



HAL
open science

Le peptide NFL-TBS, 40-63 dérivés des neurofilaments : Agents thérapeutique prometteur pour cibler et manipuler les cellules souches neurales et les cellules de glioblastomes

Kristell Barreau

► To cite this version:

Kristell Barreau. Le peptide NFL-TBS, 40-63 dérivés des neurofilaments: Agents thérapeutique prometteur pour cibler et manipuler les cellules souches neurales et les cellules de glioblastomes. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université de Liège, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0087 . tel-02612632v1

HAL Id: tel-02612632

<https://theses.hal.science/tel-02612632v1>

Submitted on 19 May 2020 (v1), last revised 19 May 2020 (v2)

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

Kristell BARREAU

Kristell BARREAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie*

Spécialité : *Neurosciences*

Unité de recherche : *Micro et Nanomédecines Translationnelles (MINT)*

INSERM 1066 / CNRS 6021 – Université d'Angers, Institut de Biologie en Santé

Soutenue le *09 novembre 2017*

Le peptide NFL-TBS.40-63 dérivés des neurofilaments :

Agent thérapeutique prometteur pour cibler et manipuler les cellules souches neurales et les cellules de glioblastomes.

JURY

Rapporteurs :

Cécile MARTINAT, Directrice de recherche INSERM, I-Stem France
Patrick VICART, Professeur des universités, Unité de biologie Fonctionnelle et Adaptatrice France

Invité :

Patrick SAULNIER, Professeur des universités, Université d'Angers France

Directeur de Thèse :

Joël EYER, Directeur de Recherche INSERM, Université d'Angers, France

Co-directrice de Thèse :

Claudia MONTERO-MENEI, Maître de conférences, Université d'Angers, France

Le peptide NFL-TBS.40-63 dérivé des neurofilaments : Agent thérapeutique prometteur pour cibler et manipuler les cellules souches neurales et les cellules de glioblastomes

Résumé

Les travaux menés au laboratoire ont mis en évidence des sites de liaison de la tubuline (TBS pour *Tubulin Binding Site*) sur les filaments intermédiaires, tels que les neurofilaments (NFs), qui sont spécifiquement exprimés par les neurones. Le peptide NFL-TBS.40-63 qui correspond à la séquence en acide aminés du TBS situé sur la sous unité légère des NFs, a montré des propriétés anti-glioblastomes *in vitro* et *in vivo*, sans effet sur les cellules saines environnantes (neurones et astrocytes). De plus, Il est aussi capable d'induire la différenciation et la maturation des précurseurs d'oligodendrocytes sans affecter la viabilité de ces cellules.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de valoriser le peptide NFL-TBS.40-63 comme agent thérapeutique possible pour la médecine régénérative. En effet, nous avons montré que le peptide est capable de pénétrer dans les cellules souches neurales (CSNs) *in vitro* de manière passive et *in vivo*, et n'est pas toxique pour les cellules. Après plusieurs jours en présence du peptide, les propriétés dites « souches » de cellules, telle que la capacité à proliférer et à s'auto-renouveler diminuent, et les cellules se différencient en cellules plus matures.

Les résultats indiquent que le peptide pourrait être un agent thérapeutique intéressant pour cibler les CSNs endogènes du cerveau dans le cas de maladies neurodégénératives afin de stimuler la différenciation de ces cellules.

Mots clés

Peptide pénétrant, cellules souches neurales, ciblage, différenciation

The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63: A promising therapeutic agent to target and manipulate neural stem cells and glioblastoma cells

Abstract

The laboratory discovered the presence of tubulin binding sites (TBS) on intermediate filaments, like on the neurofilaments (NF) that are specifically expressed by neurons. The NFL-TBS.40-63 peptide, which corresponds to the sequence of TBS on the light subunit of NF, has showed an anti-glioblastoma property in vitro and in vivo, without effect on surrounding healthy cells (neurons and astrocytes). Moreover, it induces the differentiation and maturation of oligodendrocyte precursors without impacting the viability of these cells.

Our studies, during the PhD, allowed us to exploit the NFL-TBS.40-63 peptide as a possible therapeutic agent for regenerative medicine. Indeed, we showed that the peptide penetrates passively in neural stem cells (NSCs) in vitro and in vivo, and it is not toxic for cells. After several days with the peptide, the “stem” cell properties of cells, including the capacity to proliferate and self-renew, diminish and the cells differentiate into more mature cells.

These data indicate that the NFL-TBS40-63 peptide could be a promising therapeutic agent to target endogenous brain NSCs in neurodegenerative disorders to stimulate the differentiation of these cells.

Key words

Cell penetrating peptide, neural stem cells, targeting, differentiation

*Follow your dreams, even if that includes going
through some nightmares*

Paulo Coelho

Remerciements

Cette thèse a été pour moi une expérience de vie inoubliable mais infaisable sans l'aide de quelques personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation et l'aboutissement de cette thèse. Je tiens donc à les remercier car une thèse est une course qui se réalise en équipe.

Tout d'abord je souhaiterais remercier mon directeur de thèse, le docteur Joël Eyer, pour m'avoir accueilli (pour la deuxième fois) au sein de son laboratoire et encadré durant cette thèse. Je le remercie de m'avoir fait confiance tout au long de ces trois années, pour tous ses conseils précieux. Je tiens à le remercier pour sa disponibilité, pour toutes les corrections des articles scientifiques / revues / posters / manuscrits de thèse et même lettres de motivations ! Cette thèse a été pour moi très enrichissante, tant au niveau professionnel, personnel, relationnel et scientifique. Pour finir, merci pour les avertissements contre le danger de la moto ! (même si cela ne m'empêchera pas d'en faire...)

Je souhaiterais remercier le docteur Claudia Montéro-Menei, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur des cellules souches neurales humaines mais aussi pour tous ses conseils scientifiques et professionnels. Merci pour votre écoute et vos conseils lors de 2 comités de suivis de thèse, ils m'ont été précieux. Merci aussi pour toutes les corrections de ce manuscrit.

Je remercie le professeur Patrick Vicart et le docteur Cécile Martinat, pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse en tant que rapporteur, d'avoir lu ce manuscrit et de l'avoir évalué. Merci pour votre disponibilité.

J'aimerais remercier particulièrement le professeur Patrick Saulnier, directeur de l'équipe MINT et président du jury de thèse pour sa disponibilité au cours de ces dernières années, pour sa gentillesse et sa compréhension.

Je remercie le docteur Pascale Bomont et le professeur Masayuki Takashi, pour leurs précieux conseils lors des différents comités de suivis de thèse, pour leurs jovialités et leurs disponibilités.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire, pour leur sympathie et leur accueil. Merci au docteur Catherine Fressinaud et au Professeur Annick Barthelaix pour cela.

J'aimerais remercier particulièrement le double docteur Franck Letournel, pour son aide au quotidien, sa sympathie et sa jovialité. Merci pour toutes les pauses café du matin (et du midi) autour de discussions plus ou moins scientifiques et professionnelles. Je te remercie d'avoir pris soin de tes nouveaux compagnons (et même de les avoir partagé !) même s'ils n'ont pas survécu ... ! Merci de tous tes conseils tout au long de ces années.

Je souhaiterais aussi remercier le docteur Claire Lépinoux Chambaud qui m'a vu « grandir » puisqu'elle était mon encadrante de stage de BTS (en 2010...), pour tes précieux conseils scientifiques ou non, pour le soutien apporté tout au long du doctorat, et ta gentillesse. Merci aussi pour toutes les discussions autour d'un bon café (on ne parle pas du café-soluble !), les congrès mais aussi pour m'avoir fait découvrir Confolens et la « Beau-dégâts » qui n'existe plus aujourd'hui (Je ne pense pas que j'aurais été sans cette occasion). Je te souhaite bon courage pour la suite de ton aventure, j'espère de tout cœur que ce projet ira loin. Merci pour tout.

Je remercie aussi Catherine Guillet et Jérôme Cayon de la plateforme PACeM pour le FACS et RT-PCR et tous leurs conseils scientifiques. J'aimerais aussi les remercier pour les jovialités, ce fut un plaisir de manger avec vous les midis. Bon courage à Catherine pour le risque « aquaplaning » sur les trajets. Merci à vous pour votre aide.

Merci aussi à Sébastien Boni, pour les discussions motos (ou autres) volées dans les couloirs, mais aussi pour ses conseils scientifiques.

Un merci aussi à Pascale Champagne, pour sa bonne humeur et les repas partagés.

Je remercie aussi Laurence Sindji et Nolween Lautram pour tous leurs conseils et leurs disponibilités. Je souhaite aussi remercier toute l'équipe du SCIAM et particulièrement à Rodolphe Perrot pour les heures passées au confocal.

Je remercie aussi tous les stagiaires (nommés aussi « esclaves ») qui sont passés au laboratoire, pour m'avoir supporté et aidé dans les différents projets de recherches. Merci aussi pour les gâteaux indispensables à votre réussite !

J'aimerais remercier la bourse NanoFar qui a financé ces 3 années de la thèse.

Pour finir, mes remerciements vont à mes familles et mes amis ... sans eux je n'en serais pas là.

Tout d'abord j'aimerais remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans ces études. Ils m'ont apporté les valeurs de la vie et ont fait de moi qui je suis aujourd'hui, je souhaite à tout le monde d'avoir des parents comme les miens. J'embrasse aussi mémé pour sa joie de vivre et son soutien sans oublier ceux qui sont au ciel. Sans vous je n'y serais jamais arrivée donc un énorme merci !

A mes sœurs, Maud et Marie, et leur conjoint respectifs, Jonathan et Sylvain pour tout ce que vous êtes, pour votre soutien et vos encouragements. Vous êtes unique et je vous en remercie, vous êtes mon antidépresseur au naturel !

Et au petit bout de la famille, Mohan, le nouveau grain de folie de cette famille extraordinaire.

Un grand merci spécialement à mon conjoint, Damien Goraud, qui me supporte au quotidien (et ce n'est pas chose facile), pour m'avoir toujours soutenue, encouragée et admirée. Même s'il n'arrive toujours pas à comprendre ce métier, je le remercie d'essayer ! Je lui suis particulièrement reconnaissant d'être là pour parcourir ensemble le voyage de la vie.

J'aimerais aussi remercier mes beaux-parents et beau-frère, belle-sœur pour les compréhensions et leur soutien ainsi que mes beaux-grands-parents.

Je remercie aussi tous mes amis, les vieux comme les plus neufs, de m'avoir supporté et soutenue durant toutes ces années !

Pour finir, je dédicace cette thèse à l'ensemble de ma famille qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans ces loonnngues années études, et qui sans eux, ne se seront jamais réalisées ! Et pour ceux qui n'ont toujours pas compris : oui les études sont finiiies !!

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION.....	14
Chapitre 1 : Le système nerveux central et les maladies neurologiques associées	15
1.1. Généralités sur le système nerveux	16
1.2. Les cellules du système nerveux central	17
1.2.1. Les cellules neuronales	18
1.2.2. Les cellules gliales	19
1.2.2.1. Les astrocytes	19
1.2.2.2. Les oligodendrocytes	20
1.2.2.3. La microglie	22
1.2.2.4. Les cellules épendymaires.....	23
1.2.3. Les cellules souches neurales.....	24
1.3. Le cytosquelette des cellules du SNC	24
1.3.1. Les microtubules (MTs).....	25
1.3.1.1 Expression différentielle des tubulines.....	26
1.3.2. Les microfilaments d’actines ou microfilaments (MFs)	28
1.3.3. Les filaments intermédiaires (FI).....	29
1.3.4. Les Neurofilaments (NFs).....	31
1.4. Les maladies neurologiques	31
1.4.1. Les maladies neurodégénératives.....	32
1.4.1.1. La maladie d’Alzheimer.....	32
1.4.1.2. La maladie de Parkinson	34
1.4.1.3. La maladie de Huntington.....	35
1.4.1.4 La Sclérose en plaque (SEP).....	37
1.4.1.4. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA).....	38
1.4.2. Les tumeurs cérébrales : Les gliomes	39
Chapitre 2 : Les cellules souches.....	41
2.1. Généralités sur les cellules souches	42
2.2. Différents types de cellules souches.....	43
2.2.1. Les cellules souches embryonnaires (CSEs).....	43
2.2.2. Les cellules souches pluripotentes induites (CSPis ou iPS cells en anglais).....	44
2.2.3. Les cellules souches adultes (CSAs).....	46
2.2.4. Les cellules souches fœtales (CSFs)	47
2.3. Les cellules souches neurales	47
2.3.1. Caractérisation des cellules souches neurales	48
2.3.2. Localisation des CSNs adultes	49

2.3.2.1.	Facteurs intrinsèques régulant les CSNs	52
2.3.2.2.	Les facteurs extrinsèques régulant les cellules souches neurales	54
2.4.	Les cellules souches neurales et les maladies neurologiques	56
2.4.1.	Les cellules souches neurales et les maladies neurodégénératives.....	57
2.4.2.	Les cellules souches neurales et les gliomes	61
2.4.2.1.	Implication des cellules souches neurales endogènes dans la gliomagenèse	61
2.4.2.2.	Les cellules souches neurales comme traitement pour les gliomes.....	62
Chapitre 3 :	Les peptides pour le traitement des maladies neurologiques.....	65
3.1.	Généralité sur les peptides pénétrants (CPPs pour <i>cell-penetrating peptides</i>).....	66
3.2.	Mécanismes d'internalisation des CPPs	67
3.2.1.	Les méthodes de détection	67
3.2.2.	Importance des propriétés physico-chimiques du CPP	68
3.2.3.	La translocation directe.....	69
3.2.4.	L'endocytose.....	71
3.3.	Applications des CPPs.....	73
3.3.1.	Les CPPs pour l'imagerie.....	76
3.3.2.	Les CPPs pour la délivrance de protéines	76
3.3.3.	Les CPPs pour la délivrance d'acides nucléiques	77
3.3.4.	Les CPPs pour la délivrance de nanoparticules.....	77
3.4.	Les peptides issus des filaments intermédiaires	80
3.4.1.	Découverte des peptides "TBS" (pour "Tubulin-Binding sites").....	80
3.4.2.	Le peptide VIM-TBS.58-61	82
3.4.3.	Le peptide NFL-TBS.40-63	82
3.4.3.1.	Propriété anti-glioblastome du peptide NFL-TBS.40-63	82
3.4.3.2.	Le rôle de neuro-modulation du peptide NFL.TBS.40-63	86
Chapitre 4 :	Projets de recherche	88
RESULTATS	92
1^{er} Article de revue :	Review of clinical Trials Using Neural Stem Cells.....	93
1^{er} article scientifique :	The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63 targets neural stem cells and affects their properties.	101
2^{ème} article scientifique :	The neurofilament derived-peptide NFL-TBS.40-63 enters in-vitro in human neural stem cells and increases their differentiation	122
3^{ème} article scientifique :	The carbocyanine dye DiD labels in vitro and in vivo neural stem cells of the subventricular zone as well as myelinated structures following in vivo injection in the lateral ventricle.....	166

2^{ème} article de revue : Review on glioblastoma management and new challenges.....	180
DISCUSSION	200
Ciblage des cellules par le peptide NFL-TBS.40-63	202
Effets induit par le peptide NFL-TBS.40-63	206
Effets sur le réseau de microtubules des cellules	206
Effets sur les propriétés des cellules	207
Conclusions générales	210
ANNEXES	211
Liste des figures.....	212
Liste des tableaux.....	215
Bibliographie	217

Liste des abréviations

5-HT:	"5-HydroxyTryptamine" (ou Sérotonine)
aa:	acide aminé
ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
ADP:	Adénosine Diphosphate
AP-2 :	"Adaptator Protein 2"
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP:	Adénosine TriPhosphate
AVC:	Accident Vasculaire Cérébral
Aβ:	Amyloïde β
BDNF:	"Bone-Derived Neurotrophic Factor"
BHE:	Barrière Hémato-Encéphalique
bHLH :	"Basic Helix-Loop-Helix"
BLBP :	"Brain-Lipid Binding Protein"
BMP:	Bone Morphogenic Protein
CNTF:	"Ciliary Neurotrophic Factor"
CPO:	Cellule Précurseur d'Oligodendrocyte
CPP:	"Cell Penetrating Peptide"
CSA:	Cellule Souche Adulte
CSE:	Cellule Souche Embryonnaire
CSF :	Cellule Souche Fœtale
CSH:	Cellule Souche Hématopoïtique
CSM:	Cellule Souche Mésenchymateuse
CSN:	Cellule Souche Neurale
CSPi:	Cellule Souche Pluripotente induite
DCX:	"Doublecortin"
EGF:	"Epidermal Growth Factor"
EGFR:	"Epidermal Growth Factor Receptor"
FABP7:	"Fatty Acid Binding Protein 7"
FGF:	"Fibroblast Growth Factor"
FI:	Filament intermédiaire
FIV :	Fécondation in vitro
G-SCF	"Granulocyte- Colony Stimulating Factor"
GABA:	"Gamma Amino Butyric Acid"
GAG:	Glycosaminoglycanes
GDP:	Guanosine DiPhosphate
GFAP:	"Glial fibrillary acidic protein"
GLAST:	"Glutamate Aspartate Transporter"
GTP:	Guanosine TriPhosphate
HDAC:	"Histone DéACétylase"
HTT :	Huntingtine
IDH:	"Isocitrate DeHydrogenase"
IFNγ:	Interferon gamma
IGF:	"Insulin-like Growth Factor-1"

Klf4:	"Kruppel-Like Factor 4"
LCR:	Liquide CéphaloRachidien
LNC:	"Lipid NanoCapsule"
LPC :	"LysoPhosphaydil Choline"
LRRK2:	"Leucin Rich Repeat Kinase 2" "Matrix Assisted Laser Desorption time-of-flight Mass Spectrometry"
MALDI-TOF SM:	Spectrometry"
MAP:	"Microtubule-Associated Protein"
Mbd1 :	"Methyl-CpG BinDing protein"
MEC:	Matrice Extra-Cellulaire
MF :	MicroFilaments
MGMT:	"O-6 methylguanine-DNA methyltransferase"
MT:	Microtubule
MTOC:	"MicroTubule Organizing Center"
NFH :	"NeuroFilament Heavy"
NFL :	"NeuroFilament Light"
NFM :	"NeuroFilament Middle"
NGF:	"Nerve Growth Factor"
NLS :	"Nuclear Localization Sequence"
Oct3/4:	"Octamer-binding Transcription factor 3/4"
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
PcG :	"Polycomb-Group protein"
PDGF:	"Platelet-Derived Growth Factor"
PEDF:	"Pigment Epithelium-Derived Factor"
PNA:	"Peptide Nucleic Acid"
PTD:	"Protein Transduction Domain"
SDF-1:	"Stromal Cell-Derived Factor-1"
SEP :	Sclérose En Plaque
SiRNA:	"Small Interfering RNA"
SLA:	Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC:	Système Nerveux Central
SNP:	Système Nerveux Périphérique
SOD1:	"Superoxide Dismutase 1"
SOX2:	"SRY-related HMG-box gene 2"
SSEA-1:	"Stage-Specific Embryonic Antigen 1"
TAP:	"Transit Amplifying Precursor"
TBS:	"Tubulin Binding Site"
TIC:	Thérapie d'Intervention Cognitive
TNFα:	"Tumor Necrosis Factor alpha"
VL:	Ventricule Latéral
ZSG:	Zone Sous Granulaire
ZSV:	Zone Sous Ventriculaire

Introduction

Chapitre 1

Le système nerveux central et les maladies neurologiques associées

1.1. Généralités sur le système nerveux

Le système nerveux est constitué du système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP). Le premier est composé de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et de la moelle épinière situés respectivement dans la boîte crânienne et dans le canal rachidien. Le second comprend les ganglions et les nerfs (12 paires de nerfs crâniens provenant du tronc cérébral et 31 paires de nerfs rachidiens émanant de la moelle épinière) (**Figure 1.1**). Dans le SNC il faut différencier la substance grise qui contient principalement les corps cellulaires des neurones et la substance blanche qui correspond à leurs prolongements. La substance grise joue un rôle dans la réception, l'analyse et l'élaboration de messages nerveux alors que la substance blanche permet de transmettre les informations.

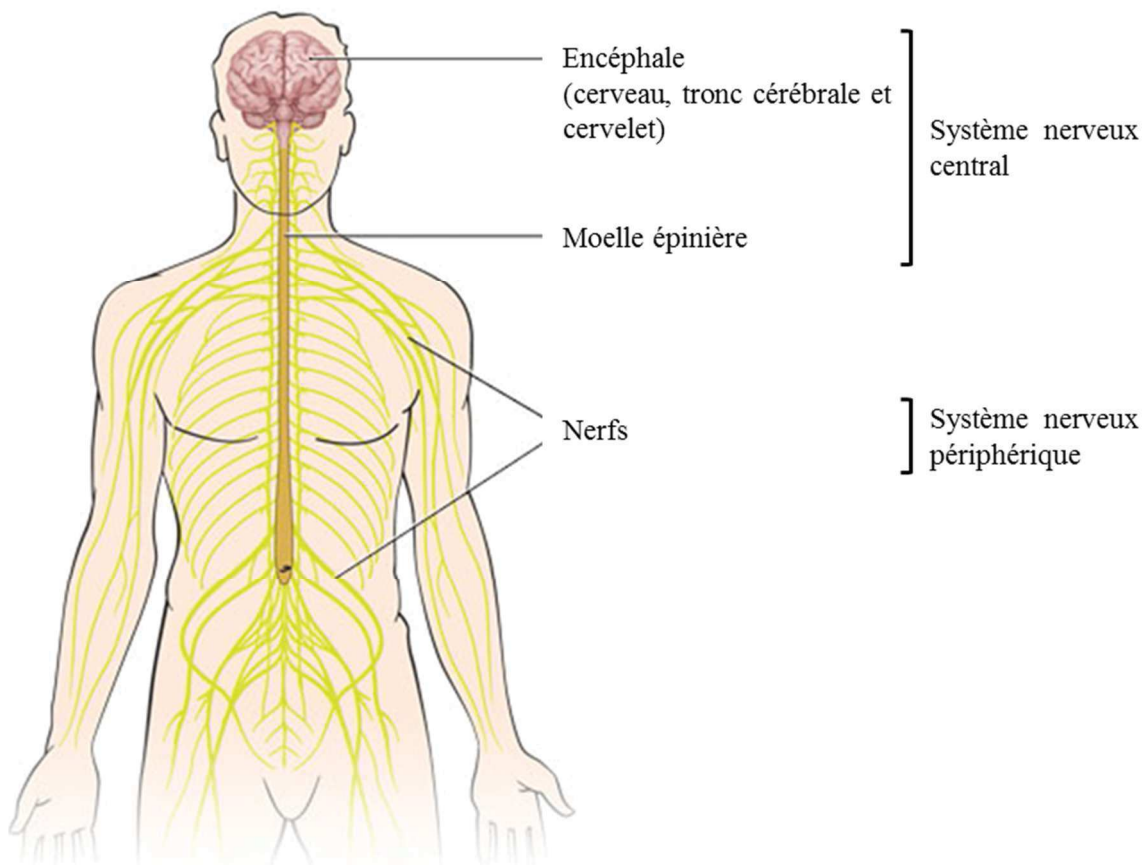
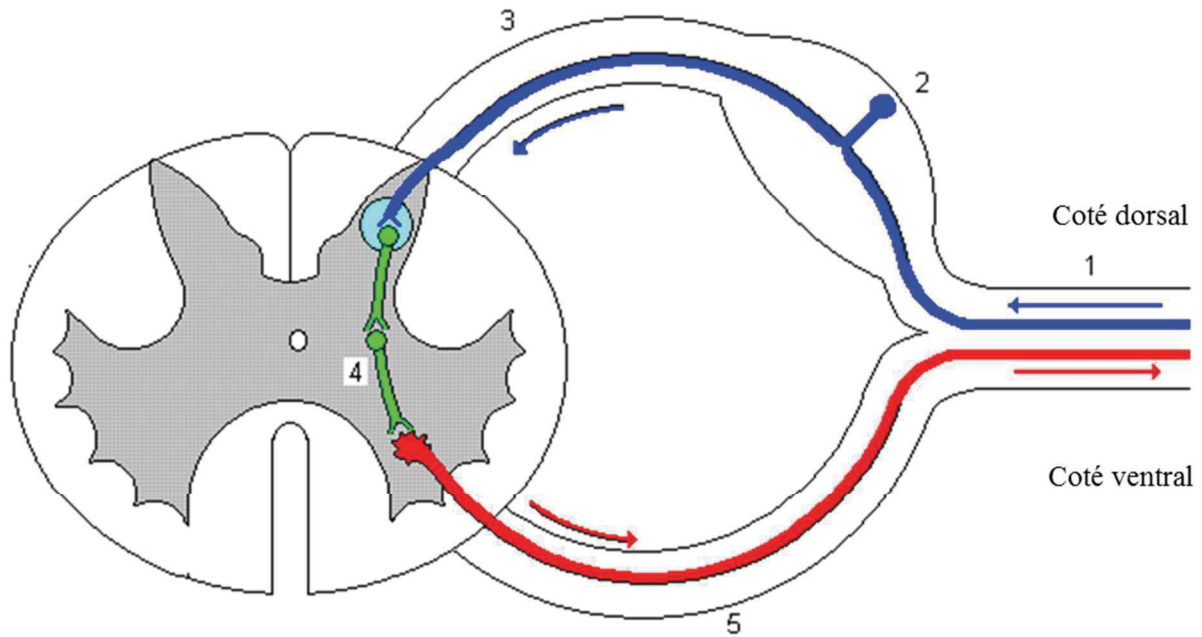


Figure 1.1: Les deux systèmes nerveux.

Le système nerveux central constitué de l'encéphale et la moelle épinière et le système nerveux périphérique constitué des nerfs.

(Modifiée d'après www.bodywellnessprogram.com)

Les deux systèmes sont interconnectés et permettent le fonctionnement correct des fonctions vitales de l'organisme, ainsi que les fonctions motrices, cognitives et sensorielles grâce à la réception, l'intégration et l'émission d'informations. Ils sont reliés par les racines dorsales et ventrales au niveau de chaque segment de la moelle épinière. Les informations sensibles provenant du système périphérique arrivent du côté dorsal, tandis que les réponses à ces informations sont émises du côté ventral (**Figure 1.2**).



- | | |
|----------------------------|---------------------|
| (1) Informations sensibles | (4) Interneurone(s) |
| (2) Ganglion spinal | (5) Racine ventrale |
| (3) Racine dorsale | |

Figure 1.2: Connexions entre le SNC et le SNP.

Les deux systèmes sont interconnectés grâce aux racines dorsales et ventrales qui permettent une communication entre l'information sensible afférente et l'information motrice efférente.

(Modifiée d'après www.anatomie-humaine.com)

1.2. Les cellules du système nerveux central

Le système nerveux est principalement constitué de 2 types de cellules : les cellules neuronales et les cellules gliales (**Figure 1.3**). Les neurones permettent de recevoir et transmettre l'information alors que les cellules gliales jouent un rôle de support pour maintenir le contact entre deux synapses, participent indirectement à l'activité neuronale et protègent les neurones grâce à leur activité immunitaire (Purves et al., 2001a).

