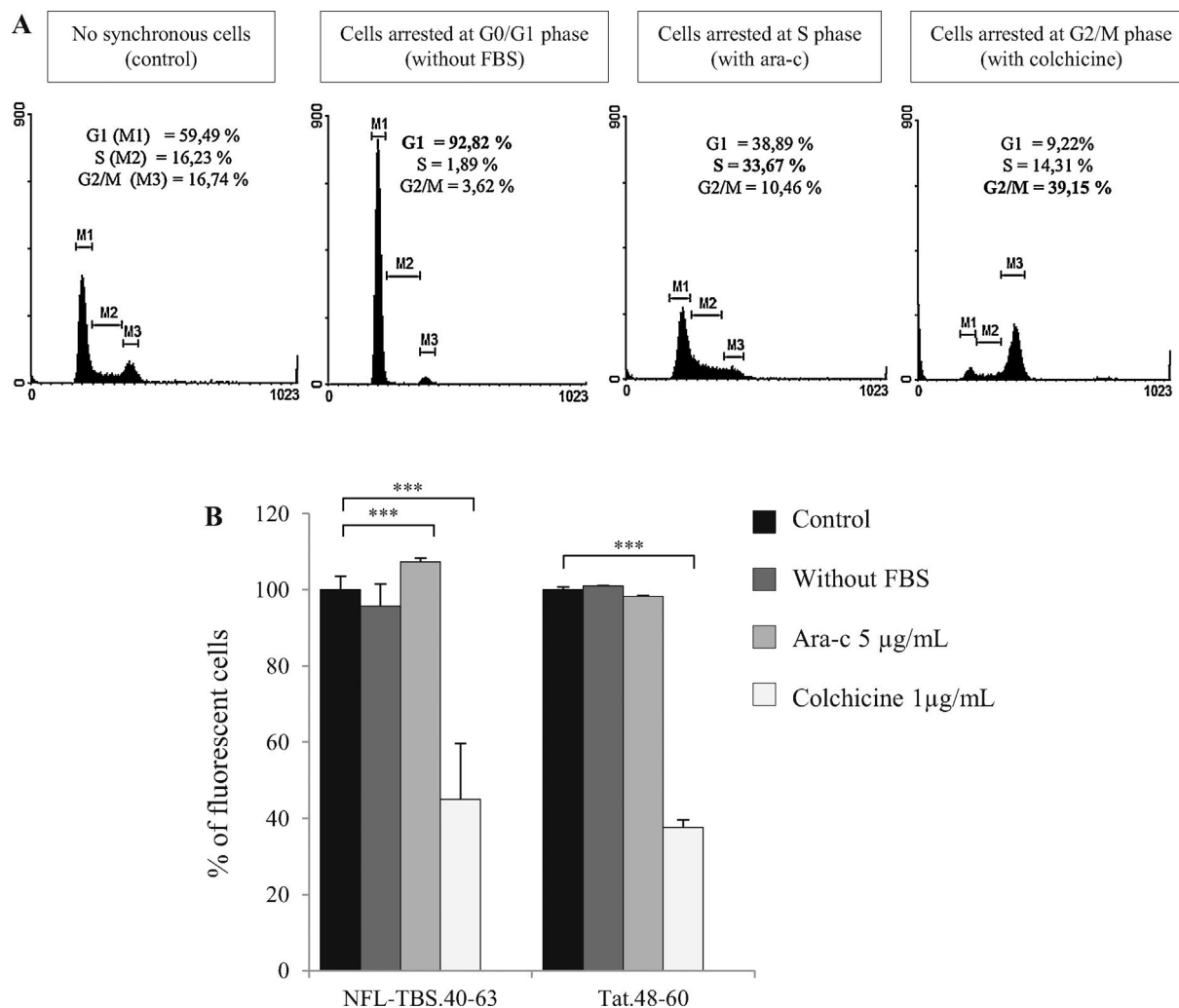
αVβ3 integrins (Fawzi et al., 2000; Thevenard et al., 2006). These studies and the over-expression of these integrins in glioblastoma (Gladson and Cheresch, 1991) led us to analyze possible involvement of the integrin binding, by blocking integrins with an anti-αVβ3 integrin antibody. Staining of cells with biotinylated anti-human αVβ3 integrin followed by avidin-AF488 confirms the presence of these integrins in U87-MG cells. The mean percentage of fluorescent positive cells was 93.41 ± 2.914% compared to 12.47 ± 1.655% of fluorescent positive cells only treated with avidin-AF488. When cells were pre-incubated with the anti-αVβ3 integrin antibody the uptake of NFL-TBS.40-63 peptide was not altered. More than 95% of cells incorporated the peptide in the presence or absence of this antibody (Fig. 5). Taken together these data indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide is not recognized at the cell surface by the HSPGs or the αVβ3 integrins.

To confirm these results, we also analyzed the NFL-TBS.40-63 peptide uptake by quenching the surface-bound fluorescence of the peptide by adding 0.4% trypan blue (Sigma) before FACS analysis to measure only the intracellular fluorescence. Results confirm that there is no classical cell surface recognition of the NFL-TBS.40-63 peptide by the glioblastoma cells as there is no difference with or without quenching (Supplementary Fig. S2).



**Fig. 5.** Evaluation of αVβ3 integrins on the uptake of NFL-TBS.40-63 peptide in U87-MG cells. Cells were treated with 20 μmol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide or Avidin-AF488 (at 1/200) during 30 min before FACS analysis. Cells were also pre-treated with 5 μg/mL biotinylated anti-αVβ3 integrin antibody during 1 h and then incubated with avidin-AF488 or 20 μmol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis.





**Fig. 6.** The uptake of NFL-TBS.40-63 and Tat.48-60 peptides is more active during the G1 and S phases. (A) U87-MG cells were not synchronized (control), arrested at G0/G1 phase (without FBS), S phase (with 5 µg/mL ara-c), and G2/M phase (with 1 µg/mL colchicine). (B) Then 20 µmol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 and Tat.48-60 peptides were added to the U87-MG cells during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined comparatively with untreated samples (control). \*\*\* $P < 0.001$ .

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.004>.

### 3.5. The NFL-TBS.40-63 peptide is selectively internalized in active proliferative cells (Figs. 6 and 7)

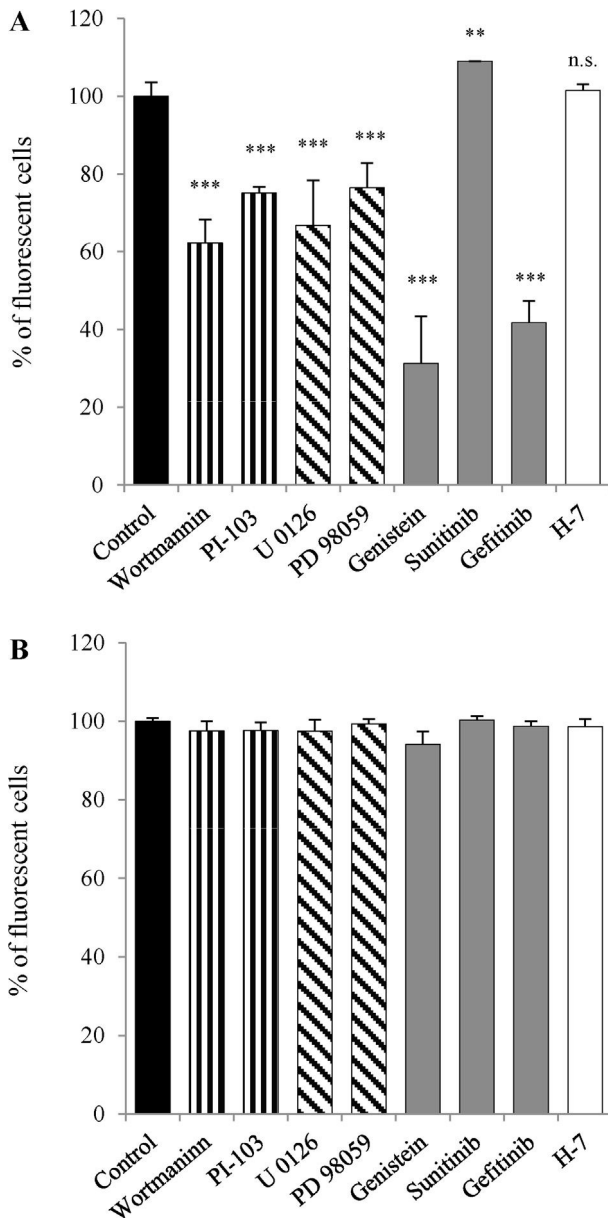
Previous studies indicated the selective uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide in glioblastoma cells, whereas its uptake is limited in normal healthy cells (astrocytes and neurons) (Berges et al., 2012a). To investigate whether the uptake of Tat.48-60 and NFL-TBS.40-63 peptides might be related to a special cell cycle phase, we cultured cells under conventional asynchronous conditions or arrested them at specific stages of their cell cycle. The cell cycle was arrested at G0/G1 phase by serum deprivation, at S phase by ara-c treatment (equivalent to thymidine), and at G2/M phases by colchicine treatment (equivalent to nocodazole) (Radis-Baptista et al., 2012) (Fig. 6A).

The uptake of Tat.48-60 peptide occurred mostly during the G1/S phase of U87-MG cell cycle (Fig. 6B), as previously described for crostamine in CHO cells (Nascimento et al., 2007). Similarly, the NFL-TBS.40-63 peptide was selectively internalized during the G1 and S phases of U87-MG cell cycle. A slight but systematic increased uptake of the peptide was found following ara-c treatment (when

compared to un-arrested cells), indicating that the peptide enters in U87-MG preferently during the S phase. It is important to note that when incubation in serum deprivation condition was prolonged (after 3 days), the peptide uptake was significantly decreased in U87-MG cells (Supplementary Fig. S3). FACS analysis showed that more than 65% of cells survived despite the 11 days incubation without serum.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.004>.

To further elucidate the molecular mechanisms involved in the uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide, we investigated the cellular signals required for activating different endocytic pathways, in particular the role of RTKs and signalling pathways associated to PI3K/Akt and MAPK (Fan and Weiss, 2010; Nikiforova and Hamilton, 2011; Seger and Krebs, 1995). Fig. 7B shows no major effect for the Tat.48-60 peptide uptake, while inhibition of RTKs with genistein decreased markedly the internalization of NFL-TBS.40-63 peptide, and inhibition of serine–threonine receptors with H-7 had no effect. Moreover, the inhibitors of PI3K (wortmannin and PI-103) and MAPK (PD 98059 and U 0126) respectively inhibit approximately 28% and 26% of the peptide uptake. Interestingly, only the inhibition of EGFR by gefitinib altered the uptake of NFL-TBS.40-63 peptide decreasing to  $53.38 \pm 2.301\%$  the



**Fig. 7.** The NFL-TBS.40-63 peptide internalization in U87-MG cells pre-treated with inhibitors of RTK signalling pathways. U87-MG cells were pre-treated during 30 min with inhibitors of PI3K/Akt signalling pathway (100 nmol/L Wortmannin and  $\mu\text{mol/L}$  PI-103), with inhibitors of MAPK signalling pathway (40  $\mu\text{mol/L}$  U 0126 and 50  $\mu\text{mol/L}$  PD 98059), with inhibitors of RTK (400  $\mu\text{mol/L}$  genistein, 1  $\mu\text{mol/L}$  sunitinib and 50  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib), and with inhibitor of serine–threonine receptor (100  $\mu\text{mol/L}$  H-7). Then, 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled NFL-TBS.40-63 (A) and Tat.48-60 (B) peptides were added to the cells during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined comparatively with untreated samples (control). n.s.: not significant, \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

peptide incorporation in U87-MG. In contrast, the peptide uptake was slightly increased when VEGFR and PDGFR were inhibited by sunitinib. These results indicate the importance of the signalling cascade including EGFR, PI3K/Akt and MAPK in the endocytic internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide (Fig. 7A).

#### 4. Discussion

In this study, we investigated the molecular mechanism involved in the selective uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide by glioblastoma cells. This peptide corresponds to the sequence of the tubulin-binding site located on the intermediate filament protein

neurofilament light subunit (Bocquet et al., 2009). In glioma cells, but not in healthy cells, this peptide inhibits microtubule formation and leads to a decreased cell viability, proliferation and migration. This peptide shows a dose-dependent uptake by both glioblastoma cells and astrocytes, with a limited internalization in healthy cells. The uptake was shown to be temperature and energy-dependent, which suggests an endocytosis uptake (Berges et al., 2012a).

Here we confirmed that the NFL-TBS.40-63 peptide is incorporated through clathrin-dependent endocytosis and macropinocytosis in rat glioma cell lines. In human glioma cells, the peptide penetrates cells through these two mechanisms and also by caveolin-dependent endocytosis, whereas only macropinocytosis is responsible for the peptide uptake in human astrocytes. Confocal microscopy analysis confirms these results in U87-MG cells where the NFL-TBS.40-63 peptide appears as punctate signals, characteristic of endosomes, and co-localized with markers of these uptake processes. A similar energy-dependent uptake was described for Vim-TBS.58-81, another TBS peptide derived from the intermediate filament vimentin, which enters glioblastoma cells through the caveolar endocytic pathway (Balzeau et al., 2012). However, it is important to note that the involvement of the different endocytic pathways depend on the extracellular peptide concentration.

To elucidate the NFL-TBS.40-63 peptide internalization, and as the NFL-TBS.40-63 peptide shares some common characteristics with the CPPs, we comparatively analyzed the molecular mechanisms involved in CPP uptake, in particular the Tat.48-60 peptide. These peptides are defined as short and water-soluble, with positive charges at physiological pH, and they can be internalized in different cell types (Madani et al., 2011; Lindgren et al., 2000; Mueller et al., 2008). Here, we show that the Tat.48-60 peptide uptake in U87-MG cells occurs through macropinocytosis, whereas the NFL-TBS.40-63 peptide uses the three endocytosis pathways. Importantly, CPPs are also able to directly translocate through the membrane, by an energy-independent process (Richard et al., 2003; Duchardt et al., 2007), as shown here for Tat.48-60 translocation. However, the NFL-TBS.40-63 peptide is unable to directly translocate in giant plasma membrane vesicles derived from U87-MG cells. Thus, unlike the CPPs uptake that occurs following a balance between direct translocation and endocytosis (Alves et al., 2010; Madani et al., 2011), the NFL-TBS.40-63 peptide uptake occurs only through endocytic pathways.

Another important difference shown between the uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide and CPPs is the involvement of HSPGs expressed at the cell surface that play key roles in the accumulation and internalization of CPPs (Richard et al., 2005; Letoha et al., 2010). Inhibition of heparan sulfates in U87-MG cells does not alter the uptake of NFL-TBS.40-63 peptide, even if HSPGs are over-expressed in these cells (Steck et al., 1989; Sallinen et al., 2000). As these results alone cannot explain the selectivity of the peptide for glioblastoma cells, we also investigated the role of other over-expressed receptors, like  $\alpha\text{V}\beta 3$  integrins (Gladson and Cheresch, 1991; Shi et al., 2011), but these integrins do not affect the NFL-TBS.40-63 peptide uptake. Together, these data clearly indicate that the selective entry of the NFL-TBS.40-63 peptide does not involve the recognition of the peptide by these cell surface molecules.

Interestingly, we observed that NFL-TBS.40-63 uptake is more active during the G1 and S phases of cell cycle, as demonstrated for Tat.48-60 in U87-MG cells and for crotonamine peptide in CHO cells. It seems that this selective uptake occurs in active proliferative cells, as already described for crotonamine uptake (Nascimento et al., 2007). Moreover, several studies showed that the positive charge of NFL-TBS.40-63 and CPPs sequence alone is not sufficient for their internalization but that the amino acid sequence is important for peptide uptake (Futaki et al., 2001; Berges et al., 2012b).

Finally, we showed that signalling pathways involved in endocytic mechanism play a key role for the internalization of

NFL-TBS.40-63 peptide in glioblastoma cells. Our results provide evidence that activation of EGFR and signalling pathways associated, PI3K/Akt and MAPK, is crucial to allow NFL-TBS.40-63 peptide uptake in cells. It is known that the activation of tyrosine kinase receptors (RTKs) regulates numerous components of the endocytic machinery, like the phosphoinositides. For example, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> is distributed at the plasma membrane and has a role in endocytosis. PtdIns3P is activated by PI3K and is enriched in early endosomes (Le Roy and Wrana, 2005; Doherty and McMahon, 2009; Czech, 2000; Raiborg et al., 2013). The involvement of specific cellular signals has already been described for the endocytosis of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) (Schelhaas et al., 2012). In many human cancers, including glioblastoma, various mutations are found in signalling molecules, as gain-of-function mutations in PI3K catalytic subunit or loss of PTEN (an oncogene that down-regulate the PI3K/Akt pathway in normal condition) (Cheng et al., 2009). The Cancer Genome Atlas (TCGA) provides a network view of the pathways altered in GBM tumours. TCGA pinpoints deregulation of RTK/PI3K pathways in most of these tumours. In human glioblastoma, TCGA reports that EGFR is the RTK the most frequently mutated and/or amplified (TCGA, 2008). For these reasons, one possibility is that the selective uptake of NFL-TBS.40-63 peptide in glioblastoma cells is related to the over-activation of EGFR and deregulation of signalling molecules involved in the endocytic mechanism. Eierhoff et al. (2010) demonstrated that variation of expression or activity of RTKs, especially EGFR, altered the uptake of influenza A viruses (IAV) into cells. Recent studies showed that less than 10% of NFL-TBS.40-63 peptide can penetrate the human prostate carcinoma cells (LNCaP) that expressed low levels of EGFR (Berges et al., 2012a; Bonaccorsi et al., 2007). Finally, our data suggest that the abnormally high proliferative activity and EGFR up-activation in glioblastoma cells promote NFL-TBS.40-63 peptide uptake, while a small amount of peptide is internalized in lower proliferative cells, like human astrocytes. These results indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide selectivity and specific effect on glioma cells (Berges et al., 2012a) could offer new therapeutic strategies of targeted delivery, improving efficacy and reducing side effects.

## Acknowledgements

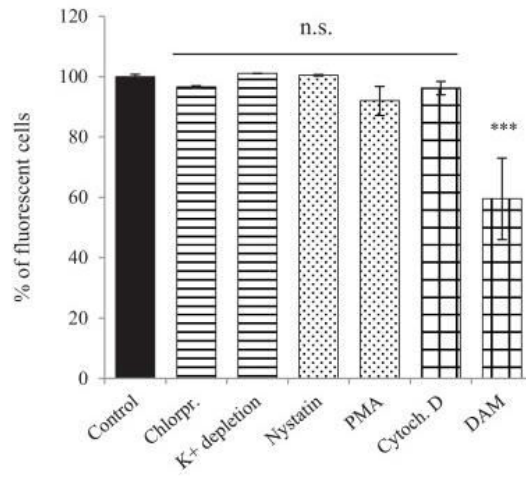
This work was supported by grants from ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), AFM (Association Française contre les Myopathies), and La Région des Pays de la Loire (CIMATH programme) to J. Eyer. C. Lépinoux-Chambaud was supported by a fellowship from le Ministère de la Recherche et des Technologies. We thank Emilie Lauret for her help with confocal microscopy, and Catherine Guillet (SCCAN platform) for her help with FACS measures.

## References

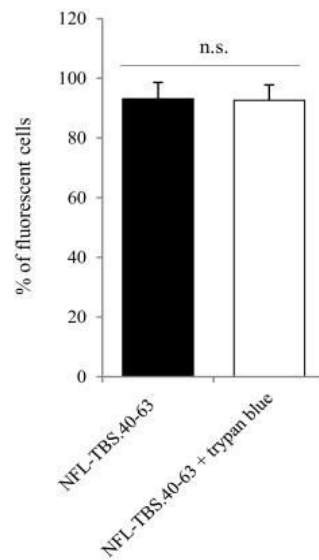
- Alves, I.D., Jiao, C.Y., Aubry, S., Aussedat, B., Burlina, F., Chassaing, G., Sagan, S., 2010. Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 2231–2239.
- Amand, H.L., Bostrom, C.L., Lincoln, P., Norden, B., Esbjorner, E.K., 2011. Binding of cell-penetrating penetratin peptides to plasma membrane vesicles correlates directly with cellular uptake. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1860–1867.
- Anderson, H.A., Chen, Y., Norkin, L.C., 1996. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell* 7, 1825–1834.
- Balzeau, J., Peterson, A., Eyer, J., 2012. The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells. *Int. J. Pharm.* 423, 77–83.
- Balzeau, J., Pinier, M., Berges, R., Saulnier, P., Benoit, J.-P., Eyer, J., 2013. The NFL-TBS.40-63 peptide improves the in vitro and in vivo targeted uptake of lipid nanocapsules by glioblastoma cells. *Biomaterials* 34, 3381–3389.
- Bauer, B., Davidson, M., Orwar, O., 2009. Proteomic analysis of plasma membrane vesicles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 1656–1659.
- Berges, R., Balzeau, J., Peterson, A.C., Eyer, J., 2012a. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol. Ther.* 20, 1367–1377.
- Berges, R., Balzeau, J., Takahashi, M., Prevost, C., Eyer, J., 2012b. Structure–function analysis of the glioma targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light neurofilament subunit. *PLoS ONE* 7, e49436.
- Bocquet, A., Berges, R., Frank, R., Robert, P., Peterson, A.C., Eyer, J., 2009. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J. Neurosci.* 29, 11043–11054.
- Bonaccorsi, L., Nosi, D., Muratori, M., Formigli, L., Forti, G., Baldi, E., 2007. Altered endocytosis of epidermal growth factor receptor in androgen receptor positive prostate cancer cell lines. *J. Mol. Endocrinol.* 38, 51–66.
- Cheng, C.K., Fan, Q.W., Weiss, W.A., 2009. PI3K signalling in glioma – animal models and therapeutic challenges. *Brain Pathol.* 19, 112–120.
- Czech, M.P., 2000. PIP<sub>2</sub> and PIP<sub>3</sub>: complex roles at the cell surface. *Cell* 100, 603–606.
- Dijkgraaf, I., Yim, C.B., Franssen, G.M., Schuit, R.C., Luurtsema, G., Liu, S., Oyen, W.J., Boerman, O.C., 2011. PET imaging of alphavbeta(3) integrin expression in tumours with (6)(8)Ga-labelled mono-, di- and tetrameric RGD peptides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 38, 128–137.
- Dimitropoulos, K., Giannopoulou, E., Argryriou, A.A., Zolota, V., Petsas, T., Tsiata, E., Kalofonos, H.P., 2010. The effects of anti-VEGFR and anti-EGFR agents on glioma cell migration through implication of growth factors with integrins. *Anticancer Res.* 30, 4987–4992.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 857–902.
- Duchardt, F., Fotin-Mlecsek, M., Schwarz, H., Fischer, R., Brock, R., 2007. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 8, 848–866.
- Eierhoff, T., Hrinicus, E.R., Rescher, U., Ludwig, S., Ehrhardt, C., 2010. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog.* 6, e1001099.
- Fan, Q.W., Weiss, W.A., 2010. Targeting the RTK-PI3K-mTOR axis in malignant glioma: overcoming resistance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 347, 279–296.
- Fawzi, A., Robinet, A., Monboisse, J.C., Ziaie, Z., Kefalides, N.A., Bellon, G., 2000. A peptide of the alpha 3(IV) chain of type IV collagen modulates stimulated neutrophil function via activation of cAMP-dependent protein kinase and Ser/Thr protein phosphatase. *Cell Signal.* 12, 327–335.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., 2001. Arginine-rich peptides: an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276, 5836–5840.
- Gladson, C.L., Cheresch, D.A., 1991. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J. Clin. Invest.* 88, 1924–1932.
- Jiao, C.Y., Delaroché, D., Burlina, F., Alves, I.D., Chassaing, G., Sagan, S., 2009. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem.* 284, 33957–33965.
- Gump, J.M., June, R.K., Dowdy, S.F., 2010. Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *J. Biol. Chem.* 285, 1500–1507.
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C.C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K.M., Grinstein, S., 2010. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signalling. *J. Cell Biol.* 188, 547–563.
- Larkin, J.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., 1983. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33, 273–285.
- Le Roy, C., Wrana, J.L., 2005. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 112–126.
- Letoha, T., Keller-Pinter, A., Kusz, E., Kolozsi, C., Bozso, Z., Toth, G., Vizler, C., Olah, Z., Szilak, L., 2010. Cell-penetrating peptide exploited syndecans. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 2258–2265.
- Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., Langel, U., 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 99–103.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., Graslund, A., 2011. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* 2011, 414729.
- Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., Boisguerin, P., 2008. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug. Chem.* 19, 2363–2374.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones, A.T., Sugiura, Y., Futaki, S., 2004. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* 10, 1011–1022.
- Nascimento, F.D., Hayashi, M.A., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E.B., Radis-Baptista, G., Nader, H.B., Yamane, T., Tersariol, L.L., Kerkis, I., 2007. Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 282, 21349–21360.
- Nikiforova, M.N., Hamilton, R.L., 2011. Molecular diagnostics of gliomas. *Arch. Pathol. Lab Med.* 135, 558–568.
- Radis-Baptista, G., de la Torre, B.G., Andreu, D., 2012. Insights into the uptake mechanism of NrTP, a cell-penetrating peptide preferentially targeting the nucleolus of tumour cells. *Chem. Biol. Drug Des.* 79, 907–915.
- Raiborg, C., Schink, K.O., Stenmark, H., 2013. Class III phosphatidylinositol 3-kinase and its catalytic product PtdIns3P in regulation of endocytic membrane traffic. *FEBS J.* <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12116>.

- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L.V., 2005. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 15300–15306.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., Lebleu, B., 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585–590.
- Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., Sandvig, K., 1999. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol. Biol. Cell* 10, 961–974.
- Saalik, P., Niinep, A., Pae, J., Hansen, M., Lubenets, D., Langel, U., Pooga, M., 2011. Penetration without cells: membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles. *J. Control. Release* 153, 117–125.
- Safaiyan, F., Kolset, S.O., Prydz, K., Gottfridsson, E., Lindahl, U., Salmivirta, M., 1999. Selective effects of sodium chlorate treatment on the sulfation of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 274, 36267–36273.
- Sallinen, S.L., Sallinen, P.K., Haapasalo, H.K., Helin, H.J., Helen, P.T., Schraml, P., Kallioniemi, O.P., Kononen, J., 2000. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res.* 60, 6617–6622.
- Schelhaas, M., Shah, B., Holzer, M., Blattmann, P., Kuhling, L., Day, P.M., Schiller, J.T., Helenius, A., 2012. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog.* 8, e1002657.
- Seger, R., Krebs, E.G., 1995. The MAPK signalling cascade. *FASEB J.* 9, 726–735.
- Shi, J., Zhou, Y., Chakraborty, S., Kim, Y.S., Jia, B., Wang, F., Liu, S., 2011. Evaluation of in-labelled cyclic RGD peptides: effects of peptide and linker multiplicity on their tumour uptake, excretion kinetics and metabolic stability. *Theranostics* 1, 322–340.
- Steck, P.A., Moser, R.P., Bruner, J.M., Liang, L., Freidman, A.N., Hwang, T.L., Yung, W.K., 1989. Altered expression and distribution of heparan sulfate proteoglycans in human gliomas. *Cancer Res.* 49, 2096–2103.
- 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., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.O., 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.
- Subrizi, A., Tuominen, E., Bunker, A., Rog, T., Antopolosky, M., Urtti, A., 2011. Tat(48–60) peptide amino acid sequence is not unique in its cell penetrating properties and cell-surface glycosaminoglycans inhibit its cellular uptake. *J. Control. Release* 158, 277–285.
- Thevenard, J., Floquet, N., Ramont, L., Prost, E., Nuzillard, J.M., Dauchez, M., Yezid, H., Alix, A.J., Maquart, F.X., Monboisse, J.C., Brassart-Pasco, S., 2006. Structural and antitumour properties of the YSNSG cyclopeptide derived from tumstatin. *Chem. Biol.* 13, 1307–1315.
- The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.
- Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B., 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010–16017.
- Wadia, J.S., Stan, R.V., Dowdy, S.F., 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* 10, 310–315.
- Yukawa, H., Noguchi, H., Nakase, I., Miyamoto, Y., Oishi, K., Hamajima, N., Futaki, S., Hayashi, S., 2010. Transduction of cell-penetrating peptides into induced pluripotent stem cells. *Cell Trans.* 19, 901–909.

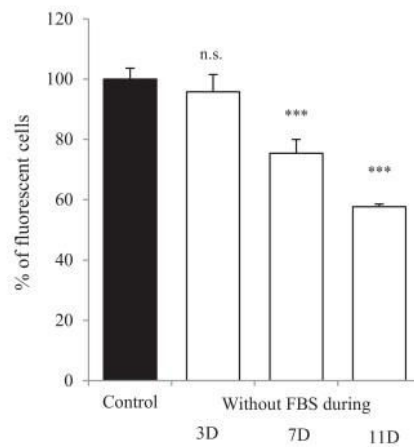
### Supplementary figure S1



### Supplementary figure S2



### Supplementary figure S3



**Supplementary Fig. S1.**

The Tat.48-60 peptide internalization in U87MG cells. Cells were pre-treated with 50 µmol/L CHLORPROMAZINE (chlorpr.), 25 µg/mL nystatin, 10 µg/mL PMA, 4 µmol/L cytochalasin D (cytoch. D) and 1 mmol/L DAM, during 30 min. Then they were incubated with 20 µmol/L FITC labelled Tat.48-60 peptide during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined comparatively with untreated sample (control). n.s.: not significant, \*\*\* $P < 0.001$ .

**Supplementary Fig. S2.**

The quenching of extracellular signal of NFL-TBS.40-63 peptide. U87-MG cells were treated with 20 µmol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide during 30 min. Before FACS analysis 0.4% trypan blue was added to quench the extracellular fluorescence. Then the percentage of fluorescent positive cells was determined by FACS analysis. n.s.: not significant.

**Supplementary Fig. S3.**

The uptake of NFL-TBS.40-63 peptide is efficient in high proliferative cells. U87-MG cells were cultured in serum-free medium during 3, 7 or 11 days (without FBS 3D, 7D or 11D). Then 20 µmol/L FITC labelled NFL-TBS.40-63 peptide were added to the U87-MG cells during 30 min. Cellular uptake was assessed by FACS analysis and the percentage of fluorescent cells was determined comparatively with untreated sample (control). n.s.: not significant. \*\*\* $P < 0.001$ .

## 2<sup>ème</sup> article scientifique

The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide disrupts microtubule and mitochondrial networks in the T98G glioma cell line.

Rivalin R., Lépinoux-Chambaud C., Eyer J., Savagner F. *PLoS One*. 2014 Jun 4;9(6):e98473. doi: 10.1371/journal.pone.0098473. eCollection 2014.

De récentes études ont montré le potentiel thérapeutique du peptide NFL-TBS.40-63 pour le traitement du glioblastome, le cancer le plus agressif et le plus fréquent du système nerveux central. Ce peptide a en effet révélé des propriétés anti-tumorales spécifiques, *in vitro* et *in vivo*, sur des cellules de glioblastome, alors qu'il n'a pas d'effet cytotoxique détectable sur des cellules saines (Bergès et al., 2012a).

Ce peptide est issu de la sous-unité légère des neurofilaments (NFL) et correspond à un des sites de fixation de la tubuline libre sur NFL. Des travaux ont en effet montré que les filaments intermédiaires, et notamment les neurofilaments, peuvent interagir avec la tubuline libre pour réguler la dynamique des MT (Bocquet et al., 2009). La sous-unité NFL est également capable d'interagir avec des molécules responsables de la dynamique mitochondriale (Gentil et al., 2012), et il a été montré que la tubuline régule le métabolisme mitochondrial en modulant le potentiel de membrane des mitochondries (Katsetos et al., 2013).

Le but de ces travaux a été d'étudier les effets possibles du peptide NFL-TBS.40-63 sur la dynamique et la biogenèse mitochondriales des cellules de glioblastome humain T98G. Les travaux ont porté sur l'analyse des principales fonctions et des acteurs majeurs de la dynamique mitochondriale, tels que la phosphorylation oxydative, la balance fission-fusion, et les gènes et protéines de régulation transcriptionnelle.

Les travaux précédents avaient montré la destruction du réseau de MT de cellules de glioblastome humain T98G après 6 h de traitement avec 10  $\mu\text{mol/L}$  de peptide (Bocquet et al., 2009). Des analyses de la respiration mitochondriale ont donc été réalisées en mesurant la consommation d'oxygène par une technique d'oxymétrie, sur les cellules T98G et NIH3T3. Ces résultats montrent que pour des faibles concentrations (2 et 5  $\mu\text{mol/L}$ ), le peptide altère la

respiration résiduelle ou passive (**Fig.1A**). Cependant, à 10  $\mu\text{mol/L}$  le peptide réduit de façon significative la respiration mitochondriale globale des cellules T98G (à la fois la forme résiduelle ou passive, et la forme majoritaire qui dépend de la phosphorylation oxydative et de la pompe ATPase), et il détruit le réseau de MT (**Fig.1A**) (Bocquet et al., 2009). En revanche, le peptide ne révèle aucun effet mesurable sur la respiration mitochondriale globale des cellules NIH3T3, ni sur leur réseau de MT (**Fig. 1A**) (Bergès et al., 2012a).