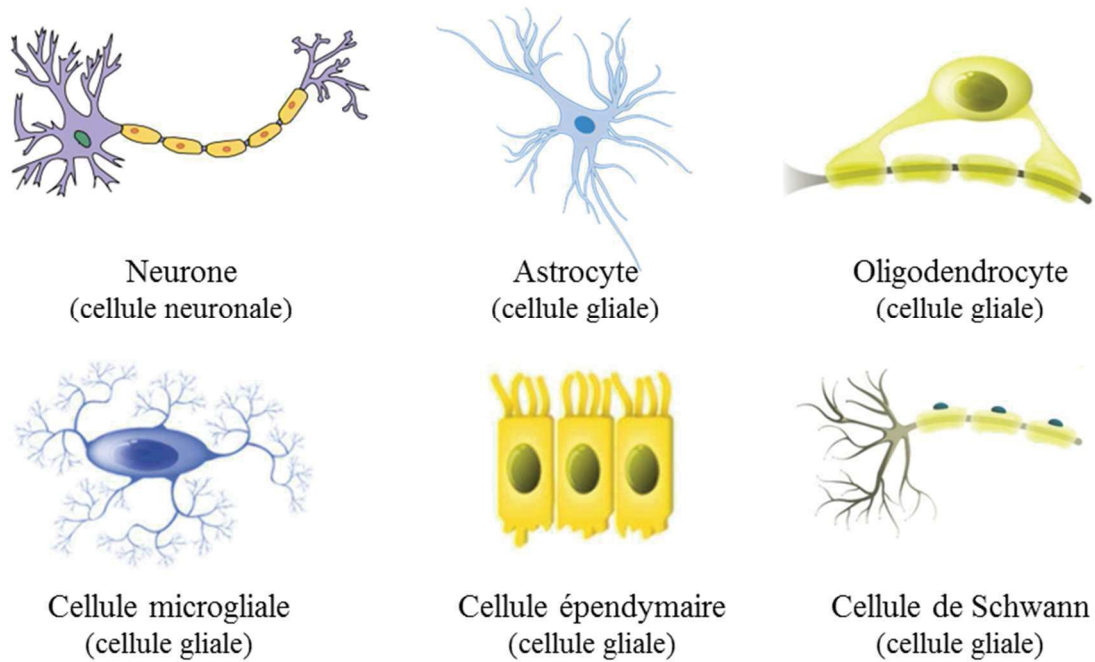


Figure 1.3: Les différents types de cellules dans le système nerveux central et périphérique : les cellules neuronales et les cellules gliales.

1.2.1. Les cellules neuronales

Les neurones sont des cellules post-mitotiques, c'est-à-dire qu'ils ne se divisent plus après maturation. Cependant, à l'âge adulte de nouveaux neurones peuvent se générer pour s'incorporer aux réseaux neuronaux préexistants (Purves et al., 2001b). Cette production est réalisée grâce aux cellules souches neurales (CSNs) présentes dans les zones neurogéniques du cerveau (voir chapitre « cellules souches »). Il existe trois types de neurones principaux : les neurones sensitifs qui reçoivent les informations et les transmettent au SNC, les neurones d'associations qui ont un rôle d'intermédiaire pour coordonner le système, et les motoneurones qui transmettent l'information aux organes. Tous ces neurones sont constitués de trois parties : le corps cellulaire, et ses prolongements : les dendrites et l'axone.

Dans la majorité des cas, le neurone possède plusieurs dendrites mais il ne possède qu'un seul axone qui peut s'étendre à un mètre et dont le diamètre varie entre 1 à plus de 10 μm (Lodish et al., 2000a). Le neurone transmet le message grâce à la synapse qui correspond à la communication entre la terminaison de l'axone (partie présynaptique) et la zone post-synaptique (qui peut être une dendrite) (Figure 1.4).

On trouve deux grands types de synapses qui dépendent de la manière de transmettre le message : alors que les synapses chimiques utilisent les neurotransmetteurs pour communiquer, les synapses électriques permettent le transfert d'ions directement entre deux neurones grâce à des jonctions communicantes appelées aussi jonctions GAP (Lodish et al., 2000b, 2000a). Les synapses chimiques sont les plus communes chez les mammifères.

Les axones sont généralement entourés d'une gaine de myéline séparée par des nœuds de Ranvier. La myéline provient des oligodendrocytes dans le SNC et des cellules de Schwann dans le SNP. Les nœuds de Ranvier sont isolés par des astrocytes (Girault and Peles, 2002). La myéline intervient comme un « isolant » permettant d'augmenter l'influx nerveux (Morell and Quarles, 1999) (Figure 1.4).

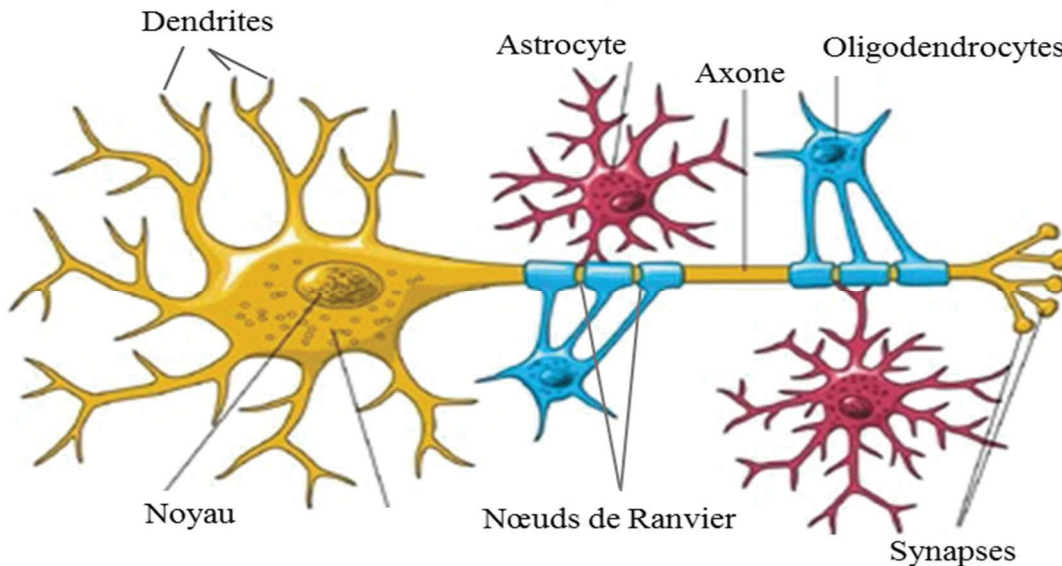


Figure 1.4: Morphologie d'un neurone.

Un neurone est formé de plusieurs dendrites, d'un corps cellulaire avec le noyau et d'un axone terminé par des synapses. Les cellules environnantes (astrocytes et oligodendrocytes) interagissent avec le neurone.

(Modifiée d'après www.edn.com)

1.2.2. Les cellules gliales

Les cellules gliales représentent en moyenne 50% de la totalité du volume cérébral. Il existe des cellules macrogliales et des cellules microgliales qui jouent un rôle dans le maintien, la survie et le développement des neurones. Dans le SNC, les cellules macrogliales correspondent aux astrocytes et aux oligodendrocytes qui proviennent de la même origine embryonnaire que les neurones (le neuroectoderme) alors que les cellules microgliales (la microglie) a pour origine le mésoderme.

1.2.2.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses dans le cerveau (Jessen, 2004). En forme d'étoile, ils apportent les nutriments nécessaires au fonctionnement des neurones. Ils contactent les vaisseaux sanguins grâce à leurs pieds astrocytaires, ce qui permet un contrôle de la barrière hématoencéphalique (BHE) via un rôle de filtration (Jessen, 2004; Stobart and Anderson, 2013). Ils peuvent aussi moduler la dilatation des vaisseaux sanguins. Les astrocytes sont également retrouvés

autour des synapses et jouent un rôle dans la modulation de la transmission synaptique (Ricci et al., 2009; Stobart and Anderson, 2013) (Figure 1.5). En effet, ils sont capables de capter les neurotransmetteurs ou les ions libérés dans la fente synaptique pour réguler la concentration de ces molécules. De plus, les astrocytes eux même sont capables de libérer des transmetteurs dits « gliotransmetteurs » qui affectent l'activité synaptique (Stobart and Anderson, 2013).

Enfin, les astrocytes ont un rôle important dans la protection du cerveau contre le stress oxydatif en absorbant le glutamate excédentaire qui est toxique pour les autres cellules (Ricci et al., 2009). De plus, on retrouve des astrocytes dits « réactifs » dans les maladies neurodégénératives qui stimulent la microglie mais aussi l'activité neuronale (Pekny and Nilsson, 2005; Ricci et al., 2009) ainsi que la différenciation (Guo et al., 2013).

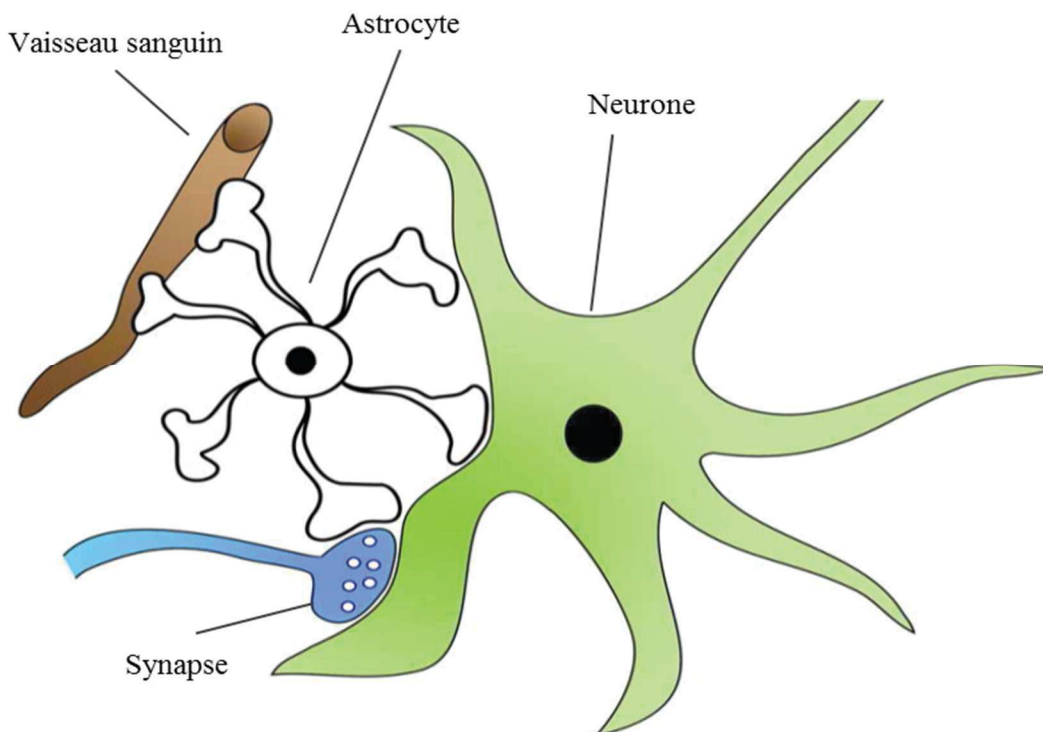


Figure 1.5: Interaction d'un astrocyte avec son environnement.

Un astrocyte est capable d'interagir avec des capillaires, les synapses et directement avec les neurones.
(Modifiée d'après Jessen, 2004)

1.2.2.2. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules qui forment la myéline autour des axones dans le SNC, ce qui permet leur isolation électrique (Baumann and Pham-Dinh, 2001). La myéline correspond à l'extension de la membrane plasmique de l'oligodendrocyte qui s'enroule progressivement autour de l'axone. L'accolement des membranes et leur fusion entraînent la formation de la gaine de myéline (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Sherman and Brophy, 2005; Michalski and Kothary, 2015) (Figure 1.6).

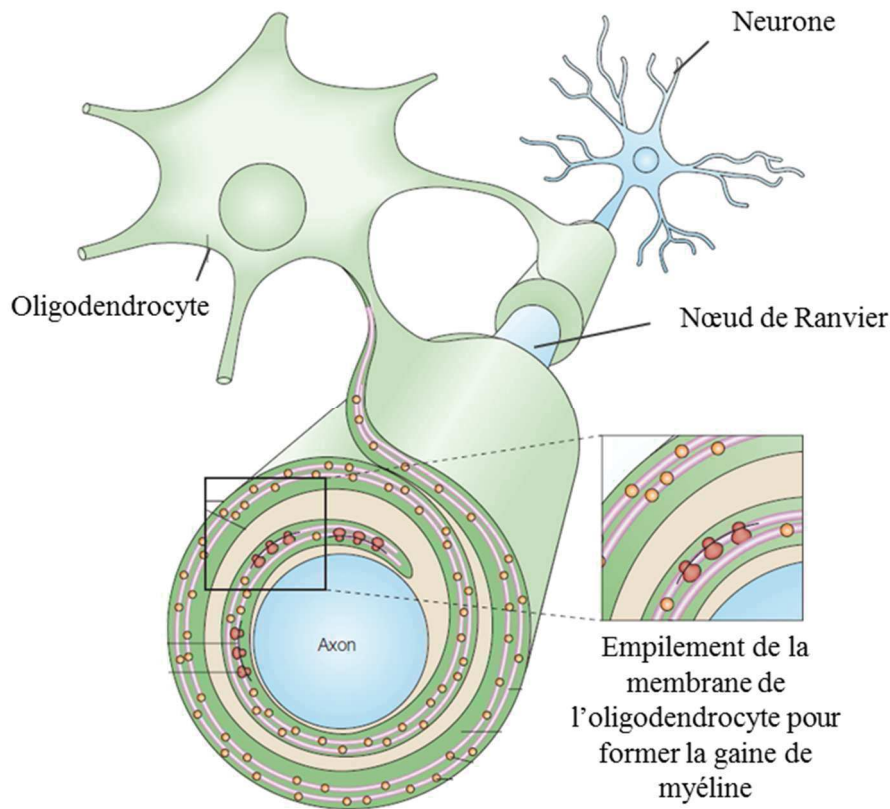


Figure 1.6: Schéma d'un oligodendrocyte qui forme la gaine de myéline autour d'un axone d'un neurone.

La gaine de myéline correspond à l'extension de la membrane cellulaire de l'oligodendrocyte qui s'enroule progressivement autour de l'axone d'un neurone. La gaine de myéline est séparée par les nœuds de Ranvier qui permettent la conduction saltatoire du message nerveux.

(Modifiée d'après Sherman et Brophy, 2005)

La séparation de la gaine de myéline par les nœuds de Ranvier permet une conduction saltatoire du message nerveux et ainsi une conduction plus rapide de l'information (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Différentes études ont montré que les oligodendrocytes pourraient avoir le même rôle que les astrocytes, à savoir un rôle trophique et un rôle de substrat métabolique pour les neurones (Dai et al., 2003). De plus, ils secrètent des molécules en réponse à une activité neuronale (Michalski and Kothary, 2015). Il existe aussi des oligodendrocytes non myélinisants (oligodendrocytes satellites) qui servent à réguler le microenvironnement neuronal (Baumann and Pham-Dinh, 2001). Contrairement aux cellules myélinisantes du SNP (les cellules de Schwann), un oligodendrocyte est capable de myéliniser plusieurs axones en même temps (Michalski and Kothary, 2015).

1.2.2.3. La microglie

La microglie est constituée par des cellules mobiles qui sont considérées comme le système immunitaire du SNC car elles permettent la libération de molécules inflammatoires et de molécules oxygénées réactives (Lull and Block, 2010; Wake and Fields, 2011). Elles représentent en moyenne 12% des cellules du cerveau (Franco and Fernández-Suárez, 2015) mais leur nombre et leurs fonctions varient en fonction de la région où elles se trouvent (Lull and Block, 2010; Wake and Fields, 2011). En condition physiologique, elles sont considérées comme des cellules en repos qui prennent la forme d'une cellule très ramifiée avec de longs et fins prolongements (Lull and Block, 2010). Ainsi, elles explorent le cerveau grâce à l'extension et la rétraction de ces prolongements (Lull and Block, 2010; Wake and Fields, 2011) permettant de maintenir adéquatement l'homéostasie et d'identifier les signaux qui engendreraient une réactivité. En présence de signaux extracellulaires (présence d'un pathogène, mort neuronale), la microglie « s'active » et prend la forme ronde dite « amiboïde » avec peu ou pas de prolongement (Lull and Block, 2010) (**Figure 1.7**). Cette forme activée favorise la mobilité de la cellule ainsi que la phagocytose. La différence de morphologie est aussi accompagnée d'une différence dans l'expression de récepteurs ou encore la libération de facteurs inflammatoires (Lull and Block, 2010; Wake and Fields, 2011).

En plus de leurs rôles dans la phagocytose des neurones et synapses qui ont dégénéré, ainsi que dans le contrôle de la mort cellulaire programmée, les cellules de la microglie sont impliquées dans le contrôle du destin des neurones et de leurs progéniteurs (Wake and Fields, 2011). En effet, elles peuvent libérer des facteurs de croissance ou des facteurs neurotrophiques afin de contribuer à la plasticité synaptique et la neurogénèse (Heneka et al., 2014). L'activité neuronale entraîne une modification du comportement de la microglie (Wake and Fields, 2011), et elle interagit continuellement avec les astrocytes, les neurones et même les vaisseaux sanguins (Heneka et al., 2014). Elles sont enfin impliquées dans la dysfonction cognitive liée à l'âge, contribuant à la pathogénèse et à la progression des maladies neurodégénératives (Wake and Fields, 2011).

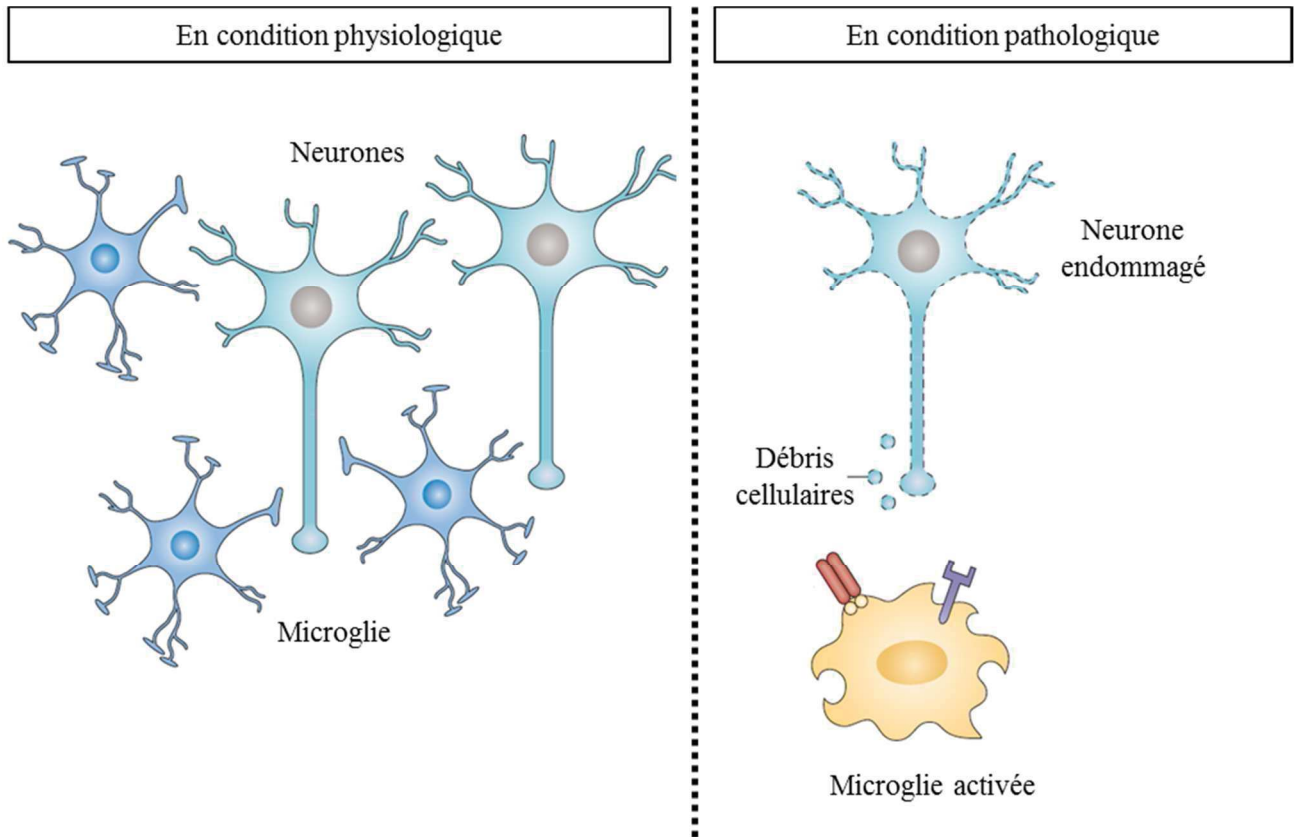


Figure 1.7: Microglie en condition physiologique ou pathologique.

En condition physiologique la microglie, sous forme ramifiée, va sonder l'environnement pour détecter des signaux qui vont provoquer une activation. En condition pathologique, la microglie change sa morphologie pour avoir une forme ronde amiboïde et exprime des récepteurs spécifiques aux stimuli.

(Modifiée d'après Heneka et al., 2014)

1.2.2.4. Les cellules épendymaires

Ces cellules gliales sont présentes le long des ventricules du système nerveux, et le long du canal central jusqu'à la partie terminale de la moelle épinière (Del Bigio, 2010). Elles ont pour fonction principale de synthétiser le liquide céphalorachidien (LCR) où baigne le cerveau (Yeh and Westerman, 2015). De plus, elles jouent un rôle de barrière grâce à leurs cils qui permettent la filtration des molécules provenant du LCR. Elles ont aussi un rôle dans le transport de molécules entre le LCR et le cerveau (Del Bigio, 2010) (Figure 1.8). De plus, les cellules épendymaires modulent leur environnement en sécrétant des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion ou des molécules impliquées dans la production de la matrice extracellulaire (MEC). Elles communiquent avec leur environnement grâce à leurs jonctions, permettant ainsi un contrôle de l'homéostasie (Del Bigio, 2010).

Certaines études montrent qu'en condition pathologique, ces cellules pourraient être impliquées dans la formation de nouveaux neurones. Cependant, elles ne sont pas capables de s'auto-renouveler, ce qui les différencie des CSNs (Li et al., 2002; Morrens et al., 2012).

Dans le SNP, on retrouve les cellules de Schwann qui ont le même rôle que les oligodendrocytes, les cellules gliales entériques et les cellules satellites.

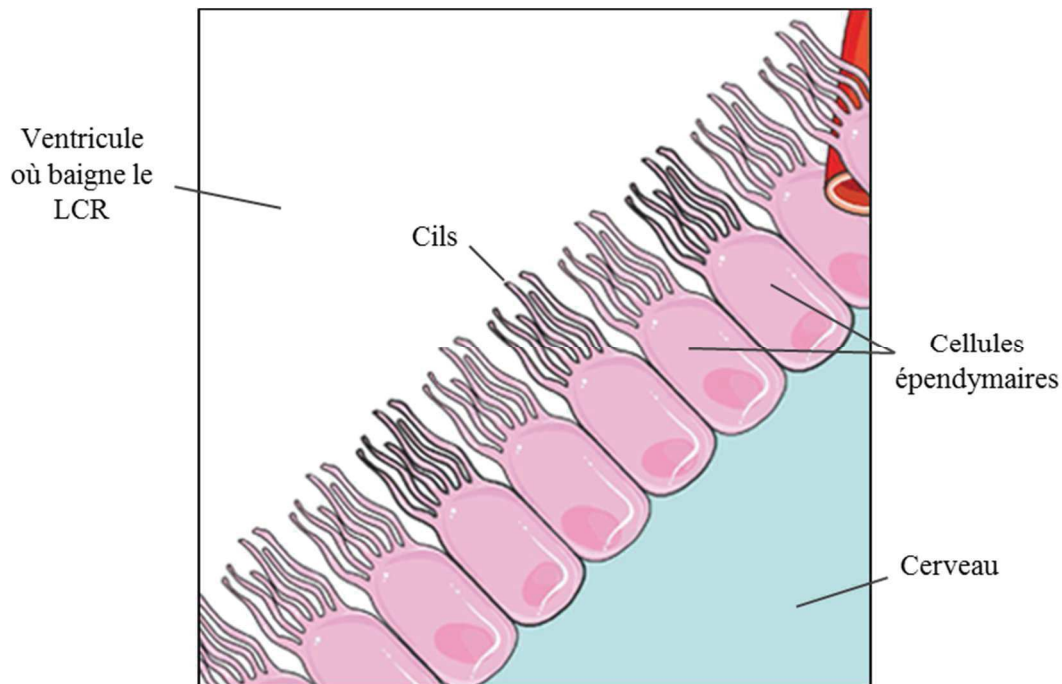


Figure 1.8: Schéma des cellules épendymaires.

Les cellules épendymaires sont présentes le long des ventricules et sont en contact avec le LCR. Les cils permettent une filtration des molécules entrantes dans le cerveau.

(Modifiée d'après www.sirtin.fr)

1.2.3. Les cellules souches neurales

Les CSNs sont des cellules indifférenciées du système nerveux qui jouent un rôle primordial dans la neurogenèse au cours du développement mais aussi à l'âge adulte. Ces cellules seront décrites plus précisément dans une partie suivante.

1.3. Le cytosquelette des cellules du SNC

Le cytosquelette correspond aux structures filamenteuses qui permettent le maintien de la forme de la cellule et son organisation interne. Il joue aussi un rôle important dans des fonctions essentielles comme la division et les mouvements cellulaires. Il est constitué de 3 structures principales : les microfilaments d'actine (MFs), les microtubules (MTs) et les filaments intermédiaires (FI) (Figure 1.9).

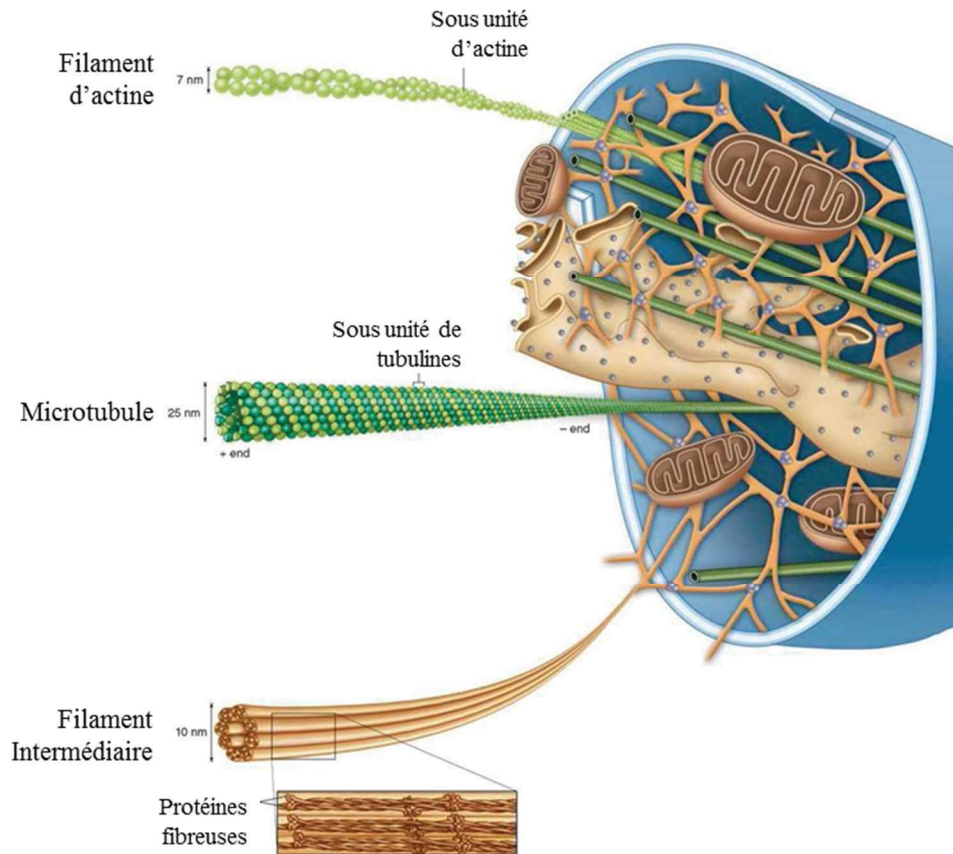


Figure 1.9: Le cytosquelette cellulaire.

Constitué de 3 principaux éléments : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires.

(Modifiée d'après <http://schoolbag.info/biology/living/31.html>)

1.3.1. Les microtubules (MTs)

Ce sont les éléments les plus gros du cytosquelette avec un diamètre d'environ 25 nm. Ils sont constitués de dimères de tubuline α et β (protéines globulaires d'environ 50 kD) qui se polymérisent entre eux pour former des protofilaments. Il faut 13 protofilaments pour former un MT qui aura la forme d'un tube creux.

Les MTs sont des structures dynamiques qui se polymérisent et se dépolymérisent rapidement. Une extrémité (nommée extrémité (+)) se polymérise plus vite que l'autre (extrémité (-)). L'extrémité (-) est ancrée au sein du MTOC (« Microtubule Organizing Centers ») souvent localisé proche du noyau. Il existe une 3^{ème} sous unité de tubuline : la γ -tubuline. Cette tubuline permet généralement l'ancrage des MTs au MTOC (Conduit, 2016). La dynamique des MTs est réalisée grâce à un changement du GTP (Guanosine TriPhosphate) en GDP (Guanosine DiPhosphate) lié sur la tubuline, et entraînant une « catastrophe » (dépolymérisation rapide du MT) (Brouhard, 2015) (Figure 1.10). D'autres protéines

sont indispensables à la (dé)polymérisation des MTs telles que les protéines MAPs (« Microtubules Associated Proteins ») (Brouhard, 2015).

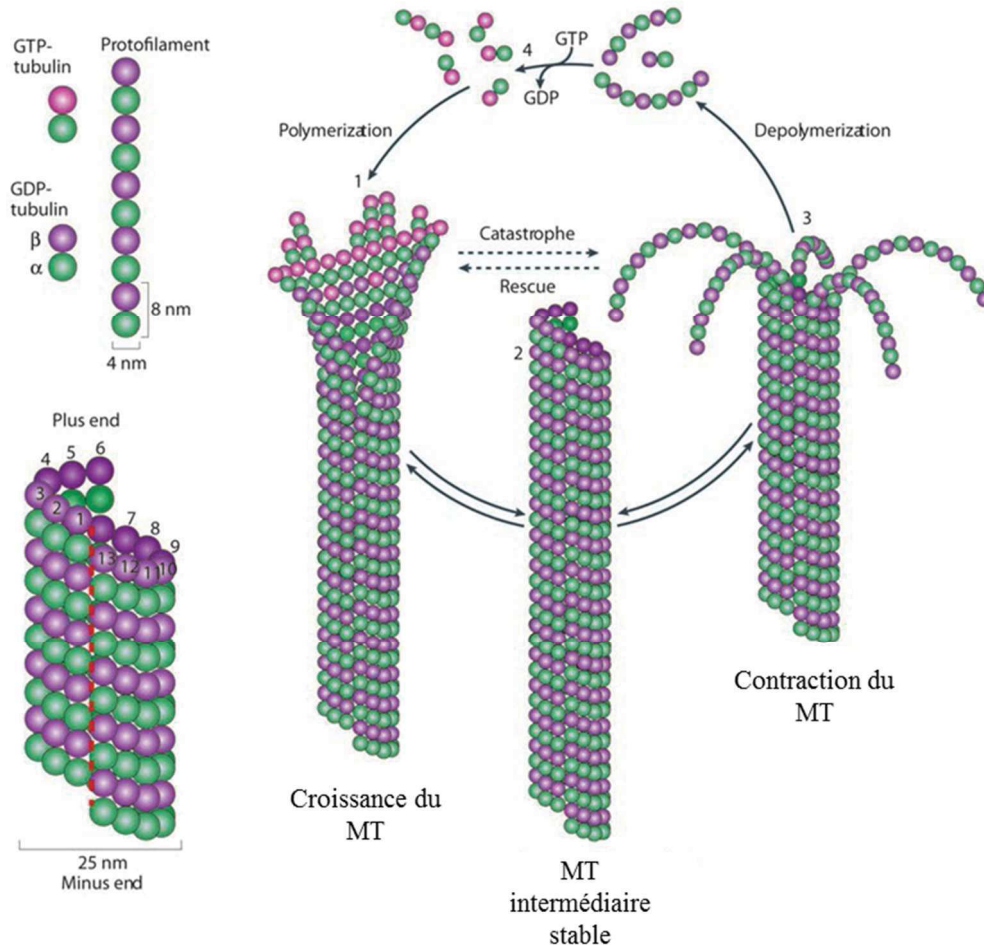


Figure 1.10: Schématisation de la dynamique des MTs.

(Modifiée d'après la thèse de des Georges, 2008)

Les MTs jouent un rôle dans diverses activités biologiques, comme la division cellulaire, le transport intracellulaire, la migration cellulaire et la signalisation inter-cellules (Brouhard, 2015; Conduit, 2016).

1.3.1.1 Expression différentielle des tubulines

Il existe différentes isoformes de tubuline α et β qui diffèrent principalement par les 15 derniers acides aminés de leurs séquences (Bhattacharya and Cabral, 2004; Janke, 2014). Il existe d'autres isoformes comme les tubulines γ , δ et ϵ qui jouent un rôle dans l'assemblage des MTs, mais leur mécanisme d'action exact reste encore controversé (Tuszynski et al., 2003).

Les différents types de tubulines changent durant le développement et la différenciation neuronale (Hoyle et al., 2000). Certaines isoformes ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 4$) sont exprimées abondamment dans de nombreux

tissus alors que d'autres sont spécifiquement exprimées par les cellules ou les tissus, comme la tubuline- $\beta 3$ dans les neurones et la $\beta 6$ dans les plaquettes (Bhattacharya and Cabral, 2004; Janke, 2014). Il existe aussi une isoforme (la tubuline $\beta 5$) qui est exprimée très faiblement (moins de 10%) par tous les tissus (Bhattacharya and Cabral, 2004). La fonction de certains MTs dépend de la présence de certaines isoformes de tubuline β , comme les MTs des neurones, où plusieurs tubulines β peuvent co-exister dans le même MT, ce qui suggère que les différentes tubulines ont différents rôles cellulaires (Bhattacharya and Cabral, 2004).

Ainsi il a été montré que la suppression de la tubuline βIII inhibe transitoirement la migration des neurones durant le développement. Le remplacement de la tubuline βIII par d'autres tubulines ne permet pas de retrouver une migration normale (Saillour et al., 2014). Une autre étude sur le rôle de la βI dans la synthèse et la structure des plaquettes indique que les tubulines ne sont pas interchangeables (Schwer et al., 2001).

La tubuline βI est nécessaire pour la viabilité des cellules neuronales alors que la βII et βIII ne le sont pas. Cependant, la tubuline βII est importante pour la croissance des neurites (Guo et al., 2010) et la tubuline $\beta 5$, faiblement exprimé par les tissus, est nécessaire à la prolifération des cellules (Bhattacharya et al., 2008).

De plus, les parties C-terminales des tubulines ne semblent pas avoir la même affinité de liaison pour les protéines d'association aux MTs entraînant des variations dans l'équilibre de polymérisation des MTs. Par exemple, le taux d'assemblage des tubulines $\alpha/\beta III$ est très rapide contrairement à celui des tubulines $\alpha/\beta II$. Des variations dans les séquences des isoformes de tubulines β peuvent jouer des rôles spécifiques comme des interactions plus ou moins importantes entre les tubulines ou des variations dans le dynamisme des MTs (Ludueña, 1993).

Chaque isoforme peut acquérir des modifications post-traductionnelles (MPTs) (phosphorylation, détyrosination, polyglutamylaton ou encore l'acétylation) au niveau de sa queue C-terminale, qui peuvent jouer des fonctions spécifiques dans la cellule (Tuszynski et al., 2003) (**Figure 1.11**). Les MTs des neurones acquièrent beaucoup de MPTs, qui peuvent affecter l'interaction des MTs avec certaines protéines, la structure des MTs ou encore leur stabilité (Song and Brady, 2015).

(Cooper, 2000a). L'actine-ADP est présente principalement à l'extrémité (-) tandis que l'actine-ATP est présente à l'extrémité (+) (Figure 1.12). L'assemblage et la dissociation des MFs sont aussi régulés par des protéines associées, comme la cofiline ou la profiline (Cooper, 2000a).

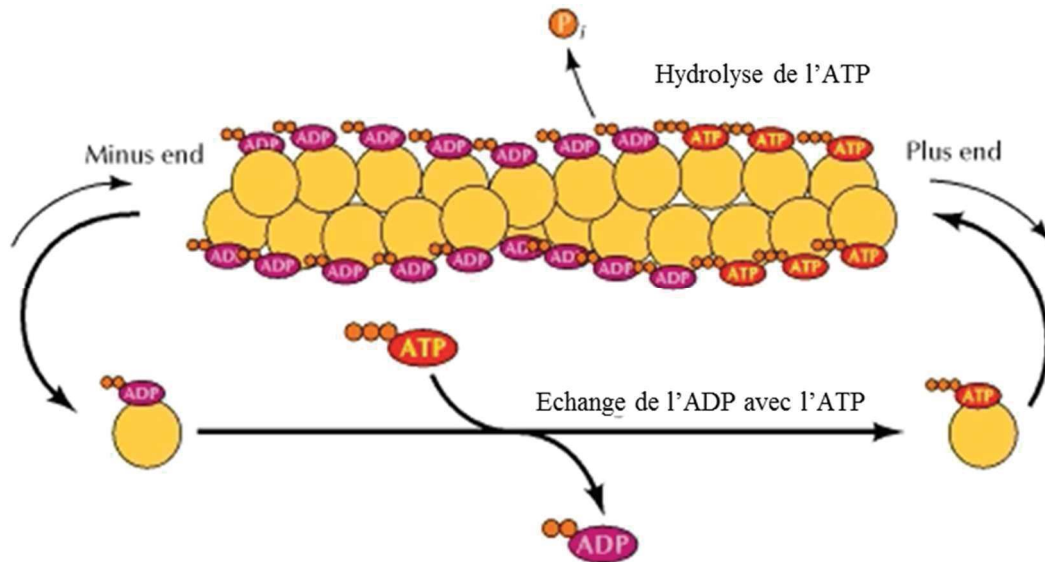


Figure 1.12: Schématisation de la dynamique des MFs.
(Modifiée d'après Cooper, 2000)

Les MFs sont principalement localisés sous la membrane plasmique pour un support mécanique et sont impliqués dans le maintien de la forme de la cellule et le mouvement cellulaire (Cooper, 2000a). Dans les neurones, ils jouent un rôle important dans la croissance du cône axonal (Kirkpatrick and Brady, 1999).

1.3.3. Les filaments intermédiaires (FI)

Les FI ont un diamètre intermédiaire aux autres éléments, soit environ 10 nm. Bien que certaines cellules expriment plusieurs types de FI, comme les CSNs qui expriment la Vimentine et la Nestine, la plupart des cellules ont un type spécifique de FI. On retrouve par exemple la Desmine dans les cellules musculaires, la Kératine dans les cellules épithéliales, la GFAP (pour « Glial fibrillary acidic protein ») dans les astrocytes, et les Neurofilaments dans les neurones matures.

L'assemblage des FI se réalise à partir de dimères polypeptidiques qui s'associent de manière antiparallèle pour former un tétramère. Ces tétramères s'assemblent pour former des protofilaments. Il faut environ 8 protofilaments pour former un FI. Contrairement aux autres éléments du cytosquelette, les FI ne requièrent pas d'ATP ou de GTP pour leur polymérisation (Lodish et al., 2000c). Les FI sont moins dynamiques que les autres protéines du cytosquelette et ils ne sont pas polarisés à cause de la composition antiparallèle des tétramères (Lodish et al., 2000d) (Figure 1.13).

Cependant, la phosphorylation des FI joue un rôle important dans leur assemblage et leur dissociation (Cooper, 2000b). Ils ont un rôle dans le maintien de la forme de la cellule, son organisation cellulaire et le soutien de la membrane plasmique (Lodish et al., 2000c).

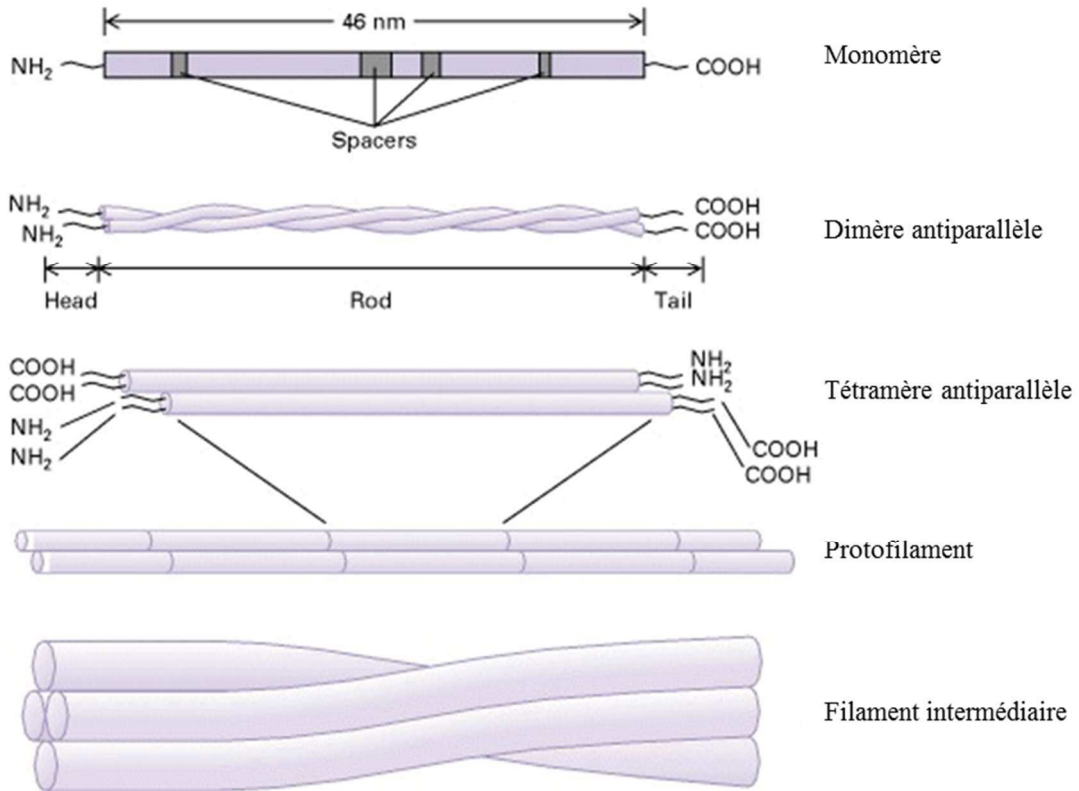


Figure 1.13: Organisation et assemblage des FIs.
(Modifiée d'après Lodish et al., 2000d)

1.3.4. Les Neurofilaments (NFs)

Les Neurofilaments sont les FI spécifiques des neurones matures. Ils sont composés de 3 sous-unités : la sous-unité légère (NFL pour « NeuroFilament Light »), la sous-unité moyenne (NFM pour « NeuroFilament Middle ») et la sous-unité haute (NFH pour « NeuroFilament Heavy ») de 68, 160 et 200 kD, respectivement (Cooper, 2000b). Les queues C-terminales de NFH et NFM se présentent comme des bras latéraux disposés le long du FI (Figure 1.14).

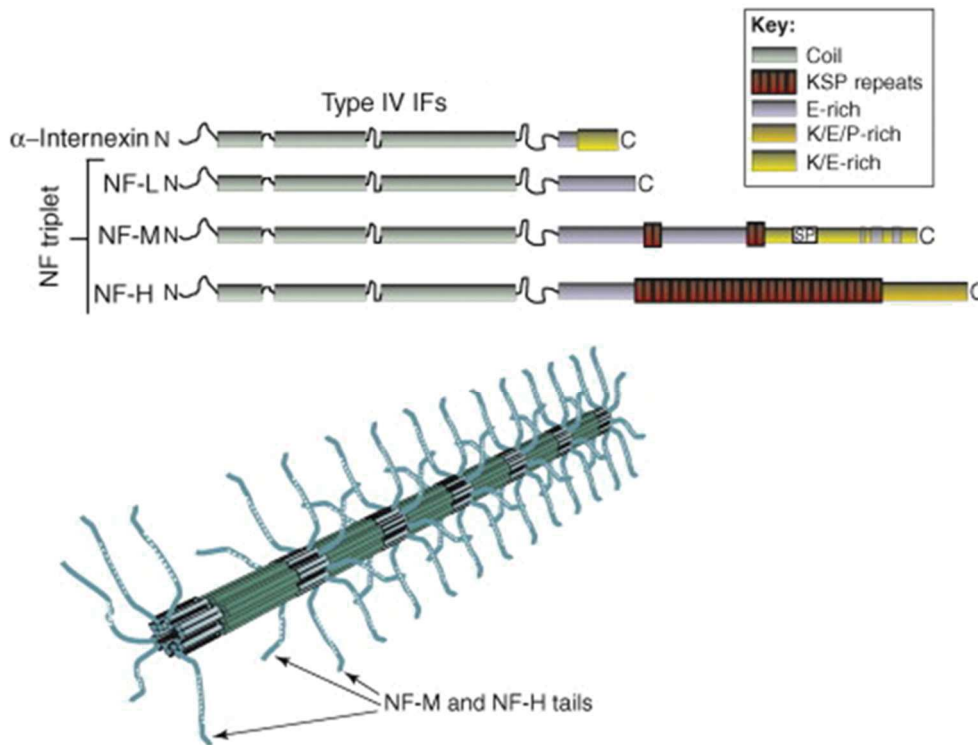


Figure 1.14: Composition et organisation des neurofilaments.
(Modifiée d'après Szaro and Strong, 2010)

Ils sont principalement présents dans les axones des neurones où ils interagissent avec les MFs et les MTs par l'intermédiaire de protéines comme la Plakine.

Les NFs jouent un rôle primordial dans la croissance axonale durant le développement, la forme du neurone, la maintenance du calibre axonal, et la vitesse de l'influx nerveux (Szaro and Strong, 2010; Yuan et al., 2012). Ils sont indispensables comme structure de maintien pour de nombreuses protéines cytoplasmiques (Szaro and Strong, 2010).

1.4. Les maladies neurologiques

Les maladies neurologiques sont des pathologies qui touchent le SNC et SNP. Elles incluent des pathologies telles que l'épilepsie, l'Accident Vasculaire Cérébrale (AVC), des maladies

neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), ou encore les tumeurs cérébrales comme le glioblastome.

1.4.1. Les maladies neurodégénératives

1.4.1.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la plus commune des maladies neurodégénératives et représente la première cause de démence. Elle touche environ 24 millions de personnes dans le monde et l'incidence est de 4,6 millions (Mayeux and Stern, 2012; Reitz and Mayeux, 2014). L'Europe de l'ouest, les Etats Unis et l'Australie sont les pays les plus touchés (Ginter et al., 2015).

Bien que l'origine de la maladie est actuellement inconnue et controversée, elle est très souvent liée à l'âge avec une augmentation exponentielle du nombre de personnes atteintes après 65 ans (Castellani et al., 2010; Mayeux and Stern, 2012; Reitz and Mayeux, 2014). Des facteurs génétiques sont aussi mis en cause dans l'apparition de la maladie (> 5% des cas) (Mayeux and Stern, 2012; Reitz and Mayeux, 2014). Certains facteurs de risques ont été mis en évidence tels que l'hypertension, le diabète, l'obésité ou encore les maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (Castellani et al., 2010; Mayeux and Stern, 2012; Campdelacreu, 2014). Le niveau d'éducation et les facteurs environnementaux comme l'expositions aux pesticides, le cholestérol, ou la consommation excessive d'alcool sont aussi mis en cause (Castellani et al., 2010; Campdelacreu, 2014). A l'opposé, l'activité physique, les activités liées à la stimulation mentale (Mayeux and Stern, 2012), ainsi que la consommation modérée d'alcool et/ou de café (Campdelacreu, 2014) permettraient une diminution des risques.

Cette maladie a une évolution lente et discrète. Le premier symptôme est un déclin cognitif progressif en commençant par une perte de la mémoire à court terme. La dégénérescence s'étend ensuite et entraîne des troubles cognitifs plus graves comme une apathie, des troubles de l'humeur et du langage, ainsi qu'une activité motrice anormale (García-Alberca, 2015) jusqu'à une perte de la mémoire à long terme. La destruction des neurones se poursuit jusqu'à la perte des fonctions autonomes et la mort.

Tous ces symptômes sont liés aux caractéristiques de la maladie : une neurodégénérescence, la présence de plaques extracellulaires diffuses d'amyloïde (ou plaques séniles) et des neurofibrilles intracellulaires, ayant pour conséquence une perte de neurones et de synapses (Castellani et al., 2010; Mayeux and Stern, 2012; García-Alberca, 2015; Ginter et al., 2015) (**Figure 1.15**). Les plaques amyloïdes sont formées par l'accumulation de protéines amyloïdes β ($A\beta$) augmentant l'influx calcique tandis que les neurofibrilles sont formées principalement par la protéine Tau anormalement hyper-phosphorylée qui induit une neuro-inflammation (Reitz and Mayeux, 2014; Ginter et al., 2015).

Actuellement, les traitements sont symptomatiques et ne permettent pas de guérir la maladie. Il existe quatre traitements principaux : trois inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Donepezil, Rivastigmine et Galantamine) et un antagoniste des récepteurs NMDA (« acide N-méthyl-D-aspartique ») du glutamate (Memantine) qui permettent une amélioration des performances cognitives et des capacités fonctionnelles (Piau et al., 2009; García-Alberca, 2015). Cependant, ces traitements nécessitent une hospitalisation dans environ 30% des cas (Piau et al., 2009). Il faut donc calculer la balance bénéfice/risque pour chaque patient, en prenant en compte l'âge, l'état et les symptômes du patient.

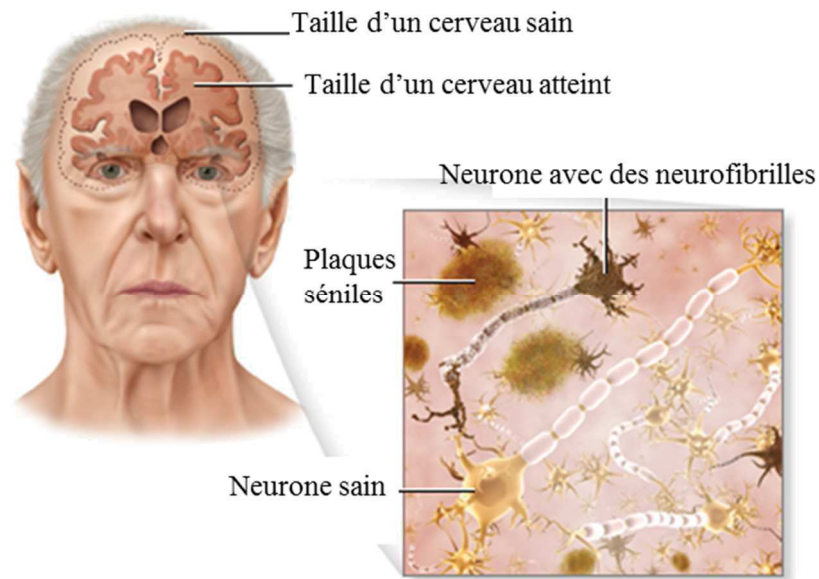


Figure 1.15: Représentation morphologique et moléculaire de la maladie d'Alzheimer.

(Modifiée d'après umm.edu)

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont en cours de développement. Par exemple, la thérapie d'intervention cognitive (TIC), consistant en des exercices physiques, musicaux et différents types de jeux, qui pourrait être un traitement alternatif car elle permet une stimulation cognitive (García-Alberca, 2015). De plus, des immunothérapies contre la protéine Tau, les plaques A β ou les voies d'inhibition de la β -secrétase sont en cours d'étude comme par exemple le Cilostazol qui inhibe la quantité de plaque amyloïde β et pourrait être utilisé comme traitement préventif.

Les méthodes de diagnostics peuvent être réalisées grâce aux biomarqueurs du LCR (niveau d'A β ou de p-tau), aux biomarqueurs d'imagerie au niveau structural (atrophie des lobes ou de l'hippocampe, changement dans la matière blanche) (Castellani et al., 2010; Reitz and Mayeux, 2014), ou au niveau fonctionnel (réduction des flux sanguins, activités neuronales associées à la parole, mesure des déficits de connectivités fonctionnelles). L'imagerie nucléaire permet de visualiser les agrégats de protéines dans les régions de l'hippocampe ou la microglie activée (Reitz and Mayeux, 2014). Toutes ces techniques pourraient permettre de différencier la maladie d'Alzheimer précoce, tardive et le niveau

intermédiaire : la déficience cognitive légère, terme employé pour les personnes à risque. Généralement, le diagnostic est défini en 3 états : possible, probable ou définitif car il est encore difficile de corrélérer l'avancée de la maladie avec la présence plus ou moins importante de la protéine Tau et A β et seule l'autopsie permet de valider le diagnostic (Castellani et al., 2010; Reitz and Mayeux, 2014). La perte de neurones ou de leurs connections serait plus corrélée au déclin de la fonction cognitive que les agrégats (Castellani et al., 2010).

1.4.1.2. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus commune après la maladie d'Alzheimer. La prévalence de cette maladie en Europe est de 1000 pour 100 000 et une incidence d'environ 15 pour 100 000. Cette maladie touche principalement les hommes (un ratio homme/femme de 3/2) et 5% des personnes de plus de 65 ans sont atteintes (Sarkar et al., 2016). Elle est principalement caractérisée par une mort progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire entraînant une déficience en dopamine dans les ganglions de la base (Kalia and Lang, 2015; Sarkar et al., 2016) (Figure 1.16).

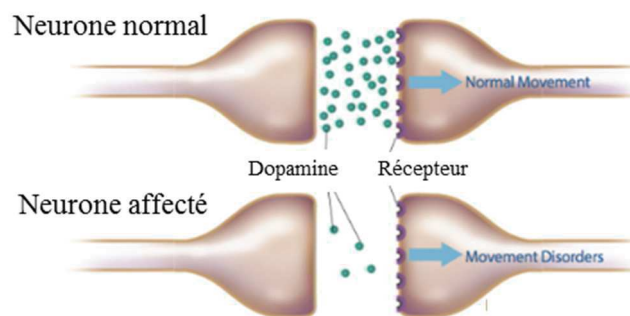


Figure 1.16: Représentation de la perte en dopamine d'un cerveau atteint de la maladie de Parkinson.