La réduction de la respiration mitochondriale des cellules T98G traitées avec 10  $\mu\text{mol/L}$  de peptide est associée à une diminution de l'expression de protéines constituant les complexes de la chaîne respiratoire des mitochondries. L'expression de la sous-unité B du complexe II succinate déshydrogénase (SDHB) est réduite de 30 %, et celle du cytochrome c oxydase 4 (COX4) du complexe IV est réduite de 20 %, dans les cellules T98G, alors que l'expression de ces protéines reste inchangée dans les cellules NIH3T3 traitées avec le peptide (**Fig. 1B**).

Considérant les effets du peptide sur l'expression de protéines impliquées dans la respiration mitochondriale, des travaux ont été menés pour étudier l'impact du peptide sur l'expression de gènes et protéines contrôlant la biogenèse et la fonction des mitochondries. Les résultats, obtenus par analyse PCR quantitative et Western Blot, montrent que le peptide altère l'expression du facteur de transcription NRF-1 (« nuclear respiratory factor-1 ») et du gène qu'il cible, codant pour un composant de la chaîne respiratoire, le CYCS (« cytochrome c somatic ») (**Fig. 2**). Le peptide influe donc sur la régulation transcriptionnelle de la biogenèse des mitochondries.

De la même façon que le peptide perturbe le réseau de MT dans les cellules T98G, il est également associé à une réduction de la densité des mitochondries (**Fig. 3A-B et Supplementary fig. S1**) et à une diminution de la motilité mitochondriale (**Supplementary fig. S2**). Ces résultats d'imagerie confocale confirment aussi que le peptide à 10  $\mu\text{mol/L}$  limite la formation des filopodes (**Fig. 3C et Supplementary fig. S1**) et la migration des cellules (**Supplementary fig. S3**), conformément aux précédents résultats qui avaient montré une réduction de la migration des cellules T98G en présence de faibles concentrations de peptide (Bergès et al., 2012a). En plus de co-localiser avec le réseau de MT, le peptide co-localise avec certaines mitochondries, indépendamment des MT, et semble ainsi capable de modifier l'architecture du réseau mitochondrial, contrairement à des cellules non traitées (**Fig. 4 et Supplementary fig. S4**).



Par la suite, il a été intéressant d'analyser l'effet du peptide sur la balance fission-fusion, qui joue un rôle important dans la dynamique et la morphologie des mitochondries, et qui modifie ainsi les propriétés bioénergétiques et la distribution des mitochondries (Caglinec et al., 2013). L'expression génique de deux acteurs principaux de cette balance fission-fusion a été quantifiée : le gène *MFN2* (codant pour la protéine mytofusine 2) qui est responsable de la multiplication mitochondriale, et le gène *FIS1* (codant pour la protéine « mitochondrial fission 1 ») qui est impliqué dans le phénomène de fission. Il apparaît qu'en présence du peptide, l'expression de ces deux gènes est significativement diminuée, suggérant une dérégulation des phénomènes de fission-fusion (**Fig.5A**).

Enfin, il a été montré l'importance de l'expression de certains miRNA dans la progression tumorale, dans la résistance aux traitements et dans la fonction mitochondriale (Barrey et al., 2011 ; Tomasetti et al., 2014). Parmi les miRNA analysés, seule l'expression de miR-96, miR-218, miR-21 et miR-221 a été réduite dans les cellules T98G traitées 6 h avec 10 µmol/L de peptide (**Fig. 5B**). Alors que la surexpression dans les gliomes de miR-96, miR21 et miR-221 est associée à la progression tumorale, la sous-expression de miR-218 favorise la migration tumorale (Karsy et al., 2012 ; Yan et al., 2014). L'effet du peptide sur l'expression de miR-21 et miR-221 a été vérifié en mesurant l'expression de leurs gènes cibles (*PTEN* et *NAIP*). En effet, dans les cancers, miR-21 inhibe l'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN*, et miR-221 est associée à une réduction de l'expression du gène *NAIP* (qui code pour une protéine inhibitrice de l'apoptose) (Karsy et al., 2012 ; Zhang et al., 2010 ; Lukiw et al., 2009). L'effet du peptide sur l'expression de miR-21 et miR-221 a été confirmé en observant une augmentation de l'expression de *PTEN* et *NAIP* dans les cellules T98G traitées 6 h avec 10 µmol/L de peptide (**Fig. 5C**).

L'ensemble de cette étude montre que le peptide est capable, non seulement de perturber le réseau de MT, comme il a déjà été démontré dans des études précédentes (Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a), mais aussi d'altérer la biogenèse et la fonction des mitochondries des cellules de glioblastome humain. Il est à noter que ces effets s'effectuent à des doses inférieures à celles provoquant une mort massive des cellules de glioblastome.

Le peptide engendre également une réduction directe de la respiration mitochondriale et une diminution de l'expression de protéines constituant la chaîne respiratoire des

mitochondries. En perturbant la distribution mitochondriale et le processus de phosphorylation oxydative, le peptide altère aussi le phénomène de fission-fusion.

L'ensemble de ces perturbations induites par le peptide s'explique également par une altération de la régulation transcriptionnelle des mitochondries, comme le facteur de transcription NRF-1 et des miRNA associés au développement des glioblastomes.

Une hypothèse serait que le peptide se fixe sur un site crucial et indispensable pour l'interaction des mitochondries avec les MT.



# The NFL-TBS.40-63 Anti-Glioblastoma Peptide Disrupts Microtubule and Mitochondrial Networks in the T98G Glioma Cell Line

Romain Rivalin<sup>1,2,3</sup>, Claire Lepinoux-Chambaud<sup>1,2,3</sup>, Joël Eyer<sup>1,2</sup>, Frédérique Savagner<sup>1,2,3\*</sup>

**1** Université d'Angers, Angers, France, **2** Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, LNBT, UPRES EA-3143, Université d'Angers, Bâtiment IBS-IRIS, Angers, France, **3** CHU Angers, Laboratoire de Biochimie, Angers, France

## Abstract

Despite aggressive therapies, including combinations of surgery, radiotherapy and chemotherapy, glioblastoma remains a highly aggressive brain cancer with the worst prognosis of any central nervous system disease. We have previously identified a neurofilament-derived cell-penetrating peptide, NFL-TBS.40-63, that specifically enters by endocytosis in glioblastoma cells, where it induces microtubule destruction and inhibits cell proliferation. Here, we explore the impact of NFL-TBS.40-63 peptide on the mitochondrial network and its functions by using global cell respiration, quantitative PCR analysis of the main actors directing mitochondrial biogenesis, western blot analysis of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) subunits and confocal microscopy. We show that the internalized peptide disturbs mitochondrial and microtubule networks, interferes with mitochondrial dynamics and induces a rapid depletion of global cell respiration. This effect may be related to reduced expression of the NRF-1 transcription factor and of specific miRNAs, which may impact mitochondrial biogenesis, in regard to default mitochondrial mobility.

**Citation:** Rivalin R, Lepinoux-Chambaud C, Eyer J, Savagner F (2014) The NFL-TBS.40-63 Anti-Glioblastoma Peptide Disrupts Microtubule and Mitochondrial Networks in the T98G Glioma Cell Line. PLoS ONE 9(6): e98473. doi:10.1371/journal.pone.0098473

**Editor:** Peter Canoll, Columbia University, United States of America

**Received:** December 5, 2013; **Accepted:** May 2, 2014; **Published:** June 4, 2014

**Copyright:** © 2014 Rivalin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from CIMATH-2 (ciblage moléculaire et applications thérapeutiques) Region Pays de la Loire, Ligue Contre le Cancer and L'INSERM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: frederique.savagner@univ-angers.fr

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Glioblastoma is a highly aggressive brain cancer that has been designated as grade IV, according to the World Health Organization [1]. It represents an extremely invasive form of glioma and has the worst prognosis of any central nervous system disease. Despite aggressive therapies that include combinations of surgery, radiotherapy and chemotherapy, the median post-diagnostic survival period is approximately one year [2]. Many aspects of glioblastoma contribute to its poor prognosis, including the invasive nature of these abnormal cells [3] and the extreme heterogeneity of this cancer [4]. The lack of specificity for the current treatments and their side effects imply the need to develop new therapeutic strategies that target tumor cells [5].

Microtubule-targeting agents (MTAs) represent an important class of drugs used in the treatment of cancers. Microtubules are ubiquitous cellular polymers composed of heterodimers of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin subunits [6]. They play major roles in several cellular functions, including intracellular transport, maintenance of cell architecture, cell signaling and mitosis. MTAs exert their anti-tumoral activity by altering microtubule polymerization and dynamics, which causes growth arrest in mitosis and subsequent cell death by apoptosis [7]. Proteins that compose the intermediate filaments are able to bind free unpolymerized tubulin onto specific sites named tubulin-binding sites (TBS) and thus can affect microtubule polymerization *in vitro* and *in vivo* [8]. A peptide

derived from the light neurofilament subunit (NFL) that corresponds to the sequence of TBS (NFL-TBS.40-63) can enter specifically into glioblastoma cells by endocytosis [9], where it disrupts the microtubule network and induces cell death by apoptosis [10].

Recent studies have confirmed that interactions between intermediate filaments, notably NFL or Vimentin, and key molecules responsible for the plasticity of the mitochondrial network, including Mitofusin-1 and -2 (MFN1 and 2, respectively) or Dynamin, are necessary to maintain organelle integrity and to allow mitochondrial motility [11–13]. The fission process ensures mitochondrial structural quality by removing damaged mitochondria through mitophagy and facilitating apoptosis in conditions of cellular stress [14,15]. The fusion process could be divided into transient and complete fusion [16]. Contrary to complete fusion, the transient process is essential for promoting mitochondrial metabolism and motility by interplaying with the cytoskeletal anchorage.

A close relationship has been demonstrated between the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process and mitochondrial network organization, which is controlled by the balance between fusion and fission events [17]. The failure of mitochondrial fusion–fission dynamics has been involved in the pathogenesis of several neurodegenerative diseases and cancers [18,19]. Mitochondrial biogenesis is dependant of transcription factors such as nuclear respiratory factors and estrogen-related receptors that coordinate

the synthesis of OXPHOS complex subunits encoded by the nuclear and mitochondrial genomes. The transcriptional efficiency of these factors is controlled by coactivators from the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 (PGC-1) family, i.e., PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  and the PGC-1-related coactivator (PRC), that integrates mitochondrial biogenesis and function to various environmental signals [20]. We previously showed that the ubiquitous PRC member was able to control mitochondrial fission by modulating the Fission-1 (FIS1) expression level in cancer cells, in addition to its effect on mitochondrial biogenesis [21].

Numerous studies have highlighted selected miRNAs related to glioma pathogenesis [22]. Some of them have potential applications as novel diagnostic and prognostic indicators. Thus, the re-expression of miR-34a encoded at Chr1p36.22, a region deleted in many glioblastomas, could be associated with reduced tumor proliferation, cell migration and invasion [23]. Conversely, miR-21 has been identified as an anti-apoptotic factor and presents a significant up-regulation in glioblastoma, while its inhibition induced apoptosis in glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo* [24,25]. This miRNA is involved in the down regulation of the tumor suppressor gene PTEN, in caspase 3/7 activation and confers a drug resistance to cancer cells [26]. Moreover, an over-expression of miR-221 has been linked with increased cellular proliferation and an over-expression of the *c-KIT* gene [27,28]. These miRNAs have also recently been related to a pool of miRNAs called mitomiRs, which are associated with the mitochondrial compartment [29]. Their role in the control of mitochondrial functions and cell redox status is now established [30,31].

In this study, we focused on the role for MTAs in the OXPHOS process and the dynamics of mitochondrial networks. For this purpose, we used the T98G cellular model of human glioblastoma, in which we have previously demonstrated the incorporation and cytoskeleton effect for 10  $\mu$ M NFL-TBS.40-63 peptide [8–10,32].

## Materials and Methods

### Cell lines and peptide design

Human T98G glioblastoma cells and mouse NIH-3T3 embryonic fibroblast cells were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). They were grown in T75 flasks at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's modified Eagle's medium with 1 g/l glucose, which was supplemented with 5% L-glutamine, 10% fetal calf serum (both from Lonza, Walkersville, MD, USA) and 5% (penicillin/streptomycin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). A biotinylated peptide corresponding to NFL (NFL-TBS.40-63: YSSY-SAPVSSSLVRRSYSSSSGS) and a similarly labeled scrambled peptide (NFL-SCR: SLGSPSSSVRASYSSRSYVYSSS) were synthesized (with more than 95% purity) by MilleGen (Toulouse, France) and dissolved in water at 1 mM concentration. They were used at final concentrations of 2, 5 and 10  $\mu$ M for 6 h at 37 °C to evaluate their cellular effects.

### Quantitative mRNA and miRNA analyses

T98G cells were tested for peptide effects on independent triplicate cell cultures. Cells were harvested following a trypsin-EDTA 1 $\times$  (Sigma) treatment for 5–10 min and centrifugation. Total RNA was extracted from cells pellets using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed on 1  $\mu$ g of total RNA with the Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. Real-time quantification was performed on a 96-well plate using the Power SYBR® Green Master mix and the ABI 7900 apparatus (Applied Biosystems by

Life technologies, Grand Island, NY, USA). Ten genes were tested for quantitative expression: MFN2 and FIS1 for the mitochondrial fusion and fission process, PRC/PPrC1, PGC-1 $\alpha$ /PPARGCA1, NRF-1, CYCS (Cytochrome c) and TFAM (Mitochondrial transcription factor A) for mitochondrial biogenesis and its functions, PTEN, NAIP and FGFR3 as genes directly targeted by miR-21, 221 and 100, respectively [33,34]. The data were normalized to  $\beta$ -globin, and the relative expression level of specific mRNA was calculated with the usual 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$  method. The sequences of primers used in this study are referenced in Table 1.

For miRNA analyses, cDNA was first produced using the VILO miRNA cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Using Express SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen), real-time PCR was carried out on a ABI 7900 apparatus (Applied Biosystems by Life technologies) using a universal primer and forward primers specific to each miRNA, according to the NCode miRNA Database (Table 1). For each sample, three independent reverse transcription reactions were performed, and each reaction was assayed in duplicate by real-time PCR. miRNA levels were normalized to U5 snRNA, a snoRNA (small nucleolar RNA), which has been established as the most stably expressed reference gene [35].

### Western blot analyses

T98G and NIH-3T3 cells were incubated with 10  $\mu$ M of NFL-TBS.40-63 or NFL-SCR. After 6 hours of treatment, the cells were rinsed in phosphate-buffered saline 1X (PBS 1X; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), trypsinized and collected in centrifuge tubes. The cells were lysed and the protein concentrations were measured using a protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 20  $\mu$ g of the proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to poly (vinylidene difluoride) membranes (Hybond-P, Amersham, Buckinghamshire, UK) and incubated either with dilutions of the following monoclonal antibodies: 1/10000 anti- $\alpha$ -tubulin (Abcam, Cambridge, UK), 1/2000 anti-complex-IV, subunit IV (COX4, MS408, Mitosciences, Eugene, OR, USA) and 1/2000 anti-complex-II, subunit Ip (SDHB, MS203, Mitosciences), or with dilutions of the following polyclonal antibodies (All from Abcam): 1/1000 anti  $\beta$ -actin (Ab-8229), 1/5000 anti NRF-1 (Ab-86516) and 1/2000 anti-PGC-1 $\alpha$  (Ab-54481). After several washes in TBS-Tween (with 0.1% Tween-20), the membranes were incubated with an appropriate chemiluminescent-labeled, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA, USA). The blots were developed using the enhanced chemiluminescence method (ECLplus, Amersham). Signal quantification was performed via non-saturating picture scanning using a Gel Doc 1000 Molecular Analyst apparatus (Biorad, Hercules, CA, USA).

### Mitochondrial oxygen consumption analyses

NIH-3T3 and T98G cells were seeded in Seahorse XF-24 plates (from Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). The cells were tested with 2, 5, or 10  $\mu$ M of NFL-TBS and compared to 10  $\mu$ M NFL-SCR. After 6 h of treatment, the cells were changed to an unbuffered DMEM (DMEM base medium supplemented with 17.5 mM glucose, 1 mM sodium pyruvate, 31 mM NaCl and 2 mM Glutamine, pH 7.4) and incubated at 37 °C in a non-CO<sub>2</sub> incubator for 1 h. Three baseline measurements of oxygen consumption rate were collected on the XF 24 Seahorse apparatus using the XF cell Mito Stress kit (#101706 from Seahorse Bioscience). After the Seahorse analysis, the cells were lysed, and the protein concentration was measured using a protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The oxygen consump-

**Table 1.** Primers used for mRNA and miRNA quantification.

PRC/PPRC1	For: 5'-CACTGGTTGACCCCTGTTCT-3' Rev: 5'-GTGTTTCAGGGCTTCTCTGC-3'	miR-125a-3p	5'-GGTGAGGTTCTGGGAGCC-3'
CYCS	For: 5'-CCAGTGCCACACCGTTGAA-3' Rev: 5'-TCCCAGATGATGCCTTTGTT-3'	miR-181b	5'-ATTCATTGTTGTGCGTGGGT-3'
PGC1 $\alpha$ /PPARGCA1	For: 5'-ACTCAAGTGGTGACGTGACC-3' Rev: 5'-CTGGGTAAGTGGTGCAGTACC-3'	miR-107	5'-GTCGTGAGCAGCATTGTACAG-3'
NRF-1	For: 5'-GGAGTGATGTCGCGACAGAA-3' Rev: 5'-CGCTGTTAAGCGCCATAGTG-3'	miR-30a	5'-TGAAACATCCTCGACTGGAAG-3'
TFAM	For: 5'-CCGAGGTGGTTTTCATCTGT-3' Rev: 5'-CAGGAAGTCCCTCCAACGC-3'	miR-146b	5'-TGAGAAGTGAATCCATAGGCT-3'
FIS1	For: 5'-GGAGGAACAGCGGATTACGT-3' Rev: 5'-CTTCATGGCCTTGTAATGAGC-3'	miR-96	5'-TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT-3'
MFN2	For: 5'-GAAGAACAGGTTCTGGAGCTC-3' Rev: 5'-CCTCATGGCCATCTGTGCC-3'	miR-221	5'-ACCTGGCATAAATGTAGATT-3'
PTEN	For: 5'-CGGCAGCATCAAATGTTTCAG-3' Rev: 5'-AACTGGCAGGTAGAAGCAAC-3'	miR-885	5'-AGGCAGCGGGGTAGTGGATA-3'
NAIP	For: 5'-TAGACTTGCGTCTTCAGGAA-3' Rev: 5'-CTGCAACTCCCACAGCTGATT-3'	miR-218	5'-CGTGTGCTTATCTAACCATGT-3'
FGFR3	For: 5'-ACCTTCAAGCAGCTGGTGA-3' Rev: 5'-CTAGGGACCCCTCACATTGT-3'	miR-100	5'-GCCCAAGCTTGTATCTATAGGTAT-3'
$\beta$ -Globin	For: 5'-CAACTTCATCCAGTTCACC-3' Rev: 5'-ACACAAGTGTTCCTACTAG-3'	miR-31	5'-AGGCAAGATGCTGGCATAGCT-3'
U5snRNA	5'-AAATTGGAACGATACAGAGAAG-3'	miR-21	5'-CGGTAGCTTATCAGACTGATGTTG-3'

doi:10.1371/journal.pone.0098473.t001

tion of each well was normalized according to the total protein amount (pmol/min/ $\mu$ g).

### Confocal microscopy

To study the molecular impact of the NFL-TBS.40-63 peptide on T98G cells, we first used mitochondria (Mitotracker Red CMX ROS) and microtubule markers (Alexa647-labeled anti-tubulin antibody, both from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) on fixed cells. The cells were seeded in 24 well plates (2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well) containing coverslips. After 48 h, the cells were incubated in 10  $\mu$ M biotinylated peptides (NFL-TBS.40-63 or NFL-SCR) for 6 h at 37°C. After washing with the media, the cells were incubated for 15 min at 37 °C with 100 nM mitotracker Red CMX ROS diluted in the media. After washing with PBS, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. Following three washes in PBS, the cells were incubated for 10 min in a permeabilization solution (Pipes 0.1 M, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.1 M, 4% PEG 8000, 0.5% triton X-100, in PBS, pH 7.4). They were washed three times in PBS before incubation in a blocking solution (5% bovine serum albumin) for 15 min. Permeabilized cells were incubated overnight with a mouse anti- $\alpha$  tubulin antibody (Sigma) at 1/500. Then, tubulin and biotinylated peptides were localized using Alexa 647 nm anti-mouse antibody and streptavidin Alexa 488 nm (Life Technologies) respectively, at 1/200 for 1 h. After washing by PBS, cell nuclei were stained by 3  $\mu$ M 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) for 5 min. Finally, coverslips were mounted with an anti-fading mounting medium (Prolong, Life Technologies) and observed with a confocal Nikon A1RSI instrument. The images were analyzed using Nikon NIS-element software.

To study dynamics of the mitochondrial network, we have realized live cell imaging after 15 hours of cell treatment by 10  $\mu$ M FITC-NFL-TBS.40-63 or FITC-scrambled peptide in Labtek four-chambered coverglasses (Nalge Nunc International), followed

by 10  $\mu$ M mitotracker Red CMX Ros treatment during 15 minutes. After washing in PBS, cells were rapidly placed in culture media according to recommended protocol [36]. Mitochondrial imaging was acquired within 3 minutes with 5 seconds intervals using confocal Nikon A1RSI instrument. Minimum laser power was used to minimize photo bleaching. Image analysis was done using the tracking suite of Metamorph software application module (Molecular Devices, Sunnyside, CA, USA).

To determine the migration ability of T98G cells treated by NFL-TBS 40-63 peptide or scramble, we have used a transwell migration assay as previously described [10].

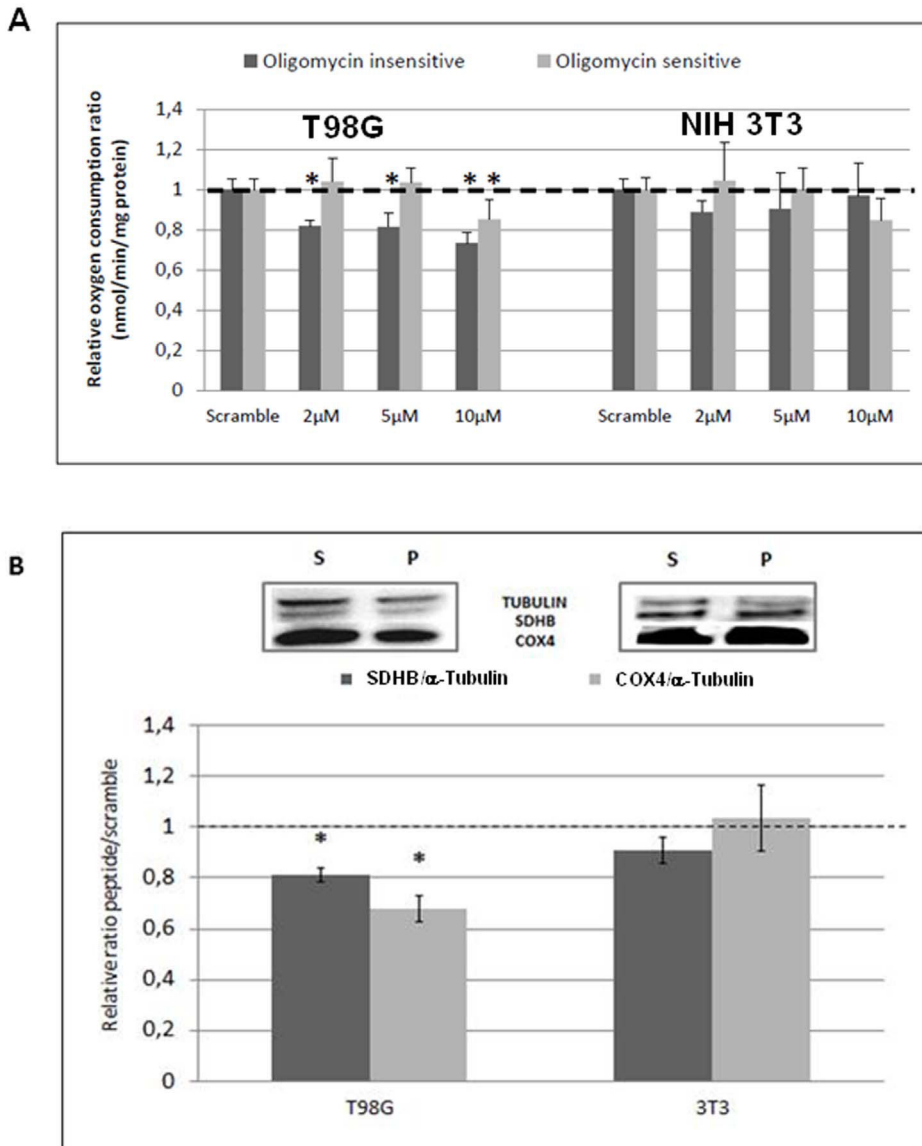
### Statistical analyses

All experiments were repeated at least three times. The data are represented as mean values  $\pm$  standard deviation (SD), with N representing the number of experiments. The statistical significance of the variations observed was assessed using the Mann-Whitney test. The differences were considered significant at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using Prism3.00 (GraphPad software, San Diego, CA).

## Results

### The NFL-TBS.40-63 peptide regulates the number of mitochondria and their function in human glioblastoma T98G cell line

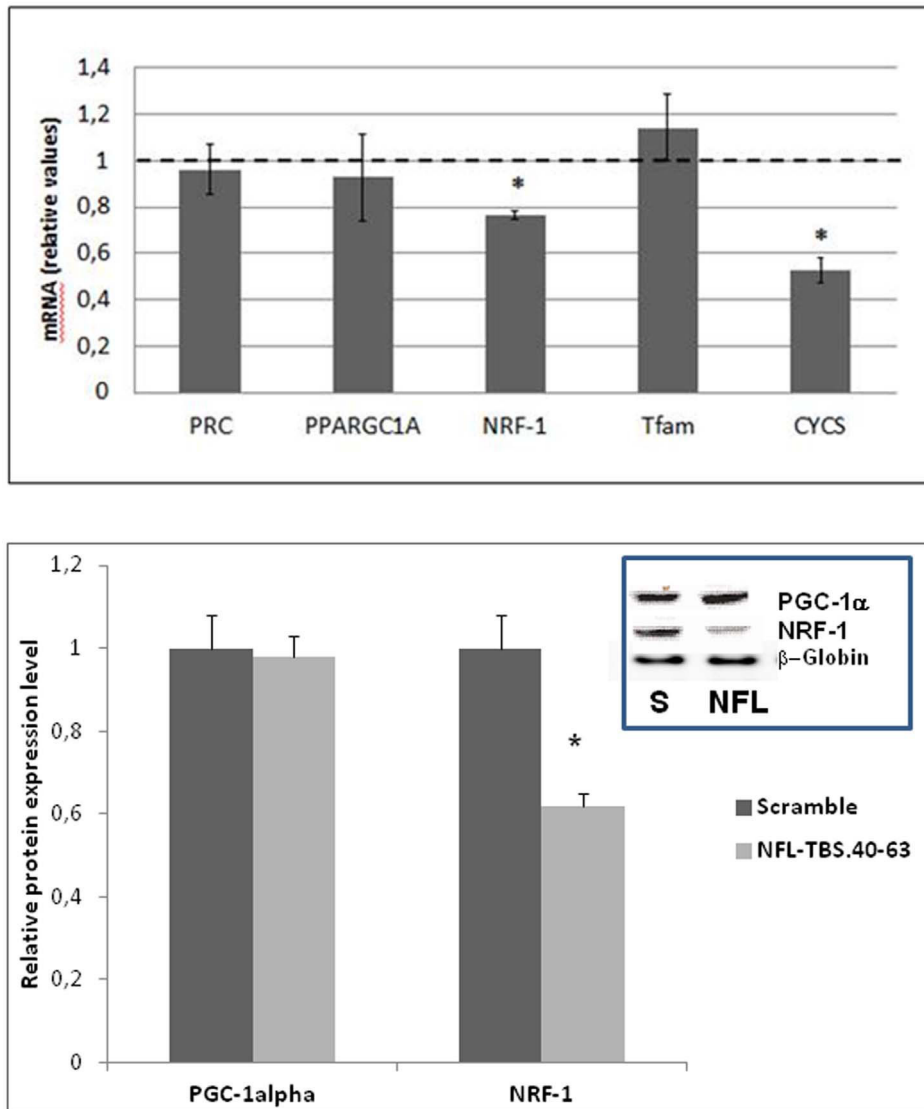
We investigated the impact of a 6 hours-incubation in various NFL-TBS.40-63 peptide concentrations (2 to 10  $\mu$ M) on mitochondrial respiratory function and biogenesis from T98G cells and NIH3T3 control cells [8,9]. A mitostress test was performed to investigate the main parameters of the OXPHOS process, including basal respiration rate, ATP turnover, proton leak and maximal oxygen consumption rate. Mitochondrial respiration is divided into two fractions. The oligomycin insensitive fraction



**Figure 1. Action of the NFL-TBS.40-63 peptide on mitochondrial number and functions in T98G cells and NIH 3T3 control cells.** 1A: The relative oxygen consumption was measured using a mitostress kit and a Seahorse XF-24 apparatus (from Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA). The oligomycin-insensitive fraction represents non-phosphorylating respiration, which was recorded after the inhibition of ATP synthase with oligomycin. The oligomycin-sensitive fraction represents the phosphorylating respiration, i.e., the fraction used for ATP synthesis. Results are expressed relative to oxygen consumption of scramble treated cells used as control (pmol/min/mg protein). 1B: The protein expression of mitochondrial subunit IV of complex IV (COX4, MS408, Mitosciences) and subunit Ip of complex II (SDHB, MS203, Mitosciences) were measured by Western blot analysis after a 6-hour exposure to 10  $\mu$ M NFL-TBS.40-63 peptide and normalized to the  $\alpha$ -tubulin level (65 KDa; Abcam, Cambridge, UK). The protein expression for the peptide-treated samples was expressed relative to that of the scramble-treated samples. S: Scramble; P: NFL-TBS.40-63 peptide. Results are expressed relative to protein expression ratio of scramble treated cells used as control. The values represent the average  $\pm$  SD for three separate determinations ( $N=3$ ). \*:  $P<0.05$  versus control. doi:10.1371/journal.pone.0098473.g001

corresponds to non-phosphorylating respiration and is recorded after the inhibition of ATP synthase with 1  $\mu$ M oligomycin. The oligomycin-sensitive fraction represents the phosphorylating respiration and is the fraction used for ATP synthesis, which is calculated by subtracting the nonphosphorylating respiration rate from the basal respiration rate. The NFL-TBS.40-63 peptide significantly affected both oligomycin-sensitive and insensitive fractions at 10  $\mu$ M (Figure 1A). The global oxygen consumption rate was reduced at all concentrations, with specific and significant decreases in the oligomycin-insensitive fractions of approximately 20% at the 2  $\mu$ M and 5  $\mu$ M concentrations. However, no defect in

the fraction used for ATP synthesis (oligomycin-sensitive fraction) could be noticed at these lowest concentrations, contrary to that observed for 10  $\mu$ M peptide. Conversely, for the NIH-3T3 cells, none of the two oligomycin fractions seemed to be significantly affected by the peptide even if a tendency to decrease could be noticed at 10  $\mu$ M peptide for the oligomycin-sensitive fraction. To explore the impact of 10  $\mu$ M NFL-TBS.40-63 treatment on mitochondrial biogenesis, we have investigated the protein expression level of mitochondrial complex subunits using Western blot analysis (Figure 1B). Our results show a significant reduction in SDHB (complex II subunit) by 30% and of COX4 (complex IV



**Figure 2. Expression analysis of the genes involved in the control of mitochondrial biogenesis in T98G cells treated by 10  $\mu$ M of NFL-TBS.40-63 peptide.** 2A: Quantitative PCR analysis: PRC (PPRC1) and PGC-1 $\alpha$  (PPARGC1A) coactivators, NRF-1 transcription factor, mitochondrial transcription factor TFAM and a component of the respiratory chain, Cytochrome c (CYCS), were measured. The data are expressed in relative units (mRNA expression of a specific gene normalized to  $\beta$ -globin mRNA expression) and expressed relative to the control, which was assigned a unit value. The values are the average  $\pm$  SD for three separate determinations ( $N=3$ ). \*:  $P<0.05$  versus control. 2B: Western blot analysis: The protein expression of PGC-1 $\alpha$  (105KDa, Ab- 54481, Abcam) and NRF-1 (54 KDa, Ab-86516, Abcam) were measured by Western blot analysis after a 6-hours exposure to 10  $\mu$ M NFL-TBS.40-63 peptide and normalized to the  $\beta$ -actin level (45 KDa; Abcam). Results are expressed relative to protein expression ratio of scramble treated cells which was assigned a unit value. The values are the average  $\pm$  SD ( $N=3$ ). \*:  $P<0.05$  versus control. doi:10.1371/journal.pone.0098473.g002

subunit) by 20%, respectively, in T98G cells, when compared to the scrambled peptide. In NIH-3T3 cells, no such reduction was observed, in accordance with our previous results for non-permeant NIH-3T3 cells for this peptide [8]. These results indicate a primary impact of the peptide on mitochondrial functions at low concentrations (2 and 5  $\mu$ M), which had no detectable effect on the microtubule network. However, at 10  $\mu$ M of peptide, both networks were affected [8].

#### The NFL-TBS.40-63 peptide rapidly affects the regulatory factors of the mitochondrial biogenesis in the T98G cell line

The expression of five essential genes that control mitochondrial biogenesis and function -PRC (PPRC1) and PGC-1 $\alpha$

(PPARGC1A) coactivators, NRF-1 transcription factor, mitochondrial transcription factor TFAM and a component of the respiratory chain (CYCS) - were investigated in T98G cells. We observed that reduced mitochondrial oxygen consumption at 10  $\mu$ M NFL-TBS.40-63 peptide was associated with a significantly reduced expression of NRF-1 and its target gene CYCS by 20% and 50%, respectively (Figure 2A). However, no significant changes in the expression levels of PRC, PGC-1 $\alpha$  or TFAM could be observed after 6 hours of NFL-TBS.40-63 treatment. These results indicate that NFL-TBS.40-63 peptide has a rapid impact on the transcriptional machinery regulating the mitochondrial biogenesis. This regulation is independent of the expression level for PRC and PGC-1 $\alpha$  and could be related to the post-transcriptional regulation of NRF-1 expression.

We confirmed, at the protein level, the decrease in NRF-1 expression compared to PGC-1 $\alpha$  following the 10  $\mu$ M peptide treatment (Figure 2B).

### The NFL-TBS.40-63 peptide alters microtubules and mitochondrial organization at 10 $\mu$ M Concentration

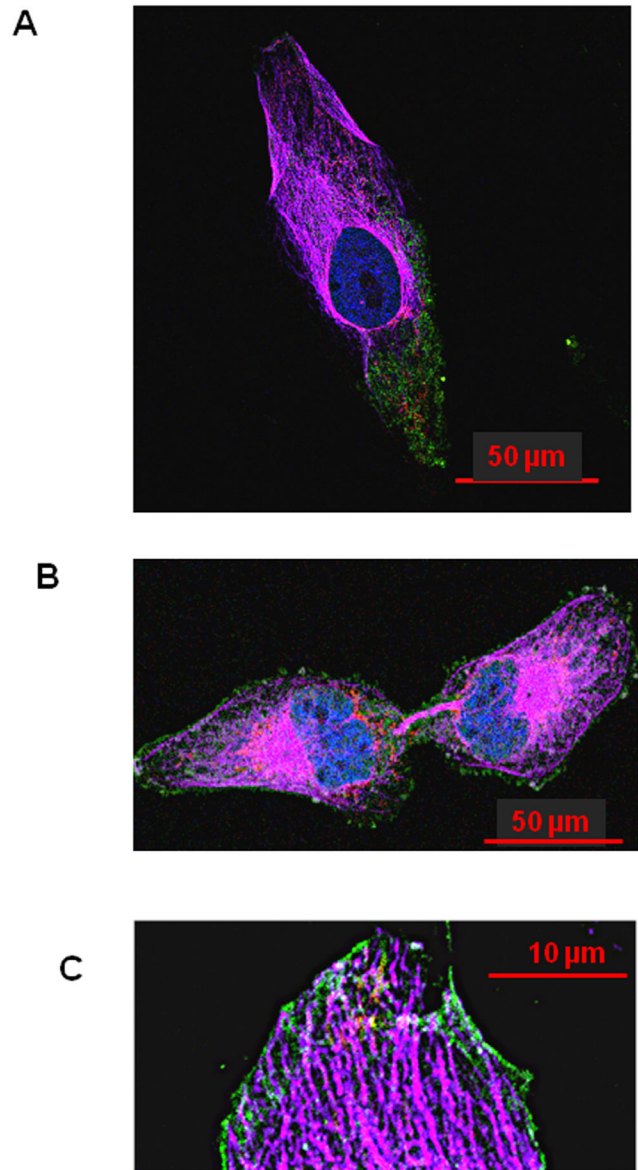
Previously, we have shown that T98G human glioblastoma cells internalized the NFL-TBS.40-63 peptide at a 10  $\mu$ M concentration, which induces the disruption of their microtubule network [8]. Consequently, tubulin is aggregated around the nucleus, while cells lose their extensions and become spherical. Using markers of both mitochondrial and microtubule networks, in association with a marked peptide, confocal microscopy showed that the peptide entered in T98G and accumulated in a polarized manner (Figure 3A and Figure S1 in File S1 for unmerged images). This was related with a reduction in microtubule and mitochondrial density where the peptide accumulated. It was also convincing for dividing cells where the basis of the midbody was enriched with peptide and mitochondria but completely devoid of microtubule (Figure 3B). The NFL-TBS.40-63 peptide was also able to surround microtubule tips and should limit filipodia formation (Figure 3C), in accordance with our previous results showing the reduction of cell motility at a low peptide concentration [10]. We observed that the peptide was able to co-localize with both the microtubules and the mitochondria to modify the architecture of their networks contrary to that observed in untreated cells (Figure 4 and Figure S4 in File S1). We also observed that mitochondria could be structured independently of the microtubule network with co-localized mitochondrial network and long chains of NFL-TBS.40-63 peptide sequences (Figure 4, yellow arrows).

### The NFL-TBS.40-63 peptide reduces mitochondrial dynamics

We explored the impact of NFL-TBS.40-63 on the mitochondrial fission–fusion balance using the master regulator of mitochondrial dynamics, MFN2, which is responsible for mitochondrial multiplication and FIS1, which is involved in mitochondrial fission (Figure 5A). Here, we showed that, even if both factors presented a significant decrease in expression level, the FIS1/MFN2 ratio, which refers to the balance between dynamic events, was conserved. Rather, this conserved modeling balance involved differences mainly in mitochondrial motility resulting from abnormal cytoskeletal anchorage. Thus, we have observed a decrease in mitochondrial motility (mean speed motility 7-times slower) using mitochondrial network imaging as well as decrease in cell motility (53% mean decrease in cell migration) using the transwell assay, in peptide-treated cells compared to scramble-treated (Figures S2 and S3 in File S1, respectively).

### The NFL-TBS.40-63 peptide induces post-transcriptional regulation

We have analyzed the expression of relevant miRNAs associated with mitochondria, drug resistance, or both and found that a 6-hours treatment with 10  $\mu$ M of NFL-TBS.40-63 peptide induced a significant change in expression for four miRNA: miR-96, miR-218, miR-21 and miR-221 (Figure 5B). Two of these miRNA (miR-21 and miR-221) were found to be overexpressed in many cancer cells, including glioblastoma, as they had anti-apoptotic and anti-mitophagic effects. We have confirmed the effect of miR-21 and miR-221 by measuring up regulation of PTEN and NAIP genes, directly targeted by these miRNA, compared to unchanged expression level for FGFR3 gene targeted by miR-100 (Figure 5C).



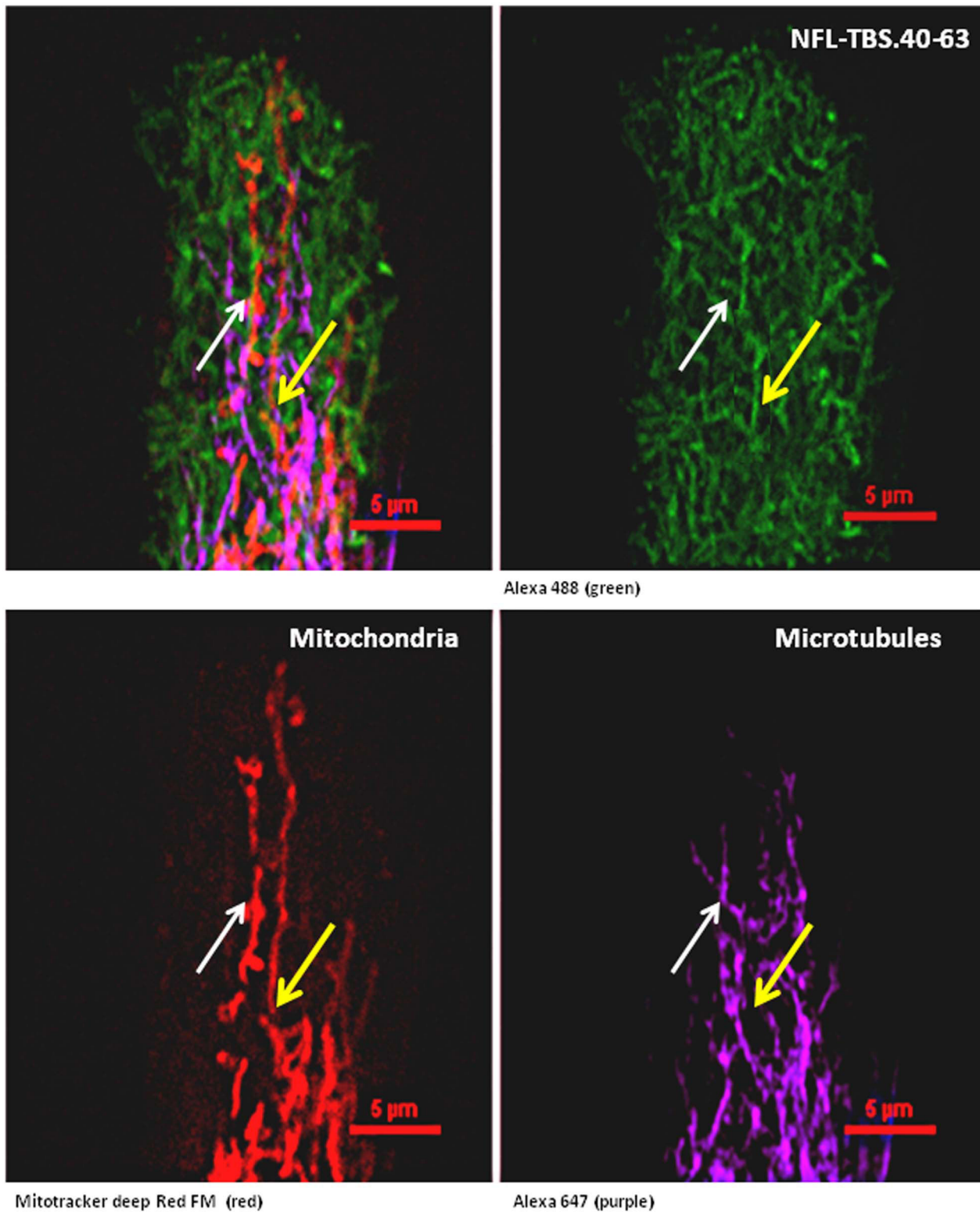
**Figure 3. Effects of 10  $\mu$ M of NFL-TBS.40-63 peptide on mitochondrial and microtubule networks in human T98G glioblastoma cells.** 3A: NFL peptide accumulates within the cell in a polarized manner, limiting the density of the microtubules and mitochondrial networks. 3B: NFL peptide accumulates at the basis of the midbody and excludes the microtubule network. 3C: The peptide surrounds the microtubules' tips and limits filopodia formation. Microtubules were detected using an Alexa647-labeled, anti- $\alpha$ -tubulin antibody (purple); biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide was labeled with streptavidin Alexa488 (green), the nuclei with diamidino phénylindole (DAPI; blue) and mitochondria with a mitotracker (RedCMX ROS). The cells were examined with a Nikon A1RSI confocal microscope and the images were analyzed with Nikon NIS-element software. The red bars are the measuring scale.

doi:10.1371/journal.pone.0098473.g003

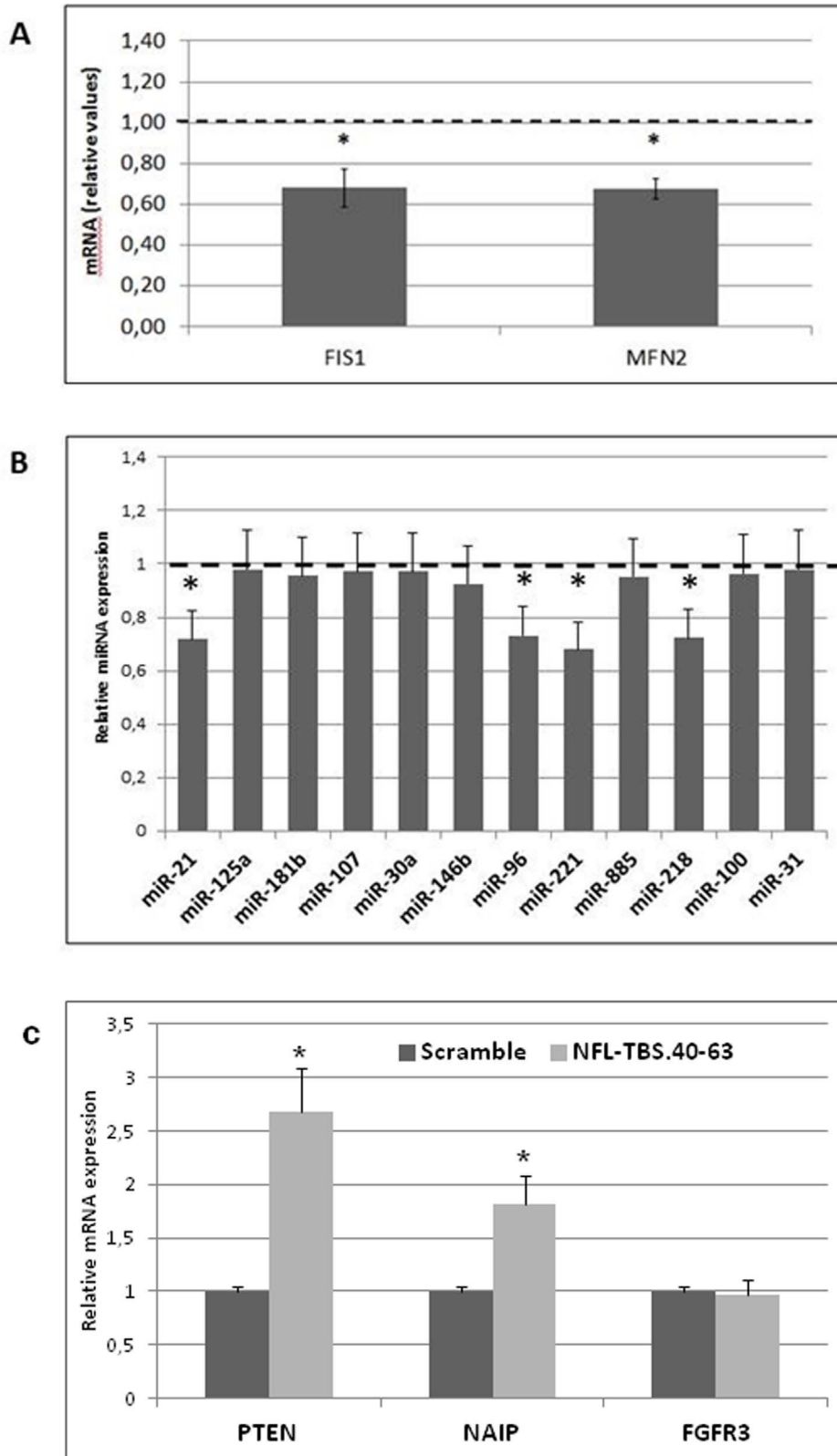
### Discussion

A close interaction between mitochondria and the cytoskeleton is essential to ensure the proper distribution of mitochondria within a cell. Recent studies have highlighted interactions between intermediate filaments, notably NFL or Vimentin and the key molecules necessary for the maintenance of organelle integrity and





**Figure 4. The NFL-TBS.40-63 peptide reorganizes mitochondrial networks in human T98G glioblastoma cells.** The white arrow indicates a mitochondrial network (bottom left) superposed with a microtubule network (bottom right). The yellow arrow indicates a mitochondrial network (bottom left) superposed with long peptide sequences (top right). The microtubules were detected using an Alexa647-labeled, anti- $\alpha$ -tubulin antibody (purple); biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide was labeled with streptavidin Alexa488 (green), the nuclei with diamidino ph $\ddot{O}$ nylindole (DAPI; blue) and the mitochondria with a mitotracker Red CMX ROS). The cells were examined with a Nikon A1RSI confocal microscope and the images were analyzed with Nikon NIS-element software. The red bars are the measuring scale.  
doi:10.1371/journal.pone.0098473.g004



**Figure 5. Quantitative PCR analysis of mitochondrial fission/fusion actors and relevant differentially-expressed miRNA-mRNA complexes in human T98G glioblastoma cells.** 5A: Quantitative PCR analysis of mitochondrial fission/fusion actors (FIS1 and MFN2) in T98G cells. The data are expressed in units (mRNA expression of a specific gene normalized to  $\beta$ -globin mRNA expression) that are relative to the control, which was assigned a unit value. 5B: Quantitative PCR analysis of relevant differentially expressed miRNA in T98G cells. The data are expressed in units (miRNA expression relative to U5 snRNA) that are relative to the control, which was assigned a unit value. 5C: Quantitative PCR analysis of PTEN and NAIP mRNA, directly targeted by miR-21 and miR-221, respectively. FGFR3 expression was used as negative control of miR-100, which expression level

was unchanged by peptide treatment. The data are expressed in units (mRNA expression of a specific gene normalized to  $\beta$ -globin mRNA expression) that are relative to the control, which was assigned a unit value. The values are the average  $\pm$  SD for three separate determinations ( $N=3$ ). \*:  $P<0.05$  versus control.

doi:10.1371/journal.pone.0098473.g005

mitochondrial motility [11–13]. The NFL-TBS.40-63 peptide is able to alter microtubule formation when it is internalized by T98G glioblastoma cells and inhibits their proliferation [8]. In this study, we have evaluated the effect of NFL-TBS.40-63 peptide internalization on mitochondrial biogenesis and function.

Our observations revealed a negative impact on T98G cell respiration after 6 hours of NFL-TBS.40-63 peptide treatment (2 to 10  $\mu$ M). This action on mitochondrial function, at lower concentrations than those necessary to disturb the cytoskeleton (10  $\mu$ M), could be related to a primary modification of the mitochondrial motility. It has been shown that peptides derived from the N-terminal domain of intermediate filaments, like desmin, vimentin and keratin, can interact with the unpolymerized tubulin [8]. A recent study demonstrated that the N-terminal domain of vimentin (residues 41–94) can also directly bind mitochondria and serve as an adaptor between actin microfilaments and mitochondria [13]. We suggest that the primary action of NFL-TBS.40-63 leads to sequential organization of the peptide, which disturbs the cytoskeleton and reorganizes the mitochondrial network. This should be related to the conserved FIS1/MFN2 ratio we observed at higher peptide concentrations. At a 10  $\mu$ M peptide treatment, we also revealed a colocalization of NFL-TBS.40-63 with mitochondria and a specific accumulation at the microtubules' extremities, which may limit membrane ruffling, as previously reported [37,38].

This study revealed that the NFL-TBS.40-63 peptide provokes a redistribution of mitochondria throughout the cytoplasm. Mitochondria were able to reorganize along the peptide from end to end, in order to form a polarized but less dense network and reduce cell respiration. Mitochondria and autophagy are linked to homeostatic elements that act in response to changes in the cellular environment, such as energy, nutrients and stress. Thus, defects in plasticity could simultaneously impair autophagy, which may result in increased risk for various human diseases [39,40]. The peptide treatment induces an inhibition of FIS1 and MFN2 gene expression. As has been shown, deregulation of mitochondrial fusion or fission is associated with alterations in the organization of the mitochondrial network and with the inhibition of energy metabolism [41]. Alterations in energetic metabolism cause defects in respiratory chain subunits and may lead to mitochondrial network fragmentation [42]. Western blotting analyses indicated that decreases in the OXPHOS process were also related to a decrease in mitochondrial biogenesis when using 10  $\mu$ M of NFL-TBS.40-63 peptide, regarding protein levels for two subunits of the respiratory chain complexes (SDHB and COX4) and for transcription factor NRF-1. This rapid reduction of mitochondria after 6 hours of peptide treatment may be related to the induction of mitophagy. Thus, the PGC-1 $\alpha$ /PRC pathway, which is related to the transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis, was not affected after 6 hours of treatment, while NRF-1 and CYCS

were repressed; this suggests a lack of extra-cellular signal regulation or a delayed PGC-adaptive response to energy depletion. Moreover, this could suggest a rapid regulation of mitophagy/biogenesis balance through post-transcriptional pathways, as recently reported [43,44].

We found that the expression of two relevant miRNAs—miR-21 and miR-221—was altered by a 6-hours treatment with the NFL-TBS.40-63 peptide, compared to the scrambled control. These miRNAs are referred to as oncomirs, as they have anti-apoptotic and proliferative effects [25,26,28,45]. In human tumors, miR-21 down-regulates the expression of PTEN, which is involved in mitophagy through its negative regulation of PINK1 (PTEN-induced kinase 1) [34]. Up-regulation of miR-221 has also been correlated with down-regulation of one of its targets, NAIP (NLR-family, apoptosis inhibitory protein), which is involved in neurodegeneration and apoptosis regulation [33]. On the contrary, over-expression of miR-218 and miR-96 were associated with apoptosis induction through targeting the PINK1/NF-KB pathway and FOXO1, respectively [46,47]. The inverse functions of these miRNAs on apoptosis or mitophagy should be considered, depending on their half-time. Thus, miR-21 is considered to be one of the most long-lived miRNAs [48].

In conclusion, we showed that a 6-hours treatment with 10  $\mu$ M of NFL-TBS.40-63 peptide induces a direct reduction in the global respiration of cells that have internalized the peptide. This effect can be related to a reduction of the main transcription factor involved in mitochondrial biogenesis and in the OXPHOS process. The treatment is efficient in reducing the expression of miRNAs that are involved in glioblastoma pathogenesis and MTA resistance. To our knowledge, this is the first report showing the role played by this peptide in the regulation of global respiration for glioblastoma cells. Our results show that disrupting a microtubule network affects the mitochondrial network distribution, thus confirming the close relationship between these two networks.

## Supporting Information

**File S1**  
(PDF)

## Acknowledgments

We are grateful to Philippe Hulin and Kevin Nedellec for technical help.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FS JE. Performed the experiments: RR CLC. Analyzed the data: FS JE RR CLC. Contributed reagents/materials/analysis tools: FS JE. Wrote the paper: RR FS.

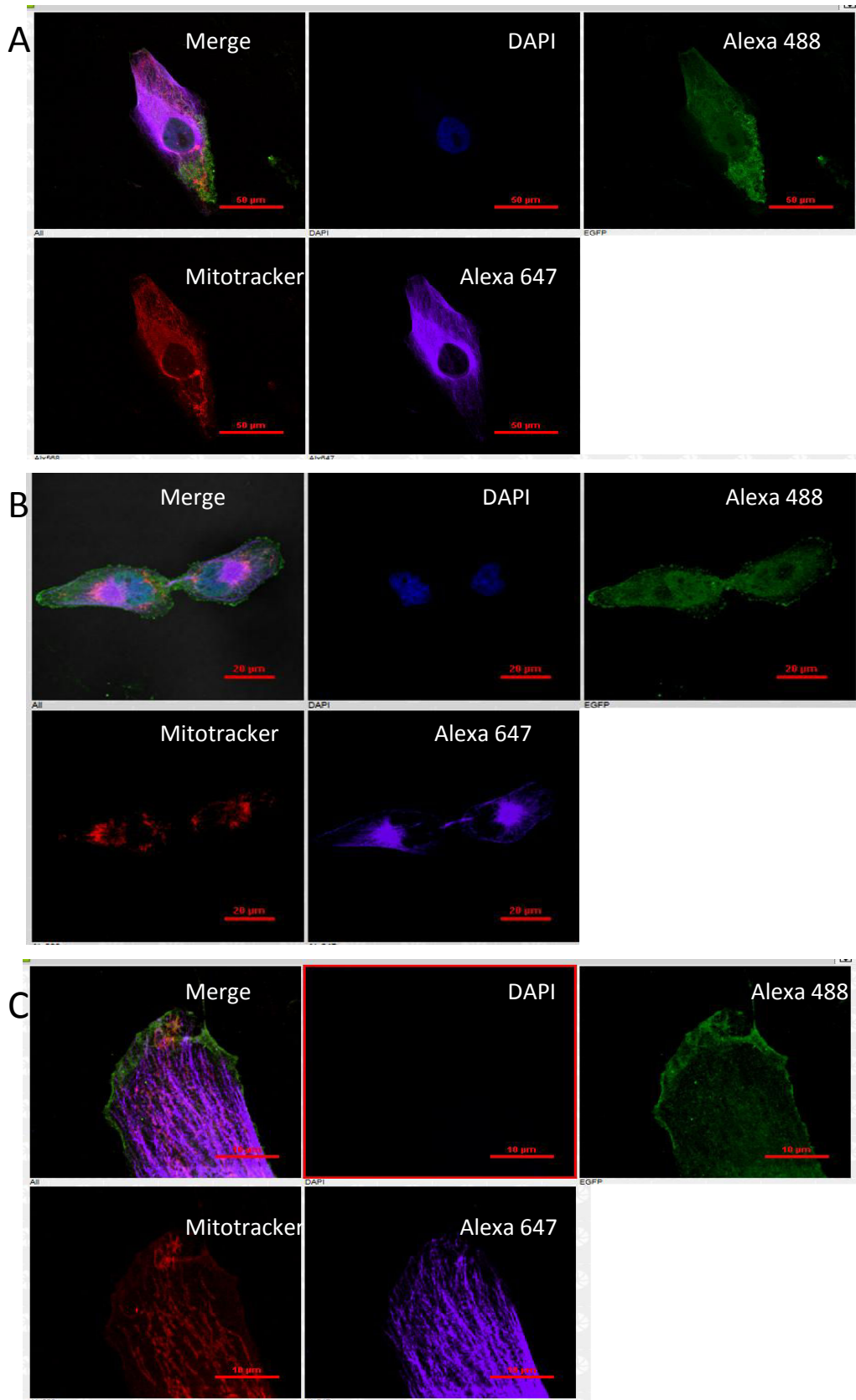
## References

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97–109.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987–996.
- Monticone M, Daga A, Candiani S, Romeo F, Mirisola V, et al. (2012) Identification of a novel set of genes reflecting different in vivo invasive patterns of human GBM cells. *BMC Cancer* 12: 358.
- Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 109: 93–108.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, 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.
6. Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69: 277–302.
  7. Dumontet C, Jordan MA (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9: 790–803.
  8. Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, et al. (2009) Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci* 29: 11043–11054.
  9. Lepinoux-Chambaud C, Eyer J (2013) The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm* 454: 738–747.
  10. Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J (2012) A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol Ther* 20: 1367–1377.
  11. Cagalinec M, Safulina D, Liiv M, Liiv J, Choubey V, et al. (2013) Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *J Cell Sci* 126: 2187–2197.
  12. Gentil BJ, Minotti S, Beange M, Baloh RH, Julien JP, et al. (2012) Normal role of the low-molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease. *FASEB J* 26: 1194–1203.
  13. Nekrasova OE, Mendez MG, Chernovianenko IS, Tyurin-Kuzmin PA, Kuczumski ER, et al. (2011) Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell* 22: 2282–2289.
  14. Gomes LC, Di BG, Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13: 589–598.
  15. Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22: 1577–1590.
  16. Liu X, Weaver D, Shirihai O, Hajnoczky G (2009) Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J* 28: 3074–3089.
  17. Hollenbeck PJ, Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118: 5411–5419.
  18. Grandemange S, Herzig S, Martinou JC (2009) Mitochondrial dynamics and cancer. *Semin Cancer Biol* 19: 50–56.
  19. Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 872–884.
  20. Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88: 611–638.
  21. Raharjaona M, Le Pennec S, Poirier J, Mirebeau-Prunier D, Rouxel C, et al. (2009) PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncogenic thyroid tumours. *PLoS One* 4: e7964.
  22. Tivnan A, McDonald KL (2013) Current progress for the use of miRNAs in glioblastoma treatment. *Mol Neurobiol* 48: 757–768.
  23. Li WB, Ma MW, Dong LJ, Wang F, Chen LX, et al. (2011) MicroRNA-34a targets notch1 and inhibits cell proliferation in glioblastoma multiforme. *Cancer Biol Ther* 12: 477–483.
  24. Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky AM, Weissleder R, et al. (2007) MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res* 67: 8994–9000.
  25. Ren Y, Zhou X, Mei M, Yuan XB, Han L, et al. (2010) MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC Cancer* 10: 27.
  26. Costa PM, Cardoso AL, Nobrega C, Pereira de Almeida LF, Bruce JN, et al. (2013) MicroRNA-21 silencing enhances the cytotoxic effect of the antiangiogenic drug sunitinib in glioblastoma. *Hum Mol Genet* 22: 904–918.
  27. Hao J, Zhang C, Zhang A, Wang K, Jia Z, et al. (2012) miR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma cells. *Oncol Rep* 27: 1504–1510.
  28. Kim HJ, Kim YH, Lee DS, Chung JK, Kim S (2008) In vivo imaging of functional targeting of miR-221 in papillary thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 49: 1686–1693.
  29. Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O, et al. (2011) Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One* 6: e20220.
  30. Ninio-Many L, Grossman H, Shomron N, Chuderland D, Shalgi R (2013) microRNA-125a-3p reduces cell proliferation and migration by targeting Fyn. *J Cell Sci* 126: 2867–2876.
  31. Tomasetti M, Neuzil J, Dong L (2014) MicroRNAs as regulators of mitochondrial function: Role in cancer suppression. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1441–1453.
  32. Balzeau J, Pinier M, Berges R, Saulnier P, Benoit JP, et al. (2013) The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials* 34: 3381–3389.
  33. Lukiw WJ, Cui JG, Li YY, Culicchia F (2009) Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol* 91: 27–32.
  34. Zhang JG, Wang JJ, Zhao F, Liu Q, Jiang K, et al. (2010) MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 411: 846–852.
  35. Galveti CR, Rozhdestvensky TS, Brosius J, Lehrach H, Konthur Z (2010) Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA* 16: 450–461.
  36. Mitra K, Lippincott-Schwartz J (2010) Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 4: Unit-21.
  37. Rinnerthaler G, Geiger B, Small JV (1988) Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membrane ruffles and microtubules. *J Cell Biol* 106: 747–760.
  38. Schober JM, Komarova YA, Chaga OY, Akhmanova A, Borisov GG (2007) Microtubule-targeting-dependent reorganization of filopodia. *J Cell Sci* 120: 1235–1244.
  39. Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, et al. (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degran and directly initiates mitophagy. *J Biol Chem* 287: 10631–10638.
  40. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 17: 87–97.
  41. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, et al. (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14: 1405–1415.
  42. Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, et al. (2006) Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C1172–C1182.
  43. Kubli DA, Gustafsson AB (2012) Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 111: 1208–1221.
  44. Li P, Jiao J, Gao G, Prabhakar BS (2012) Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J Cell Biochem* 113: 1104–1110.
  45. Karsy M, Arslan E, Moy F (2012) Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer* 3: 3–15.
  46. Guo Y, Liu H, Zhang H, Shang C, Song Y (2012) miR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer. *Oncol Lett* 4: 561–565.
  47. Xia H, Yan Y, Hu M, Wang Y, Wang Y, et al. (2013) MiR-218 sensitizes glioma cells to apoptosis and inhibits tumorigenicity by regulating ECOP-mediated suppression of NF-kappaB activity. *Neuro Oncol* 15: 413–422.
  48. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, et al. (2011) Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res* 39: 5692–5703.

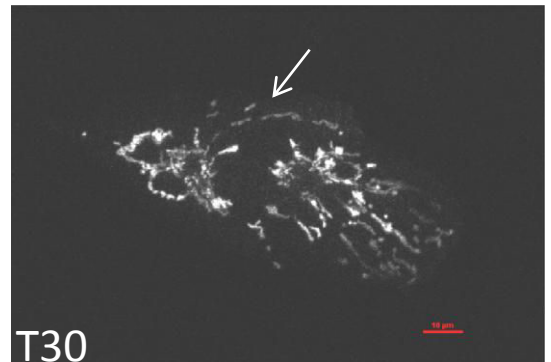
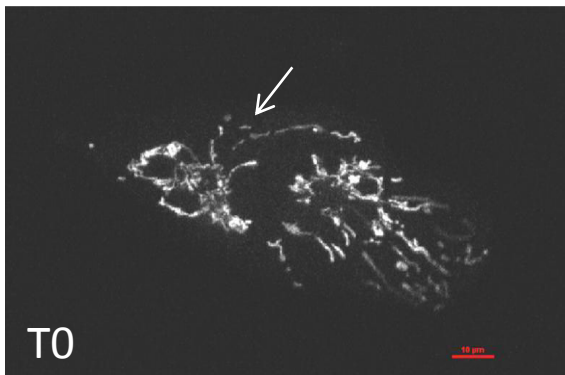
### Figure S1 : Unmerged images from Fig. 3

Microtubules were detected using an Alexa647-labeled, anti- $\alpha$ -tubulin antibody (purple); biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide was labeled with streptavidin Alexa488 (green), the nuclei with diamidino phénylindole (DAPI; blue) and mitochondria with a mitotracker (RedCMX ROS). The *red bars* are the measuring scale.