(Modifiée d'après <https://stemcells21.com>)

Cette zone du cerveau est impliquée dans les actions cognitives et motrices (Sarkar et al., 2016). Des agrégats anormaux de protéine α Synucléine, Synphiline et Ubiquitine sont retrouvés dans le corps cellulaire des neurones (Corps de Lewy) ou dans leurs prolongements (Neurites de Lewy) (Kalia and Lang, 2015; Sarkar et al., 2016). Comme dans la maladie d'Alzheimer, le diagnostic ne peut être validé avant l'examen pathologique post-mortem confirmant la pathologie de Lewy et une dégénérescence des neurones de la substance noire (Jankovic, 2008; Kalia and Lang, 2015).

Les facteurs génétiques sont mis en cause dans 5% des cas, avec des mutations dans des gènes particuliers comme le gène *SNCA* qui code pour la protéine α Synucléine ou dans les gènes *LRRK2* (« Leucin Rich Kinase 2 ») et *Parkin*.

Certains facteurs de risques ont été mis en évidence, comme l'âge avec une évolution exponentielle et un pic vers 80 ans (Kalia and Lang, 2015; Valadas et al., 2015), mais aussi des facteurs environnementaux comme l'exposition aux pesticides ou l'utilisation de β -bloquants (Campdelacreu, 2014; Kalia and Lang, 2015; Valadas et al., 2015). Certains facteurs permettraient une diminution des risques comme la consommation de café ou de thé, de tabac et d'alcool, l'exercice physique ou encore l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Campdelacreu, 2014; Sarkar et al., 2016). Cependant, l'origine de la maladie reste encore controversée (Kalia and Lang, 2015).

C'est aussi une maladie à évolution lente dont les symptômes dits « Parkinsoniens » comprennent une bradykinésie (lenteur des mouvements), une rigidité musculaire et des tremblements de repos (Jankovic, 2008; Kalia and Lang, 2015). Ces premiers symptômes entraînent d'autres symptômes moteurs comme une instabilité posturale liée à la perte des réflexes. Les chutes augmentent avec la sévérité de la maladie (Jankovic, 2008). D'autres symptômes non moteurs sont associés à la maladie tels qu'une altération cognitive, des douleurs, des pertes de mémoire et la fatigue (Kalia and Lang, 2015; Valadas et al., 2015), ainsi que des symptômes dits « pré moteurs » impliquant une altération de l'olfaction, des mouvements rapides des yeux ainsi qu'une réémission des réflexes primaires (Jankovic, 2008; Kalia and Lang, 2015). Les traitements, qui sont principalement symptomatiques, comprennent des drogues qui augmentent la concentration en dopamine ou qui stimulent directement les récepteurs à la dopamine ce qui permet d'améliorer les symptômes parkinsonien (Kalia and Lang, 2015; Sarkar et al., 2016). Cependant, ces traitements entraînent des effets secondaires incluant les symptômes non moteurs retrouvés dans la maladie de Parkinson. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont envisagées comme la greffe de précurseurs de neurones dopaminergiques, de cellules souches ou la thérapie génique grâce à des virus ou encore la stimulation des circuits des ganglions de la base grâce à des électrodes implantées dans le cerveau du patient (cette méthode est très efficace pour les patients avec une mutation du gène *Parkin* (Moro et al., 2008)). De plus, des stratégies préventives visant à éviter l'inflammation ou l'agrégation des protéines α -Synucléine sont aussi envisagées. Cependant, ces thérapies ont montré trop d'effets secondaires et n'induisent pas assez de bénéfice pour remplacer les traitements actuels. De nouvelles méthodes de diagnostic sont développées pour détecter la maladie de façon plus précoce grâce à des biomarqueurs incluant la dysfonction olfactive qui survient avant les symptômes moteurs, les méthodes dites « omiques » (transcriptomique, protéomique, métabolomique) pour détecter des anomalies protéiques, ou encore l'imagerie pour détecter la déficience en dopamine (Sarkar et al., 2016).

1.4.1.3. La maladie de Huntington

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative héréditaire à transmission autosomique dominante, qui se développe avec l'âge (entre 35 et 50 ans) dont la prévalence en Europe est entre 7 et 10 sur 100 000, et l'incidence de 0.38 pour 100 000 (Pringsheim et al., 2012; Rawlins et al., 2016).

La maladie est causée par une augmentation du nombre de répétitions de trois nucléotides (CAG) dans le gène de la Huntingtine (*HTT*) situé sur le chromosome 4 (Lipe and Bird, 2009), induisant une synthèse de la protéine Huntingtine avec une extension en poly-glutamines (Chao et al., 2017). Tandis que le taux normal de répétitions chez des patients sains est de 16 à 20 fois, les patients atteints de la maladie de Huntington ont 36 ou plus de répétitions. Les personnes ayant entre 27 et 35 répétitions CAG présentent des risques de transmettre la maladie. Le trinucéotide CAG est instable et continue à muter à travers les générations, principalement par des extensions. Cette instabilité est d'autant plus forte que le nombre d'augmentation est élevé (Lipe and Bird, 2009; Chao et al., 2017). Le nombre de répétitions CAG est corrélé à la sévérité de la maladie et est inversement proportionnel à l'âge d'apparition de la maladie (Ross et al., 2014; Chao et al., 2017). En effet, une forme plus rare de la maladie (5% des cas) se développe plus tôt (avant 20 ans). Cette forme est associée à une évolution plus rapide de la maladie (Quarrell et al., 2013; Frank, 2014). Les patients avec un nombre de répétitions supérieur à 60 déclarent la forme juvénile de la maladie (Quarrell et al., 2013). Cependant, 50% des patients atteints de la maladie de Huntington avant l'âge de 20 ans n'ont pas un nombre de répétitions supérieur à 60. Cette altération génétique entraîne une perte des neurones au niveau des ganglions de la base et une atrophie au niveau du striatum et du cortex (Purdon et al., 1994; Ross et al., 2014).

Les symptômes incluent des troubles moteurs (mouvements involontaires, troubles de l'équilibre et de l'élocution), cognitifs (perte de mémoire, démence, diminution de l'attention) et psychiatriques (anxiété, dépression et agressivité) (Ross et al., 2014; Chao et al., 2017).

Un test ADN (Acide DésoxyriboNucléique) sur des échantillons sanguins permet de détecter l'anomalie génétique liée à la maladie de Huntington et le nombre de répétitions du trinucéotide CAG (Margolis and Ross, 2003; Frank, 2014). La mesure quantifiable des fonctions motrices et cognitives des patients permet de voir les changements liés à la sévérité de la maladie, bien que la détection précoce par ces mesures soit encore absente (Ross et al., 2014; Sarkar et al., 2016). Des imageries structurales ou fonctionnelles peuvent être utilisées pour la détection plus ou moins précoce de la maladie, mais elles doivent encore être améliorées (Ross et al., 2014).

Comme les autres maladies neurodégénératives, les traitements sont principalement symptomatiques incluant des traitements médicamenteux avec des psychotropes, et un suivi régulier par des professionnels (orthophonistes, kinésithérapeutes, ...) (Lipe and Bird, 2009; Frank, 2014). Les études cliniques démontrent une efficacité de la réduction des symptômes par de nouvelles molécules. De nouvelles stratégies sont envisagées comme la thérapie par la musique, l'exercice ou le sport mais aussi l'utilisation d'ARN interférents (SiRNA pour « Small interfering RNA) pour réduire l'expression du gène *HTT* muté, par l'utilisation de vecteurs viraux (Frank, 2014) ou encore des greffes de cellules neurales (Wijeyekoon and Barker, 2011).

1.4.1.4 La Sclérose en plaque (SEP)

La SEP est une maladie démyélinisante, inflammatoire chronique qui touche la matière blanche et grise du cerveau. La prévalence et l'incidence en Europe sont de 108/100 000 et 8/100 000, respectivement (Leray et al., 2016). C'est une maladie principalement auto-immune, c'est-à-dire que les cellules du système immunitaire reconnaissent comme « étrangères » certaines protéines du patient et en particulier celles de la myéline (Loma and Heyman, 2011). La réaction d'inflammation entraîne la destruction de la myéline autour des axones, engendrant une atrophie des cellules neuronales, une destruction des axones, et plus tard la mort neuronale. Les symptômes sont donc une réduction des fonctions motrices et un déclin cognitif (Michailidou et al., 2015).

Au début de la maladie, les réactions d'inflammation se font par « poussées », entraînant une augmentation des symptômes suivie par un rétablissement plus ou moins complet pour le patient. Lorsque l'inflammation disparaît, il y a une re-myélinisation partielle ou complète des axones (**Figure 1.17**) grâce aux oligodendrocytes matures et au recrutement des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (CPOs) environnantes qui se différencient en oligodendrocytes matures (Michailidou et al., 2015; Torkildsen et al., 2016). En effet, les astrocytes activés et la microglie sécrètent des mitogènes (FGF2 (« Fibroblast Growth Factor ») et PDGF (« Platelet-Derived Growth Factor ») qui induisent la prolifération et la migration de ces CPOs (Michailidou et al., 2015). Cependant, avec le développement de la maladie, le changement dans l'environnement mitogène induit par l'altération du niveau de facteurs sécrétés, inhibe la prolifération et la différenciation des CPOs, ce qui provoque une remyélinisation incomplète (**Figure 1.17**).

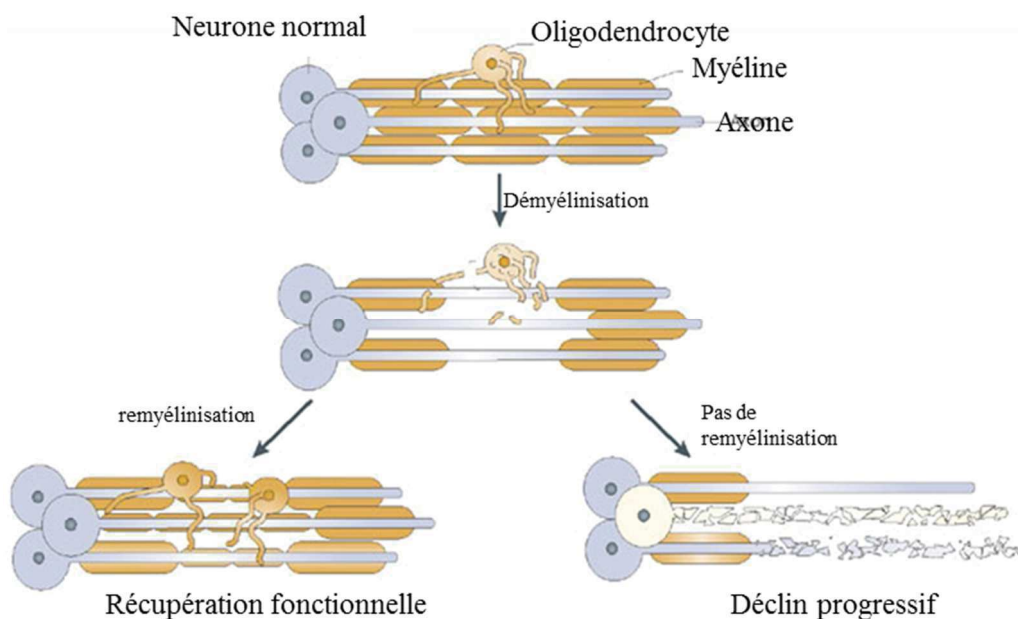


Figure 1.17: Représentation de la perte de la myéline au cours du développement de la SEP.

(Modifiée d'après : <http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com>)

De plus, les oligodendrocytes matures perdent leur capacité à myéliniser, et les axones perdent leur capacité à recevoir la myéline par la réexpression de régulateurs négatifs comme PSA-NCAM. Stimuler les progéniteurs d'oligodendrocytes ou les CSNs pour une production plus importante de neurones et d'oligodendrocytes pourrait être bénéfique pour le traitement de la SEP (Michailidou et al., 2015).

La cause de la maladie n'est pas encore établie, mais des facteurs génétiques (variation dans le gène codant pour les antigènes des leucocytes humains (protéine HLA)) et environnementaux (l'exposition au virus Epstein-Barr ou la consommation de cigarettes) ont été mis en cause (Leray et al., 2016). Les traitements sont concentrés sur une prévention de la démyélinisation en modulant la réponse immunitaire, en inhibant la prolifération des cellules immunitaires ou en réduisant la perméabilité de la BHE (Mark J. Tullman, 2013; Michailidou et al., 2015; Torkildsen et al., 2016) mais aucun traitement ne permet à ce jour une régénération des neurones. De nouveaux traitements sont en cours d'étude pour réduire la démyélinisation et la perte axonale ou encore pour dépléter les cellules immunitaires dans le cerveau, principalement via des thérapies par les anticorps (Mark J. Tullman, 2013).

1.4.1.4. La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

Aussi connue sous le nom de Maladie de Charcot, la SLA est caractérisée par une dégénérescence des neurones moteurs entraînant une paralysie progressive des muscles (Figure 1.18). En Europe, l'incidence est d'environ 2/100 000 et la prévalence de 5/100 000 (Couratier et al., 2016).

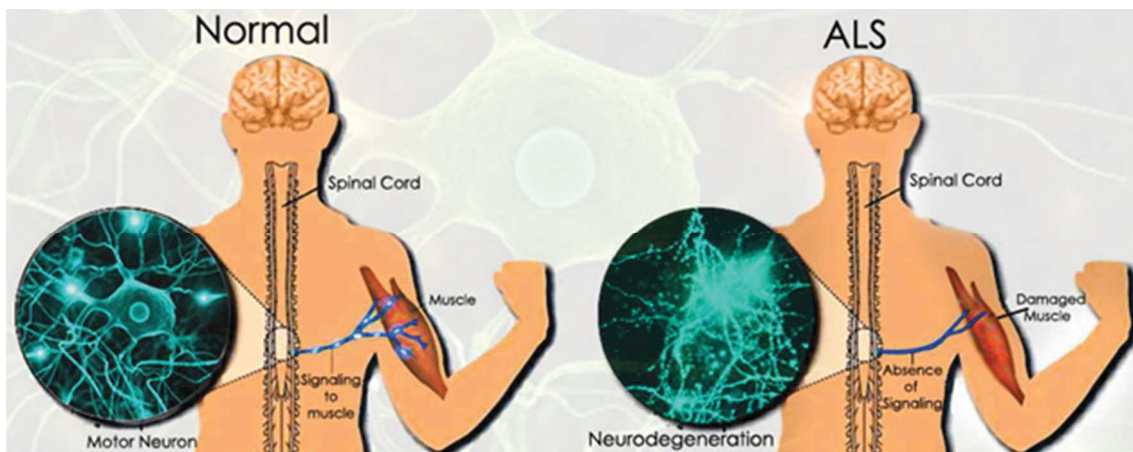


Figure 1.18: Représentation de la perte des motoneurones au cours du développement de la SLA. (Modifiée d'après www.advancells.com)

Dans la majorité des cas, la SLA est sous forme « spinale » et débute au niveau des membres inférieurs et postérieurs. Une forme plus rare et plus agressive, dite « bulbaire », débute par une dégénération de la déglutition, de la voix et de la motricité de la langue (Wijesekera and Leigh, 2009).

Les premiers symptômes sont une faiblesse au niveau des muscles des membres postérieurs ou inférieurs et des contractions involontaires, ou encore des perturbations dans le langage pour la forme la plus rare.

La mort survient généralement après un arrêt respiratoire (Wijesekera and Leigh, 2009; Couratier et al., 2016).

Comme la majorité des maladies neurodégénératives, il n'y a actuellement pas de facteur de risque qui explique l'apparition de la maladie, hormis l'âge, et la génétique dans 5% des cas (mutations des gènes *SOD1*, *ALS2* et *ALS4*) (Wijesekera and Leigh, 2009; Yacila and Sari, 2014). Des facteurs environnementaux (expositions aux pesticides et aux métaux lourds) peuvent aussi être mis en cause (Couratier et al., 2016).

Actuellement, un inhibiteur de la libération du glutamate (le Riluzole) est le seul traitement pour la SLA. La majorité des essais cliniques pour le traitement de cette maladie incluent l'utilisation de facteurs neurotrophiques pour restaurer le déficit en neurones moteurs car ils augmentent la neuroprotection et le processus de régénération (Yacila and Sari, 2014). De plus, l'utilisation de cellules souches ainsi que de l'immunothérapie sont aussi envisagées.

1.4.2. Les tumeurs cérébrales : Les gliomes

Les gliomes sont des tumeurs du cerveau qui dérivent des cellules gliales. Ces tumeurs sont classées en 4 groupes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dont le glioblastome est la seule tumeur de grade IV du système nerveux central. La moyenne de survie des patients atteints d'un glioblastome est d'environ 15 mois malgré un traitement très agressif (résection de la tumeur, radiothérapie associée ou non à la chimiothérapie par le Témazolomide ou le Bévacicumab). Vu le caractère très invasif des glioblastomes, la chirurgie reste peu efficace. Les traitements par la chimiothérapie sont peu nombreux car la plupart des molécules ne traversent pas la BHE (Kosztowski et al., 2009; Goffart et al., 2013). Certains glioblastomes sont liés à des mutations génétiques connues comme des mutations du gène *IDH1* (« Isocitrate DeHydrogenase »), une surexpression du récepteur EGF (« Epidermal Growth Factor ») ou une mutation de ce même récepteur (variant EGFRvIII (« Epidermal Growth Factor Receptor »)) (Goffart et al., 2013). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la formation des tumeurs cérébrales et leur progression (Achanta et al., 2010; Jacques et al., 2010; Goffart et al., 2013) (**Figure 1.19**):

- Une dédifférenciation des cellules gliales somatiques qui seraient donc plus sensibles à une transformation maligne bien que cette hypothèse soit controversée car les astrocytes seraient incapables de former des tumeurs (Jacques et al., 2010).
- Des mutations des CPOs qui sont des cellules très prolifératives.
- Les CSNs endogènes dérégulées après plusieurs mutations.

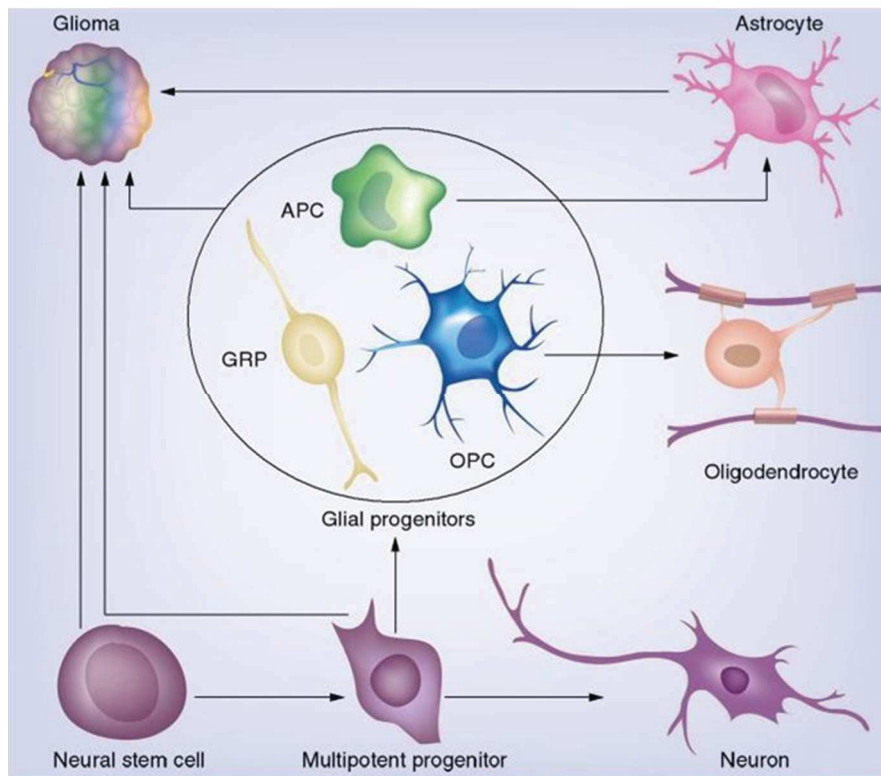


Figure 1.19: Origines possibles de la formation des gliomes.
(D'après Zong et al.,2012)

Les traitements actuels qui sont non spécifiques aux cellules tumorales, ne permettent pas une destruction totale des cellules cancéreuses, et entraînent souvent des effets secondaires importants. De nouvelles adaptations aux traitements actuels sont mises en pratique, en prenant en compte l'état général du patient, son âge ainsi que le statut de la tumeur (mutations, méthylation..) afin de parvenir à une thérapie ciblée pour chaque patient. Par exemple, il a été montré que les patients avec le promoteur MGMT (« O-6 methylguanine DNA methyltransferase ») non méthylé ne répondent pas au Témzolomide (Bruce and Kennedy, 2017).

De plus, de nouvelles techniques d'intervention, comme la chirurgie sur patient éveillé, celles associées directement à un IRM ou à la spectrométrie de masse, permettent un retrait plus efficace de la tumeur et une meilleure récupération post-chirurgicale du patient (Guyotat, 2013; Roder et al., 2014; Young et al., 2015). De nouvelles approches thérapeutiques sont actuellement en phase clinique III/IV comme le système NovoTTF-100A qui permet de délivrer des champs électriques alternatifs de faibles intensités et de fréquences intermédiaires qui ciblent les cellules en cours de division (donc les cellules cancéreuses). Des immunothérapies (DCVax-L et ICT-107) sont aussi en cours de développement (Badhiwala et al., 2013; Schuster et al., 2015). Nous avons récemment soumis une revue de ces différents traitements (Barreau et al. Soumis).

Chapitre 2

Les cellules souches

2.1. Généralités sur les cellules souches

Le terme « cellule souche » est apparu pour la première fois dans le monde scientifique en 1868 par le scientifique Allemand Haeckel en le décrivant comme « l'organisme unicellulaire ancêtre dont tous les organismes multicellulaires sont issus » mais aussi pour décrire « l'œuf fertilisé qui donne naissance à toutes les cellules de l'organisme » (Ramalho-Santos and Willenbring, 2007). Une cellule souche est une cellule indifférenciée qui a la capacité de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier en type cellulaire particulier (Mountford, 2008). Il existe différents types de cellules souches en fonction de leur potentiel de différenciation : les cellules totipotentes, pluripotentes, unipotentes et multipotentes. Les cellules souches dites totipotentes ont la capacité de produire tous les types cellulaires d'un organisme : c'est le stade de la cellule zygote après fécondation d'un ovule par un spermatozoïde (Condic, 2014). Après division, la cellule zygote devient un blastocyste. A cette étape, les cellules souches sont dites pluripotentes et ont la capacité de produire plusieurs types cellulaires (plus de 200) représentatifs de tous les tissus de l'organisme. On les appelle aussi cellules souches embryonnaires (O'Connor and Crystal, 2006). L'embryon se développe afin de former un fœtus, les cellules souches fœtales sont multipotentes, comme les cellules souches somatiques ou adultes et ont la capacité de produire un ou plusieurs types cellulaires spécifiques d'un tissu (O'Connor and Crystal, 2006) (Figure 2.1). Les cellules souches adultes peuvent aussi être unipotentes, pouvant créer qu'un seul type cellulaire particulier.

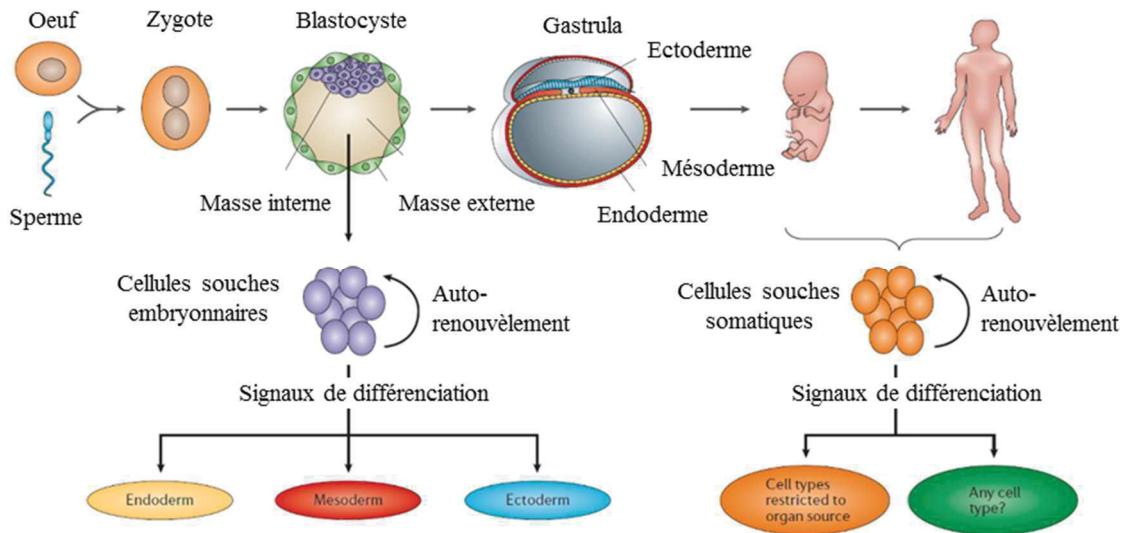


Figure 2.1 : Les différents types de cellules souches en fonction du stade de développement. (Modifiée d'après O'Connor and Crystal., 2006)

Depuis leur découverte, le domaine des cellules souches s'est développé et leur potentiel de différenciation représente un espoir thérapeutique majeur pour le traitement de maladies dégénératives, de cancers ou encore pour la régénération tissulaire (Herberts et al., 2011).

2.2. Différents types de cellules souches

Comme nous l'avons précisé ci-dessus, différentes cellules souches existent en fonction des différentes étapes du développement humain. Il existe aussi des cellules souches « créées » en laboratoire comme les cellules souches pluripotentes induites.

2.2.1. Les cellules souches embryonnaires (CSEs)

Ces cellules sont issues de l'embryon, au niveau de la masse cellulaire interne du blastocyste (**Figure 2.2**). Elles sont pluripotentes, donnant naissance aux cellules des trois types de feuillets : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme (Shufaro and Reubinoff, 2004; Semb, 2005) ce qui leur confère un potentiel thérapeutique très important (Ishii and Eto, 2014). Leur pluripotence est transitoire et elle est rapidement perdue au cours du développement (Biehl and Russell, 2009). Les premières CSEs humaines ont été isolées en 1998 par l'équipe de Thomson et al (Herberts et al., 2011).

Les CSEs sont utilisées pour créer des souris génétiquement modifiées en laboratoire. En effet, il est possible de récupérer les CSEs d'un blastocyste, puis modifier les gènes de ces cellules, et enfin les réimplanter dans un nouveau blastocyste de souris permettant la création d'une souris dite « chimère » (Herberts et al., 2011; Bouabe and Okkenhaug, 2013). Elles ont d'autres applications possibles, comme l'étude du développement embryonnaire (Svendsen et al., 1999; Shufaro and Reubinoff, 2004), la modélisation de maladies génétiques après différenciation ou encore, comme toutes les cellules souches, la régénération tissulaire après implantation des cellules différenciées chez des patients (Shufaro and Reubinoff, 2004; Lerou and Daley, 2005; Semb, 2005).

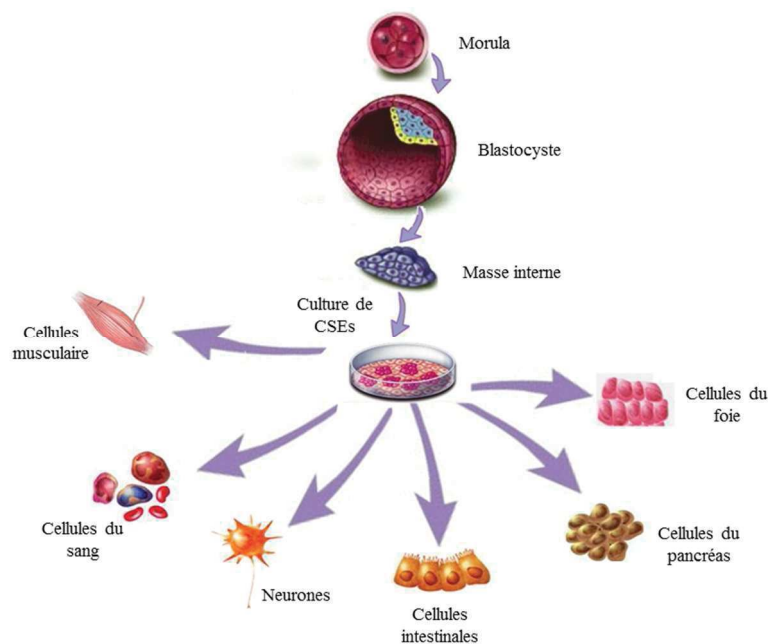


Figure 2.2 : Potentiel de différenciation des cellules souches embryonnaires.

(Modifiée d'après www.emaze.com)

Malgré l'origine connue de la CSE (le blastocyste), il est important de distinguer les différentes sources possibles, notamment au niveau humain: (1) les embryons donnés par des patients sous traitement de fécondation *in vitro* (FIV) (les embryons de réserve), (2) les embryons créés pour la recherche après fécondation *in vitro* d'ovocytes donnés (les embryons de recherche) et (3) les embryons fabriqués pour la recherche après transfert de noyau somatique des ovocytes donnés (les embryons de transfert nucléaire) (McLaren, 2000; Lerou and Daley, 2005). Il existe aussi des lignées de CSEs préexistantes (Lo and Parham, 2009). Les problèmes éthiques liés à ces différentes sources n'ont pas la même gravité. En effet, le don d'embryons semble plus « éthique » que la fabrication d'embryon où l'on parle de clone (McLaren, 2000).

Outre leur avantage d'être pluripotente et ainsi de donner accès à une thérapie cellulaire importante, l'utilisation de ces cellules a l'avantage d'avoir une croissance indéfinie ce qui permet une expansion importante *in vitro* (Shufaro and Reubinoff, 2004). Cependant, l'utilisation des CSEs est très controversée. En effet, l'idée que les CSEs peuvent éviter le rejet immunitaire est finalement inexacte (de Almeida et al., 2013). Pour trouver une solution, Taylor et al., crée une banque de CSEs en fonction de l'expression des antigènes des leucocytes humains (HLA pour *Human Leucocyte Antigen*). Cette banque permettra de déterminer la meilleure correspondance avec le receveur (Taylor et al., 2005). De plus, due à leur propriété de pluripotence, les CSEs ont plus de risque de former des tératomes (Herberts et al., 2011). L'utilisation des lignées cellulaires est pratiquement impossible à cause de leur incompatibilité pour la transplantation et à cause de leur fort taux de mutations suite à leur multiplication *in vitro*. L'utilisation des CSEs implique la destruction de l'embryon, entraînant des problèmes éthiques puisque le point de vue sur l'état humain de la blastula reste controversé (Lo and Parham, 2009). L'utilisation d'embryons de réserve après une FIV est acceptable, avec l'accord du couple, puisqu'après un certain délai, leur destruction est inévitable.

Il y a donc de multiples problèmes à régler avant leur utilisation pour la transplantation, comme par exemple le développement de tissus non désiré ou la formation de tératomes (Shufaro and Reubinoff, 2004; Semb, 2005; Herberts et al., 2011; Nam et al., 2015) qui s'ajoutent aux problèmes éthiques (O'Donoghue and Fisk, 2004).

2.2.2. Les cellules souches pluripotentes induites (CSPis ou iPS cells en anglais)

Ces cellules sont des cellules somatiques dites « reprogrammées » grâce à l'introduction de facteurs liés à la pluripotence (Okita and Yamanaka, 2011). On parle de dédifférenciation de cellules somatiques. Les fibroblastes sont les cellules les plus fréquemment utilisées pour la création de CSPis car ils sont faciles à prélever, mais d'autres cellules ont aussi été utilisées comme les cellules du foie ou du pancréas (Grskovic et al., 2011; Herberts et al., 2011) (Figure 2.3).

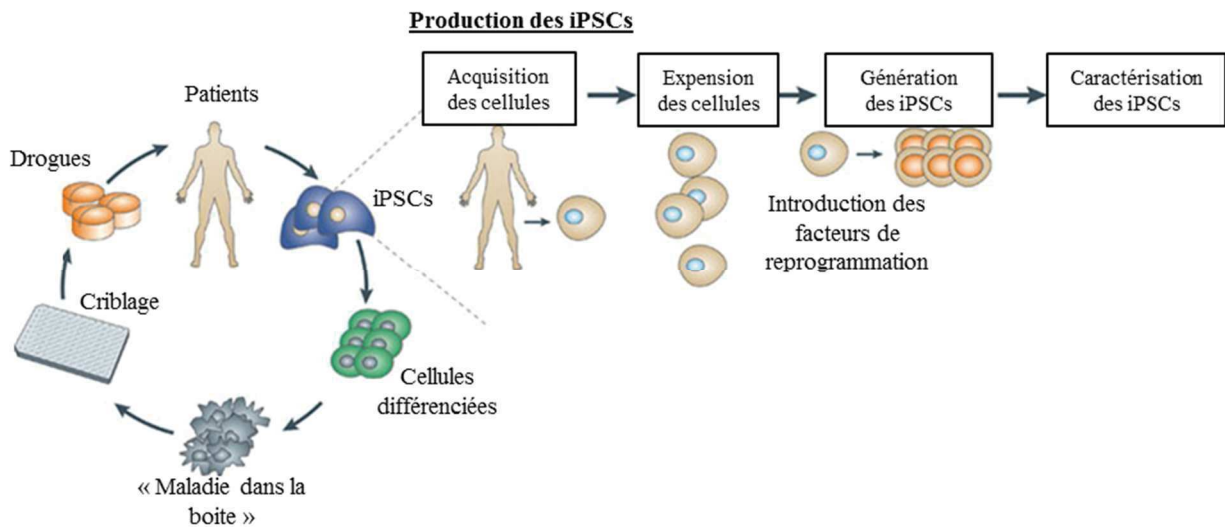


Figure 2.3: Principe d'utilisation et de production des iPSCs.
(Modifiée d'après Grskovic et al., 2011))

Une des méthodes la plus efficace est l'intégration de quatre facteurs de transcription (c-Myc, Oct3/4 (« Octamer-binding Transcription factor 3/4 »), Sox2 (« SRY-related HMG-box gene 2 ») et Klf4 (« Kruppel-like Factor 4 ») grâce à un rétrovirus. Cependant, les facteurs Klf4 et c-Myc sont aussi des oncogènes, pouvant ainsi augmenter le risque de formation de tumeurs (Okita and Yamanaka, 2011). De nouvelles méthodes ont été développées pour induire la pluripotence dans des cellules somatiques comme l'utilisation de plasmide, l'intégration d'ADN ou l'injection d'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) ou encore de protéines de reprogrammation. Cependant aucune de ces méthodes n'est totalement efficace (González et al., 2011; Okita and Yamanaka, 2011), car cette efficacité dépend de l'origine de la cellule somatique (Medvedev et al., 2010). Plusieurs études ont montré que les CSPis ont plus de chromosomes anormaux, de mutations protéiques ou une méthylation anormale de l'ADN, indiquant qu'elles ont plus de risque de développer des tumeurs (Nam et al., 2015; Song and Goldman, 2015). Ces cellules seraient très proches des CSEs (décrites ci-dessus) mais des différences dans l'expression de gènes suggéreraient que la reprogrammation des CSPis est incomplète (Herberts et al., 2011). Il est donc important de trouver des méthodes plus efficaces et plus « sûres » pour éviter les modifications génomiques pour une utilisation en clinique (Medvedev et al., 2010; González et al., 2011; Nam et al., 2015).

Ces cellules peuvent aussi servir pour la création de souris chimères. De plus elles servent de modèles pour les pathologies humaines et notamment les pathologies génétiques, pour tester de nouvelles drogues. Ceci représente un grand espoir pour la thérapie cellulaire personnalisée (Medvedev et al., 2010). Il est en effet difficile de récupérer les cellules du cerveau d'un patient qui a une maladie neurodégénérative afin de tester de nouveaux traitements. Cependant, à partir des cellules de la peau de ce patient, il est possible de les reprogrammer en cellules du système nerveux et ainsi de reproduire la maladie *in vitro*. C'est donc un espoir thérapeutique dès lors que les problèmes d'efficacité et de risques

génétiques seront résolus, puisqu'elles permettent de résoudre les problèmes éthiques et de compatibilité avec le tissu humain liés à l'utilisation des CSEs.

2.2.3. Les cellules souches adultes (CSAs)

Les CSAs sont les cellules souches présentes dans presque tous les organes du corps (foie, peau, intestins, dents, moelle osseuse et même le cerveau), en quantité minime, et responsables de l'homéostasie du tissu que ce soit naturelle ou après dommage (Henningson et al., 2003; Pessina and Gribaldo, 2006; Herberts et al., 2011). Elles sont dites multipotentes car elles se différencient en type cellulaire spécifique de l'organe où elles sont présentes (Passier and Mummery, 2003). Toutes les cellules souches sont localisées dans un microenvironnement spécialisé à chaque organe, nommé « la niche » où des signaux intra- et extracellulaires régulent l'auto-renouvellement et le destin cellulaire (Alison and Islam, 2009). Chez l'adulte, on retrouve trois types de cellules souches principales : les CS Mésenchymateuses (CSMs), les CS Hématopoïétiques (CSHs) et les CSNs (Alison and Islam, 2009; Herberts et al., 2011). Les CSMs sont capables de se différencier en cellules osseuses, du cartilage ou en cellules graisseuses (Alison and Islam, 2009), tandis que les CSHs donnent naissance aux cellules du sang (globules blancs, rouges et plaquettes). Ces deux types de cellules souches sont les plus utilisées par les différentes études. Les CSNs sont présentes dans le système nerveux central et peuvent se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Kornblum, 2007).

Certaines cellules souches sont plus actives que d'autres, comme les CSHs pour la formation des cellules sanguines et immunitaires, les CSs de la peau et les CSs de l'intestin qui sont régulièrement renouvelées (Czyz et al., 2003). Les autres cellules souches sont la plupart « quiescentes » c'est-à-dire « en dormance » afin de maintenir un pool de cellules indifférenciées qui vont être activées en cas de lésion par des signaux provenant de cette région (Biehl and Russell, 2009; Rumman et al., 2015).

Les CSAs ont l'avantage d'être plus compatibles pour la transplantation car elles peuvent provenir du patient lui-même (Passier and Mummery, 2003; Nam et al., 2015). De plus, il n'y a pas de destruction d'organisme pour prélever ces cellules (Mariano et al., 2015) ce qui élimine les problèmes éthiques (Nam et al., 2015). Les plus gros inconvénients des CSAs sont le nombre insuffisant de cellules et le taux de survie très faible après transplantation (Mariano et al., 2015; Nam et al., 2015). Il est nécessaire, dans la plupart des cas, de prélever des tissus, ce qui est relativement compliqué dans les cas du prélèvement des CSNs. Les CSMs sont les cellules les plus étudiées et utilisées, et elles peuvent être cultivées en milieu qui contient ou non du sérum de veau. La présence du sérum induit un risque pour leur utilisation en clinique. La différenciation neuronale et l'intégration des CSNs dans les réseaux neuronaux préexistants en font des cellules de choix pour le traitement de maladies neurologiques. Les CSNs adultes sont très proches des CSEs grâce à leur capacité illimitée d'auto-renouvellement et

l'expression de facteurs de transcription comme Sox2 et bHLH (« Basic Helix-Loop-Helix ») (Ahmed et al., 2009; Lee et al., 2014). De plus, leur taux de prolifération très faible ainsi que la réduction des problèmes éthiques, font de ces cellules un très grand avantage pour leur utilisation en clinique (Ma et al., 2009; Nam et al., 2015).

2.2.4. Les cellules souches fœtales (CSFs)

Trois types de cellules souches peuvent être prélevées à partir de fœtus : 1- les CSHs à partir du sang, du foie et de la moelle épinière; 2- les CSMs à partir du sang, du foie, de la moelle épinière, des poumons, des reins ou du pancréas, qui ont un potentiel de différenciation variable en fonction de la source, ou encore 3- les CSNs à partir du cerveau et de la moelle épinière (O'Donoghue and Fisk, 2004). En étant multipotentes, le potentiel de différenciation est plus limité que les CSEs et donc le risque de formation de tératomes est diminué voir nul (O'Donoghue and Fisk, 2004; Herberts et al., 2011; Nam et al., 2015). Elles sont à la fois, ressemblantes mais plus « plastiques » et ont un potentiel de prolifération plus élevé que les CSAs. Ces cellules ont donc un grand potentiel thérapeutique (O'Donoghue and Fisk, 2004; Ishii and Eto, 2014).

Comme pour les CSEs, des problèmes éthiques se posent quant à l'utilisation de fœtus (Nam et al., 2015). Bien qu'il soit possible de récupérer des fœtus morts naturellement (O'Donoghue and Fisk, 2004; Ishii and Eto, 2014), il a été montré que les cellules qui en sont issues induisent plus d'effets secondaires après transplantation (Ishii and Eto, 2014). Les cellules issues d'un avortement en clinique ou d'une grossesse ectopique sont une source plus appropriée pour la transplantation, mais les problèmes éthiques sont plus importants (Ishii and Eto, 2014). Du à leur grand potentiel de prolifération et de différenciation, les CSFs sont un espoir thérapeutique pour la thérapie génique et pour des greffes chez l'adulte ou le fœtus intra-utérin comme déjà réalisé après transplantation de cellules du foie (O'Donoghue and Fisk, 2004; Herberts et al., 2011). Ces cellules sont déjà utilisées en essai clinique, comme dans le cas d'injection dans la moelle épinière de patient atteint d'une SLA. De nombreuses études montrent que ces cellules peuvent être bénéfiques pour le traitement de cancer, des brûlures, des hépatopathies, des cardiopathies ou des maladies neurologiques (Ishii and Eto, 2014).

2.3. Les cellules souches neurales

Les CSNs sont très étudiées pour le traitement de maladies neurologiques puisqu'elles sont présentes dans le cerveau adulte et sont naturellement recrutées lors d'une régénération neuronale. Les CSNs peuvent être isolées à partir de tous les tissus nommés en première partie (Chapitre 2, « différents types de cellules souches »). Cependant, les CSNs les plus utilisées sont dérivées de cerveaux adultes ou de fœtus. Bien que peu d'études montrent des différences entre ces deux sources de CSNs, il a été noté que

les CSNs issues de fœtus ont un temps de division plus court, un potentiel d'expansion plus grand, une meilleure capacité de migration et d'intégration après une transplantation que les CSNs adultes, d'embryons ou les CSPis (Marsh and Blurton-Jones, 2017).

2.3.1. Caractérisation des cellules souches neurales

Les cellules souches neurales, *in vitro*, sont capables d'auto-renouvellement permettant de former des « neurosphères » en présence des facteurs de croissance pour ces cellules, EGF et FGF2. *In vitro*, en retirant les mitogènes du milieu, et *in vivo*, les CSNs se différencient en cellules neurales : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes (Jin and Galvan, 2007; Ma et al., 2009; Tsukamoto et al., 2013) par l'intermédiaire de progéniteurs (CPOs et neuroblastes). *In vivo*, les CSNs endogènes permettent le maintien de l'homéostasie du cerveau et elles sont aussi très sensibles aux stimuli environnementaux, physiologiques et à l'activité neuronale permettant une neurogénèse continue, avec un rôle dans la mémoire, l'apprentissage, les fonctions cognitives et la régulation de l'humeur (Ma et al., 2009). Les CSNs adultes permettent d'étudier leurs capacités de cellules souches et servent de modèle pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Galli et al., 2003; Ma et al., 2009).

Les CSNs peuvent être identifiées à l'aide de marqueurs spécifiques comme l'expression de la glycoprotéine CD133, les filaments intermédiaires GFAP et Nestine, les protéines Musachi 1 et 2, le facteur de transcription SOX2, la protéine intracellulaire FABP7 (« Fatty acid binding protein 7 ») ou encore SSEA-1 (« Stage-specific embryonic antigen 1 ») (Decimo et al., 2012; Leong et al., 2013). Cependant, ces marqueurs ne sont pas uniquement exprimés par les CSNs, et il est important d'utiliser plusieurs marqueurs. De nouvelles sondes ont été développées, qui fixent des protéines intracellulaires pour un meilleur isolement et identification des CSNs (par exemple la sonde CDy1 qui fixe spécifiquement la protéine FABP7 (Leong et al., 2013)).

Les CSNs sont capables de s'auto-renouveler grâce à la division proliférative symétrique dans laquelle une CSN donne naissance à deux CSNs identiques. Cette capacité permet d'augmenter le pool de CSNs (Galli et al., 2003; Alison and Islam, 2009; Biehl and Russell, 2009). D'autres divisions sont réalisées, comme la division différenciative symétrique qui donne deux cellules différenciées (cette division serait utilisée lors de lésions) ou encore la division asymétrique qui permet la naissance d'une CSN et d'une cellule engagée dans une voie de différenciation (progéniteurs) (Jin and Galvan, 2007; Egger et al., 2008; Shahriyari and Komarova, 2013) (**Figure 2.4**). Cette dernière division permet le maintien de l'homéostasie du tissu.

En conditions de culture des CSNs, les cellules différenciées meurent, tandis que les CSNs s'auto-renouvellent, ce qui permet de garder une culture de CSNs pure (Galli et al., 2003; Casarosa et al., 2014).

Au sein d'une neurosphère, il y a des CSNs à division lente mais aussi des progéniteurs intermédiaires à division rapide. La proportion des deux types de cellules influence la taille de la neurosphère (Svendsen et al., 1999; Galli et al., 2003).

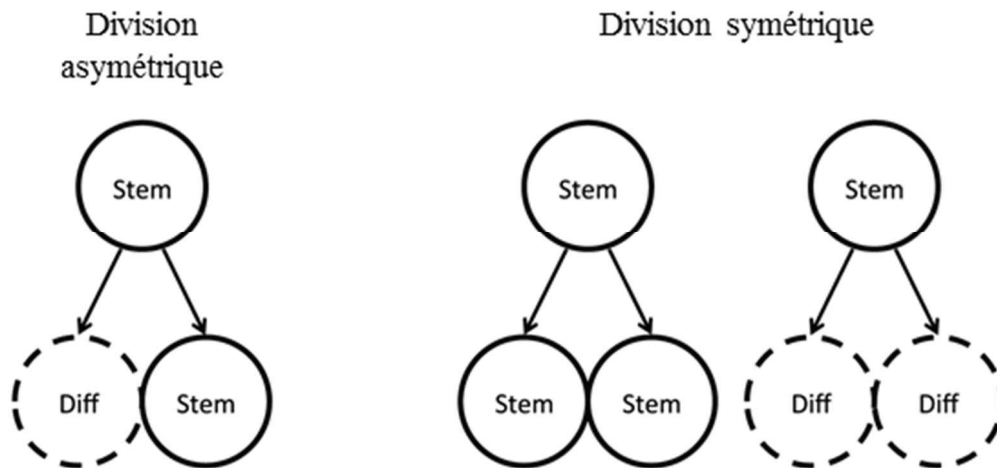


Figure 2.4: Schéma représentant la division symétrique et asymétrique des CSNs *in vitro* et *in vivo*.

(Modifiée d'après Shahriyari and Komarova., 2013)

2.3.2. Localisation des CSNs adultes

Au cours du développement, les cellules neuroépithéliales (qui proviennent du neuroectoderme), qui correspondent aux CSNs du développement (Bergström and Forsberg-Nilsson, 2012), se transforment progressivement en cellules de la glie radiaire. Ces cellules restent en contact avec les surfaces apicales et ventriculaires, mais leurs corps cellulaires restent à l'intérieur de la zone ventriculaire. Lorsque l'épaississement du cortex a lieu, les prolongements s'agrandissent mais les corps cellulaires restent dans la zone ventriculaire. Ces cellules de la glie radiaire expriment les marqueurs des astrocytes (Ten-C, GLAST (« Glutamate Aspartate Transporter ») et BLBP (« Brain-Lipid Binding Protein ») et les filaments intermédiaires (GFAP, Nestine et Vimentine). Les jonctions serrées situées entre ces cellules deviennent des jonctions adhérentes qui contactent les cellules endothéliales du système vasculaire (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Les cellules de la glie radiaire deviennent les CSNs localisées à la surface des ventricules latéraux (Figure 2.5).

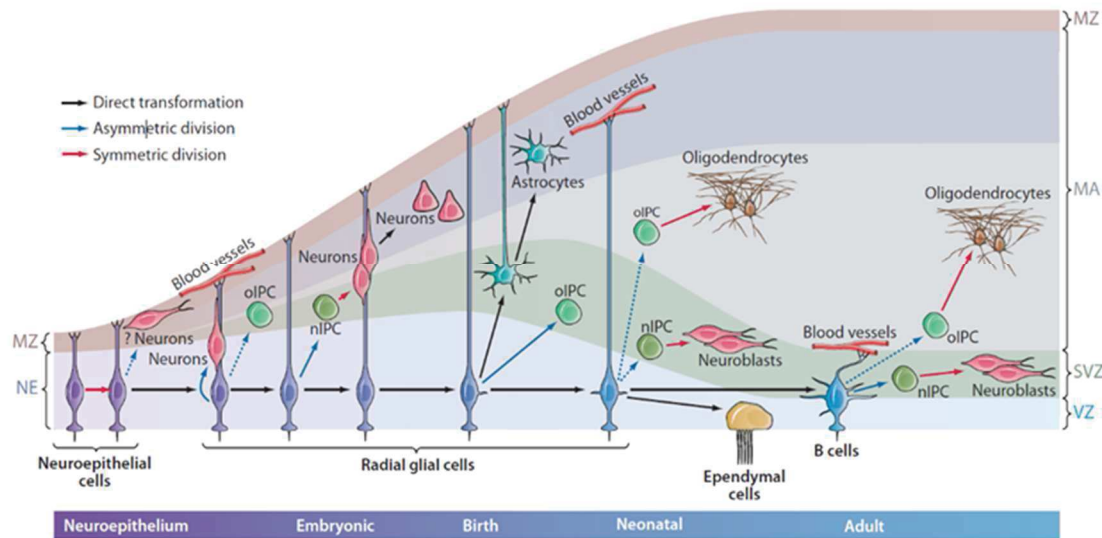


Figure 2.5 : Développement de la ZSV et localisation des CSNs après le développement du cerveau.
(D'après Kriegstein and Alvarez-Buylla., 2009)

Dans le cerveau adulte, les CSNs sont localisées dans un microenvironnement bien spécifique appelé « niche neurogénique » qui permet de réguler le comportement, la survie et la différenciation des CSNs (Nam et al., 2015). Les deux principales niches de CSNs sont la zone sous ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux (VLs) et la zone sous granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe (French-Constant, 2008; Ma et al., 2009; Horgusluoglu et al., 2017). La présence de CSNs dans d'autres zones du cerveau est encore à l'étude (hypothalamus près du 3^{ème} ventricule, cortex cérébrale, cervelet, bulbe olfactif, rétine, moelle épinière et méninges), mais la capacité de neurogénèse de ces cellules est controversée (Decimo et al., 2012).

Différentes cellules sont présentes au niveau de la ZSV : les CSNs quiescentes (prolifération lente), des progéniteurs (TAPs (« Transit amplifying precursors »)), des neuroblastes, des tancytes et des astrocytes (French-Constant, 2008; Ma et al., 2009; Decimo et al., 2012; Maki et al., 2013). Les CSNs de la ZSV sont situées directement sous la couche de cellules épendymaires qui tapissent les VLs, et elles contactent les VLs grâce à leurs surfaces apicales (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Ma et al., 2009; Putnam, 2014) permettant un contact avec le LCR (Modrek et al., 2014). Ces cellules dites "cellules de types B" sont « quiescentes » et expriment les marqueurs des astrocytes (GFAP) et des cellules épendymaires (CD133), mais aussi les filaments intermédiaires Nestine et Vimentine (Galli et al., 2003; Ma et al., 2009; Tsukamoto et al., 2013). D'autres études ont montré qu'on peut distinguer deux types de CSNs dans la ZSV : les cellules quiescentes qui sont GFAP⁺, CD133⁺ et Nestine⁻, alors que les CSNs « actives » sur-expriment la Nestine et le récepteur à l'EGF (EGFR). Les cellules du type B donnent naissance aux progéniteurs intermédiaires (cellules de type C ou TAPs) avec un taux de prolifération plus important, qui donnent à leur tour des neuroblastes (cellules de type A), ces cellules ont un taux de prolifération plus important et vont migrer en chaîne vers les bulbes olfactifs, via le flux

migratoire rostral pour donner de nouveaux interneurons (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Ma et al., 2009; Decimo et al., 2012; Tsukamoto et al., 2013) (**Figure 2.6**). Cette migration est possible grâce aux interactions entre les cellules migrantes et la formation d'un "tube glial" par des astrocytes (Jin and Galvan, 2007; Michailidou et al., 2015). Les CPOs sont retrouvées dans différentes aires du cerveau et ne se différencient pas jusqu'à leur activation (Michailidou et al., 2015).

Les cellules épendymaires ont une fonction de support et de régulation des CSNs et des neuroblastes car elles peuvent moduler le transport d'ions ou d'autres facteurs à partir du LCR (Kazanis et al., 2008; Ma et al., 2009). Elles sont aussi une source locale de facteurs neurogéniques qui sont décrits ci-dessous. De plus, elles forment des jonctions gap avec les astrocytes de la ZSV.

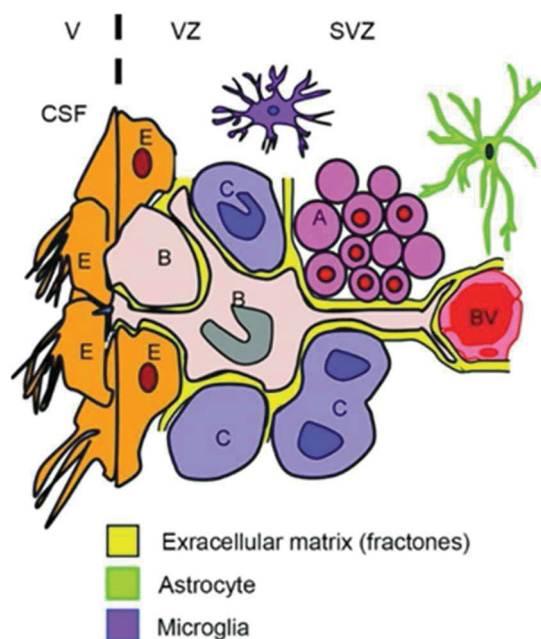


Figure 2.6 : Représentation du microenvironnement de la ZSV.

Les cellules de type B représentent les CSNs qui donnent naissance aux cellules de type C (les TAPs) qui elles même donnent les cellules du type C (les neuroblastes) qui vont migrer et se différencier.
(D'après Maki et al., 2013)

En condition pathologique, les neuroblastes peuvent migrer vers d'autres zones du cerveau (Decimo et al., 2012).