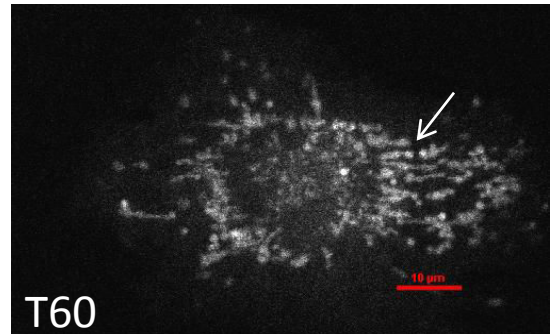
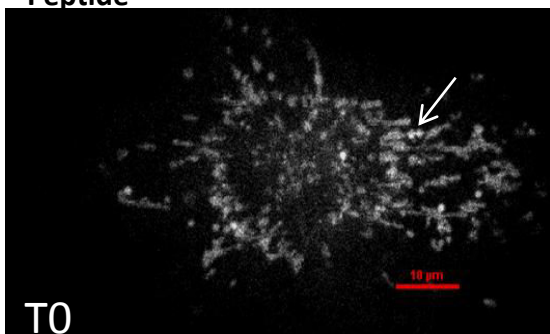


**Figure S2** : In vitro effect on mitochondrial motility of 15 hours exposure with 10  $\mu$ M NFL-TBS.40-63 peptide compared to scramble, using live confocal microscopy and Metamorph software ( $N=6$ ). Time duration 3 minutes, image every 5 seconds. T30 and T60 in seconds

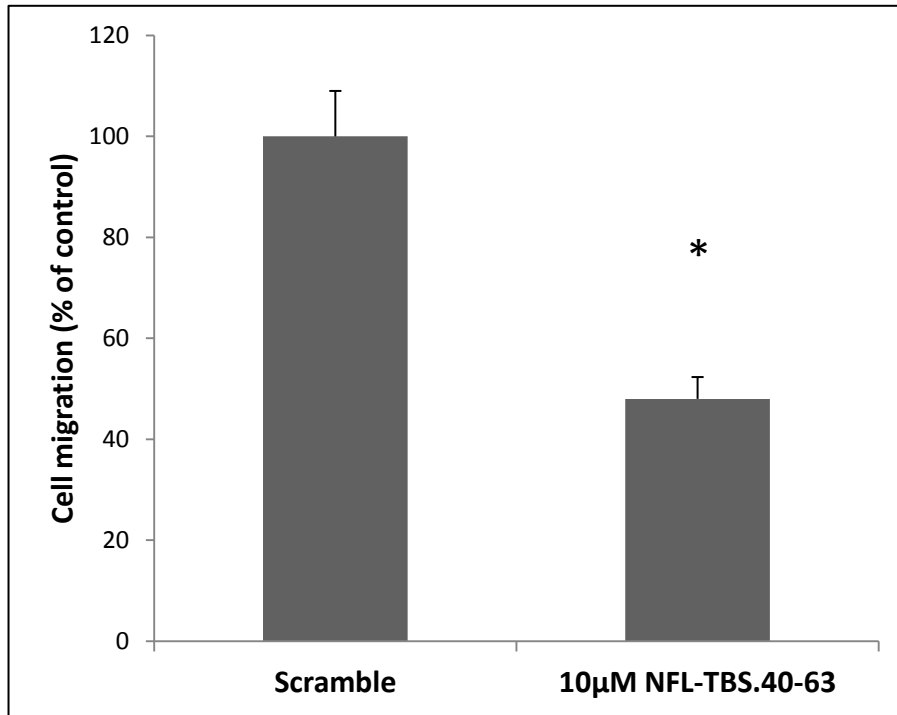
**Scramble**



**Peptide**

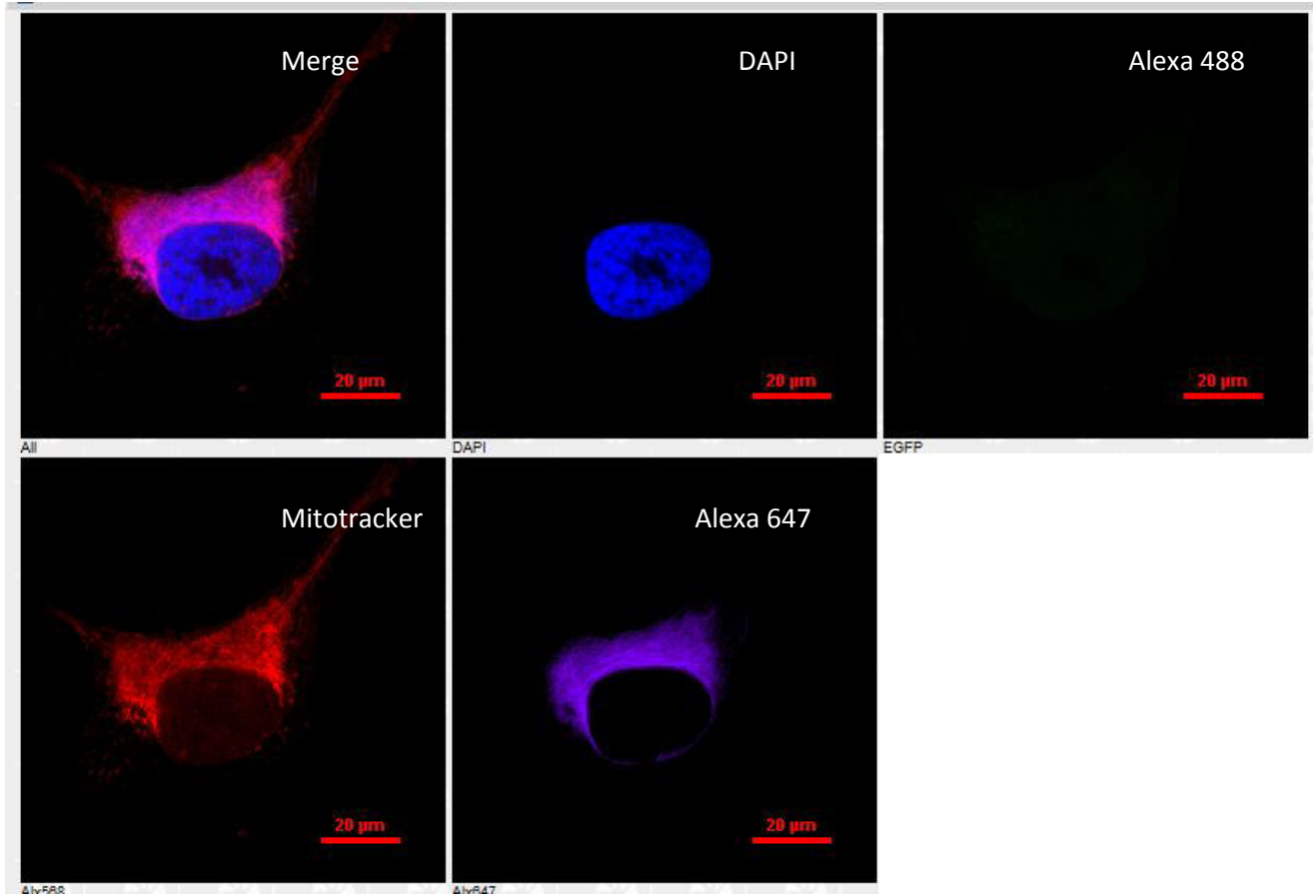


**Figure S3** : In vitro effect on T98G cell migration of 15 hours exposure with 10  $\mu$ M NFL-TBS.40-63 peptide, using Transwell migration assay . (\*  $P < 0.05$ )



**Figure S4: Confocal imaging of untreated T98G cells**

Microtubules were detected using an Alexa647-labeled, anti- $\alpha$ -tubulin antibody (purple); biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide was labeled with streptavidin Alexa488 (green), the nuclei with diamidino phénylindole (DAPI; blue) and mitochondria with a mitotracker (RedCMX ROS). The *red bars* are the measuring scale.





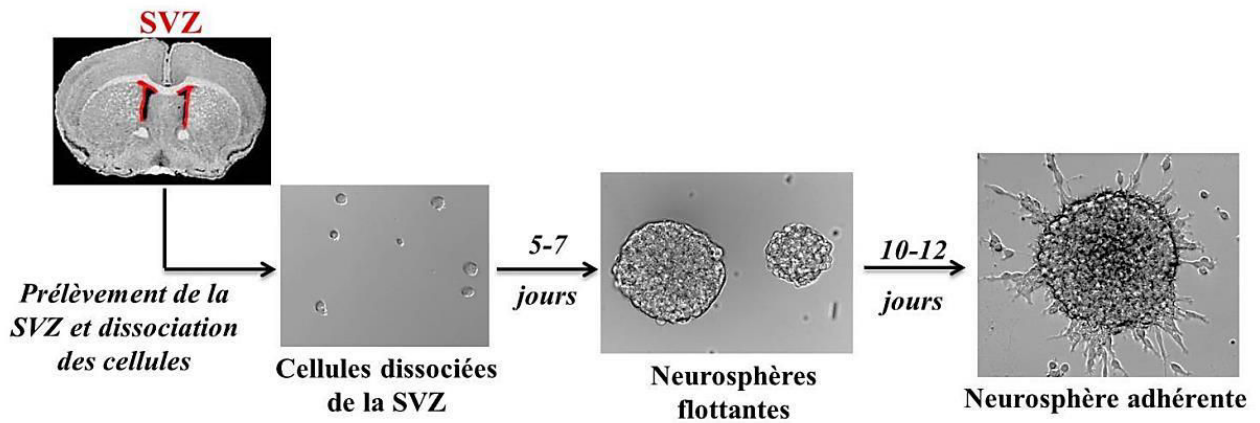
The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63 targets neural stem cells and increases their attachment.

Lépinoux-Chambaud C., Eyer J. Soumis à Biomaterials

Dans le but de lutter efficacement contre les tumeurs cérébrales de haut grade et contre la neurodégénérescence, de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes basées sur l'utilisation de cellules souches neurales (CSN) ont été abordées. Ces cellules, présentes dans le système nerveux adulte dans des régions neurogènes, ont en effet des capacités réparatrices et anti-tumorigéniques endogènes intéressantes mais limitées (Saha et al., 2012 et 2013 ; Zhang et al., 2012). Ainsi, la possibilité de pouvoir cibler ces cellules représente un enjeu majeur pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la médecine régénératrice et pour traiter les tumeurs cérébrales.

Le peptide NFL-TBS.40-63 qui présente des effets anti-tumoraux, est capable de cibler de façon sélective les cellules de glioblastome hautement prolifératives, alors qu'il rentre peu ou pas dans des cellules à faible taux de prolifération (Bergès et al., 2012a). Dans cette étude, le but a été d'analyser l'entrée du peptide dans les CSN, et les effets possibles sur leur capacité de proliférer, de s'auto-renouveler, de former des neurosphères *in vitro*, et de générer des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes.

Nos travaux ont été menés sur des CSN issues de la zone sous-ventriculaire (SVZ) de rats nouveau-nés et de rats adultes. Après prélèvement par microdissection, les fragments de SVZ sont dissociés et les cellules individualisées sont incubées en présence d'EGF. Des neurosphères flottantes sont formées après 5 à 7 jours et peuvent devenir adhérentes après 10 à 12 jours en culture (**Figure 46**).



**Figure 46 : Mise en culture des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire.**

L'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 dans les CSN a été analysée par cytométrie en flux (FACS) et par microscopie confocale. Les résultats de FACS montrent que le peptide entre de façon massive et dose-dépendante dans les CSN issues de rats nouveau-nés et adultes, jusqu'à un plateau après 20  $\mu\text{mol/L}$  de peptide (**Fig. 1A et 2A**). L'internalisation du peptide dans les CSN a été vérifiée en ajoutant du bleu de trypan avant la lecture par cytométrie en flux, afin d'éteindre une éventuelle fluorescence à la surface des cellules (**Fig. 1A**). L'entrée du peptide a ensuite été confirmée par microscopie confocale *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, l'entrée du peptide-FITC a été observée dans des CSN individualisées et au sein des neurosphères (**Fig. 1B et 1C**). *In vivo*, après injection du peptide-FITC par stéréotaxie dans le ventricule latéral de rats adultes, des marquages immuno-histochimiques, réalisés 1h après la fin de l'injection, ont permis de localiser le peptide au sein de la SVZ. La SVZ est séparée des ventricules latéraux par une couche de cellules épendymaires, exprimant la nestine et la vimentine. Dans la zone sous-épendymaire les cellules sont nestine- et GFAP-positives (cf. partie 3.2.3, figure 30). Sur les coupes de cerveau observées au microscope confocal, le peptide est majoritairement localisé au niveau des cellules épendymaires, et une partie du peptide se trouve au niveau de cellules GFAP-positives sous-épendymaires (**Fig. 2B**). Ces résultats suggèrent que le peptide est capable de cibler la SVZ et qu'une partie du peptide peut traverser la couche épendymaire *in vivo*.

L'entrée dose-dépendante du peptide dans les CSN est semblable à celle observée dans les cellules de glioblastome (Bergès et al., 2012a). Il a donc été intéressant de caractériser les mécanismes impliqués dans l'internalisation du peptide dans les CSN. Après incubation des cellules à 4°C ou après déplétion en ATP, l'entrée du peptide dans les cellules n'a pas été

altérée, suggérant un mécanisme d'entrée passif qui ne nécessite pas d'énergie (**Fig. 3A**). Dans le but de confirmer ces résultats, des inhibiteurs des différentes voies d'endocytose ont été testés (cf. partie 4.1.2.2, Figure 38) ainsi que des inhibiteurs des différents acteurs de la machinerie de l'endocytose, déjà utilisés précédemment (1<sup>er</sup> article scientifique : Lépinoux-Chambaud et Eyer, 2013). En présence de ces différents inhibiteurs, l'entrée du peptide dans les CSN n'est pas altérée (**Fig. 3B**), ce qui exclue donc un mécanisme d'entrée actif par endocytose.

Après avoir démontré les capacités du peptide à cibler les CSN *in vitro* et *in vivo*, nos travaux se sont orientés sur les effets potentiels du peptide sur ces cellules. Des études précédentes avaient mis en évidence les propriétés anti-tumorales du peptide sur les cellules de glioblastome, par l'altération de leur réseau de MT, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, l'inhibition de leur prolifération et l'induction de l'apoptose (Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a).

Contrairement aux cellules de glioblastome, les CSN traitées pendant 6h avec le peptide conservent un réseau de MT bien structuré. En revanche, en présence de colchicine le réseau de MT des CSN est complètement détruit (**Fig. 4B**). Alors que le peptide réduit la viabilité et induit l'arrêt du cycle cellulaire des cellules de glioblastome en phase G1, il n'a pas d'effet sur le cycle cellulaire des CSN quelle que soit sa concentration, et il ne réduit pas la viabilité des cellules, à part pour de fortes concentrations (100  $\mu\text{mol/L}$ ) (**Fig. 4A et 4C**).

En culture, les CSN sont capables de former des neurosphères non-adhérentes. En présence de peptide cette capacité des CSN n'est pas altérée, sauf pour de fortes concentrations (100  $\mu\text{mol/L}$ ) et en présence de colchicine (**Fig. 5A**). Il apparaît également une augmentation du nombre de neurosphères adhérentes pour des concentrations en peptide supérieures à 40  $\mu\text{mol/L}$  (**Fig. 5B-C**). Cette augmentation de l'adhérence des CSN est associée à une légère diminution de l'expression de PSA-NCAM et à une diminution de la prolifération des CSN (**Fig. 5D-E**). Dans des conditions contrôles, après dissociation des neurosphères primaires, les CSN sont capables de reformer des neurosphères, dites neurosphères secondaires. Le nombre de neurosphères secondaires dépend alors du nombre de CSN dans les neurosphères primaires. Cette capacité d'auto-renouvellement des CSN est altérée lorsque ces cellules sont cultivées en présence de peptide (**Fig. 5F**). L'ensemble de ces résultats montrent que le peptide ne perturbe pas la formation des neurosphères primaires (excepté pour de fortes

concentrations), mais altère la capacité d'auto-renouvellement des CSN, ce qui suggère que le peptide réduit le nombre de CSN. Ce phénomène ne semble pas être associé à une augmentation de la mortalité des cellules (**Fig. 4C**), mais est associé à une réduction de la prolifération et à une augmentation de l'adhérence des cellules (**Fig. 5E et 5B-C**).

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux montrent que le peptide NFL-TBS.40-63 est capable de cibler les CSN *in vitro* et *in vivo*, sans effet cytotoxique majeur, excepté à de fortes concentrations (100  $\mu\text{mol/L}$ ). L'augmentation de l'adhérence des neurosphères, la diminution de la prolifération des cellules et la diminution de l'expression de PSA-NCAM suggèrent également que le peptide pourrait favoriser la différenciation des CSN (**Fig. 6**). Cette étude indique que le peptide NFL-TBS.40-63 peut représenter un outil thérapeutique prometteur pour cibler les CSN et augmenter leur mobilisation. Dans une telle perspective, il serait intéressant d'utiliser des nanoparticules fonctionnalisées avec ce peptide pour cibler leur entrée dans les CSN.

Cette étude a fait l'objet d'un brevet européen (provisoirement, European Patent N° 14305981.4 – 1408) qui sera prochainement consultable en ligne. La gestion de ce brevet s'effectue via la SAT "Ouest-Valorisation".

## **The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63 targets *in vitro* and *in vivo* neural stem cells and increases their attachment.**

Lépinoux-Chambaud C. and Eyer J.\*

Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, LUNAM, UPRES EA-3143, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment IBS-IRIS, 49033 Angers, France.

### **ABSTRACT**

Targeting neural stem cells has promising potential for the development of new regenerative strategies because these cells are present in the adult brain and they are able to proliferate, self-renew and differentiate into new neurons, astrocytes and oligodendrocytes. In this study we investigate whether the NFL-TBS.40-63 peptide, corresponding to the tubulin-binding site located on the low molecular weight subunit of neurofilaments, can target neural stem cells. We show that this peptide is able to translocate passively in neural stem cells *in vitro* that were isolated from new born or adult rats. When injected in the cerebrospinal fluid of adult rats, the peptide targets adult neural stem cells *in vivo* without causing detectable cytotoxicity. Moreover, the *in vitro* formation of neurospheres was not altered by the peptide at low concentration, whereas at high concentrations the self-renewal capacity of these cells was reduced and associated with an increase of adherent cells and a decrease of NSC proliferation. These results indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide represents a new molecular tool to target neural stem cells in order to develop new strategies for regenerative medicine and treatment of brain tumours.

### **KEYWORDS:**

Peptide; neural stem cells; uptake; self-renewal; adhesion; proliferation.

#### **\*Corresponding author:**

Dr. Joël Eyer

Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse UPRES EA-3143, Institut de Biologie en Santé, CHU, 49033 Angers, France.

Tel.: (33) 244 688 488

Fax.: (33) 244 688 489

[joel.eyer@univ-angers.fr](mailto:joel.eyer@univ-angers.fr)

## INTRODUCTION

Neural stem cells (NSC) are located in neurogenic regions in the adult brain (sub-ventricular zone (SVZ), dentate gyrus of the hippocampus), and along the spinal cord [1-7]. These cells are characterized by their capacity to self-renew, to form neurospheres in culture, to proliferate, and to generate neurons, astrocytes and oligodendrocytes [8-10]. The use of normal or genetically modified NSC has already been described for the treatment of neurodegenerative disorders (Parkinson, Huntington and Alzheimer's diseases, Amyotrophic Lateral Sclerosis), spinal cord lesions, and for the treatment of malignant glioma [11, 12]. Therefore, the possibility to target and manipulate NSC without taking them out of the brain represents a promising avenue for regenerative based therapies in order to increase their mobilization and stimulate neurogenesis.

A potential candidate to target the NSC is the NFL-TBS.40-63 peptide that corresponds to the sequence of the tubulin-binding site located on the neurofilament light subunit [13]. This peptide alone or linked to nanoparticles, is able to target glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. Injection of this peptide in animal bearing glioma allows a significant reduction of the tumour volume and a general improvement in the health status of treated animals [14, 15]. The selective and massive uptake of this peptide by glioblastoma cells occurs through endocytic pathways and is related to their high proliferative state. However, a small amount of peptide is internalized in low proliferative healthy cells, such as astrocytes, oligodendrocytes or neurons. Moreover, while the peptide is able to disrupt the microtubule network of glioblastoma cells, it has no major effect on healthy cells [14,16]. Finally, this peptide enhances the differentiation and maturation of oligodendrocytes *in vitro*, and partially prevents them from lysophosphatidyl choline toxicity, a well-known demyelinating compound [17,18].

In this study, we investigated the targeting capacity and the potential effects of this peptide on NSC. We showed that the peptide is able to target *in vitro* new-born or adult NSC, as well as *in vivo* following its injection in the lateral ventricle of rats. Contrary to an ATP-dependent active endocytosis in glioblastoma, the uptake of the peptide by NSC occurs through a passive transport. While the peptide showed cytotoxic activities against glioblastoma cells, it has no major effect on the formation of neurospheres, the NSC viability, the cell cycle, and on the microtubule network. However, at high concentration the peptide reduced the self-renewal of NSC, which is related to an increased adhesion and a decreased proliferation of these cells.

Together, these results indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide represents an adequate carrier for the targeted delivery of biologically active proteins into NSC.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture and materials**

Primary cultures of NSC are derived from the SVZ of new-born (1-5 days) or adults (< 4 months) Wistar rats as previously described [19]. The dissociated cells were grown in MEM alpha (Gibco) supplemented with 25 mmol/L D-glucose (Sigma), 1 mmol/L Na Pyruvate, 15 mmol/L HEPES, 5% penicillin/streptomycin (PAA) and 1% B27 (Gibco), and containing 20 ng/mL EGF (Promega). After 5-7 days, stem cells formed floating neurospheres.

The peptide was synthesized by Millegen (Toulouse, France), Eurogentec (Angers, France) and Genecust (Dudelange, Luxembourg). The peptides from these three companies show similar results. The NFL-TBS.40-63 peptide (YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS) is biotinylated or coupled to carboxy-fluorescein isothiocyanate (FITC), and dissolved in sterile water.

Chlorpromazine hydrochloride (50  $\mu$ mol/L), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10 g/mL), 5-(N,N-dimethyl) amiloride hydrochloride (DAM, 1 mmol/L), wortmannin (100 nmol/L), U 0126 (40  $\mu$ mol/L), sunitinib (1  $\mu$ mol/L), and colchicine (1  $\mu$ g/mL) were obtained from Sigma. Genistein (400  $\mu$ mol/L) was obtained from Merck. Gefitinib (50  $\mu$ mol/L) was obtained from Santa Cruz Biotechnology.

### **Neurosphere forming and self-renewal analysis**

To investigate neurosphere forming properties we used a previously described protocol [20]. Briefly,  $5 \cdot 10^3$  SVZ cells were seeded per well in a 24 wells plate in media containing 20 ng/mL EGF. Cells were incubated in the absence or presence of increasing concentrations of biotinylated peptide, or with 1  $\mu$ g/mL colchicine. Following 5-7 days, the total number of primary neurospheres and the percent of adherent primary neurospheres were determined in each condition by microscopy analysis, and pictures were taken on an inverted microscope (Leica DMI6000) equipped with a CoolSNAP-HQ2 camera and analysed with the Metamorph 7.1.7.0 software. Then for self-renewal assay, primary neurospheres were collected in each condition, dissociated as single cells, and seeded in media containing 20 ng/mL EGF. After 5

days, the total number of secondary neurospheres was counted in each condition by microscopy analysis.

### **Flow cytometry**

To evaluate the internalization of the peptide, neurospheres were seeded in 35-mm dishes and cultured for 30 minutes at 37°C in media containing FITC labelled peptide at increasing concentrations. To quench the extracellular signal of the FITC labelled peptide, 0.4 % trypan blue (Sigma) was added before analysis. To investigate the uptake molecular mechanism, neurospheres were pre-incubated at 4°C during 30 minutes or with 10 mmol/L sodium azide in the presence of 6 mmol/L 2-deoxy-D-glucose, to deplete cellular ATP, or with different inhibitors during 30 minutes at 37°C. Then 20 µmol/L FITC labelled peptide was added to the cells for 30 minutes at 37°C. Subsequently, after centrifugation (5 minutes at 700 rpm), cells were dissociated mechanically and washed twice with PBS, and then re-suspended in 50 µg/mL propidium iodide (PI, Sigma). The fluorescent positive cells that incorporated the FITC labelled peptide were analysed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson).

To quantify the PSA-NCAM (polysialylated-neural cell adhesion molecule) expression on NSC, neurospheres were seeded in 35-mm dishes and cultured for 7 days at 37°C in media containing biotinylated peptide at increasing concentrations, or containing 1% new-born calf serum (NBCS). After dissociation, cells were incubated with the anti-PSA-NCAM antibody conjugated to R-phycoerythrin (PE) for 10 minutes at 4°C (Miltenyi), washed and then re-suspended in 50 µg/mL PI. The fluorescent positive cells that expressed PSA-NCAM were analysed by flow cytometry.

To investigate the possible effects of the peptide on the cell cycle, neurospheres were seeded in 35-mm dishes and then treated with increased concentrations of biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide or with 1 µmol/L colchicine during 48 hours at 37°C. Neurospheres were then collected in a microcentrifuge tube. After centrifugation (5 minutes at 700 rpm), cells were dissociated mechanically and permeabilized with PBS-Tween 0,5%, and fixed with ethanol 70% before adding 1 mg/mL RNase (Invitrogen) during 30 minutes at 37°C. The cell suspension was diluted in 10 µg/mL PI before DNA content analysis by flow cytometry.

To analyse the cell viability in the presence of the peptide, neurospheres were seeded in 35-mm dishes and then treated with increased concentrations of biotinylated peptide or with 1 µmol/L colchicine during 3 or 5 days at 37°C. Neurospheres were then collected in a



microcentrifuge tube. After centrifugation (5 minutes at 700 rpm), cells were dissociated mechanically and stained with annexin-V FITC (Annexin-V FITC Kit, Miltenyi Biotec) during 15 minutes at room temperature. Finally, cells were counterstained with 1 µg/mL PI solution prior to analysis by flow cytometry.

### **CyQUANT cell proliferation assay**

To analyse the peptide effect on the NSC proliferation, primary neurospheres were dissociated and  $5 \cdot 10^3$  cells per well were plated on BD Cell-Tak ( $3.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  and 1.4 mg/mL) (BD Biosciences) on 96 well microplate. Cells were treated with increased concentrations of biotinylated peptide or with 1 µmol/L colchicine, during 72 hours at 37°C. After 3 washes with PBS, cells were frozen at -80°C. Finally, the DNA concentration was analysed using the CyQUANT cell proliferation assay kit (Molecular Probes).

### **Immunocytochemistry**

To visualize the peptide uptake in NSC, dissociated cells were incubated with the FITC-peptide for 30 minutes and then plated on BD Cell-Tak coverslips during 1 hour. Following PBS washing, they were fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes and washed three times in PBS, before mounting coverslips with a ProLong Gold antifade solution (Life Technologies).

To visualize the peptide uptake in NSC and possible effects on the microtubule network, neurospheres were plated on BD Cell-Tak coverslips during 24 hours. Then, they were incubated with 20 µmol/L FITC labelled peptide for 30 minutes or 6 hours. Following PBS washing, they were fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes and washed three times in PBS. They were then incubated in a 0.5 % triton X-100 permeabilization solution for 30 minutes and washed three times in PBS before incubation in a blocking solution (1 % bovine serum albumin in 0.1 % triton X-100) for 1 hour. Neurospheres were then incubated overnight at 4°C with mouse anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma) 1/1000. After three washes in PBS, tubulin was localized using an Alexa 568 nm anti-mouse antibody (Life Technologies) 1/200 for 2 hours. Neurospheres were washed three times with PBS before adding 3 µmol/L 4',6-diaminido-2-phenylindole (DAPI, Sigma) during 5 minutes. Following PBS washing, coverslips were mounted with a ProLong Gold antifade solution.

Stained dissociated cells and neurospheres were observed with an inverted fluorescent microscope Leica (DMI6000) equipped with a CoolSNAP-HQ2 camera and analysed with the Metamorph 7.1.7.0 software, or with a confocal microscope Leica (TCS SP8).

### **Intra-ventricular injection of the NFL-TBS.40-63 peptide and immunohistochemistry**

All experimental procedures and animal care were achieved in conformity with the guidelines of the French Government and following the approval by the Local Committee for Ethics on Animal Experiments (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale des Pays-de-la-Loire).

Adult Wistar female rats were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine 10 % (80 mg/kg) and xylazine 2 % (10 mg/kg). Animals were then placed on a stereotaxic apparatus (David Kopf instruments, Tujunga, CA), and a sagittal incision was made through the skin to expose the cranium in which a small hole was made using a dental drill, at the appropriate coordinates (-0.8 mm anterior and 1.6 mm lateral to the bregma). A volume of 20  $\mu$ L of the FITC-peptide 1 mmol/L was injected, using a 10- $\mu$ L Hamilton syringe (Hamilton glass syringe 70 RN) with a 32-G needle (Hamilton, VWR), at a depth of 4.3 mm from the outer border of the cranium into the right lateral ventricle, and connected through a cannula to a 100- $\mu$ L Hamilton 22-G syringe (Hamilton glass syringe 810 RN) containing the peptide. A slow infusion was performed by convection-enhanced delivery with an osmotic pump (Harvard Apparatus) at a flow rate of 0.5  $\mu$ L/minute. After injection and slow withdrawal of the needle (0.5 mm/minute), the head skin was sutured. Animals were sacrificed 1 hour after the injection, and brains were removed and frozen, before sectioning them using a Leica cryostat.

For immunohistochemistry, the brain sections (12  $\mu$ m thick) were fixed with cold methanol during 10 minutes, washed three times in PBS, and blocked with PBS containing 5 % bovine serum albumin at room temperature for 1 hour. The sections were then incubated overnight with mouse anti-GFAP, mouse anti-vimentin (Sigma) and mouse anti-nestin (R&D) antibodies diluted 1/200, 1/200 and 1/500 respectively in PBS 5 % bovine serum albumin. After washing three times in PBS, primary antibodies were revealed using an anti-mouse antibody Alexa 568 nm (Life Technologies) 1/200 in PBS 5 % bovine serum albumin, and incubated during 90 minutes at room temperature, followed by washing in PBS. The brain sections were then counterstained with 3  $\mu$ mol/L 4'6-diaminido-2-phenylindole (DAPI, Sigma) for 5 minutes and rinsed twice with PBS. Finally, slides were mounted with a ProLong Gold antifade reagent and observed with a confocal microscope Leica (TCS SP8).

## Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. For FACS analysis, 20,000 events per sample were analysed. Results were presented as mean percentage of fluorescent cells and data were represented as bar graphs with the standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed with t of Student test by using Prism 3.00 (GraphPad software, San Diego, CA). Asterisks indicate significant level versus the control condition: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

## RESULTS

We first investigated the internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide in NSC from new-born and adult rats *in vitro* and *in vivo*, and then characterized the uptake molecular mechanism. We also analysed the possible molecular and cellular effects of the peptide on the microtubule network, the cell cycle and viability of NSC. Finally, we evaluated the consequences of the peptide uptake on the fundamental properties of the NSC, including the neurosphere formation, self-renewal, and proliferation.

### **The NFL-TBS.40-63 peptide penetrates in neural stem cells of new-born and adult rats *in vitro* and *in vivo***

The NSC were incubated with increased concentrations of FITC-peptide for 30 minutes and then peptide incorporation was evaluated using the sensitive FACS technique. Figure 1A shows a dose-dependent uptake of the peptide in the NSC of new-born rats. At 5  $\mu\text{mol/L}$  of FITC-peptide,  $38.72 \pm 9.08 \%$  of NSC internalized the peptide, and at 40  $\mu\text{mol/L}$  most NSC internalized the peptide ( $91.07 \pm 5.13 \%$ ). To assess whether the obtained signal corresponds to the internalized FITC-peptide, we added 0.4 % trypan blue before the FACS reading, to quench the surface-bound fluorescence of the FITC-peptide. Results showed a dose-dependent uptake of the peptide similar to that without quenching, confirming the intracellular fluorescence of the peptide (Fig.1A). These results were further investigated by confocal microscopy of dissociated NSC or neurospheres treated during 30 minutes with the FITC-peptide on coated coverslips (Fig.1B-C). Confocal observations confirmed the internalization of the peptide in NSC present in the neurosphere and these observations indicate that the peptide was only internalized in NSC located in the center of neurospheres but not in the periphery (Fig.1C).