Dans la ZSG de l'hippocampe, les CSNs expriment les mêmes marqueurs mais contrairement aux CSNs de la ZSV, ces CSNs restent plus localisées et donnent des neurones granulaires (Kazanis et al., 2008; Ma et al., 2009). Elles ont un rôle important dans la mémoire et l'apprentissage (Jin and Galvan, 2007; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Les CSNs de la ZSG seraient impliquées dans la mémoire spatiale à long terme contrairement à la mémoire à court terme qui dépendrait des CSNs de la ZSV (Carradori et al., 2017). On retrouve aussi deux types de cellules dans la ZSG : les progéniteurs de type I exprimant la GFAP et la Nestine, qui ont un potentiel de développement plus étroit que les cellules du type B de la ZSV (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Casarosa et al., 2014) (**Figure 2.7**). Ces progéniteurs donnent naissance à des progéniteurs immatures de type II (aussi nommés progéniteurs intermédiaires neurogéniques). Elles se différencient graduellement en neuroblastes migrants, et migrent vers la couche de cellules granulaires qui, après maturation, donnent des neurones granulaires exprimant DCX

(« DoubleCortin »), PSA-Ncam et neuN (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Casarosa et al., 2014; Horgusluoglu et al., 2017). Le microenvironnement de la ZSG reste approximativement le même que dans la ZSV où les CSNs sont entourées de progéniteurs intermédiaires, d'astrocytes et de cellules granulaires matures. De plus, la ZSG reste à proximité de vaisseaux sanguins comme dans la ZSV (Kazanis et al., 2008), mais l'environnement de la ZSG ne contient pas de cellules épendymaires.

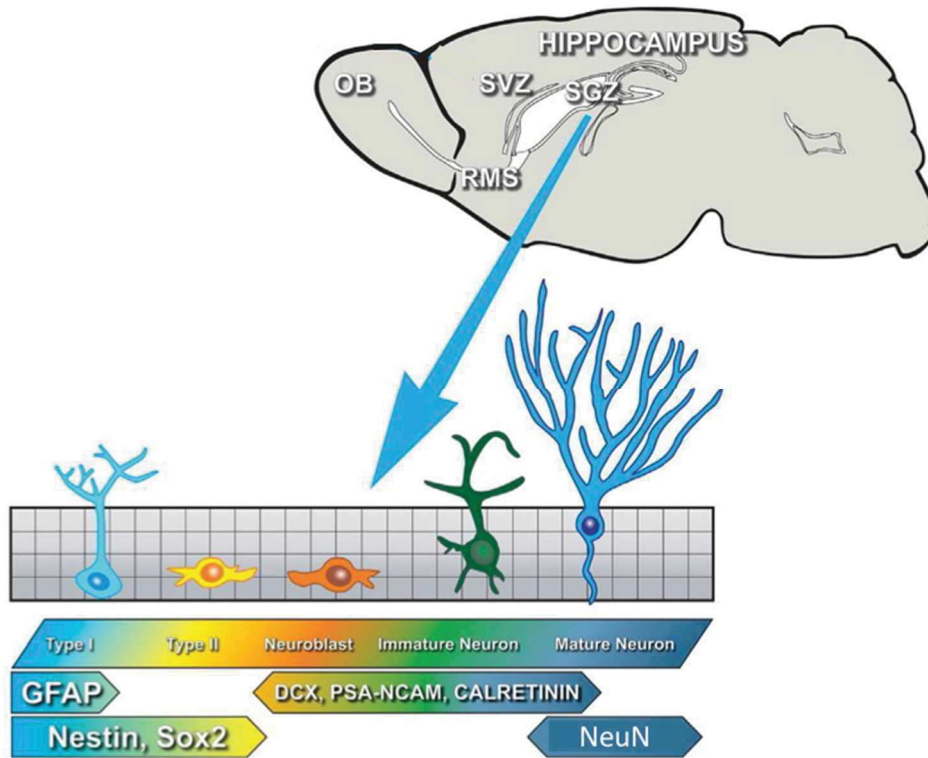


Figure 2.7 : Représentation du microenvironnement de la ZSG.
 Les cellules de type I donnent naissance aux cellules du type II qui se différencient en neuroblastes.
 (D'après Horgusluoglu et al., 2017)

In vivo, les CSNs sont sensibles à leur environnement. En effet, les mêmes CSNs implantées dans deux zones différentes du cerveau ne donnent pas le même type de cellules, car elles se différencient en neurones ou astrocytes présents dans la zone d'implantation (Svendsen et al., 1999; Galli et al., 2003).

2.3.2.1. Facteurs intrinsèques régulant les CSNs

Les CSNs sont sensibles à leur environnement, ce qui leur permet de migrer et de se différencier dans des cas pathologiques, et de réguler l'homéostasie du tissu. Cette régulation est faite par des récepteurs via les interactions cellule-cellule ou des facteurs épigénétiques.

Des récepteurs et les voies de signalisation qui y sont associées sont impliqués dans cette régulation. Notch est impliqué dans le maintien du pool de CSNs et la prolifération, tandis que les récepteurs aux neurotrophines comme BDNF (« Brain-Derived Neurotrophic Factor ») et NFG (« Nerve Growth

Factor ») sont impliqués dans la régulation de la prolifération et la survie des neuroblastes (Kazanis et al., 2008; Decimo et al., 2012; Putnam, 2014). La signalisation par les éphrines régule positivement et négativement la prolifération, la différenciation, la survie et la migration des CSNs (les éphrines B2/3 et A4 régulent positivement contrairement aux éphrines A2 et A7). Les cellules sont capables de communiquer entre elles grâce aux jonctions gap formées par les Connexines ou par les jonctions adhérentes dépendantes des Cadhérines (Kazanis et al., 2008).

Les protéines de la famille des polycomb ou du complexe PcG (« Polycomb-group protein »), sont des régulateurs épigénétiques clés dans la maintenance des CSNs tel que Bmi1 qui catalyse la méthylation des histones H3K27 ou encore Mbd1 (« methyl-CpG binding protein 1 ») qui régule l'expression de FGF2 de manière dépendante de la méthylation de l'ADN. Les protéines du groupe Trithorax (comme Mll1) maintiennent les domaines de chromatine stables et actifs pour la transcription en maintenant la méthylation des queues histones H3K4. Ces protéines sont donc impliquées dans la différenciation. Les histones déacétylase ou des micro ARN (miR-184 ou miR-124) sont aussi impliqués dans la régulation de la différenciation par répression des facteurs de transcriptions neurogéniques, via le ciblage des protéines tel Mbd1 (Ma et al., 2010; Decimo et al., 2012) (**Figure 2.8**).

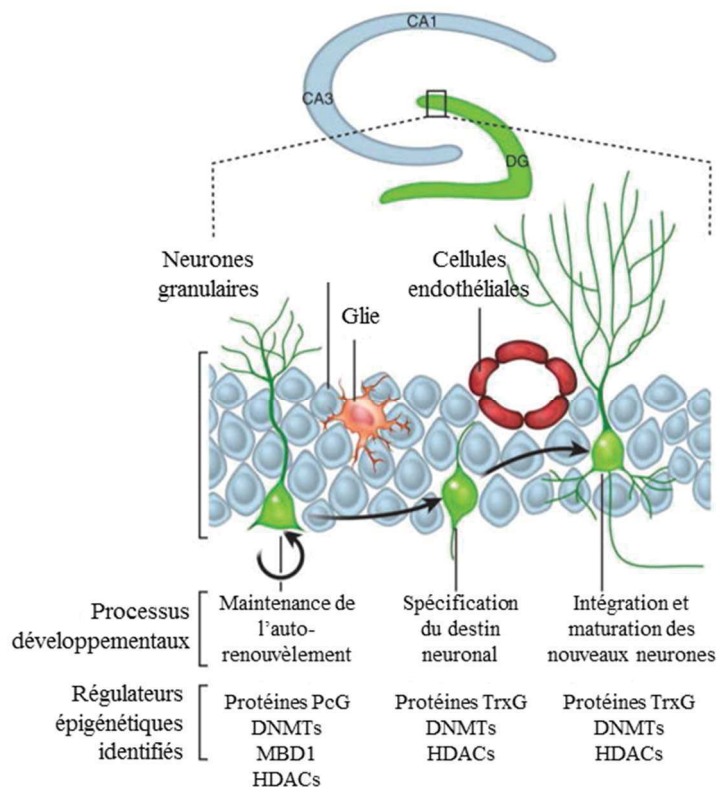


Figure 2.8 : Les facteurs épigénétiques qui régulent les CSNs.
(Modifiée d'après Ma et al., 2010)

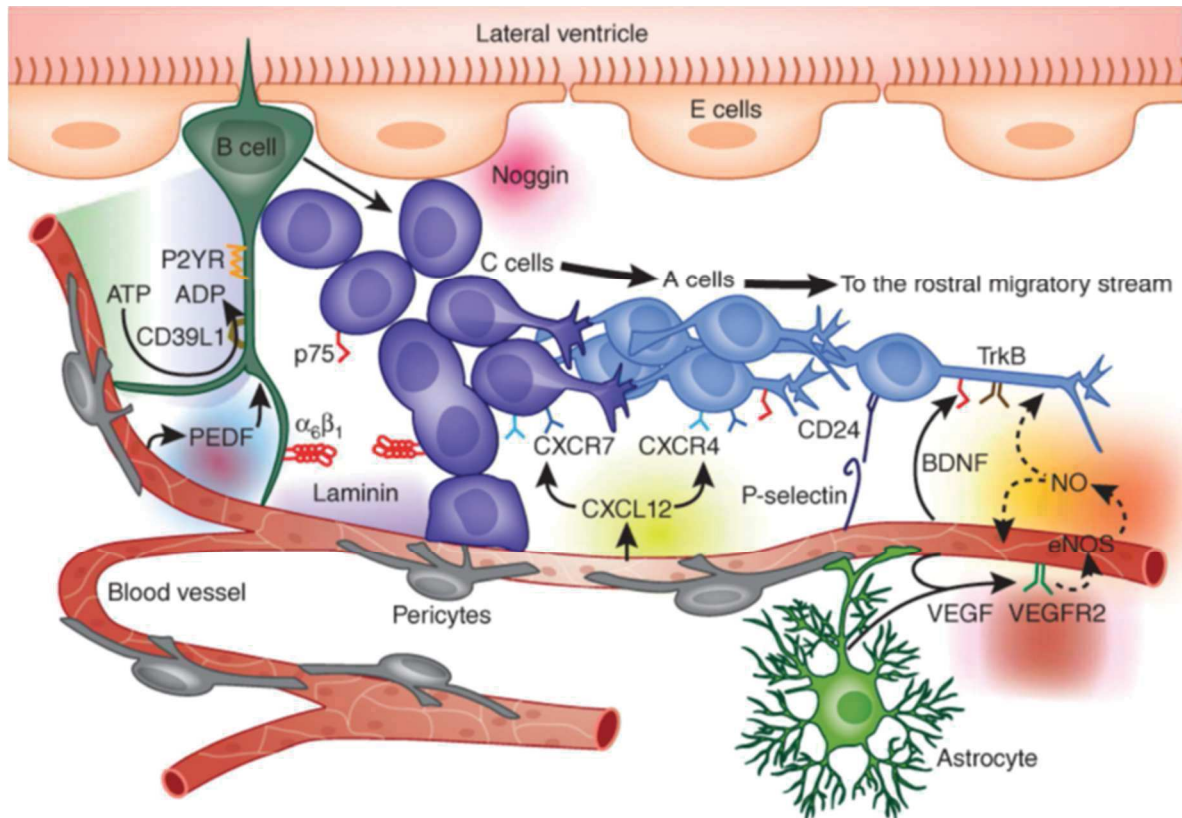


Figure 2.9 : La niche des CSNs adultes située au niveau de la ZSV.
(D'après Putnam., 2014)

2.3.2.2. Les facteurs extrinsèques régulant les cellules souches neurales

Les cellules souches sont trouvées dans une niche qui assure un microenvironnement unique pour leur maintien (Figure 2.9).

La niche peut modifier ses signaux en fonction des changements dans l'environnement pour répondre au besoin du tissu. De plus, les CSNs sont capables de migrer à distance vers les bulbes olfactifs ou d'autres zones du cerveau. Ces migrations impliquent (entre autres) des facteurs chimiotrophiques comme par exemple le facteur SDF-1 (« Stromal Cell-derived factor-1 ») et son récepteur CXCR4 qui est exprimé par les neuroblastes.

Les interactions entre les CSNs ou avec les autres types cellulaires présents dans la niche, avec les molécules de la matrice extracellulaires ou encore les signaux endocrines, paracrines et autocrines permettent une communication des stimuli internes ou externes vers les CSNs et ainsi réguler l'homéostasie du tissu (Kazanis et al., 2008; Decimo et al., 2012).

Des facteurs trophiques, comme le BMP (« Bone Morphogenic Protein »), PEDF (« Pigment Epithelium Derived factor ») ou WNT, des facteurs neurotrophiques comme le NGF (« Nerve Growth Factor »), BDNF, CNTF (« Ciliary Neurotrophic Factor »), des facteurs de croissances comme l'EGF et le FGF, ou encore des cytokines (IL-1, IL-3, IL-6) peuvent être produits et libérés par les cellules présentes dans

la niche comme les astrocytes, la microglie, les cellules endothéliales ou encore les cellules épendymaires (Kazanis et al., 2008; Decimo et al., 2012; Putnam, 2014). Ces facteurs sont impliqués dans la régulation de la quiescence, la prolifération, et la différenciation des CSNs (Decimo et al., 2012; Horgusluoglu et al., 2017). Par exemple, les astrocytes libèrent le NGF et le BDNF qui stimulent respectivement la prolifération et la neurogénèse. Les cellules de la microglie, qui sont à proximité des CSNs, restent quiescentes jusqu'à leur activation en cas de lésion. Dans ce cas, elles synthétisent alors des molécules comme IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor-1 »), BDNF et NGF mais aussi des cytokines en réponse à une neuro-inflammation, telles IL-1 β et TNF- α (« Tumor Necrosis Factor alpha ») qui jouent un rôle dans la régulation de la prolifération des CSNs (Kazanis et al., 2008; Decimo et al., 2012). La régulation temporelle et spatiale du BDNF est un critère essentiel pour la différenciation neuronale car elle cible les cellules de type C plutôt que les cellules de type B (Putnam, 2014). Une expression différentielle de facteurs de transcriptions au niveau de la ZSV ou du flux migratoire rostral permettra la génération de différents types d'interneurones (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Les astrocytes sont reliés entre eux grâce à des jonctions gap, et sont donc capables de former un réseau pour transporter l'information à distance. Ils agissent comme des modulateurs du microenvironnement (Kazanis et al., 2008).

La niche des CSNs possède un réseau vasculaire permettant la délivrance de molécules provenant de la circulation sanguine. Les pieds astrocytaires provenant des astrocytes, les péricytes et les cellules endothéliales qui sont présentes au niveau des vaisseaux, sont cruciaux pour la délivrance de substances métaboliques comme les hormones prolactine et érythropoïétine qui sont impliquées dans la survie, la prolifération et la neurogénèse. Cette barrière créée par ces cellules permet aussi de filtrer la diffusion de molécules toxiques (Decimo et al., 2012). Les cellules de types C contactent aussi le système vasculaire grâce à une interaction intégrine-laminine, là où les astrocytes et péricytes sont absents (Putnam, 2014). Les cellules de type B ont des prolongements basaux longs qui sont orientés tangentiellement aux vaisseaux sanguins (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Les CSNs expriment le récepteur au PDGF α qui est libéré par la circulation sanguine et permet la régulation de la prolifération des CSNs (Kazanis et al., 2008) (**Figure 2.9**).

De plus, le LCR, qui circule dans les ventricules latéraux, contient des facteurs neurotrophiques et de croissance (FGF-2, Shh ou IGF-2 ou l'oxyde nitrique) qui peuvent être libérés pour la survie et la prolifération (Kazanis et al., 2008; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Ma et al., 2009). Tous les facteurs de croissance cités ci-dessus sont libérés par le LCR et les vaisseaux sanguins, ce qui permet une communication à partir de zones distantes aux niches neurogéniques (Kazanis et al., 2008).

La MEC de la ZSV est différente de la MEC des tissus matures environnants, puisque la lame basale s'introduit dans la ZSV et émet des branchements autour des CSNs et des progéniteurs. Ces structures

sont nommées fractones et sont riches en laminine et collagène I. Les fractones sont capables de fixer le FGF2 ce qui permet la régulation de la concentration de ce facteur de croissance et donc l'activité de la ZSV. Ce mécanisme est aussi retrouvé pour d'autres molécules de la MEC (des metalloprotéinases, des glycoprotéines (Tenascine-C), des protéoglycanes (Brevican, Chondroïtine), et le tri-saccharide LeX/SSEA-1/CD15). La majorité de ces protéines sont régulées négativement lors du développement post-natal (Kazanis et al., 2008; Decimo et al., 2012) mais sont retrouvées au niveau des niches neurogéniques, démontrant leurs rôles dans la neurogénèse.

D'autres mécanismes sont impliqués dans l'homéostasie. Par exemple, l'activité neuronale permet la prolifération, la différenciation, la maturation, la survie et l'intégration des nouveaux neurones dans les réseaux préexistants. Le neurotransmetteur GABA (« Gamma-Amino-Butyric Acid »), qui a un rôle d'inhibiteur dans le système nerveux central, a aussi une action excitatrice dans les zones neurogéniques en régulant positivement la prolifération des CSNs et en réduisant leur migration (Kazanis et al., 2008; Decimo et al., 2012). Le glutamate inhibe la différenciation via le récepteur NMDA des neuroblastes (Jin and Galvan, 2007). Il agit donc comme une boucle de rétroaction entre les CSNs et les neuroblastes pour contrôler le nombre de neuroblastes. La sérotonine (5-HT) régule positivement (avec le 5-HT1A) ou négativement (avec le 5-HT2A/2C) la prolifération dans les deux zones neurogéniques (Kazanis et al., 2008).

La tension en oxygène, qui peut être modifiée après un AVC par exemple, influence le destin et la prolifération des CSNs via la modulation des voies de signalisation intracellulaire Notch et P53 (Decimo et al., 2012).

2.4. Les cellules souches neurales et les maladies neurologiques

Bien que les CSNs représentent un espoir thérapeutique pour le traitement des maladies neurologiques grâce à leur propriété de différenciation, il est important de noter que ces cellules peuvent être la cause de maladies. En effet, un dysfonctionnement de la neurogénèse ou de la gliogénèse au cours du développement entraîne des pathologies graves comme des microencéphalies (petite taille du cerveau), des hémimegalencéphalies (grande taille du cerveau), des lissencéphalies (perte de l'aspect du cortex cérébral) ou encore des dysplasies corticales (désorganisation du cortex). Ces dysfonctionnements de la neurogénèse endogène sont associés à des retards mentaux et des épilepsies chez l'enfant (Kazanis et al., 2008).

Chez l'adulte, il est plus difficile d'associer la dégradation de la neurogénèse à des pathologies. En effet, seules des preuves indirectes, comme le déclin de la neurogénèse, associé à l'âge, qui est aussi corrélé avec les démences, sont présentes. De plus, la régulation positive de la neurogénèse endogène induite par les drogues est bénéfique pour le traitement des dépressions et des démences (Kazanis et al., 2008). Chez des patients atteints de SEP, il a été noté un déficit olfactif, qui corrèle avec une réduction de la

production de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif montrant que la dégradation de la neurogénèse peut être liée à la pathologie (Michailidou et al., 2015).

Il existe deux stratégies principales pour l'utilisation des CSNs pour la réparation de tissus : la stimulation et la différenciation *in vitro* des CSNs exogènes ou endogènes après extraction, puis leur réimplantation, ou la stimulation des CSNs endogènes (Figure 2.10). Cette dernière stratégie pourrait être plus appropriée à l'heure d'aujourd'hui car les technologies actuelles ne nous permettent pas de reproduire tous les signaux extracellulaires et intracellulaires de la niche neurogénique. De plus, cela éviterait l'apport de cellules exogènes dans l'organisme. Le comportement des CSNs ou précurseurs prédifférenciés après transplantation ne peut actuellement pas être contrôlé et explique les échecs actuelles de cette méthode (Carradori et al., 2017; Volkman and Offen, 2017).

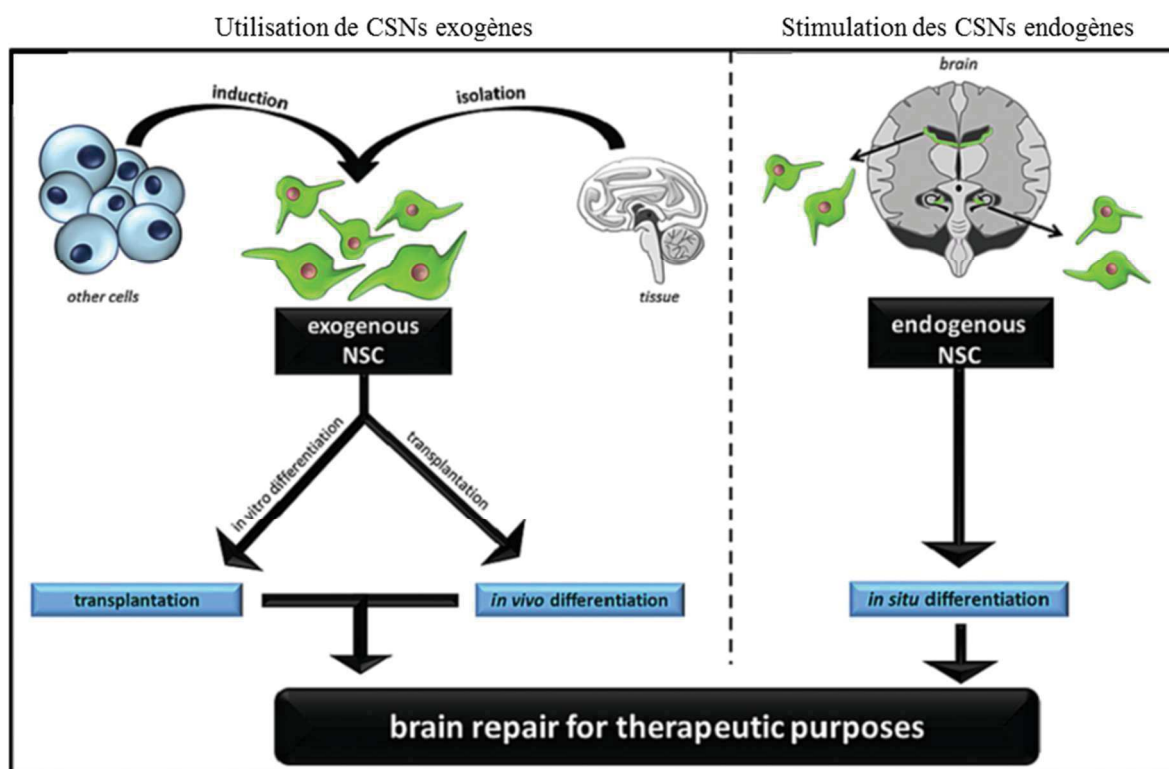


Figure 2.10 : Les différentes stratégies actuelles pour l'utilisation thérapeutique des cellules souches neurales.

(Modifiée d'après Carradori et al., 2017)

2.4.1. Les cellules souches neurales et les maladies neurodégénératives

Lors de certaines maladies neurologiques, (AVC, maladie d'Alzheimer, maladie d'Huntington), le microenvironnement des zones neurogéniques est modifié grâce à des signaux plus ou moins éloignés, entraînant une modulation de la neurogénèse (Jin and Galvan, 2007; Kazanis et al., 2008; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Dans la ZSV, le changement de concentration d'hormones ou de facteurs de

croissances peut être transmis grâce à la proximité du LCR, au continuum MEC - vaisseaux - méninges ou encore grâce aux réseaux d'astrocytes. Les signaux inflammatoires, retrouvés dans des maladies démyélinisantes, entraînent une augmentation de la production d'oligodendrocytes endogènes permettant une remyélinisation. Chez l'humain, il a été montré qu'une augmentation de la neurogenèse dans le cas d'AVC, corrèle avec une augmentation de molécules de la MEC (Tenascine C), des facteurs de croissance et de morphogènes (Jin and Galvan, 2007; Kazanis et al., 2008). Toutes ces observations montrent que les CSNs endogènes sont capables de migrer vers les zones lésées et de se différencier en cellules neuronales fonctionnelles. Cependant, cette capacité d'auto-réparation n'est pas suffisante car 80% des cellules qui ont migré meurent après 6 semaines et seulement 0.2% des cellules lésées sont remplacées (Jin and Galvan, 2007).

Une stratégie thérapeutique intéressante serait donc de stimuler directement les cellules endogènes ou de prévenir la mort des cellules migrantes et d'augmenter leur potentiel de différenciation (Jin and Galvan, 2007; Michailidou et al., 2015; Horgusluoglu et al., 2017).

Pour une stratégie thérapeutique basée sur le remplacement cellulaire, il est important de distinguer les maladies « neuronales » qui impliquent une perte de neurones spécifiques, des maladies « non neuronales ». En effet, dans la maladie de Parkinson par exemple, les neurones dopaminergiques affectés dans la substance noire exercent une action modulatrice dans le striatum, via la libération de dopamine qui peut se faire en dehors des synapses, ne nécessitant pas une intégration complète des cellules transplantées. Donc une réparation partielle peut entraîner une récupération significative dans certaines conditions. Par exemple, les cellules donatrices peuvent être transplantées directement dans la région cible pour éviter la migration des cellules. Cette stratégie est plus difficilement envisageable dans d'autres maladies comme la maladie d'Alzheimer ou la SEP, qui sont caractérisées par un besoin plus complexe en réparation avec des lésions plus vastes (Casarosa et al., 2014; Marsh and Blurton-Jones, 2017).

Cependant, il a été montré que les cellules implantées dans le cadre de la SEP, ont un effet « de voisinage » entraînant une stimulation de la prolifération, de la migration et de la différenciation des CSNs endogènes (Michailidou et al., 2015).

L'activité immunomodulatrice des cellules greffées peut être bénéfique. Comme dans la SEP où l'inflammation est associée à la progression de la maladie (Casarosa et al., 2014; Michailidou et al., 2015). En effet, une étude a montré que dans des modèles animaux d'encéphalomyélite-auto-immune, les cellules souches implantées directement dans les ventricules latéraux ou le cerveau sont capables de migrer vers les zones inflammatoires tandis qu'elles ne sont pas retrouvées dans les autres zones du cerveau. Ces cellules expriment les marqueurs des cellules gliales montrant qu'elles sont capables de se différencier après migration. Ce serait donc le processus inflammatoire par la sécrétion de facteurs comme le TNF- α , l'IFN- γ (« Interferon gamma »), et le PDGF qui entraîne la migration et la

différenciation des cellules. De plus, la réduction de la sévérité de la maladie est liée à la réduction du processus inflammatoire et non au remplacement cellulaire. Cependant, les CSNs injectées par voie intraveineuse agissent sur le processus inflammatoire via l'interaction avec le système immunitaire périphérique car les cellules transplantées sont retrouvées dans les organes lymphoïdes et non dans le cerveau (Ben-Hur, 2008).

La capacité des CSNs à produire des facteurs de croissance en font des cellules de choix pour une transplantation comme précédemment démontré dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer où une amélioration des fonctions cognitives a été observée. Cependant, les cellules n'ont aucun effet sur la pathologie A β . L'amélioration est principalement due à une augmentation de la production de facteurs de croissance ainsi qu'une différenciation astrocytaire (et non neuronale) des cellules (Marsh and Blurton-Jones, 2017).