We also analysed the peptide uptake in adult NSC *in vitro* by flow cytometry and *in vivo* by injecting the peptide in the lateral ventricle of adult rats followed by immunohistochemistry. The NSC were isolated from the SVZ of adult rats and incubated with increasing concentrations of FITC-peptide during 30 minutes. The incorporation evaluated by the sensitive FACS technique showed a dose-dependent uptake of the peptide in these cells, with a maximum threshold of  $92.74 \pm 2.51$  % reached at  $40 \mu\text{mol/L}$ , similar to the uptake observed in the NSC of new-born rats (Fig.2A). To test the possible targeted uptake of the peptide *in vivo* by adult NSC, we injected the FITC-peptide in the right lateral ventricle of adult rats and examined the samples 1 hour after the injection. The SVZ is separated from the lateral ventricles by a layer of ciliated ependymal cells that express vimentin, and there are GFAP-expressing cells in the sub-ependymal zone [7]. NSC were also recognized with anti-nestin, which is the intermediate filament expressed specifically by these cells. The brain section revealed that the peptide is localized in the lateral ventricle, and in the SVZ in the ependymal cells and a part in the sub-ependymal zone (Fig.2B). These confocal analyses indicate that the peptide is internalized in ependymal cells and can cross the ependymal barrier to penetrate in the sub-ependymal zone, where NSC and progenitors were found, without causing detectable cytotoxicity.

### **The uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide by neural stem cells occurs through a passive transport**

We investigated the molecular mechanism involved for the peptide uptake, in particular the endocytosis and the direct translocation, two well-known and major pathways for the internalization of cell-penetrating peptides [21]. The passive or active transports were first evaluated by incubating cells at  $4^{\circ}\text{C}$  or in an ATP-depleted buffer during 30 minutes prior to add the peptide, and they were further incubated in the same conditions during 30 minutes. The peptide uptake was not affected by  $4^{\circ}\text{C}$  or ATP-depletion, indicating that its internalization in NSC occurs through a passive mechanism (Fig.3A). To further exclude the use of an active transport we also tested a panel of inhibitors for each well-known endocytic pathways, as well as inhibitors of signalling pathways involved in the endocytic mechanism (PI3K, MAPK, growth factor receptors). These products did not induce a major toxicity to cells. The figure 3B shows that in the presence of these inhibitors, the peptide uptake was not dramatically affected, thus confirming that it was not internalized in NSC through endocytosis.

### **The NFL-TBS.40-63 peptide has no detectable cytotoxic effect on neural stem cells**

To investigate the possible peptide effects on NSC, we analysed by FACS the cell cycle of NSC in the presence of increased concentrations of the peptide during 48 hours. With or without peptide, the cell cycle of NSC remained unchanged with approximately 60-65 % of cells in G1-phase, 10 % in S-phase and 7 % in G2/M-phases. The cell cycle of NSC was only affected in the presence of 1  $\mu\text{g/mL}$  colchicine, used as a positive control to disrupt the microtubule network (Fig. 4A). These results show that to the opposite of glioblastoma cells, the peptide has no major effect on the cell cycle of NSC [14]. Moreover, confocal microscopy shows that following 6 hours of incubation with the peptide, the cell shape and the microtubule network of NSC were not affected, whereas colchicine induces profound alterations (Fig. 4B). We also showed that the peptide has no major effect on the NSC viability. Cells were treated three days with increased concentrations of the peptide or with colchicine, stained with Annexin V-FITC and PI, and then analysed by flow cytometry. The number of viable cells was strongly reduced when treated with colchicine and 100  $\mu\text{mol/L}$  of peptide, but the cell viability was not modified in the presence of the peptide up to 40  $\mu\text{mol/L}$  (Fig.4C).

### **The NFL-TBS.40-63 peptide has no effect on the neurosphere formation but reduces the self-renewal of neural stem cells by increasing their adhesion and decreasing their proliferation**

When NSC were exposed to increased concentrations of the peptide during 5 days, the number of primary neurospheres did not change when compared to untreated control NSC cultures, except at 100  $\mu\text{mol/L}$  concentration (Fig.5A). Moreover, most of primary neurospheres were adherent at 40  $\mu\text{mol/L}$  peptide, and at higher peptide concentrations, no floating neurospheres were observed (Fig.5B). Images of these neurospheres show that with high peptide concentrations their spherical shape is modified into a more flattened shape surrounded by increased adherent cells (Fig. 5C).

The increased attachment of the NSC at high peptide concentrations is related to a weak decrease of the PSA-NCAM expression. This is also seen when NSC were incubated with 1% NBCS (Fig.5D). A significant decrease of the NSC proliferation was also observed when cells were incubated with high peptide concentrations (Fig. 5E). Colchicine also decreased significantly the NSC proliferation (Fig. 5E), but unlike the peptide this effect was associated with cell cycle alteration and microtubule disruption (Fig. 4A-B).

To investigate the self-renewal capacity of NSC, the primary neurospheres cultured with or without peptide were dissociated and replaced during 5 days only in culture medium. The dissociated cells, from primary neurospheres previously cultured with peptide, generated a significantly lower number of secondary neurospheres, when compared to control condition (Fig.5F). In these experiments we also used a positive control by exposing NSC to 1  $\mu$ g/mL colchicine that blocks cell proliferation. Together, these results showed that the peptide has no effect on the neurosphere formation (except at high concentrations), but it affects the self-renewal of NSC with an increased cell attachment and a decreased cell proliferation.

## DISCUSSION

In this study we demonstrate that the NFL-TBS.40-63 peptide can translocate massively in NSC derived from new-born and adult rats, through a dose-dependent uptake. As previously suggested, the high proliferative activity of glioblastoma cells could account for their massive internalization of the peptide, but interestingly the uptake mechanism in NSC is fundamentally different from glioblastoma cells. In glioblastoma cells the peptide was only internalized by endocytosis [16], while in NSC it can translocate directly through the membrane by a passive transport, which is temperature and energy-independent. This was also confirmed using a complete panel of inhibitors of endocytosis which did not affect the peptide uptake. Interestingly, it indicates that the peptide use a unique entry pathway that is different from other cell-penetrating peptides, like R8 and Tat, which transduce in induced pluripotent stem cells (iPS cells) through macropinocytosis, an endocytic pathway [22]. One possibility could be due to a particular composition of these cells for lipids or phospho-lipids, which may modulate the translocation of the peptide [23-24]. Moreover, when injected in the lateral ventricle of adult rat, the NFL-TBS.40-63 peptide was located in the ependymal layer and a part of it in the sub-ependymal area, showing that the peptide could also enter *in vivo* in the SVZ to target NSC. It is important to note that the ependymal cells of the SVZ express CD133, a stem cell marker, and could also represent a population of NSC in the SVZ [25]. To our knowledge, it is the first time that a peptide has been shown to enter so specifically and massively *in vivo* in neural stem cells.

Interestingly, the specific effect of the peptide on glioblastoma cells to disrupt their microtubule network and consequently block their cell cycle was not observed on NSC. Tubulin immunostaining in NSC revealed a normally organized microtubule network following peptide incubation. Longer treatment with the peptide did not affect the cell cycle

and the viability of NSC. This suggests that the peptide interacts with a tubulin strongly expressed in glioblastoma cells that is absent or at low concentration in healthy cells [13,14]. High levels of  $\beta$ III-tubulin was found in glioblastoma, while NSC express mainly the  $\beta$ II-tubulin [25,26].

Finally, we investigated the possible effects of the peptide on neurosphere formation, self-renewal and proliferation. Incubated in free-serum medium and EGF, NSC proliferate and form typical neurospheres. After dissociation, secondary spheres were formed from NSC. Our results showed that the peptide has no major effect on primary neurosphere formation, except at high concentrations. The toxic effects at concentrations higher than 40 – 60  $\mu$ mol/L, could be due to a decreased expression of PSA-NCAM together with an increased attachment of cells. These alterations could disturb the self-renewal capacity of NSC, decreasing the number of secondary neurospheres compared with untreated cells. This protein characterizes the NSC growing, by limiting the cell-cell interactions and the cell interactions with the extracellular matrix, and by abolishing cell adhesion [27]. Increased NSC adhesion was also reported when cells were cultured on phospholipid bilayers functionalized with different RGD-containing peptides, probably due to increased peptide interactions with receptors on NSC surface [28]. Unlike these RGD peptides, the NFL-TBS.40-63 peptide was internalized in NSC to promote adhesion. Moreover, recent works showed that this peptide promotes the differentiation and maturation of oligodendrocytes from glial cell cultures derived from new-born rats. But the specific signalling pathway responsible for these effects is unknown [17, 18].

Taken together our data show that the NFL-TBS.40-63 peptide at low concentrations can target NSC *in vitro* and *in vivo* without major cytotoxic effect. At high concentrations, the peptide increases the NSC adhesion and affects their proliferation and self-renewal (Fig. 6). Further investigations are necessary to analyse the NSC differentiation in the presence of the peptide using specific markers including  $\beta$ III-tubulin, GFAP and Olig2 to stain neurons, astrocytes and oligodendrocytes respectively.

Complexes of plasmid DNA and nanoparticles functionalized with cell-penetrating Tat peptide were proposed to genetically modify glioblastoma and NSC cell lines, and transgene expression was shown in spinal cord [29]. But to our knowledge, the Tat peptide does not show such an *in vitro* and *in vivo* NSC targeting capacity as the NFL-TBS.40-63 peptide.

## CONCLUSION

Therefore, the NFL-TBS.40-63 peptide can be used to target *in vitro* and *in vivo* NSC and modulate their properties, as previously shown with the Tat and RGD peptides for mesenchymal stem cells [30-32], or can be used to functionalize lipid nanoparticles to target NSC, as previously demonstrated for glioblastoma cells [15]. Such a NSC selective delivery system could represent a new potential application for stem cell-based therapeutic strategies in several pathological conditions such as tumour brain and neurodegenerative disorders, which avoids manipulations of NSC outside from the brain.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), UNAM (Université Nantes, Angers, Le Mans), CIMATH (Ciblage Moléculaire et Thérapeutique), AFM (Association Française contre les Myopathies) and MATWIN (Maturation & Accelerating Translation With Industry).

The authors acknowledge SCIAM (Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques), PACeM (Plateforme d'Analyses Cellulaire et Moléculaire) and SCAHU (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire) for their assistance.

## REFERENCES

- [1] Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965;124 (3):319-35.
- [2] Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969; 137 (4):433-57.
- [3] Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4 (11):1313-17.
- [4] Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96 (10):5768-73.
- [5] Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98 (8):4752-57.
- [6] Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287 (5457):1433-38.



- [7] Hamilton LK, Truong MK, Bednarczyk MR, Aumont A, Fernandes KJ. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* 2009;164 (3):1044-56.
- [8] Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106 (4):619-33.
- [9] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255 (5052):1707-10.
- [10] Azari H, Rahman M, Sharififar S, Reynolds BA. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. *J Vis Exp* 2010;(45). pii: 2393. doi: 10.3791/2393.
- [11] Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 2013;33 (5):491-504.
- [12] Bexell D, Svensson A, Bengzon J. Stem cell-based therapy for malignant glioma. *Cancer Treat Rev* 2013;39 (4):358-65.
- [13] Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, Eyer J. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci* 2009;29 (35):11043-54.
- [14] Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol Ther* 2012;20 (7):1367-77.
- [15] Balzeau J, Pinier M, Berges R, Saulnier P, Benoit JP, Eyer J. The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials* 2013;34 (13):3381-89.
- [16] Lépinoux-Chambaud C, Eyer J. The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm* 2013;454 (2):738-47.
- [17] Fressinaud C, Eyer J. Axoskeletal proteins prevent oligodendrocyte from toxic injury by upregulating survival, proliferation, and differentiation in vitro. *Neurochem Int* 2013;62 (3):306-13.
- [18] Fressinaud C, Eyer J. Neurofilament-tubulin binding site peptide NFL-TBS.40-63 increases the differentiation of oligodendrocytes in vitro and partially prevents them from lysophosphatidyl choline toxicity. *J Neurosci Res* 2014;92 (2):243-53.
- [19] Coronas V, Bantubungi K, Fombonne J, Krantic S, Schiffmann SN, Roger M. Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem* 2004;91 (6):1292-301.

- [20] Nicoleau C, Benzakour O, Agasse F, Thiriet N, Petit J, Prestoz L, et al. Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal. *Stem Cells* 2009;27 (2):408-19.
- [21] Stewart KM, Horton KL, Kelley SO. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* 2008;6 (13):2242-55.
- [22] Yukawa H, Noguchi H, Nakase I, Miyamoto Y, Oishi K, Hamajima N, et al. Transduction of cell-penetrating peptides into induced pluripotent stem cells. *Cell Transplant* 2010;19 (6):901-09.
- [23] Terrone, D., Sang, S.L., Roudaia, L., Silvius, J.R. Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential. *Biochemistry* 2003;42, 13787-99.
- [24] Redeker, V. Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. *Methods Cell Biol* 2010;95, 77-103.
- [25] Coskun V, Wu H, Blanchi B, Tsao S, Kim K, Zhao J, et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105 (3):1026-31.
- [25] Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, et al. Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest* 2003;83 (4):479-89.
- [26] Katsetos CD, Draberova E, Legido A, Dumontet C, Draber P. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin. *J Cell Physiol* 2009;221 (3):505-13.
- [27] Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* 2005;280 (1):137-45.
- [28] Ananthanarayanan B, Little L, Schaffer DV, Healy KE, Tirrell M. Neural stem cell adhesion and proliferation on phospholipid bilayers functionalized with RGD peptides. *Biomaterials* 2010;31 (33):8706-15.
- [29] Song HP, Yang JY, Lo SL, Wang Y, Fan WM, Tang XS, et al. Gene transfer using self-assembled ternary complexes of cationic magnetic nanoparticles, plasmid DNA and cell-penetrating Tat peptide. *Biomaterials* 2010;31 (4):769-78.
- [30] Shah BS, Clark PA, Moiola EK, Stroschio MA, Mao JJ. Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots. *Nano Lett* 2007;7 (10):3071-79.

**[31]** Lei Y, Tang H, Yao L, Yu R, Feng M, Zou B. Applications of mesenchymal stem cells labeled with Tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body. *Bioconjug Chem* 2008;19 (2):421-27.

**[32]** Jo J, Song H, Park SG, Lee SH, Ko JJ, Park JH, et al. Regulation of differentiation potential of human mesenchymal stem cells by intracytoplasmic delivery of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 protein using cell-penetrating peptide. *Stem Cells* 2010;30 (8):1703-13.

**FIGURES**

Figure 1:

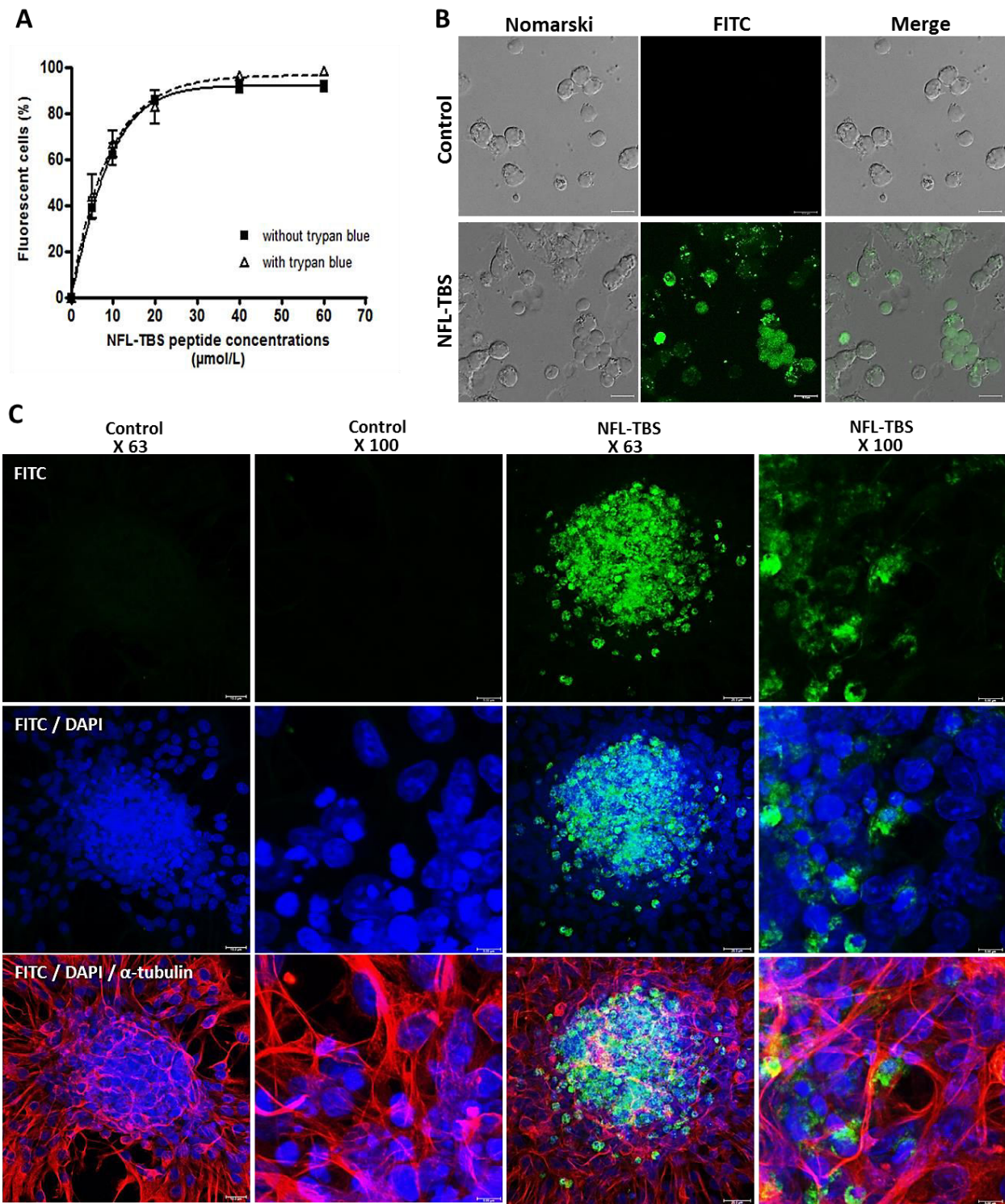


Figure 2:

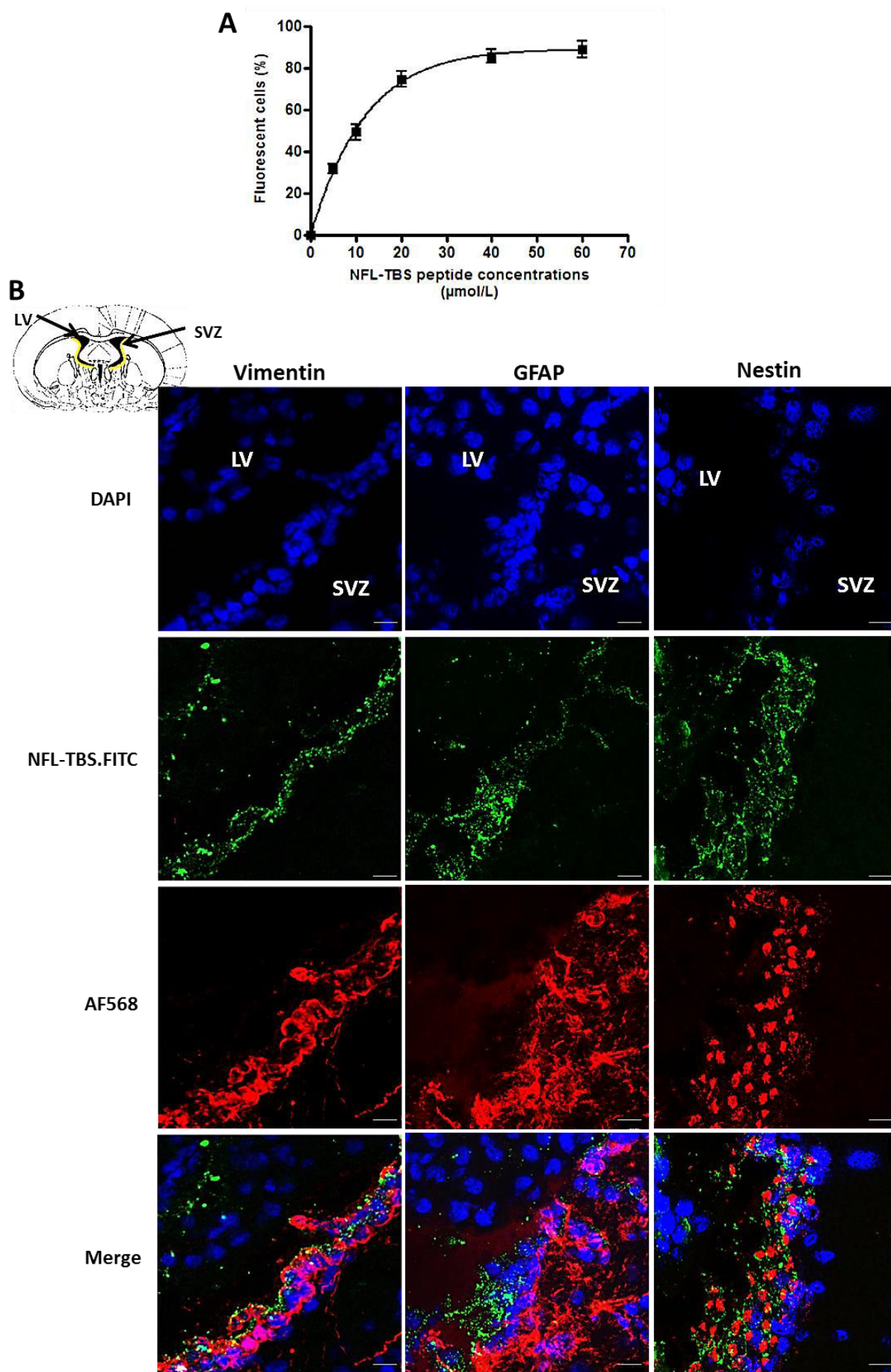


Figure 3:

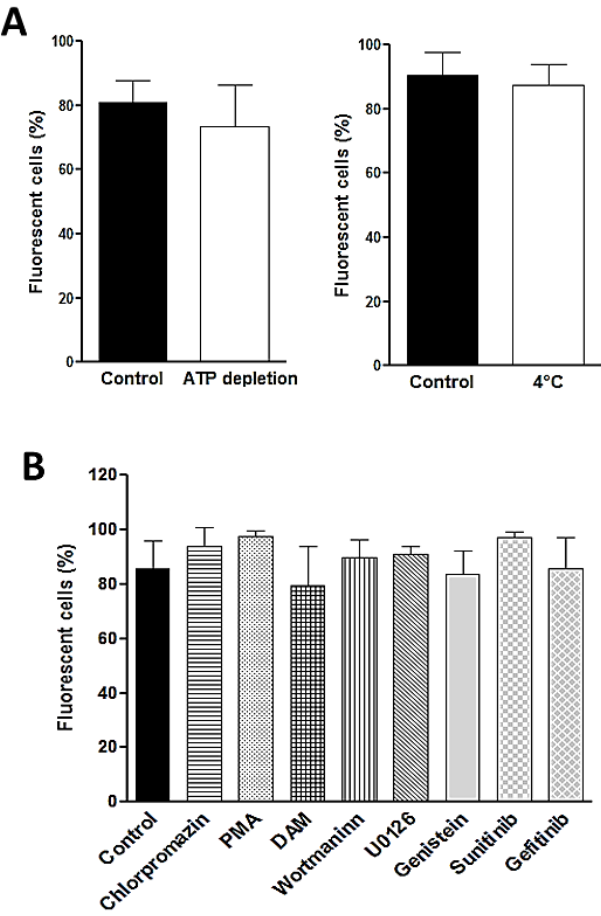


Figure 4:

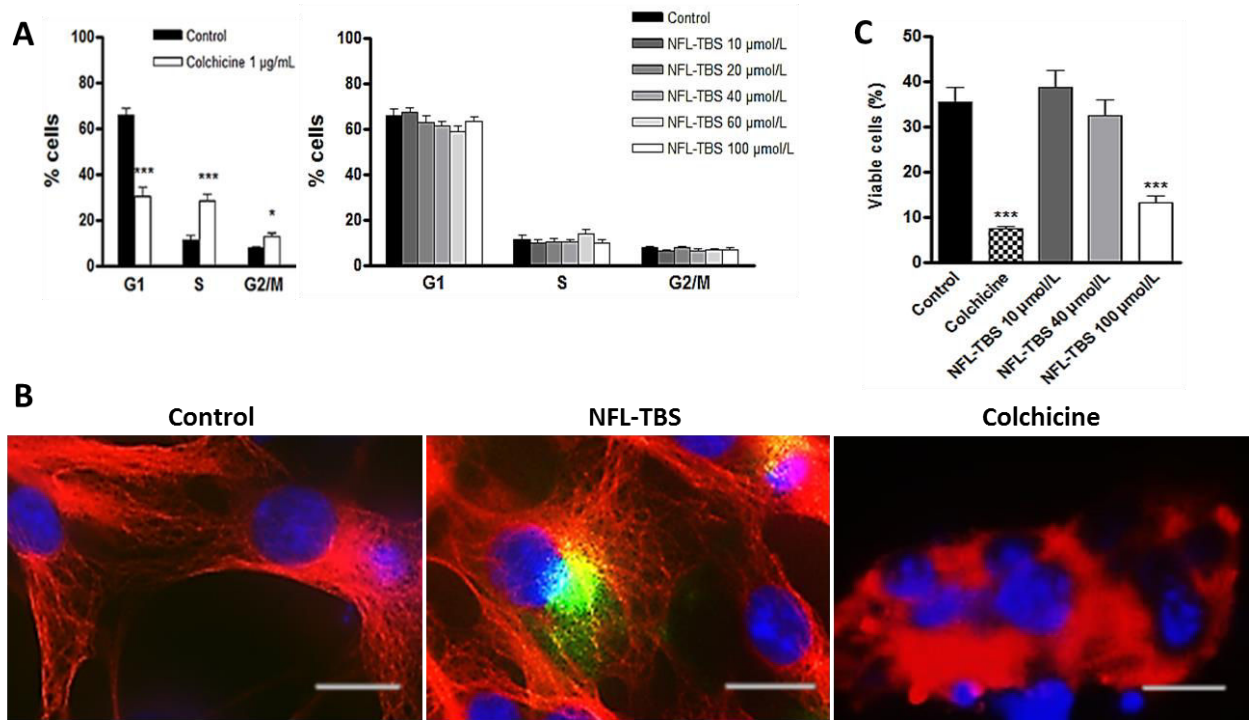


Figure 5:

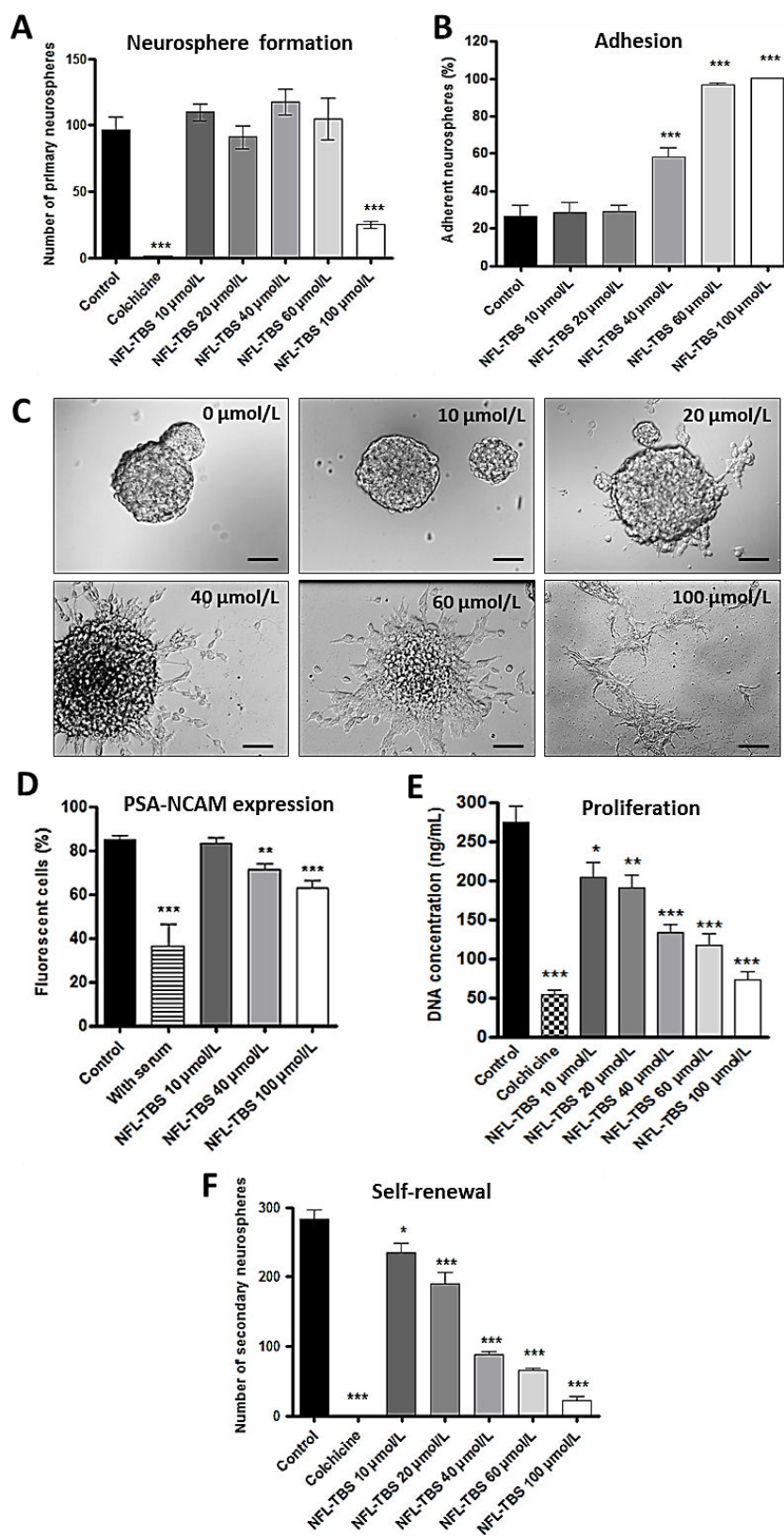
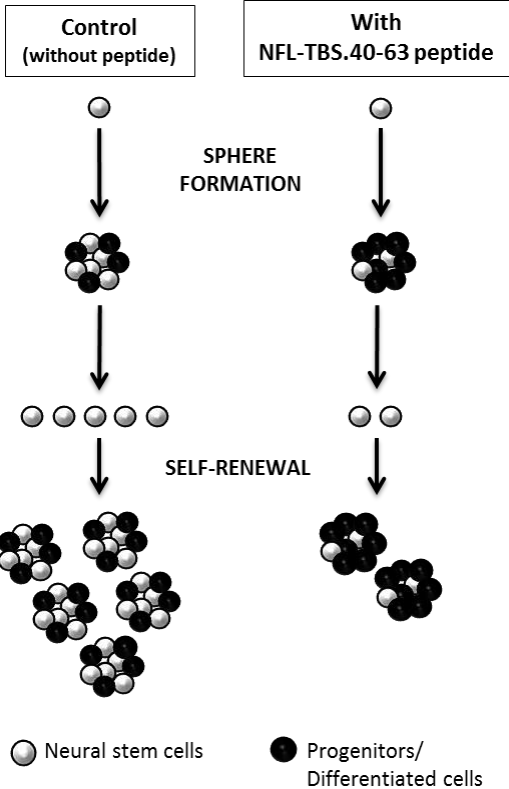




Figure 6:



## FIGURE CAPTIONS

**Figure 1 : The dose-dependent uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide in neural stem cells of new-born rats.** (A) Neurospheres were incubated during 30 minutes with increased concentrations of FITC labelled peptide, and then dissociated before FACS analysis of the peptide uptake in NSC with (dark curve) or without (dotted curve) 0.4% trypan blue. Results represent the percentage of fluorescent cells containing the peptide and compared to cells incubated without the peptide (control). (B) Confocal microscopy of the NSC treated with or without 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled peptide (green) during 30 minutes, and then fixed on coated coverslips. Scale : 10  $\mu\text{m}$ . (C) Confocal microscopy of neurospheres incubated on coated coverslips with 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled peptide (green) during 30 minutes, and immunocytochemistry was performed to reveal the microtubule network with an anti- $\alpha$ -tubulin (red). The nuclei were stained with DAPI (blue). Scales: 20  $\mu\text{m}$  (x63) and 5  $\mu\text{m}$  (x100).