Dans d'autres modèles de maladies neurodégénératives (Huntington, Parkinson), il semble que les CSNs non modifiées soient moins efficaces que les CSNs transformées pour sur-exprimer un facteur de croissance due au fort taux de mortalité des cellules après transplantation. Cependant, l'utilisation de ces cellules transformées pourrait entraîner des effets secondaires néfastes chez l'humain (Marsh and Blurton-Jones, 2017).

Avant d'envisager une application thérapeutique des CSNs pour le système nerveux central, il faut se confronter à des problèmes encore irrésolus : la source idéale de cellules en fonction de la maladie, le nombre de cellules à transplanter, la méthode de transplantation, le stade réel de la maladie pour que le traitement soit efficace, les étapes de purification et d'isolation pour une injection (Casarosa et al., 2014; Michailidou et al., 2015; Marsh and Blurton-Jones, 2017), ainsi que les méthodes pour éviter le rejet des cellules (Jin and Galvan, 2007; Marsh and Blurton-Jones, 2017). Contrôler les facteurs épigénétiques qui modifient le destin cellulaire des CSNs *in vitro* est primordial pour créer le type cellulaire idéal et standardisé pour un traitement des maladies neurodégénératives (Srinageshwar et al., 2016).

Différentes études cliniques utilisent les CSNs pour les maladies neurologiques (Barreau et al., 2016). Ainsi, il y a actuellement 44 études cliniques qui utilisent les CSNs. Elles étudient principalement la transplantation de CSNs, que ce soit des CSNs isolées de la moelle épinière de patients, des lignées cellulaires, des CSNs dérivées de CSMs ou de fœtus. La majorité des essais cliniques sont actuellement en phase clinique I, pour évaluer la sécurité et la tolérance d'injection de CSNs dans différentes pathologies (Alzheimer, Parkinson, SLA, gliomes). Par exemple, un essai analyse les effets d'une injection dans la moelle épinière de CSNs issues de fœtus chez des patients atteints de SLA. Une autre étude évalue les effets d'une injection dans le ventricule latéral d'un facteur neurotrophique pour stimuler la différenciation endogène chez des patients atteints de SLA (Barreau et al., 2016). Les essais cliniques actuellement en cours sont résumés dans le **Tableau 2.1**.

Tableau 2.1 : Les cellules neurales en clinique pour les maladies neurodégénératives.

Maladie	Types de CSNs	Protocole	Mesures	Phase clinique	N° NCT
Maladies Neurodégénératives					
SLA	CSNs dérivées de fœtus humain	- Transplantation des CSNs au niveau laminaire de la moelle épinière	- Sécurité (Taux de mortalité et effets secondaires) - Efficacité (mesures des variables neuroradiologique/ Neurophysiologique/ Neuropsychologique)	I	NCT01640067
SLA	CSNS dérivées de la moelle épinière de fœtus humain	- Transplantation dans la moelle épinières	- Sécurité (effets secondaires)	I	NCT01348451
SLA	/	- Injection du GCS-F (granulocyte colony stimulating factor) tous les 3 mois pendant 5 jours	- Efficacité	II	NCT00397423
SLA	CSNs modifiées pour sécréter le GDNF	- Transplantation des CSNs au niveau laminaire de la moelle épinière	- Sécurité (effets secondaires) - Efficacité (potention action moteur)	I	NCT02943850
SEP	progéniteurs neurax dérivés de CSMs auto-logues (de la moelle épinière des patients)	- Transplantation intrathécale des cellules	- Sécurité (effets secondaires) - Tolérance - Efficacité	I	NCT01933802
Parkinson	CSNs dérivées des cellules souches parthénogénétiques	- Transplantation des cellules dans le striatum et la substance noire	- Sécurité (effets secondaires)	I	NCT02452723
Parkinson	CSNs endogènes	-Récupération des eCSNs de patients aillant subit une chirurgie. Les CSNs sont récupérées le long des électrodes précédemment implantées chez des patients atteint de Parkinson	/	I	NCT01329926
AVC	CTX cells : lignées cellulaires de CSNs humaines immortalisées	- Injection intra striatal du coté ipsilatérale de 20 millions de cellules	- Efficacité	II	NCT02117635
AVC	CTX cells : lignées cellulaires de CSNs humaines immortalisées	- Injection intra striatal du coté ipsilatérale de doses croissantes de cellules	- Sécurité (effets secondaires) - Dose limite	I	NCT01151124
Paralysie cérébrale	source non décrite	- Protocole non décrit	-Efficacité (changement dans les fonctions motrices)	I	NCT03005249
EIH	cellules progénitrices neuronales de fœtus	- Transplantation intrathécale des cellules et/ou facteurs paracrines	- Sécurité (effets secondaires) - Efficacité (Evaluation du comportement neurologique)	-	NCT02854579
Dégénérescence maculaire lié à l'âge	HuCNS-SC : lignée cellulaire de CSNs dérivées de cerveau de fœtus humain	- Transplantation des cellules dans l'espace subrétinal d'un œil.	- Sécurité (effets secondaires) - Efficacité (Evaluation du changement de l'activité visuelle) nerveuse)	I/II	NCT01632527
Autisme	/	- Récupération des cellules mononucléaires du sang périphérique pour crée des Cpis afin de dériver des cellules souches neurales et des neurones pour modéliser la maladie	- caractérisation des Cpis	-	NCT02720939

CSNs: Cellules Souches Neurales; eCSNs : CSNs endogènes; EIH : Encéphalopathie Ischémique hypoxique

2.4.2. Les cellules souches neurales et les gliomes

2.4.2.1. Implication des cellules souches neurales endogènes dans la gliomagenèse

Certaines études chez le rongeur ont montré que les cellules de type B, ainsi que les cellules de type C dans la ZSV sont capables d'accumuler des mutations épigénétiques (Achanta et al., 2010), et que seulement 5 mutations oncogéniques des CSNs sont suffisantes pour initier la gliomagenèse (Bauer et al., 2014). En effet, la surexpression/ dérégulation des voies de signalisation (Notch et Shh), des facteurs de croissance (PDGFR ou EGFR) et/ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (*PTEN* et/ou *p53*) dans les CSNs de la ZSV entraînent la formation de tumeur (Achanta et al., 2010; Jacques et al., 2010; Lee et al., 2012b). Selon le type de mutation ou encore la combinaison des mutations au sein des CSNs, le phénotype de la tumeur n'est pas le même (Jacques et al., 2010). D'autres études ont montré que la gliomagenèse dépend du type de tumeur et que les CSNs présentes au niveau du 3ème ventricule seraient responsables de la gliomagenèse chez l'enfant (Lee et al., 2012a). D'autres indications indirectes montrent que les CSNs peuvent être impliquées dans la gliomagenèse. En effet, la ZSV est aussi une zone péri-vasculaire qui est un régulateur clé pour la croissance normale (pour les CSNs) ou pathologique (pour la formation de la tumeur), et elle permettrait d'alimenter la tumeur (Achanta et al., 2010; Putnam, 2014). De plus, des évidences cliniques suggèrent que l'origine des gliomes provient des CSNs, car les gliomes se forment fréquemment au niveau des ventricules latéraux (Modrek et al., 2014), et sont associés à une augmentation de la taille de la tumeur et une diminution de la survie (Achanta et al., 2010). Des cellules souches de gliomes, qui sont très proches phénotypiquement des CSNs, ont été retrouvées dans presque tous les gliomes. Ces cellules sont capables de ré-initier une tumeur grâce à la même capacité d'auto-renouvellement que les CSNs endogènes. Ces différentes données indiquent que les CSNs peuvent être à l'origine des gliomes (Ma et al., 2009; Modrek et al., 2014) (Figure 2.11).

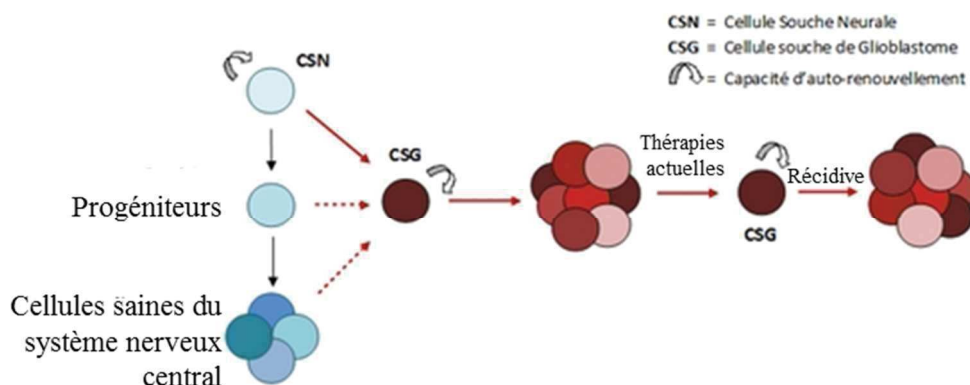


Figure 2.11: Les CSNs seraient les cellules initiatrices des gliomes et responsables de la récurrence de la tumeur.

(Modifiée d'après <https://etudes.univ-rennes1.fr>)

2.4.2.2. Les cellules souches neurales comme traitement pour les gliomes

Certaines études ont proposé que les CSNs endogènes ont une action anti-cancéreuse naturelle qui s'ajoute à leur tropisme vers les tumeurs (Kosztowski et al., 2009; Achanta et al., 2010). Bien que très mal compris, le tropisme serait réalisé grâce à la libération par la tumeur, de facteurs de croissance ou de cytokines et à la présence de récepteurs sur les cellules tumorales. La MEC de la tumeur et l'environnement hypoxique semblent aussi être impliqués dans la migration des CSNs. De plus, les CSNs ont la capacité à traverser la BHE (Zhao et al., 2008; Kosztowski et al., 2009). Ces propriétés font de ces cellules un véhicule pour les traitements des gliomes comme la libération de cytokines ou l'incorporation d'enzyme qui convertissent des pro-drogues permettant la libération spécifiquement dans les cellules tumorales et dans les zones hypoxiques qui sont connues pour être résistantes aux traitements (Zhao et al., 2008; Oh and Lim, 2009; Achanta et al., 2010), ainsi que l'intégration d'agents sensibles à la radiothérapie, de virus ou d'autres agents alkylants (Kosztowski et al., 2009) (**Figure 2.12**). En effet, des études sur des rongeurs ont montré que des CSNs induites à partir de fibroblastes ou des lignées de CSNs, sont capables migrer vers une tumeur et de réduire la taille de la tumeur par sécrétion de protéines anti-tumorales (Zhao et al., 2008; Bagó et al., 2016). Ce tropisme vers les cellules tumorales peut aussi servir comme outil d'imagerie pour la localisation de la tumeur (Achanta et al., 2010), où l'injection dans les ventricules latéraux de CSNs est plus efficace que les routes intraveineuses ou intrapéritonéales (Kosztowski et al., 2009).

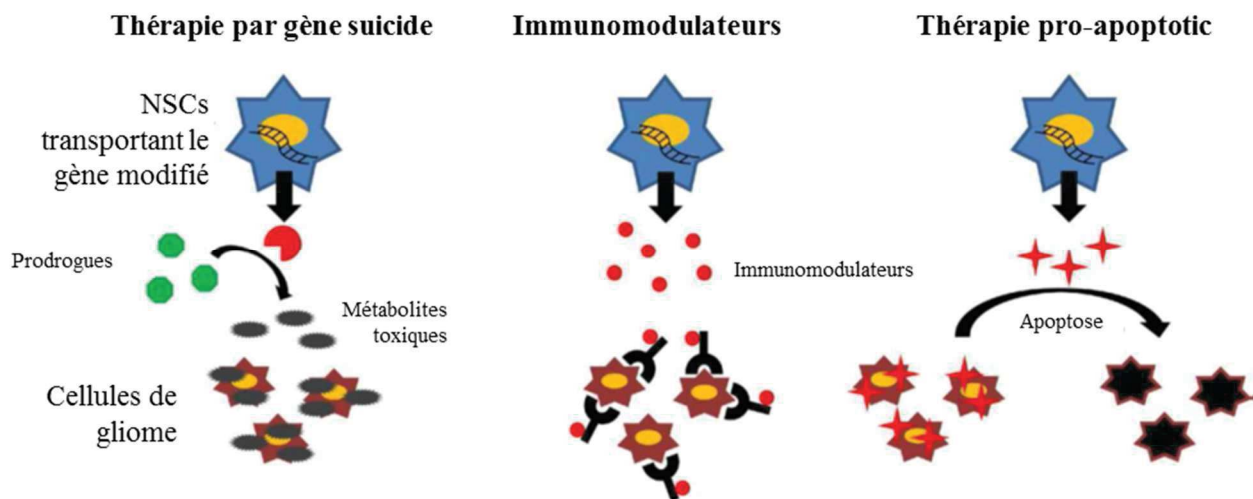


Figure 2.12 : Exemples de différentes thérapies possibles avec des CSNs grâce à leur tropisme naturel vers les gliomes.

(Modifiée d'après Oh and Lim., 2009)

Actuellement, plusieurs études cliniques pour le traitement des gliomes via l'utilisation de CSNs sont en cours selon le site www.clinicaltrials.gov. L'une d'entre elle étudie l'efficacité de l'injection de CSNs génétiquement modifiées pour exprimer la cytosine déaminase, qui va convertir le promédicament (5-fluorocytosine) donné au patient, en agent de chimiothérapie (5-fluorouracile) (NCT01172964 et

NCT02015819). Une autre étude teste l'efficacité de l'injection de CSNs modifiées pour exprimer une carboxylesterase, qui pourrait augmenter l'efficacité du traitement donné aux patients après migration vers les cellules tumorales (NCT02192359). La majorité des études cliniques actuellement en cours sont résumées dans le **Tableau 2.2**, et font l'objet d'un article de revue (Barreau et al. Soumis).

Tableau 2.2 : Les CSNs en clinique pour les tumeurs cérébrales

Maladie	Types de CSNs	Protocole	Mesures	Phase clinique	N° NCT
Tumeurs cérébrales					
Gliome	CSNs (source non décrite) chargées avec adénovirus oncolytique	-Transplantation des cellules chez des patients qui ont eu une chirurgie ou une biopsie	-Mesure de la dose maximale tolérée - Sécurité (effets secondaires) -Efficacité (progression de la tumeur par IRM)	I	NCT03072134
Gliome	CSNs modifiées pour exprimées l'enzyme cytosine déaminase (CD)	-Transplantation intracérébrale des cellules. Quelques jours après l'implantation, les patients sont traités pendant 7 jours avec l la prodrogue 5-FC. L'enzyme CD convertie la prodrogue 5-FC en agent chimiothérapeutique 5-FU	- Mesure de la dose maximale tolérée - Sécurité (effets secondaires et toxicités) - Réactions allergique	I	NCT02015819
Gliome	CSNs modifiées pour exprimées l'enzyme cytosine déaminase (CD)	-Transplantation intracérébrale des cellules. Quelques jours après l'implantation, les patients sont traités pendant 7 jours avec l la prodrogue 5-FC. L'enzyme CD convertie la prodrogue 5-FC en agent chimiothérapeutique 5-FU	- Sécurité et faisabilité de l'administration intracérébrale - Relation entre concentration intracérébrale et systemic de 5-FC et 5-FU	0	NCT01172964
Gliome	CSNs exprimant la carboxylesterase	- Injection intracranienne de CSNs modifiées en combinaison avec une injection intraveineuse d'irinotecan	- Sécurité (effets secondaires) -Mesure de la dose maximale tolérée - Incidence de l'immunogénicité - Efficacité	I	NCT02055196
Gliome	allogénique CSNs exprimant la carboxylesterase	- Injection intracranienne de CSNs modifiées en combinaison avec une injection intraveineuse d'irinotecan	- Sécurité (effets secondaires) -Mesure de la dose maximale tolérée - Paramètres pharmacocinétiques - Bénéfice clinique par IRM - Destin des NSCs	I	NCT02192359
Gliome	/	- Récupération des CSNs et des cellules souches de gliomes pour crée des lignées cellulaires stables	/	0	NCT01251913
Gliome	/	- les patients reçoivent une radiothérapie qui ne touchent pas les CSNs	- Sécurité (effets secondaires)	-	NCT01478854
Gliome	/	- les patients reçoivent une radiothérapie qui cible les CSNs	- Efficacité (PFS and progression de la tumeur par IRM)	II	NCT02177578
métastase cérébrale due à des cancers autres	/	- les patients avec des métastases cérébrales reçoivent une radiothérapie sur tout le cerveau avec une méthode qui conserve les CSNs	- Suivi de l'évolution (augmentation de la formation d'une tumeur à partir d'une métastase ou apparition de nouvelles métastases).	III	NCT00581113
métastase cérébrale due à un cancer du sein	/	- les patients avec des métastases cérébrales reçoivent une radiothérapie sur tout le cerveau avec une méthode qui conserve les CSNs	- Efficacité (Mesure de la fonction neurocognitive)	-	NCT03002532

5 FC: 5-fluorocytosine; 5-FU : 5-fluorouracil

Chapitre 3

Les peptides pour le traitement des maladies neurologiques

3.1. Généralité sur les peptides pénétrants (CPPs pour *cell-penetrating peptides*)

Les CPPs (pour « cell-penetrating peptides »), aussi nommés peptides pénétrants ou PTDs (pour « Protein transduction Domains »), sont des petits peptides (entre 5 et 30 acides aminés), de charges nettes généralement positives, et qui sont capables de traverser la membrane de différents types cellulaires (Lindgren et al., 2000; Poillot and Waard, 2011). Ils sont principalement utilisés pour augmenter la pénétration de macromolécules à l'intérieur du cytoplasme, du noyau cellulaire, ou à travers la BHE (Lindgren et al., 2000).

Les CPPs peuvent être classés en trois grandes familles selon leur origine : les peptides dérivés de protéines, les peptides chimériques qui sont formés par fusion de séquences naturelles et les peptides synthétiques (Lindgren et al., 2000; Bechara and Sagan, 2013). Ils peuvent être aussi classés selon leurs propriétés physicochimiques : les peptides cationiques, amphipathiques ou hydrophobes (Bechara and Sagan, 2013; Kristensen et al., 2016). Les peptides cationiques sont les CPPs avec un fort taux de charges positives, et on retrouve parmi eux des CPPs spéciaux qui sont internalisés dans les noyaux des cellules : les NLSs (pour « Nuclear Localization sequences ») (Guo et al., 2016). Les peptides amphipathiques sont des peptides chimériques avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe alors que les peptides hydrophobes, qui sont peu nombreux (moins de 15% de tous les CPPs) contiennent seulement des résidus apolaires (Guo et al., 2016).

La capacité des protéines à traverser les membranes fut découverte pour la première fois en 1988 par Frankel et Pabo, qui étudiaient la protéine Tat (Frankel and Pabo, 1988). Cette protéine est un facteur d'activation de la transcription qui permet la réplication du virus VIH. Elle est composée de 86 à 102 acides aminés en fonction de la souche du virus et est sécrétée puis internalisée par les cellules (Lindgren et al., 2000; Poillot and Waard, 2011).

En 1991, Joliot et al. ont montré que l'homéodomaine (facteur de transcription qui lie l'ADN par une structure de 60 acides aminés) d'*Antennapedia*, est capable d'entrer dans les noyaux des cellules neurales (Joliot et al., 1991; Poillot and Waard, 2011). L'étude du mécanisme d'internalisation a montré que la troisième hélice (de l'acide aminé 43 à 58) est nécessaire et suffisante pour entrer dans les cellules (Lindgren et al., 2000). La capacité d'internalisation d'une protéine est donc due à une séquence minimale au sein d'une protéine (PTD pour « Protein transduction domain ») (Poillot and Waard, 2011). Cette découverte a entraîné le développement du premier CPP : la pénétratine (ou *Antp*). En 1998, la même approche a été réalisée par Vives et al. pour déterminer la séquence minimale de la protéine Tat qui permet l'internalisation dans les cellules. Ainsi, fut découvert le peptide Tat (Poillot and Waard, 2011). Il existe actuellement plus de 10 peptides Tat dérivés de cette protéine qui ont tous la capacité de

transporter des cargos dans le cytoplasme ou le noyau cellulaire (Lindgren et al., 2000). D'autres CPPs ont ensuite été développés, certains d'entre eux sont détaillés dans le **Tableau 3.1**.

Tableau 3.1 : Exemple de peptides pénétrants. (modifié d'après Guidotti et al., 2017)

Nom du CPP	Séquence	origine		Classification
TAT (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	Naturel	Protéine TAT du virus VIH	Cationique
Penetratine (Antp)	RQIKIWFQNRRMKWKK	Naturel	Antennapedia	
Poly-Arginines	R(n)	Synthétique	Synthèse chimique	
DPV1047	VKRGLKLRHVRPRVTRMDV	Synthétique	Synthèse chimique	
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	chimérique	Fusion d'un NLS avec une séquence hydrophobe	Amphipathique
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	chimérique	Fusion d'un NLS avec une séquence hydrophobe	
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	chimérique	Cadherine endothéliale vasculaire	
MAP	KLALKLALKALKAALKLA	Synthétique	Synthèse chimique	
transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	chimérique	Fusion du peptide Galanine et mastoparane	
C105Y	CSIPPEVKFNKPFVYLI	Synthétique	Antitrypsine $\alpha 1$	
PFVYLI	PFVYLI	Synthétique	Dérivé du peptide synthétique C105Y	
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	Synthétique	Clone de phage	

3.2. Mécanismes d'internalisation des CPPs

Le mécanisme d'internalisation dépend de la nature du CPP, de sa taille, du nombre et de la densité de ses charges et résidus, de sa concentration, du cargo attaché (nature et taille) et du type cellulaire (Lindgren et al., 2000; Poillot and Waard, 2011; Bechara and Sagan, 2013). De plus, la formulation entre le cargo et le CPP (liaisons covalentes ou physiques) et la conjugaison de traceurs influencent aussi le mode d'internalisation dans les cellules (Kristensen et al., 2016).

3.2.1. Les méthodes de détection

Il existe différentes techniques cellulaires et moléculaires pour étudier l'entrée des CPPs et du cargo associé à l'intérieur des cellules. Les méthodes indirectes sont basées sur le couplage d'un CPP à diverses molécules comme des molécules fluorescentes (exemple : la fluorescéine), des métaux, des isotopes radioactifs ou à la biotine qui permettent de visualiser le peptide à l'intérieur de la cellule « directement » (la molécule couplée au CPP est visualisée et non pas le CPP) ou après couplage avec la Streptavidine après extinction de la fluorescence membranaire (Bechara and Sagan, 2013; Kristensen et al., 2016). La microscopie confocale permet de déterminer la localisation intracellulaire du complexe CPP-molécule. Cependant, ce couplage ne permet pas de savoir si le CPP est toujours attaché à la molécule fluorescente et peut donc induire des faux positifs. De plus, alors que le couplage à des métaux

ou des isotopes radioactifs ne semble pas (ou peu) modifier l'internalisation des CPPs, le couplage à une molécule fluorescente peut changer ses propriétés physico-chimiques (structure secondaire ; charge nette; etc.) ce qui peut influencer l'internalisation et entraîner une toxicité (Bechara and Sagan, 2013; Kristensen et al., 2016). Afin de confirmer l'efficacité d'internalisation, il est possible de regarder l'effet du cargo actif sur la cellule (Bechara and Sagan, 2013). Si le CPP est utilisé pour amener une nanoparticule, il est possible de suivre cette dernière lorsqu'une molécule fluorescente est encapsulée, comme les carbocyanines lipidiques. Cependant, la fluorescence émise n'indique pas nécessairement l'état de la nanoparticule. De plus, les molécules fluorescentes seules (comme le DiD) peuvent aussi être internalisées par les cellules (Carradori et al., 2016).

L'utilisation de la technique MALDI-TOF SM (pour « Matrix Assisted Laser Desorption time-of-flight mass spectrometry ») a été développée pour détecter quantitativement la proportion de peptide à l'intérieur de la cellule ou accroché à la membrane, et la dégradation du peptide. Cette technique ne permet pas de détecter la localisation intracellulaire du peptide (Bechara and Sagan, 2013).

3.2.2. Importance des propriétés physico-chimiques du CPP

La première étape d'entrée cellulaire des peptides basiques est réalisée grâce aux interactions électrostatiques entre les charges positives du CPP (apportées principalement par les lysines et les arginines) et les charges négatives de la membrane cellulaire (représentées par les glycosaminoglycanes (GAG), les protéoglycanes, les acides sialiques et les phospholipides) (Bechara and Sagan, 2013; Kristensen et al., 2016). Les charges sont essentielles mais les différents groupes présents sur les acides aminés sont aussi cruciaux pour améliorer l'entrée dans la cellule. Par exemple, le groupe guanidine de l'arginine forme une double liaison hydrogène avec les charges négatives de la membrane contrairement au cation ammonium de la lysine qui forme une simple liaison hydrogène (Bechara and Sagan, 2013; Kristensen et al., 2016). Cette double liaison semble être essentielle pour l'entrée dans les cellules (Kristensen et al., 2016). En effet, augmenter le nombre d'arginine améliore la capacité d'internalisation alors qu'augmenter le nombre de lysine réduit cette capacité (Guo et al., 2016). La présence et la position de résidus hydrophobes (comme le tryptophane) dans la séquence en acides aminés du CPP est importante pour interagir et s'insérer dans la membrane cellulaire (Kristensen et al., 2016).

La structure tridimensionnelle de chaque CPP en hélice α ou en feuillet β est aussi un critère important pour l'entrée cellulaire, bien que tous les peptides n'adoptent pas la même conformation. Par exemple, dans le cas de la pénétatine, la conformation en hélice α n'est pas nécessaire pour son internalisation (Lindgren et al., 2000).

L'internalisation des CPPs est réalisée par deux grands mécanismes : la voie indépendante de l'énergie et de la température (la translocation directe), ou les voies dépendantes de l'énergie et de la température

(les voies d'endocytoses). Il existe différents modèles de translocations directes : le modèle du "tapis" (ou Carpet en anglais) et celui de "baril" (ou Barrel-Stave en anglais) qui forment des pores transitoires, ou alors la fusion de membrane et le modèle d'électroporation. L'endocytose regroupe la phagocytose pour les grosses molécules et la pinocytose. Cette dernière englobe la macropinocytose, l'endocytose dépendante des clathrines, l'endocytose dépendante des cavéolines et l'endocytose indépendante des clathrines et des cavéolines qui se différencient par le mécanisme de formation et la taille des vésicules. La translocation directe permet un accès plus facile et rapide au cytoplasme que l'utilisation de l'endocytose (Poillot and Waard, 2011; Kristensen et al., 2016), mais en général il y a une balance entre les deux voies d'internalisation (Bechara and Sagan, 2013).

La plupart de ces modèles d'internalisation sont schématisés dans la **Figure 3.1**.