**Figure 2 : The NFL-TBS.40-63 peptide uptake in neural stem cells of adult rats.** (A) Neurospheres obtained from adult rats were incubated with increased concentrations of FITC labelled peptide during 30 minutes, and then dissociated before FACS analysis. Results represent the percentage of fluorescent cells. (B) Immunohistochemistry of the SVZ of adult rat after *in vivo* peptide injection. Adult rats received 1 mmol/L FITC labelled peptide (green) in the lateral ventricle and they were sacrificed 1 hour later. Intermediated filaments expressed in the SVZ were stained with anti-vimentin, anti-GFAP or anti-nestin (red), and nuclei with DAPI (blue), and images were taken by confocal microscopy. Scale: 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3 : The passive transport of the NFL-TBS.40-63 peptide in neural stem cells of new-born rats.** Neurospheres were cultured during 30 minutes in normal condition (black column), in an ATP depleted buffer, at 4°C (A), with 50  $\mu\text{mol/L}$  chlorpromazine, 10  $\mu\text{g/mL}$  PMA, 1 mmol/L DAM, 100 nmol/L wortmannin, 40  $\mu\text{mol/L}$  U0126, 400  $\mu\text{mol/L}$  genistein, 1  $\mu\text{mol/L}$  sunitinib, or 50  $\mu\text{mol/L}$  gefitinib (B). Cells were then incubated in the same conditions with 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled peptide during 30 minutes, and then dissociated before FACS analysis. Results represent the percentage of fluorescent cells when compared to the normal (control) condition.

**Figure 4 : The NFL-TBS.40-63 peptide has no detectable effect on the cell cycle and the viability of neural stem cells.** (A) Neurospheres were treated during 48 hours with increased concentrations of the peptide, or with 1  $\mu\text{g/mL}$  colchicine. After dissociation, cell cycle analysis was performed by PI incorporation and FACS reading. The percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined comparatively with untreated cells (control). \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . (B) Immunocytochemistry of NSC cultured on coated coverslips and incubated with 20  $\mu\text{mol/L}$  FITC labelled peptide (green), was performed to reveal the microtubule network with an anti- $\alpha$ -tubulin

(red). The nuclei were stained with DAPI (blue) and images were taken with an inverted fluorescent microscope Leica (DMI6000) with the Metamorph 7.1.7.0 software. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . (C) Neurospheres were treated for 72 hours with increased concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide, or with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  colchicine. After dissociation, cell viability analysis was performed by AnnexinV/PI staining and FACS reading. The percentage of viable cells was determined comparatively with untreated cells (control). \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 5 : The NFL-TBS.40-63 peptide effects on neural stem cell properties.** To analyse the formation of neurospheres, NSC were incubated during 5-7 days with or without increased concentrations of the peptide or with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  colchicine. The total number of primary neurospheres (A) and the number of adherent primary neurospheres (B) were counted in each condition by microscopy analysis, comparatively to the control condition. (C) Images of the representative morphology of primary neurospheres in each condition were taken with an inverted microscope Leica (DMI6000) and the Metamorph 7.1.7.0 software. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$ . (D) To quantify the PSA-NCAM expression on NSC, neurospheres were treated with or without increased concentrations of the peptide, or with 1% new born calf serum (serum) during 7 days, and the dissociated cells were analysed by FACS after PSA-NCAM labelling. Results represent the percentage of fluorescent cells expressing PSA-NCAM compared to the control condition. (E) To analyse the NSC proliferation, cells were treated with or without increased concentrations of the peptide, or with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  colchicine during 72 hours. Then DNA concentration (ng/mL) was quantified using the CyQUANT cell proliferation assay. Results represent the percentage of DNA concentration compared to the control condition. \*  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ . (F) To analyse the NSC self-renewal, the treated primary neurospheres were dissociated, and the number of secondary neurospheres was counted after 5 days in each condition by microscopy analysis, comparatively to the control condition. \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

**Figure 6: Hypothetic effect of the NFL-TBS.40-63 peptide on the neural stem cells.** In the presence of the peptide the neurosphere formation was not affected whereas the self-renewal capacity was reduced, with increased stem cell attachment and probably increased number of progenitors or differentiated cells.

---

# DISCUSSION GENERALE

---

Les travaux menés au laboratoire portent sur l'étude du cytosquelette, et plus précisément sur la biologie des neurofilaments et sur leurs interactions avec les microtubules, dans des conditions physiologiques normales et pathologiques.

Dans le but d'étudier la biologie des NF, un modèle de souris transgéniques NFH-LacZ a été développé par les Dr. Eyer et Peterson en 1994, par fusion d'une forme tronquée du gène codant pour NFH avec le gène rapporteur Lac-Z, pour donner une protéine de fusion NFH- $\beta$ -galactosidase. Chez ces souris une accumulation anormale des NF a été observée dans le corps cellulaire des neurones, associée à une absence de MT, alors que dans les axones les NF sont absents et le nombre de MT est fortement augmenté. La quantité de tubuline entre les souris contrôles et les souris transgéniques étant inchangée, ces travaux ont suggéré le rôle des NF dans la formation des MT (Eyer et Peterson, 1994). Ces souris transgéniques NFH-LacZ représentent un bon modèle d'étude de la biologie et du rôle des NF dans un contexte comparable à une situation pathologique.

Des études ultérieures ont permis de mettre en évidence l'interaction de la tubuline libre non polymérisée avec chaque sous-unité des NF, ainsi qu'avec d'autres filaments intermédiaires. La tubuline est en effet capable de se fixer sur des sites de fixation localisés sur les extrémités N et C-terminales des FI, appelés domaines TBS pour « Tubulin-Binding Sites ». Ceci a été mis en évidence grâce à une technique de « peptide array » (Bocquet et al., 2009). Ces travaux indiquent que les NF sont de véritables réservoirs de tubuline non polymérisée, et permettent ainsi de réguler la formation des MT.

Parmi les peptides correspondants aux domaines TBS qui ont été analysés, le peptide NFL-TBS.40-63, issu de la sous-unité NFL, a révélé des propriétés de pénétration cellulaire et des effets anti-tumoraux intéressants. Ce peptide est en effet capable d'entrer dans différentes lignées de cellules de gliomes de rat et de souris, et de glioblastomes humains, dans lesquelles il détruit le réseau de MT, inhibe la prolifération et la migration, et induit la mort des cellules par apoptose. En revanche, le peptide entre peu dans les cellules saines de type neurones et astrocytes, et n'a pas d'effet cytotoxique majeur sur ces cellules. De plus, injecté chez des animaux porteurs de gliome le peptide induit une diminution importante du volume tumoral, sans effet cytotoxique notable sur le tissu sain (Bergès et al., 2012a). Le peptide NFL-TBS.40-63 représente ainsi un candidat thérapeutique prometteur pour lutter contre les gliomes, et notamment les glioblastomes qui sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et

les plus agressives, avec une médiane de survie de 14 à 18 mois, et pour lesquelles les traitements actuels manquent d'efficacité et de spécificité.

Les travaux menés par la suite ont permis de mieux caractériser les mécanismes moléculaires responsables de l'entrée du peptide, de mettre en évidence ses effets sur les mitochondries des cellules de glioblastome, et enfin de valoriser l'utilisation du peptide comme agent de ciblage des cellules souches neurales, qui représentent de nouveaux outils thérapeutiques prometteurs pour la médecine réparatrice et pour le traitement des gliomes.

### **1. Entrée sélective du peptide NFL-TBS.40-63**

Des études précédemment réalisées au laboratoire ont montré l'entrée massive du peptide dans les cellules de glioblastome, et une entrée plus faible dans des cellules saines comme les astrocytes et les neurones. *In vivo*, le peptide n'est d'ailleurs retrouvé qu'au sein des cellules tumorales, et non dans le tissu sain d'animaux porteurs de gliome. *In vitro*, l'internalisation se fait de manière dose-dépendante dans les cellules via un mécanisme énergie et température-dépendant, caractéristique de l'endocytose (Bergès et al., 2012a).

Nos travaux ont par la suite permis de clarifier les mécanismes moléculaires responsables de l'entrée sélective du peptide dans les cellules de glioblastome, en se basant sur les mécanismes d'entrée connus d'autres peptides pénétrant, les CPP. Contrairement à ces derniers dont l'entrée dépend d'une balance entre translocation directe et endocytose, l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules de glioblastome est principalement associée aux voies d'endocytose (clathrine et cavéoline-dépendantes, et la macropinocytose). Alors que ces trois voies sont impliquées dans l'entrée du peptide dans les cellules de glioblastome humain, seules l'endocytose dépendante de la clathrine et la macropinocytose permettent l'entrée du peptide dans les cellules de gliomes de rat, et enfin seule la macropinocytose est responsable de l'entrée du peptide dans les astrocytes (1<sup>er</sup> article). De la même façon, il a été montré que le peptide Vim-TBS.58-81, correspondant à un domaine TBS issu de la vimentine, pénètre dans les cellules de glioblastome humain via l'endocytose dépendante de la cavéoline (Balzeau et al., 2012). Un autre peptide, aux effets similaires, a été décrit récemment. Ce peptide de 36 acides aminés, dérivé du venin de scorpion, est connu sous le nom de chlorotoxine ou TM601. Ce peptide a en effet révélé des propriétés anti-tumorales, notamment pour le traitement de glioblastome, mais également des capacités de ciblage sélectif. La chlorotoxine cible

préférentiellement les cellules tumorales, comme les cellules de gliome, plutôt que des cellules saines de type neurones, astrocytes ou fibroblastes. Si la macropinocytose est le mécanisme de transport principal dans les astrocytes et les fibroblastes, la voie d'endocytose clathrine-dépendante est la principale voie d'entrée de la chlorotoxine dans les cellules de gliome (Wiranowska et al., 2011). Il a également été montré que la chlorotoxine se fixe à l'annexine A2 dans de multiples lignées tumorales (Kesavan et al., 2010). Ces travaux suggèrent que l'entrée du peptide chlorotoxine dans les cellules de gliome dépend d'un mécanisme de transport associé à un récepteur, contrairement à son entrée dans les cellules saines (Wiranowska et al., 2011). Cependant, l'identité de ce récepteur n'est pas encore connue.

En outre, l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules de glioblastome nécessite l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la machinerie de l'endocytose, comme les voies PI3K/Akt et MAPK activées par les récepteurs RTK, notamment par l'EGFR (1<sup>er</sup> article). L'activation des RTK permet en effet de réguler divers composants de la machinerie de l'endocytose, comme les phosphoinositides tels que PIP2 et PIP3 (Le Roy et Wrana, 2005; Doherty et McMahon, 2009; Czech, 2000; Raiborg et al., 2013). Dans la plupart des cancers humains de multiples mutations de molécules de signalisation ont été décrites, comme pour l'EGFR qui est le récepteur le plus fréquemment surexprimé dans les glioblastomes (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Des variations de l'expression ou de l'activité des RTK comme l'EGFR altèrent par exemple l'entrée du virus influenza A dans les cellules hôtes (Eierhoff et al., 2010). De récentes études ont montré que moins de 10 % du peptide NFL-TBS.40-63 entre dans les cellules humaines du cancer de la prostate (LNCaP), qui expriment un faible taux d'EGFR (Bergès et al., 2012a ; Bonaccorsi et al., 2007). Au contraire, le peptide entre massivement dans les cellules cancéreuses cervicales HeLa qui expriment un taux élevé d'EGFR (Bergès et al., 2012a ; Nicholson et al., 2001).

Suite à ces résultats, et à la mise en évidence de mécanismes d'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 similaires à ceux de la chlorotoxine, des études en cours au laboratoire visent à identifier un récepteur ou une molécule de surface responsable de l'entrée sélective du peptide dans les cellules de gliome, notamment par des analyses de résonance plasmonique de surface (BIAcore) et de spectrométrie de masse.

En plus de cibler les cellules de glioblastome, le peptide NFL-TBS.40-63 est capable de cibler les CSN *in vitro* et *in vivo*. Injecté dans le ventricule latéral de rat adulte, le peptide cible la SVZ, en pénétrant essentiellement dans la couche épendymaire et une partie dans la couche sous-épendymaire. Des traces du peptide ont également été observées au niveau de la couche épendymaire du 3<sup>ème</sup> ventricule, qui correspondrait à la troisième niche neurogène stable dans le cerveau adulte. Cette zone neurogène sous-ventriculaire hypothalamique du troisième ventricule serait en effet impliquée dans les mécanismes de régulation hypothalamique (Kokoeva et al., 2005 ; Rojczyk-Gołębiewska et al., 2014). *In vitro*, le peptide entre dans les CSN selon un profil similaire aux cellules de glioblastome, de manière dose-dépendante, mais via des mécanismes moléculaires différents. En effet l'internalisation du peptide dans les CSN ne dépend pas d'un transport actif, mais s'effectue de façon passive à travers la membrane plasmique des cellules (3<sup>ème</sup> article).

L'ensemble de ces résultats montre que l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 varie selon le type cellulaire. Dans des cellules tumorales hautement prolifératives sur-exprimant l'EGFR, le peptide entre de façon massive et uniquement par endocytose, alors que dans des cellules qui prolifèrent peu comme les astrocytes, l'entrée du peptide par endocytose est plus faible. En revanche, dans les CSN l'internalisation du peptide ne nécessite pas d'énergie, mais un transport passif à travers la membrane. Il est possible que le peptide interagisse avec des composants membranaires qui diffèrent entre les cellules de glioblastome et les CSN. Une autre piste pour expliquer l'entrée sélective du peptide serait la composition physico-chimique particulière des membranes (phospholipides, sphingolipides, ...), qui serait différente entre ces différentes cellules. Des analyses par résonance plasmonique de surface et par spectrométrie de masse seront entreprises au laboratoire, afin d'identifier les protéines et/ou les lipides membranaires issus des CSN et des cellules de glioblastome qui ont une affinité avec le peptide. Le phénomène de translocation des CPP comme la pénétratine, TAT ou Pep-1, a été décrit grâce à l'utilisation de modèles membranaires (vésicules lipidiques), qui ont permis de révéler que ce transport passif dépend essentiellement de la composition lipidique des membranes, mais aussi de la présence d'un potentiel transmembranaire négatif (Terrone et al., 2003 ; Henriques et Castanho, 2008). En ajoutant un ionophore dépolarisant (la valinomycine) qui engendre un potentiel transmembranaire négatif, Pep-1 peut traverser la membrane vésiculaire, alors qu'un potentiel transmembranaire positif l'empêche (Henriques et Castanho, 2008).



Les capacités de ciblage du peptide en font un candidat thérapeutique prometteur, notamment dans le cas de thérapies utilisant des nanoparticules. En effet, des études menées au laboratoire ont montré que le peptide NFL-TBS.40-63, greffé à la surface de nanocapsules lipidiques (LNC), permet d'augmenter d'environ 50 % l'internalisation des LNC dans les cellules de glioblastome, comparé à des LNC non fonctionnalisées avec le peptide. Lorsque ces LNC contenant du paclitaxel sont testées sur des cellules de glioblastome, la viabilité des cellules tumorales est diminuée *in vitro*, et *in vivo* sur un modèle de souris porteuses de gliome, avec un volume tumoral réduit respectivement de 60 % et 75 %, pour les LNC non fonctionnalisées et les LNC fonctionnalisées avec le peptide (Balzeau et al., 2013). De la même façon, des travaux ont montré les effets anti-tumoraux prometteurs de liposomes fonctionnalisés avec TAT et remplis de paclitaxel (Niu et al., 2011). Comme pour les CPP, le peptide NFL-TBS.40-63 est capable d'améliorer la délivrance de nanovecteurs dans les cellules. Des études en cours au laboratoire s'intéressent à la capacité de ciblage des CSN par des nanoparticules fonctionnalisées avec le peptide. Ce peptide, comme les CPP, représente donc un nouveau système pour délivrer de façon plus efficace et ciblée diverses molécules thérapeutiques. De plus, la capacité du peptide NFL-TBS.40-63 à cibler les CSN *in vitro* et *in vivo* en fait un candidat prometteur pour délivrer des molécules thérapeutiques dans ces cellules, et développer de nouvelles stratégies, visant à augmenter la mobilisation des CSN dans le cas de médecine régénératrice du système nerveux, et de traitements anti-tumoraux de gliome malins.

## **2. Spécificité d'action du peptide NFL-TBS.40-63**

Des études menées au laboratoire ont montré la capacité du peptide NFL-TBS.40-63 à détruire le réseau de MT de cellules de glioblastome, et ainsi à réduire la prolifération et la viabilité de ces cellules. Injecté chez des animaux porteurs de gliome, le peptide permet de réduire considérablement le volume de la tumeur sans affecter le tissu sain (Bergès et al., 2012a).

Contrairement aux effets observés sur les cellules de glioblastome, les travaux menés sur les CSN ont révélé que le peptide ne perturbe ni le réseau de MT, ni le cycle cellulaire, ni la viabilité de ces cellules (3<sup>ème</sup> article ; Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a). Les mêmes observations ont été faites sur les cellules cancéreuses cervicales HeLa, les cellules cancéreuses du cortex surrénal SW13, les fibroblastes NIH3T3, et les astrocytes, dans

lesquelles le peptide n'a pas d'effet sur le réseau de MT (Bergès et al., 2012a ; Bergès et al., 2012b). En revanche, le peptide est capable d'altérer le réseau de MT d'autres lignées de cellules cancéreuses, comme les cellules MCF-7 du cancer du sein, les cellules LNCaP du cancer de la prostate, les cellules NGP de neuroblastome, et les cellules LS187 du cancer colorectal (Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a).

L'ensemble de ces résultats suggère que le peptide agit sur un isotype de tubuline spécifique ou surexprimé dans certains types cellulaires. L'une des cibles potentielles est la  $\beta$ III-tubuline, qui est principalement exprimée par les neurones, et qui est surexprimée de façon ectopique dans différents types de cellules tumorales, comme les cellules de glioblastome, les cellules du cancer du sein et les cellules de neuroblastomes, dans lesquelles le peptide a un effet (Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a ; Katsetos et al., 2003 ; Leandro-Garcia et al., 2010). En revanche, dans les cellules SW13, les astrocytes et les CSN, la  $\beta$ III-tubuline n'est pas exprimée et le peptide n'a pas d'effet (3<sup>ème</sup> article ; Bergès et al., 2012a ; Bergès et al., 2012b ; Rieske et al., 2005 ; Nakamura et al., 2003). De plus, des taux élevés de modifications post-translationnelles de la  $\beta$ III-tubuline, par phosphorylation et glycosylation, sont associés à la chimiorésistance de certaines cellules tumorales (Cicchillitti et al., 2008). Ceci pourrait expliquer la spécificité d'action du peptide pour certains types de cellules cancéreuses.

Dans cette même optique, l'estramustine, une molécule anti-tumorale dérivée de l'oestradiol et utilisée en traitement de seconde intention pour les cancers prostatiques, possède des propriétés semblables au peptide en ciblant préférentiellement les cellules de glioblastomes et en altérant leur MT. Son action antiproliférative n'a pas été observée sur les astrocytes (Piepmeier et al., 1996). Le site de fixation de l'estramustine sur la tubuline est distinct de ceux de la colchicine et de la vinblastine, alors qu'il est semblable à celui du paclitaxel. Cette même étude a montré que la  $\beta$ III-tubuline a une plus faible affinité pour l'estramustine comparé aux autres isotypes de tubuline  $\beta$  (Laing et al., 1997).

En vue de ces différents résultats, des études sont en cours au laboratoire pour mettre en évidence l'isotype de tubuline qui a le plus d'affinité pour le peptide, par des techniques de résonance plasmonique de surface et de protéomique par électrophorèse bidimensionnelle. De la même façon, le site de fixation du peptide sur la tubuline sera déterminé par analyse compétitive avec d'autres drogues du cytosquelette dont le site de fixation est connu (colchicine, vinblastine, paclitaxel, épothilone, laulimalide) (Liu et al., 2014).

Le peptide NFL-TBS.40-63 dérive de la sous-unité NFL des NF qui, de façon endogène, servent de réservoir de tubuline libre non polymérisée pour réguler la dynamique des MT (Bocquet et al., 2009). Or la sous-unité NFL est également capable d'interagir avec des molécules responsables de la dynamique mitochondriale (Gentil et al., 2012). De plus, il a été montré que la tubuline régule le métabolisme mitochondrial en modulant le potentiel de membrane des mitochondries (Katsetos et al., 2013). Il a donc été évident d'étudier les éventuels effets du peptide sur la biologie et la dynamique des mitochondries de cellules de glioblastome. Les résultats obtenus montrent la capacité du peptide à altérer la biogenèse et la fonction des mitochondries des cellules de glioblastome humain. Il engendre en effet une réduction directe de la respiration mitochondriale. Pour de faibles concentrations (< 10 µmol/L), le peptide est capable d'altérer la respiration résiduelle des mitochondries. Cependant, au dessus de 10 µmol/L le peptide perturbe la respiration mitochondriale globale (forme résiduelle et forme majoritaire) et détruit le réseau de MT (2<sup>ème</sup> article ; Bocquet et al., 2009 ; Bergès et al., 2012a). Des travaux récents ont montré que les NF régulent la motilité mitochondriale. Dans des motoneurons de souris transgéniques *NEFL* *-/-* (n'exprimant pas de NF), la motilité des mitochondries est augmentée (Gentil et al., 2012). D'autres FI peuvent interagir directement avec les mitochondries, comme la vimentine, pour réguler la motilité des mitochondries. Cette interaction se fait directement via un site situé sur le domaine N-terminal de la vimentine. Le peptide correspondant à cette séquence, et situé entre les acides aminés 41 à 94, est capable de s'associer aux mitochondries dans des cellules qui n'expriment pas de vimentine (Nekrasova et al., 2011). De la même façon, nous avons montré que le peptide NFL-TBS.40-63, également issu du domaine N-terminal des NF, réduit la motilité mitochondriale (2<sup>ème</sup> article). L'ensemble de ces travaux suggèrent que le peptide interagit de façon directe ou indirecte avec les mitochondries pour moduler leur dynamique. Une hypothèse serait que le peptide interagisse avec la tubuline exprimée au niveau de la membrane des mitochondries qui régule la perméabilité membranaire (Katsetos et al., 2013).

Le peptide NFL-TBS.40-63 entraîne également une diminution de l'expression de protéines constituant la chaîne respiratoire des mitochondries, et une altération de la régulation transcriptionnelle des mitochondries, comme le facteur de transcription NRF-1 et des miRNA associés au développement des glioblastomes (2<sup>ème</sup> article).

Les miRNA qui régulent négativement l'expression de gènes sont souvent altérés dans les tumeurs. Une sous-expression de miRNA suppresseurs de tumeurs ou une surexpression de miRNA oncogènes favorisent le développement tumoral en augmentant notamment la prolifération, la migration et la survie des cellules tumorales (Esquela-Kerscher et Slack,

2006). Dans le cas des glioblastomes, l'expression de nombreux miRNA est altérée, telle que celle de miR-21, miR-96, miR-221, miR-100, miR-125a, miR-146b, miR-181b et miR-218 (Karsy et al., 2012 ; Yan et al., 2014 ; Alrfaei et al., 2013 ; Shi et al., 2008). De manière intéressante, l'effet du peptide sur les cellules de glioblastome entraîne une réduction significative de l'expression des oncogènes miR-21, miR-96 et miR-221, permettant ainsi de rétablir l'expression de leurs gènes cibles, comme *PTEN* et *NAIP* contrôlés respectivement par miR-21 et miR-221. De façon surprenante, l'expression de miR-218, un miRNA suppresseur de tumeur, est également diminuée en présence du peptide (2ème article ; Zhang et al., 2010 ; Lukiw et al., 2009).

Des études ont mis en avant le rôle des MT dans la dynamique de compartiments cellulaires cytoplasmiques contenant les miRNA, et appelés « P-bodies » (« processing-bodies »). Ces « P-bodies » s'associent notamment avec les mitochondries via un réseau intact de MT, pour faciliter l'échange de miRNA. D'après ces résultats, il est possible que la destruction des MT et l'altération des mitochondries par le peptide, dans les cellules de glioblastome, perturbe le transfert des miRNA et par conséquent leurs gènes cibles (Huang et al., 2011 ; Bandiera et al., 2013).

Le peptide NFL-TBS.40-63, qui ne perturbe pas le réseau de MT des CSN, a néanmoins des effets sur les propriétés cellulaires spécifiques aux CSN. La capacité de ces cellules à former des neurosphères n'est pas altérée en présence de peptide, cependant celui-ci réduit de façon significative leur auto-renouvellement, suggérant une diminution du nombre de CSN. Cet effet du peptide est associé à un accroissement de l'adhérence des neurosphères et à une diminution de la prolifération et de l'expression de PSA-NCAM. Cette molécule caractérise en effet la croissance des CSN en limitant leur adhérence (Johnson et al., 2005). PSA-NCAM module l'adhérence cellulaire induite notamment par les cadhérines et les intégrines (Fujimoto et al., 2001). Une étude récente a également montré une augmentation de l'adhérence de cellules souches mésenchymateuses lors de l'activation de la protéine kinase C, et via l'expression de la « focal adhesion kinase », de différentes protéines associées au cytosquelette et des intégrines (Song et al., 2013). De la même façon, il serait intéressant d'analyser l'expression de ces différentes protéines dans les CSN traitées avec le peptide.

L'ensemble de ces résultats suggère également qu'en présence de peptide les CSN se différencient en progéniteurs ou cellules différenciées adhérentes, qui perdent les caractéristiques propres aux CSN (auto-renouvellement, prolifération) (3ème article). Pour

confirmer cette hypothèse, l'expression de marqueurs spécifiques aux progéniteurs/cellules différenciées peut être analysée, comme l'expression de la  $\beta$ III-tubuline, de la GFAP et de Olig2 qui sont exprimés par les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes respectivement (Hamilton et al., 2009).

L'ensemble de ces travaux indique que le peptide NFL-TBS.40-63 est un agent thérapeutique prometteur, capable de cibler de façon sélective et d'agir de façon spécifique sur certains types cellulaires, comme les CSN et les cellules de glioblastome. Dans la continuité de ce travail, des études sont en cours au laboratoire pour étudier l'entrée et les effets de ce peptide sur des cellules souches de glioblastome, dans le but de lutter efficacement contre les glioblastomes et d'éviter la récurrence tumorale.

### **3. Conclusion générale : Le peptide NFL-TBS.40-63 comme agent thérapeutique et outil de ciblage des cellules de glioblastome et des cellules souches neurales.**

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse montrent que le peptide NFL-TBS.40-63 est un candidat thérapeutique prometteur, capable de cibler sélectivement, seul ou couplé à des nanoparticules, différents types cellulaires cibles, comme les cellules de glioblastome et les CSN, alors qu'il entre peu voire pas dans des cellules saines de type neurones ou astrocytes.

Couplé à des nanoparticules, le peptide favorise leur délivrance intracellulaire et ainsi augmente indirectement l'effet thérapeutique de l'agent contenu dans les nanoparticules.

Utilisé seul, le peptide a des effets spécifiques sur différents types de cancers, comme les glioblastomes, et sur les CSN qui offrent de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes.

Ce peptide serait une alternative aux traitements actuels qui manquent d'efficacité et de spécificité pour lutter contre les glioblastomes, et permettrait d'augmenter la réparation tissulaire après neurodégénérescence ou lésion cérébrale, en favorisant la mobilisation des CSN.

*" De toutes les sciences que  
l'Homme peut et doit savoir,  
la principale, c'est la science  
de vivre de manière  
à faire le moins de mal  
et le plus de bien possible."*

Léon Tolstoï

---

# ANNEXES

---

## Annexe 1 : Liste des figures

- Figure 1, p.16 :** Organisation et structure des différents constituants du cytosquelette.
- Figure 2, p.17 :** Formation des microfilaments par différentes étapes de polymérisation de l'actine (A) puis par le phénomène de « tapis roulant » ou « treadmilling » (B).
- Figure 3, p.18 :** Organisation des éléments du cytosquelette dans le cône de croissance.
- Figure 4, p.20 :** Dynamique des microtubules.
- Figure 5, p.23 :** Modifications post-translacionnelles des dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sur leur domaine C-terminal (à l'exception de l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline sur le domaine N-terminal).
- Figure 6, p.26 :** Composants clés du fuseau mitotique.
- Figure 7, p.29 :** Structure des filaments intermédiaires.
- Figure 8, p.29 :** Assemblage des filaments intermédiaires.
- Figure 9, p.30 :** Modifications post-traductionnelles ciblant les différents domaines des filaments intermédiaires.
- Figure 10, p.34 :** Représentation schématique des différentes sous-unités des neurofilaments (NFL, NFM et NFH), chez la souris, le rat et l'Homme.
- Figure 11, p.34 :** Neurofilaments.
- Figure 12, p.35 :** Agrégation de neurofilaments dans le corps cellulaire d'un neurone dans des conditions pathologiques, comparé à un neurone normal.
- Figure 13, p.36 :** Structure des différents isotypes de GFAP.
- Figure 14, p.37 :** Structure de la nestine.
- Figure 15, p.41 :** Représentation des plaques d'amyloïdes et des NFT de neurones dans le cas de la maladie d'Alzheimer, comparé aux neurones dans un tissu sain.
- Figure 16, p.43 :** Expression de la GFAP dans des cellules SW13vim- transfectées avec un vecteur exprimant la forme sauvage de la GFAP humain (wild-type) ou une forme mutée de la GFAP (p.Asp417Ala) identifiée chez des patients atteints de la maladie d'Alexander.
- Figure 17, p.51 :** Localisation des tumeurs du système nerveux central selon différentes régions cérébrales.
- Figure 18, p.53 :** Distribution des gliomes selon les données de CBTRUS entre 2005 et 2009.
- Figure 19, p.54 :** Coupe axiale d'un patient atteint d'un glioblastome dans le lobe temporal droit, mis en évidence par IRM.
- Figure 20, p.59 :** Voies de signalisation majeures impliquées dans la genèse des glioblastomes.
- Figure 21, p.60 :** Métabolisme mitochondrial entre une cellule cancéreuse et une cellule saine.
- Figure 22, p.61 :** Régulation par les miRNA des voies de signalisation impliquées dans le métabolisme mitochondrial.
- Figure 23, p.62 :** Représentation schématique du blocage de VDAC par la tubuline libre.
- Figure 24, p.63 :** IRM avant et après craniotomie et résection d'un glioblastome situé à proximité de régions motrices (zones colorées).
- Figure 25, p.65 :** Cellules embryonnaires (ESC) pluripotentes et cellules souches neurales (CSN) multipotentes.
- Figure 26, p.67 :** Régions neurogéniques de la moelle épinière et du cerveau de mammifère adulte.
- Figure 27, p.68 :** Divisions symétriques et asymétriques des cellules souches neurales.
- Figure 28, p.68 :** Caractéristiques des cellules souches neurales.
- Figure 29, p.70 :** Composition et organisation cellulaire de la zone sous-ventriculaire de mammifère adulte.



- Figure 30, p.71 :** Marqueurs spécifiques des différents types de cellules de la zone sous-ventriculaire.
- Figure 31, p.72 :** Facteurs de transcription impliqués dans l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales.
- Figure 32, p.73 :** Rôles des molécules d'adhérence sur l'auto-renouvellement, la différenciation, la migration et la survie des cellules souches neurales.
- Figure 33, p.76 :** Migration de progéniteurs de la zone sous-ventriculaire vers le site lésionnel cortical.
- Figure 34, p.78 :** Illustration de l'activation de la zone sous-ventriculaire dans le cas de sclérose en plaques.
- Figure 35, p.81 :** Origine des cellules souches de glioblastome et thérapies des glioblastomes.
- Figure 36, p.82 :** Tropisme des cellules souches neurales vers la tumeur.
- Figure 37, p.84 :** Modèles de translocation directe des CPP à travers la membrane plasmique: micelle inversée, pore membranaire transitoire, modèles de Barrel-Save et de Carpet.
- Figure 38, p.85 :** Voies d'endocytose impliquées dans l'entrée des CPP et les différents inhibiteurs et marqueurs spécifiques.
- Figure 39, p.86 :** Exemple de voies de signalisation régulant la machinerie de l'endocytose et sites d'action des inhibiteurs spécifiques de ces voies.
- Figure 40, p.90 :** Principe de la technique de « peptide array ».
- Figure 41, p.91 :** Localisation des sites de fixation de la tubuline libre (TBS) sur différents filaments intermédiaires, et de deux peptides correspondants, Vim-TBS.58-81 et NFL-TBS.40-63.
- Figure 42, p.91 :** Représentation schématique des effets du peptide NFL-TBS.40-63 sur la polymérisation des microtubules.
- Figure 43, p.93 :** Internalisation du peptide NFL-TBS.40-63 et effet sur le réseau de microtubules, dans des cellules de gliome F98 et des cellules saines de rat.
- Figure 44, p.94 :** Repléments suggérés du peptide NFL-TBS.40-63.
- Figure 45, p.96 :** Etudes in vivo du peptide NFL-TBS.40-63 injecté seul ou couplé à des nanoparticules remplies d'un agent anti-cancéreux chez des animaux porteurs de gliome.
- Figure 46, p.145 :** Mise en culture des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire.

## **Annexe 2 : Liste des tableaux**

- Tableau 1, p.21 :** Isotypes des tubulines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et gènes codant.
- Tableau 2, p.22 :** Modifications post-translationnelles de la tubuline.
- Tableau 3, p.27 :** Les principaux agents ciblant la tubuline.
- Tableau 4, p.32 :** Principales protéines associées aux filaments intermédiaires (IFAP).
- Tableau 5, p.46 :** Maladies neurodégénératives et filaments intermédiaires associés.
- Tableau 6, p.49 :** Neurofilaments et GFAP comme biomarqueurs de maladies neurodégénératives.
- Tableau 7, p.52 :** Classification histologique des tumeurs du système nerveux central selon l'OMS.
- Tableau 8, p.56 :** Filaments intermédiaires comme biomarqueurs de gliomes.
- Tableau 9, p.89 :** Caractéristiques de quelques CPP utilisés comme système de délivrance.

---

# REFERENCES

---

# | A |

- Abdo, W.F., Bloem, B.R., Van Geel, W.J., Esselink, R.A., Verbeek, M.M., 2007. CSF neurofilament light chain and tau differentiate multiple system atrophy from Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 28, 742-747.
- Aboody, K.S., Najbauer, J., Metz, M.Z., D'Apuzzo, M., Gutova, M., Annala, A.J., Synold, T.W., Couture, L.A., Blanchard, S., Moats, R.A., Garcia, E., Aramburo, S., Valenzuela, V.V., Frank, R.T., Barish, M.E., Brown, C.E., Kim, S.U., Badie, B., Portnow, J., 2013. Neural stem cell-mediated enzyme/prodrug therapy for glioma: preclinical studies. *Sci Transl Med* 5, 184ra159.
- Aguirre, A., Rubio, M.E., Gallo, V., 2010. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 467, 323-327.
- Ahmed, S., Gan, H.T., Lam, C.S., Poonepalli, A., Ramasamy, S., Tay, Y., Tham, M., Yu, Y.H., 2009. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adh Migr* 3, 412-424.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., 2002. *The Self-Assembly and Dynamic Structure of Cytoskeletal Filaments*, Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. En ligne : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26862> (consulté le 02.10.14).
- Aldape, K., Burger, P.C., Perry, A., 2007. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med* 131, 242-251.
- Alrfaei, B.M., Vemuganti, R., Kuo, J.S., 2013. microRNA-100 targets SMRT/NCOR2, reduces proliferation, and improves survival in glioblastoma animal models. *PLoS One* 8, e80865.
- Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.
- Altman, J., 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137, 433-457.
- Alvarez-Buylla, A., Seri, B., Doetsch, F., 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 57, 751-758.
- Alves, I.D., Jiao, C.Y., Aubry, S., Aussedat, B., Burlina, F., Chassaing, G., Sagan, S., 2010. Cell biology meets biophysics to unveil the different mechanisms of penetratin internalization in cells. *Biochim Biophys Acta* 1798, 2231-2239.
- Amand, H.L., Bostrom, C.L., Lincoln, P., Norden, B., Esbjorner, E.K., 2011. Binding of cell-penetrating penetratin peptides to plasma membrane vesicles correlates directly with cellular uptake. *Biochim Biophys Acta* 1808, 1860-1867.
- Aroui, S., Ram, N., Appaix, F., Ronjat, M., Kenani, A., Pirollet, F., De Waard, M., 2009. Maurocalcine as a non toxic drug carrier overcomes doxorubicin resistance in the cancer cell line MDA-MB 231. *Pharm Res* 26, 836-845.
- Axelsson, M., Malmstrom, C., Nilsson, S., Haghghi, S., Rosengren, L., Lycke, J., 2011. Glial fibrillary acidic protein: a potential biomarker for progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 258, 882-888.
- Ayuso-Sacido, A., Roy, N.S., Schwartz, T.H., Greenfield, J.P., Boockvar, J.A., 2008. Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery* 62, 223-229; discussion 229-231.

## | B |

- Balzeau, J., Peterson, A., Eyer, J., 2012. The vimentin-tubulin binding site peptide (Vim-TBS.58-81) crosses the plasma membrane and enters the nuclei of human glioma cells. *Int J Pharm* 423, 77-83.
- Balzeau, J., Pinier, M., Berges, R., Saulnier, P., Benoit, J.P., Eyer, J., 2013. The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials* 34, 3381-3389.
- Bancher, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Wisniewski, H.M., 1989. An antigenic profile of Lewy bodies: immunocytochemical indication for protein phosphorylation and ubiquitination. *J Neuropathol Exp Neurol* 48, 81-93.
- Bandiera, S., Mategot, R., Girard, M., Demongeot, J., Henrion-Caude, A., 2013. MitomiRs delineating the intracellular localization of microRNAs at mitochondria. *Free Radic Biol Med* 64, 12-19.
- Bang, M.L., Gregorio, C., Labeit, S., 2002. Molecular dissection of the interaction of desmin with the C-terminal region of nebulin. *J Struct Biol* 137, 119-127.
- Barami, K., Sloan, A.E., Rojiani, A., Schell, M.J., Staller, A., Brem, S., 2009. Relationship of gliomas to the ventricular walls. *J Clin Neurosci* 16, 195-201.
- Barrey, E., Saint-Auret, G., Bonnamy, B., Damas, D., Boyer, O., Gidrol, X., 2011. Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One* 6, e20220.
- Basso, M., Giraud, S., Corpillo, D., Bergamasco, B., Lopiano, L., Fasano, M., 2004. Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* 4, 3943-3952.
- Beck, S., Jin, X., Yin, J., Kim, S.H., Lee, N.K., Oh, S.Y., Jin, X., Kim, M.K., Kim, E.B., Son, J.S., Kim, S.C., Nam, D.H., Kim, S.H., Kang, S.K., Kim, H., Choi, Y.J., 2011. Identification of a peptide that interacts with Nestin protein expressed in brain cancer stem cells. *Biomaterials* 32, 8518-8528.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., Beckers, J., Yoder, B., Irmeler, M., Gotz, M., 2010. In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 744-758.
- Bellin, R.M., Sernett, S.W., Becker, B., Ip, W., Huiatt, T.W., Robson, R.M., 1999. Molecular characteristics and interactions of the intermediate filament protein synemin. Interactions with alpha-actinin may anchor synemin-containing heterofilaments. *J Biol Chem* 274, 29493-29499.
- Berges, R., Balzeau, J., Peterson, A.C., Eyer, J., 2012a. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol Ther* 20, 1367-1377.
- Berges, R., Balzeau, J., Takahashi, M., Prevost, C., Eyer, J., 2012b. Structure-function analysis of the glioma targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light neurofilament subunit. *PLoS One* 7, e49436.
- Bian Shan, 2013. Cell Adhesion Molecules in Neural Stem Cell and Stem Cell- Based Therapy for Neural Disorders, *Neural Stem Cells - New Perspectives*, Dr. Luca Bonfanti (Ed.), ISBN: 978-953-51-1069-9, InTech, DOI: 10.5772/55136. En ligne : <http://www.intechopen.com/books/neural-stem-cells-new-perspectives/cell-adhesion-molecules-in-neural-stem-cell-and-stem-cell-based-therapy-for-neural-disorders> (consulté le 02.10.2014).

- Binder, L.I., Frankfurter, A., Rebhun, L.I., 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101, 1371-1378.
- Bocquet, A., Berges, R., Frank, R., Robert, P., Peterson, A.C., Eyer, J., 2009. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci* 29, 11043-11054.
- Boland, M.L., Chourasia, A.H., Macleod, K.F., 2013. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol* 3, 292.
- Bomont, P., Cavalier, L., Blondeau, F., Ben Hamida, C., Belal, S., Tazir, M., Demir, E., Topaloglu, H., Korinthenberg, R., Tuysuz, B., Landrieu, P., Hentati, F., Koenig, M., 2000. The gene encoding gigaxonin, a new member of the cytoskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy. *Nat Genet* 26, 370-374.
- Bonaccorsi, L., Nosi, D., Muratori, M., Formigli, L., Forti, G., Baldi, E., 2007. Altered endocytosis of epidermal growth factor receptor in androgen receptor positive prostate cancer cell lines. *J Mol Endocrinol* 38, 51-66.
- Boylan, K.B., Glass, J.D., Crook, J.E., Yang, C., Thomas, C.S., Desaro, P., Johnston, A., Overstreet, K., Kelly, C., Polak, M., Shaw, G., 2013. Phosphorylated neurofilament heavy subunit (pNF-H) in peripheral blood and CSF as a potential prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 467-472.
- Brenner, M., Johnson, A.B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J.E., Messing, A., 2001. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27, 117-120.
- Brettschneider, J., Petzold, A., Sussmuth, S.D., Landwehrmeyer, G.B., Ludolph, A.C., Kassubek, J., Tumani, H., 2006. Neurofilament heavy-chain NfH(SMI35) in cerebrospinal fluid supports the differential diagnosis of Parkinsonian syndromes. *Mov Disord* 21, 2224-2227.
- Brommeland, T., Rosengren, L., Fridlund, S., Hennig, R., Isaksen, V., 2007. Serum levels of glial fibrillary acidic protein correlate to tumour volume of high-grade gliomas. *Acta Neurol Scand* 116, 380-384.
- Brownlees, J., Ackerley, S., Grierson, A.J., Jacobsen, N.J., Shea, K., Anderton, B.H., Leigh, P.N., Shaw, C.E., Miller, C.C., 2002. Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport. *Hum Mol Genet* 11, 2837-2844.

## I C I

- Cagalinec, M., Safiulina, D., Liiv, M., Liiv, J., Choubey, V., Wareski, P., Veksler, V., Kaasik, A., 2013. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *J Cell Sci* 126, 2187-2197.
- Cairns, N.J., Zhukareva, V., Uryu, K., Zhang, B., Bigio, E., Mackenzie, I.R., Gearing, M., Duyckaerts, C., Yokoo, H., Nakazato, Y., Jaros, E., Perry, R.H., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2004. alpha-internexin is present in the pathological inclusions of neuronal intermediate filament inclusion disease. *Am J Pathol* 164, 2153-2161.
- Carden, M.J., Trojanowski, J.Q., Schlaepfer, W.W., Lee, V.M., 1987. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci* 7, 3489-3504.

- Cardoso, A.M., Trabulo, S., Cardoso, A.L., Maia, S., Gomes, P., Jurado, A.S., Pedroso de Lima, M.C., 2013. Comparison of the Efficiency of Complexes Based on S4-PV Cell-Penetrating Peptides in Plasmid DNA and siRNA Delivery. *Mol Pharm*.
- Carlier, M.F., 1991. Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* 266, 1-4.
- Chen, P.C., Hayashi, M.A., Oliveira, E.B., Karpel, R.L., 2012. DNA-interactive properties of crotamine, a cell-penetrating polypeptide and a potential drug carrier. *PLoS One* 7, e48913.
- Chen, Y.S., Lim, S.C., Chen, M.H., Quinlan, R.A., Perng, M.D., 2011. Alexander disease causing mutations in the C-terminal domain of GFAP are deleterious both to assembly and network formation with the potential to both activate caspase 3 and decrease cell viability. *Exp Cell Res* 317, 2252-2266.
- Cheng, L.C., Pastrana, E., Tavazoie, M., Doetsch, F., 2009. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci* 12, 399-408.
- Chung, B.M., Rotty, J.D., Coulombe, P.A., 2013. Networking galore: intermediate filaments and cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 25, 600-612.
- Cicchillitti, L., Penci, R., Di Michele, M., Filippetti, F., Rotilio, D., Donati, M.B., Scambia, G., Ferlini, C., 2008. Proteomic characterization of cytoskeletal and mitochondrial class III beta-tubulin. *Mol Cancer Ther* 7, 2070-2079.
- Cimini, A., Ippoliti, R., 2011. Innovative Therapies against Human Glioblastoma Multiforme. *ISRN Oncol* 2011, 787490.
- Clairembault, T., Kamphuis, W., Leclair-Visonneau, L., Rolli-Derkinderen, M., Coron, E., Neunlist, M., Hol, E.M., Derkinderen, P., 2014. Enteric GFAP expression and phosphorylation in Parkinson's disease. *J Neurochem* 130, 805-815.
- Cochard, P., Paulin, D., 1984. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci* 4, 2080-2094.
- Conde, C., Caceres, A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319-332.
- Constantinescu, R., Holmberg, B., Rosengren, L., Corneliussen, O., Johnels, B., Zetterberg, H., 2011. Light subunit of neurofilament triplet protein in the cerebrospinal fluid after subthalamic nucleus stimulation for Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 124, 206-210.
- Cooper, J.A., 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105, 1473-1478.
- Corbo, M., Hays, A.P., 1992. Peripherin and neurofilament protein coexist in spinal spheroids of motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 51, 531-537.
- Coronas, V., 2009. Endogenous regulation of neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9, 110-118.
- Correia, I., Chu, D., Chou, Y.H., Goldman, R.D., Matsudaira, P., 1999. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol* 146, 831-842.
- Coskun, V., Wu, H., Blanchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J.C., Hutnick, L., Krueger, R.C., Jr., Fan, G., de Vellis, J., Sun, Y.E., 2008. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1026-1031.
- Crombez, L., Aldrian-Herrada, G., Konate, K., Nguyen, Q.N., McMaster, G.K., Brasseur, R., Heitz, F., Divita, G., 2009a. A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol Ther* 17, 95-103.

- Crombez, L., Morris, M.C., Dufort, S., Aldrian-Herrada, G., Nguyen, Q., Mc Master, G., Coll, J.L., Heitz, F., Divita, G., 2009b. Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acids Res* 37, 4559-4569.
- Czech, M.P., 2000. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell* 100, 603-606.
- Czosnek, H., Soifer, D., Wisniewski, H.M., 1980. Studies on the biosynthesis of neurofilament proteins. *J Cell Biol* 85, 726-734.

## | D |

- Davidson, T.J., Harel, S., Arboleda, V.A., Prunell, G.F., Shelanski, M.L., Greene, L.A., Troy, C.M., 2004. Highly efficient small interfering RNA delivery to primary mammalian neurons induces MicroRNA-like effects before mRNA degradation. *J Neurosci* 24, 10040-10046.
- Deng, Y., Li, B., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Brandt, R., Gong, C.X., 2008. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *Faseb J* 22, 138-145.
- Dequen, F., Bomont, P., Gowing, G., Cleveland, D.W., Julien, J.P., 2008. Modest loss of peripheral axons, muscle atrophy and formation of brain inclusions in mice with targeted deletion of gigaxonin exon 1. *J Neurochem* 107, 253-264.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A., 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269, 10444-10450.
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., Prochiantz, A., 1996. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271, 18188-18193.
- Deshayes, S., Heitz, A., Morris, M.C., Charnet, P., Divita, G., Heitz, F., 2004. Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. *Biochemistry* 43, 1449-1457.
- Deshayes, S., Plenat, T., Charnet, P., Divita, G., Molle, G., Heitz, F., 2006. Formation of transmembrane ionic channels of primary amphipathic cell-penetrating peptides. Consequences on the mechanism of cell penetration. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1846-1851.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999a. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999b. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11619-11624.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857-902.
- Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., Kruchko, C., 2012. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5, v1-49.

- Drewes, G., Ebnet, A., Mandelkow, E.M., 1998. MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* 23, 307-311.
- Duchardt, F., Fotin-Mlecsek, M., Schwarz, H., Fischer, R., Brock, R., 2007. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 8, 848-866.
- Ducray, F., Mokhtari, K., Criniere, E., Idhahbi, A., Marie, Y., Dehais, C., Paris, S., Carpentier, C., Dieme, M.J., Adam, C., Hoang-Xuan, K., Duyckaerts, C., Delattre, J.Y., Sanson, M., 2011. Diagnostic and prognostic value of alpha internexin expression in a series of 409 gliomas. *Eur J Cancer* 47, 802-808.
- Durand, K.S., Guillaudeau, A., Weinbreck, N., DeArmas, R., Robert, S., Chaunavel, A., Pommepuy, I., Bourthoumieu, S., Caire, F., Sturtz, F.G., Labrousse, F.J., 2010. 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol* 23, 619-628.
- Durand, K., Guillaudeau, A., Pommepuy, I., Mesturoux, L., Chaunavel, A., Gadeaud, E., Porcheron, M., Moreau, J.J., Labrousse, F., 2011. Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p, 19q, 10p and 10q status. *J Clin Pathol* 64, 793-801.
- Dutcher, S.K., 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol* 13, 49-54.
- Dutcher, S.K., 2003. Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily. *Curr Opin Microbiol* 6, 634-640.

## | E |

- Eierhoff, T., Hrinicius, E.R., Rescher, U., Ludwig, S., Ehrhardt, C., 2010. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog* 6, e1001099.
- Elmqvist, A., Lindgren, M., Bartfai, T., Langel, U., 2001. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* 269, 237-244.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Eriste, E., Kurrikoff, K., Suhorutsenko, J., Oskolkov, N., Copolovici, D.M., Jones, S., Laakkonen, P., Howl, J., Langel, U., 2013. Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2. *Bioconjug Chem* 24, 305-313.
- Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343, 1350-1354.
- Esteve, E., Mabrouk, K., Dupuis, A., Smida-Rezgui, S., Altafaj, X., Grunwald, D., Platel, J.C., Andreotti, N., Marty, I., Sabatier, J.M., Ronjat, M., De Waard, M., 2005. Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem* 280, 12833-12839.
- Etienne-Manneville, S., 2013. Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29, 471-499.



- Eyer, J., Peterson, A., 1994. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12, 389-405.
- Eyer, J., Cleveland, D.W., Wong, P.C., Peterson, A.C., 1998. Pathogenesis of two axonopathies does not require axonal neurofilaments. *Nature* 391, 584-587.

## | F |

- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeub, M., Rochat, H., Allen, P.D., Pessah, I.N., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2000. Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett* 469, 179-185.
- Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., Quilichini, B., Maues De Paula, A., Fernandez, C., Bouvier, C., 2008. [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev Neurol (Paris)* 164, 505-515.
- Figlewicz, D.A., Krizus, A., Martinoli, M.G., Meininger, V., Dib, M., Rouleau, G.A., Julien, J.P., 1994. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3, 1757-1761.
- Frankel, A.D., Pabo, C.O., 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.
- Fressinaud, C., 2005. Repeated injuries dramatically affect cells of the oligodendrocyte lineage: effects of PDGF and NT-3 in vitro. *Glia* 49, 555-566.
- Fressinaud, C., Dubas, F., 2011. Axon cytoskeleton ultrastructure in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve* 44, 332-339.
- Fressinaud, C., Eyer, J., 2013. Axoskeletal proteins prevent oligodendrocyte from toxic injury by upregulating survival, proliferation, and differentiation in vitro. *Neurochem Int* 62, 306-313.
- Fressinaud, C., Eyer, J., 2014. Neurofilament-tubulin binding site peptide NFL-TBS.40-63 increases the differentiation of oligodendrocytes in vitro and partially prevents them from lysophosphatidyl choline toxicity. *J Neurosci Res* 92, 243-253.
- Fujimoto, I., Bruses, J.L., Rutishauser, U., 2001. Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J Biol Chem* 276, 31745-31751.
- Fujiwara, S., Takeo, N., Otani, Y., Parry, D.A., Kunitatsu, M., Lu, R., Sasaki, M., Matsuo, N., Khaleduzzaman, M., Yoshioka, H., 2001. Epiplakin, a novel member of the Plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen. Structure and tissue localization. *J Biol Chem* 276, 13340-13347.
- Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., Tsujiuchi, T., 2009. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem* 109, 683-693.
- Fulda, S., Galluzzi, L., Kroemer, G., 2010. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9, 447-464.

# I G I

- Galloway, P.G., Mulvihill, P., Perry, G., 1992. Filaments of Lewy bodies contain insoluble cytoskeletal elements. *Am J Pathol* 140, 809-822.
- Ganay, T., Boizot, A., Burrer, R., Chauvin, J.P., Bomont, P., 2011. Sensory-motor deficits and neurofilament disorganization in gigaxonin-null mice. *Mol Neurodegener* 6, 25.
- Gentil, B.J., Minotti, S., Beange, M., Baloh, R.H., Julien, J.P., Durham, H.D., 2012. Normal role of the low-molecular-weight neurofilament protein in mitochondrial dynamics and disruption in Charcot-Marie-Tooth disease. *Faseb J* 26, 1194-1203.
- Giannini, C., Burger, P.C., Berkey, B.A., Cairncross, J.G., Jenkins, R.B., Mehta, M., Curran, W.J., Aldape, K., 2008. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol* 18, 360-369.
- Gilyarov, A.V., 2008. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 38, 165-169.
- Gladson, C.L., Cheresch, D.A., 1991. Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88, 1924-1932.
- Glass, R., Synowitz, M., Kronenberg, G., Walzlein, J.H., Markovic, D.S., Wang, L.P., Gast, D., Kiwit, J., Kempermann, G., Kettenmann, H., 2005. Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J Neurosci* 25, 2637-2646.
- Goffart, N., Kroonen, J., Rogister, B., 2013. Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers (Basel)* 5, 1049-1071.
- Gomez-Gavero, M.V., Lovell-Badge, R., Fernandez-Aviles, F., Lara-Pezzi, E., 2012. The vascular stem cell niche. *J Cardiovasc Transl Res* 5, 618-630.
- Gonzales-Roybal, G., Lim, D.A., 2013. Chromatin-based epigenetics of adult subventricular zone neural stem cells. *Front Genet* 4, 194.
- Gonzalez-Perez, O., Gutierrez-Fernandez, F., Lopez-Virgen, V., Collas-Aguilar, J., Quinones-Hinojosa, A., Garcia-Verdugo, J.M., 2012. Immunological regulation of neurogenic niches in the adult brain. *Neuroscience* 226, 270-281.
- Green, K.J., Bohringer, M., Gocken, T., Jones, J.C., 2005. Intermediate filament associated proteins. *Adv Protein Chem* 70, 143-202.
- Greenberg, D.A., Jin, K., 2007. Regenerating the brain. *Int Rev Neurobiol* 77, 1-29.
- Gritti, A., Cova, L., Parati, E.A., Galli, R., Vescovi, A.L., 1995. Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal growth factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse CNS. *Neurosci Lett* 185, 151-154.
- Gros-Louis, F., Lariviere, R., Gowing, G., Laurent, S., Camu, W., Bouchard, J.P., Meininger, V., Rouleau, G.A., Julien, J.P., 2004. A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 279, 45951-45956.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.

# | H |

- Hall, P.A., Watt, F.M., 1989. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-633.
- Halpain, S., Dehmelt, L., 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7, 224.
- Hamilton, L.K., Truong, M.K., Bednarczyk, M.R., Aumont, A., Fernandes, K.J., 2009. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* 164, 1044-1056.
- Hamza, M.A., Gilbert, M., 2014. Targeted therapy in gliomas. *Curr Oncol Rep* 16, 379.
- Hardy, J., 2006. A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron* 52, 3-13.
- Hatzia Apostolou, M., Polytarchou, C., Iliopoulos, D., 2013. miRNAs link metabolic reprogramming to oncogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 24, 361-373.
- Haucke, V., 2005. Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans* 33, 1285-1289.
- Heese, O., Disko, A., Zirkel, D., Westphal, M., Lamszus, K., 2005. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro Oncol* 7, 476-484.
- Heins, S., Wong, P.C., Muller, S., Goldie, K., Cleveland, D.W., Aebi, U., 1993. The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *J Cell Biol* 123, 1517-1533.
- Heitz, F., Morris, M.C., Divita, G., 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 157, 195-206.
- Henriques, S.T., Castanho, M.A., 2008. Translocation or membrane disintegration? Implication of peptide-membrane interactions in pep-1 activity. *J Pept Sci* 14, 482-487.
- Herbig, M.E., Weller, K., Krauss, U., Beck-Sickinger, A.G., Merkle, H.P., Zerbe, O., 2005. Membrane surface-associated helices promote lipid interactions and cellular uptake of human calcitonin-derived cell penetrating peptides. *Biophys J* 89, 4056-4066.
- Herrmann, H., Wiche, G., 1987. Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J Biol Chem* 262, 1320-1325.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., Aebi, U., 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 562-573.
- Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P., Aebi, U., 2009. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* 119, 1772-1783.
- Hill, W.D., Arai, M., Cohen, J.A., Trojanowski, J.Q., 1993. Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson's disease substantia nigra pars compacta neurons. *J Comp Neurol* 329, 328-336.
- Hirokawa, N., Glicksman, M.A., Willard, M.B., 1984. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J Cell Biol* 98, 1523-1536.
- Hlobilkova, A., Ehrmann, J., Knizetova, P., Krejci, V., Kalita, O., Kolar, Z., 2009. Analysis of VEGF, Flt-1, Flk-1, nestin and MMP-9 in relation to astrocytoma pathogenesis and progression. *Neoplasma* 56, 284-290.

- Hofer, S., Rushing, E., Preusser, M., Marosi, C., 2014. Molecular biology of high-grade gliomas: what should the clinician know? *Chin J Cancer* 33, 4-7.
- Hoffman, R.M., 2011. Nestin-driven green fluorescent protein as an imaging marker for nascent blood vessels in mouse models of cancer. *Methods Mol Biol* 689, 183-204.
- Hofmann, I., Mertens, C., Brettel, M., Nimmrich, V., Schnolzer, M., Herrmann, H., 2000. Interaction of plakophilins with desmoplakin and intermediate filament proteins: an in vitro analysis. *J Cell Sci* 113 ( Pt 13), 2471-2483.
- Huang, L., Mollet, S., Souquere, S., Le Roy, F., Ernoult-Lange, M., Pierron, G., Dautry, F., Weil, D., 2011. Mitochondria associate with P-bodies and modulate microRNA-mediated RNA interference. *J Biol Chem* 286, 24219-24230.
- Hughes, A.J., Daniel, S.E., Ben-Shlomo, Y., Lees, A.J., 2002. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 125, 861-870.
- Husain, H., Savage, W., Grossman, S.A., Ye, X., Burger, P.C., Everett, A., Bettegowda, C., Diaz, L.A., Jr., Blair, C., Romans, K.E., Holdhoff, M., 2012. Pre- and post-operative plasma glial fibrillary acidic protein levels in patients with newly diagnosed gliomas. *J Neurooncol* 109, 123-127.
- Huse, J.T., Holland, E.C., 2010. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 10, 319-331.

## | I-J |

- Institut National du Cancer (INCa). Les cancers en France en 2013. En ligne : <http://www.e-cancer.fr/publications/69-epidemiologie/758-les-cancers-en-france-edition-2013> (consulté le 02.10.14).
- Jang, S.I., Kalinin, A., Takahashi, K., Marekov, L.N., Steinert, P.M., 2005. Characterization of human epiplakin: RNAi-mediated epiplakin depletion leads to the disruption of keratin and vimentin IF networks. *J Cell Sci* 118, 781-793.
- Janke, C., Bulinski, J.C., 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 773-786.
- Jany, P.L., Hagemann, T.L., Messing, A., 2013. GFAP expression as an indicator of disease severity in mouse models of Alexander disease. *ASN Neuro* 5, e00109.
- Jayagopal, A., Su, Y.R., Blakemore, J.L., Linton, M.F., Fazio, S., Haselton, F.R., 2009. Quantum dot mediated imaging of atherosclerosis. *Nanotechnology* 20, 165102.
- Jin, K., Minami, M., Lan, J.Q., Mao, X.O., Bateur, S., Simon, R.P., Greenberg, D.A., 2001. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4710-4715.
- Jin, X., Jin, X., Jung, J.E., Beck, S., Kim, H., 2013. Cell surface Nestin is a biomarker for glioma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 433, 496-501.
- Jing, R., Pizzolato, G., Robson, R.M., Gabbiani, G., Skalli, O., 2005. Intermediate filament protein synemin is present in human reactive and malignant astrocytes and associates with ruffled membranes in astrocytoma cells. *Glia* 50, 107-120.

- Jo, J., Song, H., Park, S.G., Lee, S.H., Ko, J.J., Park, J.H., Jeong, J., Cheon, Y.P., Lee, D.R., 2012. Regulation of differentiation potential of human mesenchymal stem cells by intracytoplasmic delivery of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 protein using cell-penetrating peptide. *Stem Cells* 30, 1703-1713.
- Johannessen, T.C., Bjerkvig, R., Tysnes, B.B., 2008. DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? *Cancer Treat Rev* 34, 558-567.
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., Frisen, J., 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.
- Johnson, C.P., Fujimoto, I., Rutishauser, U., Leckband, D.E., 2005. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* 280, 137-145.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A., 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1864-1868.
- Jones, A.T., Sayers, E.J., 2012. Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs. *J Control Release* 161, 582-591.
- Joo, C.K., Lee, E.H., Kim, J.C., Kim, Y.H., Lee, J.H., Kim, J.T., Chung, K.H., Kim, J., 1999. Degeneration and transdifferentiation of human lens epithelial cells in nuclear and anterior polar cataracts. *J Cataract Refract Surg* 25, 652-658.
- Jost, M., Simpson, F., Kavran, J.M., Lemmon, M.A., Schmid, S.L., 1998. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol* 8, 1399-1402.
- Jung, C.S., Foerch, C., Schanzer, A., Heck, A., Plate, K.H., Seifert, V., Steinmetz, H., Raabe, A., Sitzler, M., 2007. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain* 130, 3336-3341.

## | K |

- Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J.A., Kooi, E.J., Moeton, M., Freriks, M., Mizee, M.R., Hol, E.M., 2014. Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35, 492-510.
- Karsy, M., Arslan, E., Moy, F., 2012. Current Progress on Understanding MicroRNAs in Glioblastoma Multiforme. *Genes Cancer* 3, 3-15.
- Katsetos, C.D., Herman, M.M., Mork, S.J., 2003. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 55, 77-96.
- Katsetos, C.D., Anni, H., Draber, P., 2013. Mitochondrial dysfunction in gliomas. *Semin Pediatr Neurol* 20, 216-227.
- Kazerounian, S., Uitto, J., Aho, S., 2002. Unique role for the periplakin tail in intermediate filament association: specific binding to keratin 8 and vimentin. *Exp Dermatol* 11, 428-438.
- Kerkis, A., Kerkis, I., Radis-Baptista, G., Oliveira, E.B., Vianna-Morgante, A.M., Pereira, L.V., Yamane, T., 2004. Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Faseb J* 18, 1407-1409.

- Kesavan, K., Ratliff, J., Johnson, E.W., Dahlberg, W., Asara, J.M., Misra, P., Frangioni, J.V., Jacoby, D.B., 2010. Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects. *J Biol Chem* 285, 4366-4374.
- Khafagy el, S., Morishita, M., Kamei, N., Eda, Y., Ikeno, Y., Takayama, K., 2009. Efficiency of cell-penetrating peptides on the nasal and intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins. *Int J Pharm* 381, 49-55.
- Khodiyar, V.K., Maltais, L.J., Ruef, B.J., Sneddon, K.M., Smith, J.R., Shimoyama, M., Cabral, F., Dumontet, C., Dutcher, S.K., Harvey, R.J., Lafanechere, L., Murray, J.M., Nogales, E., Piquemal, D., Stanchi, F., Povey, S., Lovering, R.C., 2007. A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics* 90, 285-289.
- Kilic, E., Kilic, U., Hermann, D.M., 2005. TAT-GDNF in neurodegeneration and ischemic stroke. *CNS Drug Rev* 11, 369-378.
- Killela, P.J., Pirozzi, C.J., Healy, P., Reitman, Z.J., Lipp, E., Rasheed, B.A., Yang, R., Diplas, B.H., Wang, Z., Greer, P.K., Zhu, H., Wang, C.Y., Carpenter, A.B., Friedman, H., Friedman, A.H., Keir, S.T., He, J., He, Y., McLendon, R.E., Herndon, J.E., 2nd, Yan, H., Bigner, D.D., 2014. Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas. *Oncotarget*.
- Kim, D.W., Jeong, H.J., Kang, H.W., Shin, M.J., Sohn, E.J., Kim, M.J., Ahn, E.H., An, J.J., Jang, S.H., Yoo, K.Y., Won, M.H., Kang, T.C., Hwang, I.K., Kwon, O.S., Cho, S.W., Park, J., Eum, W.S., Choi, S.Y., 2009. Transduced human PEP-1-catalase fusion protein attenuates ischemic neuronal damage. *Free Radic Biol Med* 47, 941-952.
- Kim, S.U., Lee, H.J., Kim, Y.B., 2013. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 33, 491-504.
- Kim, W.J., Christensen, L.V., Jo, S., Yockman, J.W., Jeong, J.H., Kim, Y.H., Kim, S.W., 2006. Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol Ther* 14, 343-350.
- Knoblich, J.A., 2001. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 11-20.
- Knudsen, K.A., Wheelock, M.J., 1992. Plakoglobin, or an 83-kD homologue distinct from beta-catenin, interacts with E-cadherin and N-cadherin. *J Cell Biol* 118, 671-679.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., Flier, J.S., 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679-683.
- Korn, E.D., 1982. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev* 62, 672-737.
- Korobova, F., Svitkina, T., 2008. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell* 19, 1561-1574.
- Kruger, R., Fischer, C., Schulte, T., Strauss, K.M., Muller, T., Voitalla, D., Berg, D., Hungs, M., Gobbele, R., Berger, K., Epplen, J.T., Riess, O., Schols, L., 2003. Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 351, 125-129.
- Kull, F.J., Endow, S.A., 2002. Kinesin: switch I & II and the motor mechanism. *J Cell Sci* 115, 15-23.

# | L |

- Laing, N., Dahllof, B., Hartley-Asp, B., Ranganathan, S., Tew, K.D., 1997. Interaction of estramustine with tubulin isotypes. *Biochemistry* 36, 871-878.
- Langley, R.C., Jr., Cohen, C.M., 1986. Association of spectrin with desmin intermediate filaments. *J Cell Biochem* 30, 101-109.
- Langley, R.C., Jr., Cohen, C.M., 1987. Cell type-specific association between two types of spectrin and two types of intermediate filaments. *Cell Motil Cytoskeleton* 8, 165-173.
- Lavedan, C., Buchholtz, S., Nussbaum, R.L., Albin, R.L., Polymeropoulos, M.H., 2002. A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci Lett* 322, 57-61.
- Le Roy, C., Wrana, J.L., 2005. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112-126.
- Leandro-Garcia, L.J., Leskela, S., Landa, I., Montero-Conde, C., Lopez-Jimenez, E., Leton, R., Cascon, A., Robledo, M., Rodriguez-Antona, C., 2010. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 214-223.
- Lee, K.S., Choe, G., Nam, K.H., Seo, A.N., Yun, S., Kim, K.J., Cho, H.J., Park, S.H., 2013. Immunohistochemical classification of primary and secondary glioblastomas. *Korean J Pathol* 47, 541-548.
- Lee, S.C., Kim, I.G., Marekov, L.N., O'Keefe, E.J., Parry, D.A., Steinert, P.M., 1993. The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J Biol Chem* 268, 12164-12176.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D., 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Letoha, T., Keller-Pinter, A., Kusz, E., Kolozsi, C., Bozso, Z., Toth, G., Vizler, C., Olah, Z., Szilak, L., 2010. Cell-penetrating peptide exploited syndecans. *Biochim Biophys Acta* 1798, 2258-2265.
- Liberali, P., Ramo, P., Pelkmans, L., 2008. Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 501-523.
- Lie, D.C., Dziewczapolski, G., Willhoite, A.R., Kaspar, B.K., Shults, C.W., Gage, F.H., 2002. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 22, 6639-6649.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.
- Lima, F.R., Kahn, S.A., Soletti, R.C., Biasoli, D., Alves, T., da Fonseca, A.C., Garcia, C., Romao, L., Brito, J., Holanda-Afonso, R., Faria, J., Borges, H., Moura-Neto, V., 2012. Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochim Biophys Acta* 1826, 338-349.
- Liu, C., Teng, Z.Q., Santistevan, N.J., Szulwach, K.E., Guo, W., Jin, P., Zhao, X., 2010. Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell* 6, 433-444.

- Liu, Y.M., Chen, H.L., Lee, H.Y., Liou, J.P., 2014. Tubulin inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 24, 69-88.
- Lo, S.L., Wang, S., 2008. An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials* 29, 2408-2414.
- Lopez-Ornelas, A., Vergara, P., Segovia, J., 2014. Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy* 16, 1011-1023.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Lukiw, W.J., Cui, J.G., Li, Y.Y., Culicchia, F., 2009. Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol* 91, 27-32.
- Lycke, J.N., Karlsson, J.E., Andersen, O., Rosengren, L.E., 1998. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64, 402-404.

## I M I

- Mabuchi, K., Li, B., Ip, W., Tao, T., 1997. Association of calponin with desmin intermediate filaments. *J Biol Chem* 272, 22662-22666.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., Graslund, A., 2011. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 2011, 414729.
- Mae, M., El Andaloussi, S., Lundin, P., Oskolkov, N., Johansson, H.J., Guterstam, P., Langel, U., 2009. A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* 134, 221-227.
- Mahammad, S., Murthy, S.N., Didonna, A., Grin, B., Israeli, E., Perrot, R., Bomont, P., Julien, J.P., Kuczmarski, E., Opal, P., Goldman, R.D., 2013. Giant axonal neuropathy-associated gigaxonin mutations impair intermediate filament protein degradation. *J Clin Invest* 123, 1964-1975.
- Malmestrom, C., Haghghi, S., Rosengren, L., Andersen, O., Lycke, J., 2003. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* 61, 1720-1725.
- Manetto, V., Sternberger, N.H., Perry, G., Sternberger, L.A., Gambetti, P., 1988. Phosphorylation of neurofilaments is altered in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 47, 642-653.
- Mano, M., Henriques, A., Paiva, A., Prieto, M., Gavilanes, F., Simoes, S., Pedroso de Lima, M.C., 2006. Cellular uptake of S413-PV peptide occurs upon conformational changes induced by peptide-membrane interactions. *Biochim Biophys Acta* 1758, 336-346.
- McPherson, P.S., Kay, B.K., Hussain, N.K., 2001. Signaling on the endocytic pathway. *Traffic* 2, 375-384.
- Messing, A., Li, R., Naidu, S., Taylor, J.P., Silverman, L., Flint, D., van der Knaap, M.S., Brenner, M., 2012. Archetypal and new families with Alexander disease and novel mutations in GFAP. *Arch Neurol* 69, 208-214.



- Metz, M.Z., Gutova, M., Lacey, S.F., Abramyants, Y., Vo, T., Gilchrist, M., Tirughana, R., Ghoda, L.Y., Barish, M.E., Brown, C.E., Najbauer, J., Potter, P.M., Portnow, J., Synold, T.W., Aboody, K.S., 2013. Neural stem cell-mediated delivery of irinotecan-activating carboxylesterases to glioma: implications for clinical use. *Stem Cells Transl Med* 2, 983-992.
- Meunier, S., Vernos, I., 2012. Microtubule assembly during mitosis - from distinct origins to distinct functions? *J Cell Sci* 125, 2805-2814.
- Mialhe, A., Lafanechere, L., Treilleux, I., Peloux, N., Dumontet, C., Bremond, A., Panh, M.H., Payan, R., Wehland, J., Margolis, R.L., Job, D., 2001. Tubulin detyrosination is a frequent occurrence in breast cancers of poor prognosis. *Cancer Res* 61, 5024-5027.
- Middeldorp, J., Hol, E.M., 2011. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421-443.
- Minin, A.A., Moldaver, M.V., 2008. Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution. *Biochemistry (Mosc)* 73, 1453-1466.
- Mohamed Ariff, I., Mitra, A., Basu, A., 2012. Epigenetic regulation of self-renewal and fate determination in neural stem cells. *J Neurosci Res* 90, 529-539.
- Morris, M.C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., Divita, G., 1997. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 25, 2730-2736.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G., 2001. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* 19, 1173-1176.
- Mueller, J., Kretschmar, I., Volkmer, R., Boisguerin, P., 2008. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug Chem* 19, 2363-2374.
- Muller, F.J., Snyder, E.Y., Loring, J.F., 2006. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci* 7, 75-84.
- Muller-Reichert, T., Chretien, D., Severin, F., Hyman, A.A., 1998. Structural changes at microtubule ends accompanying GTP hydrolysis: information from a slowly hydrolyzable analogue of GTP, guanylyl (alpha,beta)methylenediphosphonate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3661-3666.

## | N-O |

- Nagamatsu, M., Terao, S., Misu, K., Li, M., Hattori, N., Ichimura, M., Sakai, M., Yamamoto, H., Watanabe, H., Riku, S., Ikeda, E., Hata, J., Oda, M., Satake, M., Nakamura, N., Matsuya, S., Hashizume, Y., Sobue, G., 1999. Axonal and perikaryal involvement in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66, 727-733.
- Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., Decker, L., Seilhean, D., Hoglinger, G.U., Hirsch, E.C., Reynolds, R., Baron-Van Evercooren, A., 2007. Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4694-4699.
- Nakamura, Y., Yamamoto, M., Oda, E., Yamamoto, A., Kanemura, Y., Hara, M., Suzuki, A., Yamasaki, M., Okano, H., 2003. Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest* 83, 479-489.
- Nakano, I., Kornblum, H.I., 2006. Brain tumor stem cells. *Pediatr Res* 59, 54R-58R.

- Nascimento, F.D., Hayashi, M.A., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E.B., Radis-Baptista, G., Nader, H.B., Yamane, T., Tersariol, I.L., Kerkis, I., 2007. Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 282, 21349-21360.
- Nekrasova, O.E., Mendez, M.G., Chernovivanenko, I.S., Tyurin-Kuzmin, P.A., Kuczmariski, E.R., Gelfand, V.I., Goldman, R.D., Minin, A.A., 2011. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol Biol Cell* 22, 2282-2289.
- Neuber, S., Muhmer, M., Wratten, D., Koch, P.J., Moll, R., Schmidt, A., 2010. The desmosomal plaque proteins of the plakophilin family. *Dermatol Res Pract* 2010, 101452.
- Nicholson, R.I., Gee, J.M., Harper, M.E., 2001. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4, S9-15.
- Niu, R., Zhao, P., Wang, H., Yu, M., Cao, S., Zhang, F., Chang, J., 2011. Preparation, characterization, and antitumor activity of paclitaxel-loaded folic acid modified and TAT peptide conjugated PEGylated polymeric liposomes. *J Drug Target* 19, 373-381.
- Nixon, R.A., Sihag, R.K., 1991. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci* 14, 501-506.
- Nixon, R.A., Shea, T.B., 1992. Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell Motil Cytoskeleton* 22, 81-91.
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170, 1445-1453.
- Olynik, B.M., Rastegar, M., 2012. The genetic and epigenetic journey of embryonic stem cells into mature neural cells. *Front Genet* 3, 81.
- Omary, M.B., Coulombe, P.A., McLean, W.H., 2004. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* 351, 2087-2100.
- Omuro, A., DeAngelis, L.M., 2013. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama* 310, 1842-1850.
- Ouyang, P., Sugrue, S.P., 1996. Characterization of pinin, a novel protein associated with the desmosome-intermediate filament complex. *J Cell Biol* 135, 1027-1042.

## | P-Q |

- Pan, Y., Jing, R., Pitre, A., Williams, B.J., Skalli, O., 2008. Intermediate filament protein synemin contributes to the migratory properties of astrocytoma cells by influencing the dynamics of the actin cytoskeleton. *Faseb J* 22, 3196-3206.
- Pekny, T., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Curtis, M.A., Matej, R., Skalli, O., Pekny, M., 2014. Synemin is expressed in reactive astrocytes and Rosenthal fibers in Alexander disease. *Apms* 122, 76-80.
- Perea, S.E., Reyes, O., Puchades, Y., Mendoza, O., Vispo, N.S., Torrens, I., Santos, A., Silva, R., Acevedo, B., Lopez, E., Falcon, V., Alonso, D.F., 2004. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res* 64, 7127-7129.
- Perez-Olle, R., Lopez-Toledano, M.A., Liem, R.K., 2004. The G336S variant in the human neurofilament-M gene does not affect its assembly or distribution: importance of the functional analysis of neurofilament variants. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 759-774.

- Perez-Olle, R., Lopez-Toledano, M.A., Goryunov, D., Cabrera-Poch, N., Stefanis, L., Brown, K., Liem, R.K., 2005. Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport. *J Neurochem* 93, 861-874.
- Perrot, R., Lonchampt, P., Peterson, A.C., Eyer, J., 2007. Axonal neurofilaments control multiple fiber properties but do not influence structure or spacing of nodes of Ranvier. *J Neurosci* 27, 9573-9584.
- Perrot, R., Berges, R., Bocquet, A., Eyer, J., 2008. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 38, 27-65.
- Perrot, R., Eyer, J., 2009. Neuronal intermediate filaments and neurodegenerative disorders. *Brain Res Bull* 80, 282-295.
- Perry, E.K., Johnson, M., Ekonomou, A., Perry, R.H., Ballard, C., Attems, J., 2012. Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. *Neurobiol Dis* 47, 155-162.
- Petzold, A., Keir, G., Green, A.J., Giovannoni, G., Thompson, E.J., 2003. A specific ELISA for measuring neurofilament heavy chain phosphoforms. *J Immunol Methods* 278, 179-190.
- Petzold, A., Eikelenboom, M.J., Keir, G., Grant, D., Lazeron, R.H., Polman, C.H., Uitdehaag, B.M., Thompson, E.J., Giovannoni, G., 2005. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 206-211.
- Petzold, A., Keir, G., Warren, J., Fox, N., Rossor, M.N., 2007. A systematic review and meta-analysis of CSF neurofilament protein levels as biomarkers in dementia. *Neurodegener Dis* 4, 185-194.
- Pfenninger, C.V., Roschupkina, T., Hertwig, F., Kottwitz, D., Englund, E., Bengzon, J., Jacobsen, S.E., Nuber, U.A., 2007. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res* 67, 5727-5736.
- Piepmeyer, J.M., Pedersen, P.E., Yoshida, D., Greer, C., 1996. Targeting microtubule-associated proteins in glioblastoma: a new strategy for selective therapy. *Ann Surg Oncol* 3, 543-549.
- Pitre, A., Davis, N., Paul, M., Orr, A.W., Skalli, O., 2012. Synemin promotes AKT-dependent glioblastoma cell proliferation by antagonizing PP2A. *Mol Biol Cell* 23, 1243-1253.
- Qin, H., Diaz, A., Blouin, L., Lebbink, R.J., Patena, W., Tanbun, P., LeProust, E.M., McManus, M.T., Song, J.S., Ramalho-Santos, M., 2014. Systematic Identification of Barriers to Human iPSC Generation. *Cell* 158, 449-461.
- Quinones-Hinojosa, A., Chaichana, K., 2007. The human subventricular zone: a source of new cells and a potential source of brain tumors. *Exp Neurol* 205, 313-324.

## | R |

- Raiborg, C., Schink, K.O., Stenmark, H., 2013. Class III phosphatidylinositol 3-kinase and its catalytic product PtdIns3P in regulation of endocytic membrane traffic. *Febs J* 280, 2730-2742.
- Redeker, V., 2010. Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. *Methods Cell Biol* 95, 77-103.
- Reilly, M.M., 2009. NEFL-related Charcot-Marie-tooth disease: an unraveling story. *Ann Neurol* 66, 714-716.

- Reitz, M., Demestre, M., Sedlacik, J., Meissner, H., Fiehler, J., Kim, S.U., Westphal, M., Schmidt, N.O., 2012. Intranasal delivery of neural stem/progenitor cells: a noninvasive passage to target intracerebral glioma. *Stem Cells Transl Med* 1, 866-873.
- Reynolds, B.A., Weiss, S., 1992. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., Lebleu, B., 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 278, 585-590.
- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L.V., 2005. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* 280, 15300-15306.
- Richards, L.J., Kilpatrick, T.J., Bartlett, P.F., 1992. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8591-8595.
- Rieske, P., Krynska, B., Azizi, S.A., 2005. Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. *Differentiation* 73, 474-483.
- Roberts, A.J., Kon, T., Knight, P.J., Sutoh, K., Burgess, S.A., 2013. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 713-726.
- Rojczyk-Golebiewska, E., Palasz, A., Wiaderkiewicz, R., 2014. Hypothalamic subependymal niche: a novel site of the adult neurogenesis. *Cell Mol Neurobiol* 34, 631-642.
- Rostovtseva, T.K., Bezrukov, S.M., 2012. VDAC inhibition by tubulin and its physiological implications. *Biochim Biophys Acta* 1818, 1526-1535.
- Rudrabhatla, P., Grant, P., Jaffe, H., Strong, M.J., Pant, H.C., 2010. Quantitative phosphoproteomic analysis of neuronal intermediate filament proteins (NF-M/H) in Alzheimer's disease by iTRAQ. *Faseb J* 24, 4396-4407.
- Ruhrberg, C., Hajibagheri, M.A., Simon, M., Dooley, T.P., Watt, F.M., 1996. Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *J Cell Biol* 134, 715-729.
- Ruhrberg, C., Hajibagheri, M.A., Parry, D.A., Watt, F.M., 1997. Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *J Cell Biol* 139, 1835-1849.

## ISI

- Saalik, P., Niinep, A., Pae, J., Hansen, M., Lubenets, D., Langel, U., Pooga, M., 2011. Penetration without cells: membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles. *J Control Release* 153, 117-125.
- Saha, B., Jaber, M., Gaillard, A., 2012. Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Front Cell Neurosci* 6, 14.
- Saha, B., Peron, S., Murray, K., Jaber, M., Gaillard, A., 2013. Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. *Stem Cell Res* 11, 965-977.

- Saini, A., Jaswal, R.R., Negi, R., Nandel, F.S., 2013. Insights on the structural characteristics of Vim-TBS (58-81) peptide for future applications as a cell penetrating peptide. *Biosci Trends* 7, 209-220.
- Sallinen, S.L., Sallinen, P.K., Haapasalo, H.K., Helin, H.J., Helen, P.T., Schraml, P., Kallioniemi, O.P., Kononen, J., 2000. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 60, 6617-6622.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M.S., Alvarez-Buylla, A., 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740-744.
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., Berger, M.S., 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353, 811-822.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., McLean, W.H., 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 122, 1285-1294.
- Sarkaria, J.N., Kitange, G.J., James, C.D., Plummer, R., Calvert, H., Weller, M., Wick, W., 2008. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin Cancer Res* 14, 2900-2908.
- Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R., 2004. Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J Neurobiol* 58, 103-117.
- Savagner, F., Mirebeau, D., Jacques, C., Guyetant, S., Morgan, C., Franc, B., Reynier, P., Malthiery, Y., 2003. PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 779-784.
- Schmelz, M., Franke, W.W., 1993. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur J Cell Biol* 61, 274-289.
- Schnitzer, J., Franke, W.W., Schachner, M., 1981. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol* 90, 435-447.
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., Dowdy, S.F., 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-1572.
- Scott, C., Keating, L., Bellamy, M., Baines, A.J., 2001. Protein 4.1 in forebrain postsynaptic density preparations: enrichment of 4.1 gene products and detection of 4.1R binding proteins. *Eur J Biochem* 268, 1084-1094.
- Semra, Y.K., Seidi, O.A., Sharief, M.K., 2002. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol* 122, 132-139.
- Shaw, G., Yang, C., Ellis, R., Anderson, K., Parker Mickle, J., Scheff, S., Pike, B., Anderson, D.K., Howland, D.R., 2005. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1268-1277.
- Shi, J., Zhou, Y., Chakraborty, S., Kim, Y.S., Jia, B., Wang, F., Liu, S., 2011. Evaluation of In-Labeled Cyclic RGD Peptides: Effects of Peptide and Linker Multiplicity on Their Tumor Uptake, Excretion Kinetics and Metabolic Stability. *Theranostics* 1, 322-340.
- Shi, L., Cheng, Z., Zhang, J., Li, R., Zhao, P., Fu, Z., You, Y., 2008. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 1236, 185-193.

- Shinomiya, H., 2012. Plastin family of actin-bundling proteins: its functions in leukocytes, neurons, intestines, and cancer. *Int J Cell Biol* 2012, 213492.
- Shirao, T., 1995. The roles of microfilament-associated proteins, drebrins, in brain morphogenesis: a review. *J Biochem* 117, 231-236.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., 1999. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Philadelphia, "Lippincott-Raven", 6th edition. En ligne : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28122> (consulté le 02.10.14)
- Sihag, R.K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T.B., Pant, H.C., 2007. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res* 313, 2098-2109.
- Sirajuddin, M., Rice, L.M., Vale, R.D., 2014. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 16, 335-344.
- Skerrow, C.J., Matoltsy, A.G., 1974. Chemical characterization of isolated epidermal desmosomes. *J Cell Biol* 63, 524-530.
- Slawson, C., Hart, G.W., 2003. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr Opin Struct Biol* 13, 631-636.
- Smith, E.A., Fuchs, E., 1998. Defining the interactions between intermediate filaments and desmosomes. *J Cell Biol* 141, 1229-1241.
- Snider, N.T., Omary, M.B., 2014. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 163-177.
- Sobue, K., 1993. Actin-based cytoskeleton in growth cone activity. *Neurosci Res* 18, 91-102.
- Song, B.W., Chang, W., Hong, B.K., Kim, I.K., Cha, M.J., Lim, S., Choi, E.J., Ham, O., Lee, S.Y., Lee, C.Y., Park, J.H., Choi, E., Song, H., Jang, Y., Hwang, K.C., 2013. Protein kinase C activation stimulates mesenchymal stem cell adhesion through activation of focal adhesion kinase. *Cell Transplant* 22, 797-809.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., Huang, G.T., 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 34, 166-171.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hallbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., Langel, U., 2000. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta* 1467, 165-176.
- Soucek, K., Kamaid, A., Phung, A.D., Kubala, L., Bulinski, J.C., Harper, R.W., Eiserich, J.P., 2006. Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of alpha-tubulin posttranslational modifications. *Prostate* 66, 954-965.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M., 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6469-6473.
- Steck, P.A., Moser, R.P., Bruner, J.M., Liang, L., Freidman, A.N., Hwang, T.L., Yung, W.K., 1989. Altered expression and distribution of heparan sulfate proteoglycans in human gliomas. *Cancer Res* 49, 2096-2103.
- Stewart, K.M., Horton, K.L., Kelley, S.O., 2008. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* 6, 2242-2255.

- Strong, M.J., Hudson, A.J., Alvord, W.G., 1991. Familial amyotrophic lateral sclerosis, 1850-1989: a statistical analysis of the world literature. *Can J Neurol Sci* 18, 45-58.
- Stuckey, D.W., Shah, K., 2014. Stem cell-based therapies for cancer treatment: separating hope from hype. *Nat Rev Cancer* 14, 683-691.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 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., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.O., 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.
- Su, P.H., Chen, C.C., Chang, Y.F., Wong, Z.R., Chang, K.W., Huang, B.M., Yang, H.Y., 2013. Identification and cytoprotective function of a novel nestin isoform, Nes-S, in dorsal root ganglia neurons. *J Biol Chem* 288, 8391-8404.
- Su, W., Chen, H.B., Li, S.H., Wu, D.Y., 2012. Correlational study of the serum levels of the glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins in Parkinson's disease patients. *Clin Neurol Neurosurg* 114, 372-375.
- Szeverenyi, I., Cassidy, A.J., Chung, C.W., Lee, B.T., Common, J.E., Ogg, S.C., Chen, H., Sim, S.Y., Goh, W.L., Ng, K.W., Simpson, J.A., Chee, L.L., Eng, G.H., Li, B., Lunny, D.P., Chuon, D., Venkatesh, A., Khoo, K.H., McLean, W.H., Lim, Y.P., Lane, E.B., 2008. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat* 29, 351-360.

## | T |

- Tattersfield, A.S., Croon, R.J., Liu, Y.W., Kells, A.P., Faull, R.L., Connor, B., 2004. Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 127, 319-332.
- Taupin, P., Gage, F.H., 2002. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res* 69, 745-749.
- Taupin, P., 2010. Aging and neurogenesis, a lesion from Alzheimer's disease. *Aging Dis* 1, 158-168.
- Terrone, D., Sang, S.L., Roudaia, L., Silviu, J.R., 2003. Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential. *Biochemistry* 42, 13787-13799.
- The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.

- Thomsen, R., Daugaard, T.F., Holm, I.E., Nielsen, A.L., 2013. Alternative mRNA splicing from the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene generates isoforms with distinct subcellular mRNA localization patterns in astrocytes. *PLoS One* 8, e72110.
- Tobin, M.K., Bonds, J.A., Minshall, R.D., Pelligrino, D.A., Testai, F.D., Lazarov, O., 2014. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Tomasetti, M., Neuzil, J., Dong, L., 2014. MicroRNAs as regulators of mitochondrial function: role in cancer suppression. *Biochim Biophys Acta* 1840, 1441-1453.
- Torchilin, V.P., 2008. Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery. *Biopolymers* 90, 604-610.
- Tortelli, R., Ruggieri, M., Cortese, R., D'Errico, E., Capozzo, R., Leo, A., Mastrapasqua, M., Zoccolella, S., Leante, R., Livrea, P., Logroscino, G., Simone, I.L., 2012. Elevated cerebrospinal fluid neurofilament light levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a possible marker of disease severity and progression. *Eur J Neurol* 19, 1561-1567.
- Tropepe, V., Coles, B.L., Chiasson, B.J., Horsford, D.J., Elia, A.J., McInnes, R.R., van der Kooy, D., 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287, 2032-2036.
- Tutt B, 2011. Glioblastoma Cure Remains Elusive Despite Treatment Advances. *OncoLog Vol. 56, No. 3*.

## | U-V-W |

- Uchikado, H., Shaw, G., Wang, D.S., Dickson, D.W., 2005. Screening for neurofilament inclusion disease using alpha-internexin immunohistochemistry. *Neurology* 64, 1658-1659.
- Vanacker, J., Viswanath, A., De Berdt, P., Everard, A., Cani, P.D., Bouzin, C., Feron, O., Diogenes, A., Leprince, J.G., des Rieux, A., 2014. Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. *J Endod* 40, 1410-1418.
- Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B., 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272, 16010-16017.
- Walczak, C.E., Heald, R., 2008. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int Rev Cytol* 265, 111-158.
- Walzlein, J.H., Synowitz, M., Engels, B., Markovic, D.S., Gabrusiewicz, K., Nikolaev, E., Yoshikawa, K., Kaminska, B., Kempermann, G., Uckert, W., Kaczmarek, L., Kettenmann, H., Glass, R., 2008. The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age. *Stem Cells* 26, 2945-2954.
- Wang, F., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, W., Guo, S., Jin, F., 2014. Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J Control Release* 174C, 126-136.
- Wang, J., Tung, Y.C., Wang, Y., Li, X.T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2001. Hyperphosphorylation and accumulation of neurofilament proteins in Alzheimer disease brain and in okadaic acid-treated SY5Y cells. *FEBS Lett* 507, 81-87.



- Warbrick, E., Lane, D.P., Glover, D.M., Cox, L.S., 1995. A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol* 5, 275-282.
- Wen, P.Y., Kesari, S., 2008. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492-507.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B., 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13003-13008.
- Westerlund, U., Svensson, M., Moe, M.C., Varghese, M., Gustavsson, B., Wallstedt, L., Berg-Johnsen, J., Langmoen, I.A., 2005. Endoscopically harvested stem cells: a putative method in future autotransplantation. *Neurosurgery* 57, 779-784; discussion 779-784.
- Westgate, G.E., Weaver, A.C., Couchman, J.R., 1985. Bullous pemphigoid antigen localization suggests an intracellular association with hemidesmosomes. *J Invest Dermatol* 84, 218-224.
- Wiche, G., Krepler, R., Artlieb, U., Pytela, R., Denk, H., 1983. Occurrence and immunolocalization of plectin in tissues. *J Cell Biol* 97, 887-901.
- Wilde, A., Beattie, E.C., Lem, L., Riethof, D.A., Liu, S.H., Mobley, W.C., Soriano, P., Brodsky, F.M., 1999. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell* 96, 677-687.
- Wiranowska, M., Colina, L.O., Johnson, J.O., 2011. Clathrin-mediated entry and cellular localization of chlorotoxin in human glioma. *Cancer Cell Int* 11, 27.
- Wloga, D., Gaertig, J., 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci* 123, 3447-3455.

## | X-Y-Z |

- Yan, Z., Wang, J., Wang, C., Jiao, Y., Qi, W., Che, S., 2014. miR-96/HBP1/Wnt/beta-catenin regulatory circuitry promotes glioma growth. *FEBS Lett*.
- Yeaman, M.R., Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55, 27-55.
- Yi, B.R., Kim, S.U., Choi, K.C., 2013. Development and application of neural stem cells for treating various human neurological diseases in animal models. *Lab Anim Res* 29, 131-137.
- Yoshida, T., Nakagawa, M., 2012. Clinical aspects and pathology of Alexander disease, and morphological and functional alteration of astrocytes induced by GFAP mutation. *Neuropathology* 32, 440-446.
- Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna, Nixon, R.A., 2012. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* 125, 3257-3263.
- Yun, S.J., Byun, K., Bhin, J., Oh, J.H., Nhung le, T.H., Hwang, D., Lee, B., 2010. Transcriptional regulatory networks associated with self-renewal and differentiation of neural stem cells. *J Cell Physiol* 225, 337-347.
- Zencak, D., Lingbeek, M., Kostic, C., Tekaya, M., Tanger, E., Hornfeld, D., Jaquet, M., Munier, F.L., Schorderet, D.F., van Lohuizen, M., Arsenijevic, Y., 2005. Bmi1 loss produces an increase in

- astroglial cells and a decrease in neural stem cell population and proliferation. *J Neurosci* 25, 5774-5783.
- Zhang, J.G., Wang, J.J., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., Yang, G.H., 2010. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta* 411, 846-852.
- Zhang, S., Luo, X., Wan, F., Lei, T., 2012. The roles of hypoxia-inducible factors in regulating neural stem cells migration to glioma stem cells and determining their fates. *Neurochem Res* 37, 2659-2666.
- Zhou, K., Pandol, S., Bokoch, G., Traynor-Kaplan, A.E., 1998. Disruption of Dictyostelium PI3K genes reduces [32P]phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate and [32P]phosphatidylinositol trisphosphate levels, alters F-actin distribution and impairs pinocytosis. *J Cell Sci* 111 ( Pt 2), 283-294.
- Ziegler, A., 2008. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 580-597.
- Zougman, A., Pilch, B., Podtelejnikov, A., Kiehnopf, M., Schnabel, C., Kumar, C., Mann, M., 2008. Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J Proteome Res* 7, 386-399.
- Zuchner, S., Vance, J.M., 2006. Mechanisms of disease: a molecular genetic update on hereditary axonal neuropathies. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 45-53.
- Zulch, K.J., 1980. Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors. *Neuroradiology* 19, 59-66.



# Thèse de Doctorat

**Claire LÉPINOUX-CHAMBAUD**

**Le peptide NFL-TBS.40-63 issu des neurofilaments** : agent thérapeutique et outil de ciblage des cellules de glioblastome et des cellules souches neurales.

**The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63** : therapeutic tool and targeting of glioblastoma cells and neural stem cells.

## Résumé

Des travaux menés au laboratoire sur la biologie des neurofilaments et sur leurs interactions avec les autres constituants du cytosquelette ont montré, sur différents filaments intermédiaires, des sites de fixation de la tubuline libre TBS (« tubulin-binding site »). Parmi les peptides synthétisés correspondant à ces séquences, le peptide NFL-TBS.40-63 issu de la sous-unité légère des neurofilaments (NFL) a révélé *in vitro* et *in vivo* des propriétés de ciblage et une action anti-tumorale sur des cellules de glioblastome, tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive, pour laquelle l'efficacité des traitements actuels reste très limitée. L'intérêt thérapeutique de ce peptide est renforcé par le fait qu'il entre peu et qu'il n'a pas d'effet cytotoxique dans des cellules saines (astrocytes, neurones).

Les travaux présentés dans cette thèse décrivent les mécanismes d'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 dans les cellules de glioblastome, pour mieux comprendre sa sélectivité. Sa spécificité d'action dans ces cellules a été complétée en analysant les effets du peptide sur l'organisation et la fonction des mitochondries. Enfin, nous montrons que le peptide cible des cellules souches neurales, qui pourraient être à l'origine du développement des glioblastomes, et qui pourraient servir d'outil thérapeutique dans de nombreuses pathologies cérébrales, telles que des lésions traumatiques et des maladies neurodégénératives.

Ces travaux indiquent que le peptide NFL-TBS.40-63 représente un outil prometteur dans la stratégie thérapeutique des glioblastomes. Il peut aussi permettre de cibler les cellules souches neurales pour développer de nouveaux traitements des pathologies cérébrales.

## Mots clés

peptide pénétrant ; cytosquelette ; glioblastome ; cellules souches neurales ; ciblage

## Abstract

In the laboratory, investigations on neurofilament biology and on their interactions with other cytoskeleton components showed tubulin-binding sites (TBS) on different intermediate filaments. Among the synthesized peptide corresponding to these sequences, the NFL-TBS.40-63 peptide derived from the neurofilament light subunit (NFL), revealed *in vitro* and *in vivo* targeting properties and anti-tumour effect on glioblastoma cells, the most frequent and aggressive brain tumour, for which current treatments show very limited effects. The therapeutic value of this peptide is reinforced by its lower uptake and the lack of a major cytotoxic effect in healthy cells (astrocytes, neurons).

Works in this thesis describe the uptake mechanisms of the NFL-TBS.40-63 peptide in glioblastoma cells, to better understand its selective internalization. Its specific action on glioblastoma cells has been completed by the analysis of the peptide effects on the mitochondrial organization and function. Finally, we show that the peptide targets neural stem cells, which could be at the origin of glioblastoma, and serve as a therapeutic tool in several brain diseases, such as traumatic injuries and neurodegenerative diseases.

Altogether these works indicate that this NFL-TBS.40-63 peptide is a promising tool for therapeutic strategies of glioblastoma. It can also target neural stem cells in order to develop new treatments for various brain disorders.

## Key Words

penetrating peptide ; cytoskeleton ; glioblastoma ; neural stem cells ; targeting