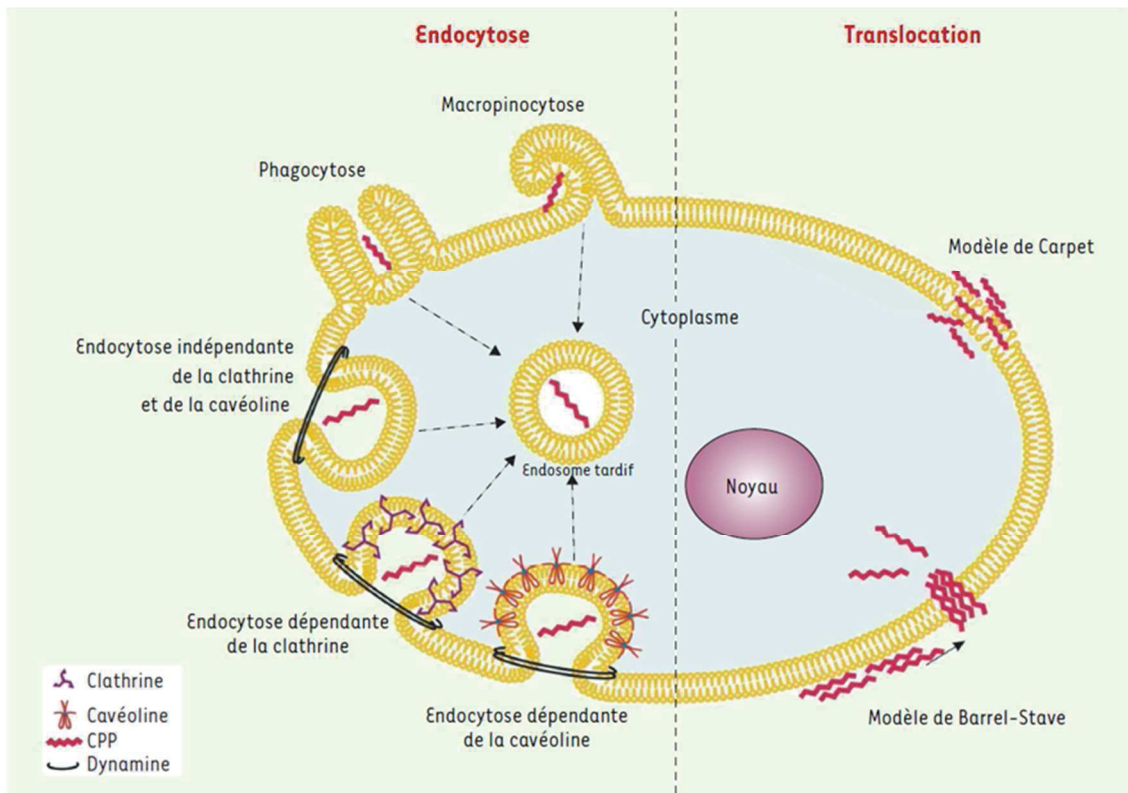


Figure 3.1 : Les différents mécanismes d'entrée dans une cellule.
Représentation schématique des deux grands modes de pénétration dans les cellules :
l'endocytose et la translocation directe.
(D'après Poillot and Waard, 2011).

3.2.3. La translocation directe

La translocation directe est le premier mécanisme d'entrée pour expliquer l'internalisation des CPPs (première fois décrite pour la pénétратine). C'est un mécanisme qui déstabilise la membrane plasmique et qui est indépendant de l'énergie et de la température.

Le premier modèle de translocation directe pour expliquer l'entrée de la pénétatine est le modèle de formation de micelles inverses. Les charges positives du CPPs interagissent avec les charges négatives de la membrane cellulaire puis les résidus hydrophobes interagissent avec le centre de la membrane ce qui provoque une invagination de cette membrane. Les lipides membranaires voisins se réorganisent pour former une micelle inverse où le peptide est emprisonné. Le peptide est libéré dans le cytoplasme après destruction de la membrane (Bechara and Sagan, 2013).

La formation d'un pore transitoire ressemblant à un "baril" (comme le modèle de « Barrel-stave » (Yang et al., 2001)) peut aussi expliquer l'internalisation passive des CPPs à l'intérieur des cellules. L'interaction entre les différentes charges induit une accumulation du peptide à la surface membranaire entre le phosphate et le carbone des lipides. L'amincissement de la membrane associé à l'attraction entre les chaînes latérales de l'arginine et la lysine (sur le CPP) et la couche distale de la membrane provoque la formation d'un pore transitoire où les CPPs diffusent entraînant avec eux les phospholipides membranaires (Bechara and Sagan, 2013).

Le modèle de « tapis » (carpet) est expliqué par une déstabilisation transitoire de la membrane cellulaire due à l'accumulation du peptide sur la membrane provoquant une réorganisation des phospholipides membranaires (Trabulo et al., 2010; Ruczynski et al., 2014).

Le modèle d'électroporation est expliqué par le fait qu'à une concentration élevée en CPPs, la distribution des charges entre l'espace extracellulaire et intracellulaire est perturbée, ce qui entraîne une tension électrique transmembranaire et donc une perméabilisation de la membrane (Bechara and Sagan, 2013).

Ces différents modèles sont schématisés dans la **Figure 3.2**.

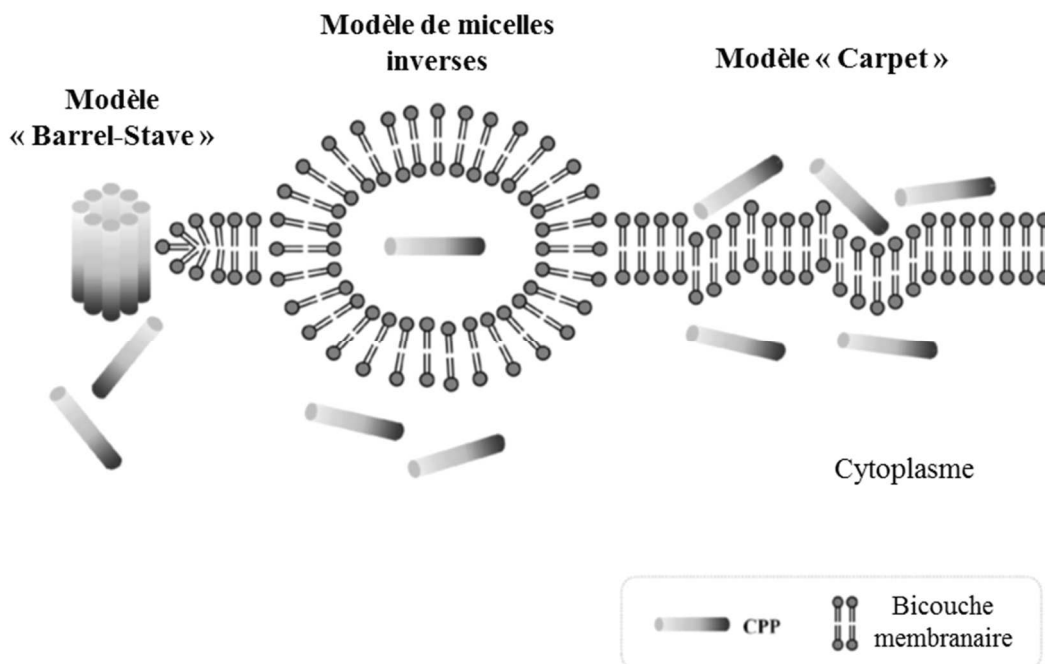


Figure 3.2: Exemples de modèles pour la translocation directe des CPPs.
(Modifiée d'après Ruczynski et al., 2014)

La translocation directe peut être étudiée indirectement grâce à des modèles, notamment en supprimant l'ATP du milieu (ce qui élimine toutes les endocytoses nécessitant de l'énergie) ou en réduisant la température à 4°C. Cependant, la réduction de la température affecte aussi le dynamisme et la fluidité membranaire (Bechara and Sagan, 2013).

3.2.4. L'endocytose

L'endocytose est réalisée en deux étapes : l'internalisation via l'endosome et la libération du CPP dans le cytoplasme en échappant (ou non) à la dégradation. Mais le mécanisme de cette dernière étape reste peu connu. Les CPPs cycliques semblent échapper plus facilement à la dégradation grâce à la déstabilisation des membranes (Kristensen et al., 2016).

L'endocytose des CPPs peut être réalisée quand le CPP lie un GAG à la surface membranaire. Ce dernier est naturellement recyclé et donc internalisé à l'intérieur de la cellule. Le CPP peut aussi, via l'interaction avec GAG, déclencher des signaux intracellulaires et un remodelage de l'actine pour être internalisé (Bechara and Sagan, 2013).

La macropinocytose se différencie des autres voies par la taille des vésicules formées (de l'ordre du μm vs nm pour les autres voies), par l'hétérogénéité morphologique et par l'absence de structure. Ce mécanisme ressemble à la phagocytose réalisée par les macrophages, en particulier la formation de couronnes circulaires englobant un large volume de milieu externe. Il engendre une réorganisation importante de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine et est contrôlé par des protéines comme Rab5 et Rab35 (Jones, 2007).

L'endocytose dépendante des clathrines fait intervenir des interactions entre des protéines intracellulaires, des protéines adaptatrices et la membrane plasmique. Ce modèle est bien décrit car il correspond à la voie utilisée pour le recyclage des vésicules après libération des neurotransmetteurs dans les neurones ainsi que pour le recyclage des récepteurs membranaires activés par leurs ligands (exemple : récepteurs aux protéines G). Elle est caractérisée par 3 étapes : (1) l'assemblage des clathrines en un maillage polygonal et la formation d'une « fosse recouverte », (2) l'invagination de cette fosse et (3) le pincement de la vésicule. Cette endocytose est réalisée sur des sites spécialisés au niveau de la membrane (0,5-2% de la surface cellulaire), où se regroupent des molécules telles que les clathrines, l'AP-2 (pour « Adaptator protein 2 »), les épsines, les dynamines ou encore les synaptotagmines afin de créer une vésicule. Chaque protéine a un rôle spécifique dans l'assemblage, l'invagination ou le pincement. La vésicule est donc constituée de 3 couches : 1- la couche interne des membranes lipidiques avec des protéines d'inclusions, puis 2- les protéines adaptatrices qui vont se lier à la membrane et reconnaître les cibles pour l'endocytose, et enfin 3- la couche externe qui est constituée de clathrines. Il est indispensable d'éliminer le manteau de clathrines pour délivrer le cargo à sa cible, puis la vésicule est dégradée via le lysosome ou recyclée à la membrane pour certains récepteurs. (Mousavi et al., 2004; Popova et al., 2013)

Le mécanisme dépendant des cavéolines est dépendant du cholestérol et des sphingolipides membranaires et fait intervenir des partenaires comme la cavéoline, la filamine ou encore la dynamine bien que cette dernière semble être un phénomène transitoire (Nabi and Le, 2003; Kiss and Botos, 2009). Les cavéoles sont des structures membranaires immobiles, et la liaison de certains ligands entraîne son internalisation par le déclenchement des voies de signalisation en aval. Cette endocytose serait un mécanisme qui se déroulerait parallèlement à l'endocytose dépendant des clathrines (Kiss and Botos, 2009) et pourrait se produire indépendamment de l'expression de la cavéoline puisque cette dernière serait plus impliquée dans la stabilité de la cavéole plutôt que dans son internalisation (Nabi and Le, 2003). Le mécanisme d'endocytose dépendant des cavéolines est régulé par des phosphatases, des kinases ou encore les intégrines. De plus, le cytosquelette est impliqué dans l'invagination et le transport intracellulaire des vésicules. Ainsi, le réseau d'actine confine les cavéoles à la membrane et un désassemblage de ce réseau est essentiel pour initier le transport de la vésicule le long du réseau de microtubules. Le cargo internalisé joue un rôle important dans le devenir de la cavéole, entre la libération et la dégradation par les endosomes (Nabi and Le, 2003; Kiss and Botos, 2009).

Il existe plusieurs endocytoses indépendantes des clathrines et des cavéolines, qui peuvent faire intervenir la dynamine et le cholestérol. Elles font intervenir le réseau d'actine pour l'invagination. Comme pour les autres endocytoses, la destination des vésicules dépend du type d'internalisation, du cargo et du type cellulaire (Mayor et al., 2014).

Les différentes voies d'endocytoses sont schématisées dans la **Figure 3.3**.

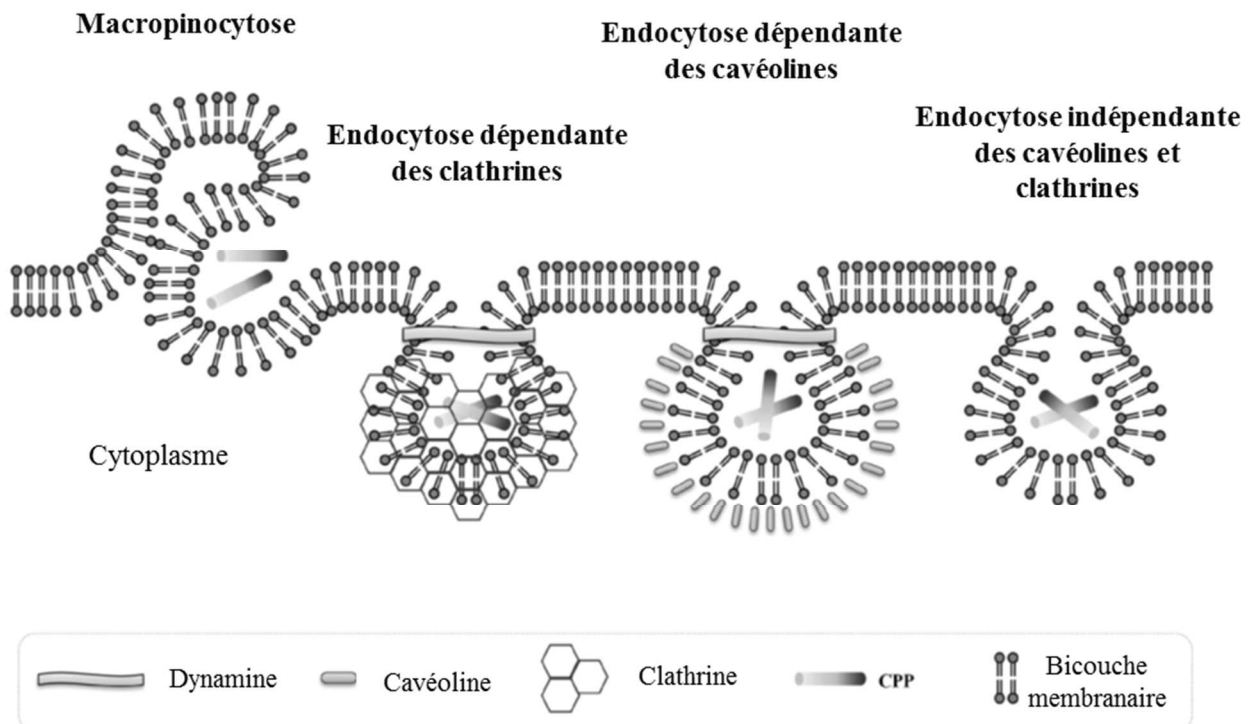


Figure 3.3 : Schématisation des différentes voies d'endocytoses.
(modifiée d'après Ruczynski et al., 2014)

Les différentes voies d'endocytoses peuvent être analysées grâce à des inhibiteurs spécifiques de chaque voie: la cytochalasin A et la Wortmannin inhibent la macropinocytose (Jones, 2007), le milieu hyperosmolaire ou la dynamine inhibent l'endocytose dépendante des clathrines et la nystatine, le méthyl- β -cyclodextrine ou filipiline III inhibent l'endocytose dépendante des cavéolines (Nabi and Le, 2003; Kiss and Botos, 2009; Bechara and Sagan, 2013). Il est aussi possible d'utiliser des marqueurs spécifiques de chaque voie d'endocytose pour étudier une co-localisation entre le CPPs et la dite voie. Par exemple, l'immuno-marquage des clathrines, de la dynamine et de la transferrine permettent de visualiser le voie d'endocytose des clathrines (Benmerah and Lamaze, 2002; Rappoport and Simon, 2003) alors que l'immuno-marquage des cavéolines, et l'utilisation d'albumine ou de la toxine cholérique B marquée permet d'étudier la voie dépendante des cavéolines (Singh et al., 2003). La macropinocytose est visualisée grâce au Dextran (Benmerah and Lamaze, 2002; Wang et al., 2014).

3.3. Applications des CPPs

L'intérêt des CPPs est d'amener des molécules à travers les barrières cellulaires, épithéliales ou endothéliales, puisque seules ces molécules n'en sont pas capables. En effet, 98% des petites et 100% des grosses molécules ne passent pas la BHE (De Jong and Borm, 2008; Zou et al., 2013).

Les CPPs sont capables d'augmenter l'internalisation de peptides, de protéines, d'acides nucléiques (oligonucléotides, ADN, ARN, siRNA), de fluorochromes, de liposomes et de nanoparticules (Poillot and Waard, 2011; Bechara and Sagan, 2013; Kristensen et al., 2016), ou encore des nanotubes de silicium qui permet de créer des événements électro-physiologiques (comme un potentiel d'action) à l'intérieur d'une cellule (Lee et al., 2016) (**Figure 3.4**).

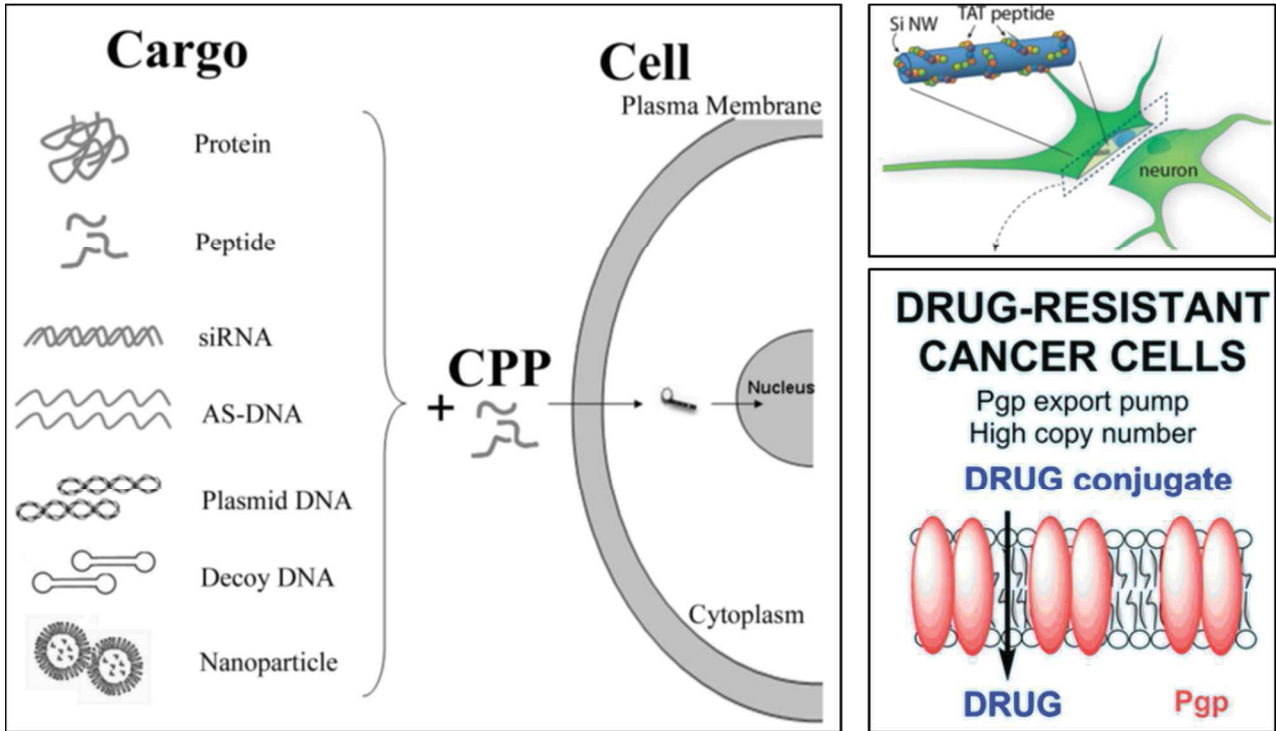


Figure 3.4 : Présentation des différentes applications de CPPs.

Les CPPs sont utilisés pour amener diverses molécules à l'intérieur du cytoplasme ou des noyaux des cellules, des nanotubes de silicium ou encore pour contrer la résistance à des traitements spécifiques. (D'après Zou et al., 2013; Lee et al., 2016 et Vargas et al., 2014)

De plus, les CPPs sont de plus en plus utilisés pour contrer les phénomènes de résistance des cellules cancéreuses à certains traitements. En effet, la résistance peut être la conséquence d'une surexpression par les cellules de pompes d'efflux engendrant un rejet de la drogue au niveau de leur membrane. La conjugaison de la drogue à un CPP permet d'internaliser la drogue à travers la membrane sans que les pompes ne reconnaissent la drogue. Cette stratégie a déjà été utilisée pour augmenter la pénétration du Paclitaxel couplé au CPP R8 dans des cellules tumorales résistantes (Vargas et al., 2014).

D'autres CPPs peuvent avoir une double action : une action de pénétration dans les cellules ainsi qu'une action directe sur la cellule (effets de neuroprotection ou induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses), et ainsi ces CPPs sont nommés CPPs actifs. Par exemple, les CPPs TAT, Pénétratine et R9 ont un rôle de neuroprotection dans des modèles ischémiques et excitotoxiques (Meloni et al., 2014, 2015).

Les applications de plusieurs CPPs sont résumées dans le **Tableau 3.2**.

Tableau 3.2 : Applications possibles des CPPs.

Applications of Representative CPPs in Proteins Delivery					
CPPs	Sequences	Cargo	Target	Summary	
TAT	YGRKKRRQRRR	β -Gal/GDNF/ JNK1/PSD-95	Brain	β -Gal fused to TAT resulting in strong β -Gal enzyme activity in mice brain; TAT-JNK1 administration 3 hours after brain ischemia significantly reduced the infarct volume; TAT-PSD-95 protected cultured neurons from excitotoxicity, and reduced focal ischemic brain damage; TAT-GDNF protected brain neurons from cell death when administered after focal cerebral ischemia	
TAT-HA	YGRKKRRQRRR-YPYDVPDVA	Bcl-xL	Brain	Administration of TAT-HA-Bcl-xL into mice decreased cerebral infarction in a dose-dependent manner, as determined at 3 d after 90 min of focal ischemia	
RDP	KSVRTWNEIIPSKCLRVGGRCHPHVNGGRR RRRRRRR	BDNF/ β -Gal/Luc	Brain	RDP-BDNF showed the neuro-protective properties in mouse experimental stroke including reduction of stroke volume and neural deficit; The brain slices with X-Gal staining were determined the delivery of RDP- β -Gal across the BBB; The time-course relationship of RDP-Luc was studied to confirm the transport efficiency of RDP	
FGF4	AAVLLPVLAAAP	SOCS3	Brain	FGF4-SOCS3 protected mice from lethal effects of staphylococcal enterotoxin B and lipopolysaccharide by reducing production of inflammatory cytokines and hemorrhagic necrosis brain	
Applications of Representative CPPs in Nucleic Acids Delivery					
TAT-10H	5H-YGRKKRRQRRR-5H	Plasmid DNA	Brain	5H-TAT-5H/DNA complexes improve up to 7000-fold in BBB across efficiency over the original Tat peptide	
RVG-9R	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRSNG-9R	GAPDH/BACE1 siRNA	Brain	RVG-9R delivered GAPDH/BACE1 siRNA to neurons, microglia, oligodendrocytes in the brain, resulting in a specific gene knockdown	
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	APP antisense oligonucleotides	Brain	Penetratin-APP antisense oligonucleotides reduced APP expression and embryonic neural stem cell proliferation in the subventricular zone of the CNS	
Applications of Representative CPPs in Small-Molecule Drugs Delivery					
SynB3	RRLYSRRRF	Morphine-	Brain	Enhanced the brain uptake of morphine-glucuronide in situ brain perfusion	
SynB1/SynB3	RGRLYSRRRFSTSTGR/RLLSYRRRF	Dalargin/Paclitaxel	Brain	Enhanced dalargin in brain uptake, resulting in a significant improvement of anti-nociceptive effect	
SynB1/SynB5	RGRLYSRRRFSTSTGR/RGRLAYLRRWA VLGR	Doxorubicin	Brain	Significantly increase the uptake of doxorubicin into the brain	
SynB1/D-Penetratin	RGRLYSRRRFSTSTGR/RQIKIWFQNRRMKW KK	Doxorubicin	Brain	20-fold increase of doxorubicin in brain parenchyma by using a capillary depletion method	
Angiopep-2	PFYGGSGGNRRNYLREEY	Paclitaxel	Brain	Angiopep-2-paclitaxel showed activity in heavily pretreated patients with brain metastases and/or failed prior taxane therapy	
Angiopep-5	RFFYGGSRGKRNNFRTEEY	Doxorubicin	Brain	Angiopep-5-doxorubicin exhibited dramatically higher BBB influx rate constants than doxorubicin and pooled within brain parenchymal tissue	
Applications of Representative CPPs in Nanoparticles Delivery					
TAT	YGRKKRRQRRR	Qdots	Brain	TAT-Qdot was loading sufficiently high in brain that a gross fluorescent can be visualized using a low power UV lamp	
TAT-Liposome	YGRKKRRQRRR- Liposome	Coumarin-6	Brain	TAT-LIP was a promising brain drug delivery system due to its high delivery efficiency across the BBB	
TAT-cholesterol	YGRKKRRQRRR -cholesterol	G(3)R(6)	Brain	FITC-loaded cholesterol-conjugated G(3)R(6)-TAT can cross BBB, and is a promising antimicrobial agent for treatment of brain infections caused by C. neoformans	
TAT-PEG-cholesterol	YGRKKRRQRRR-PEG -cholesterol	Ciprofloxacin	Brain	TAT-PEG-cholesterol were effective for delivery of ciprofloxacin across the BBB	
RVG-BPEI-SS (RXRRBR)2XB	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRSNG- BPEI-SS RXRRBRXRBRXB	cys5,5-miR-124a AMO	Brain	The RVG combined with BPEI-SS for neurons-specific targeting in vivo is sufficient to deliver neurogenic microRNA (e.g. cys5,5-miR-124a) into the brain	
Angiopep-2-PEG	PFYGGSGGNRRNYLREEY-PEG	Paclitaxel - Alexa488	Brain	Systemic administration of (RXRRBR)2XB-AMO in mice showed efficient uptake in the brain, which can dramatically improve ATM splicing correction efficiency	
Angiopep-2-O-MWNTs- PEG	PFYGGSGGNRRNYLREEY-O-MWNTs-PEG	Doxorubicin	Brain	Fluorescence microscopy revealed that Angiopep-2 modified PEG nanoparticle deliver Alexa488 labeled paclitaxel across BBB, and localized in brain endothelial cell monolayers Fluorescence imaging demonstrated that Angiopep-2-O-MWNTs-PEG constituted an ideal dual-targeting drug delivery system to deliver doxorubicin for the treatment of brain tumor	

3.3.1. Les CPPs pour l'imagerie

Ils permettent la délivrance d'agents d'imagerie, de contraste, ou encore des quantum dots pour quantifier des biomarqueurs, évaluer la progression d'une maladie ou mesurer l'effet d'un traitement (Guo et al., 2016). Par exemple, la détection d'une tumeur par IRM ou directement pendant une chirurgie permet de détecter et retirer une quantité plus importante de cellules tumorales (Poillot and Waard, 2011).

3.3.2. Les CPPs pour la délivrance de protéines

Les peptides Tat et poly-arginine sont capables d'améliorer l'absorption à travers l'épithélium intestinal des protéines comme l'insuline, la gastrine, ou l'interferon β (Kristensen et al., 2016). Cette capacité n'est pas accessible à tous les CPPs.

Après injection intrapéritonéale, le peptide Tat fusionné à la protéine apoptotique Bcl-xl ou couplé à une partie du récepteur NMDA et au GDNF est retrouvé dans différentes zones du cerveau et prévient l'ischémie (Zou et al., 2013; Kristensen et al., 2016). Ce même effet a été montré avec d'autres protéines liées à TAT (Zou et al., 2013). Certains CPPs permettent donc de traverser la BHE et d'apporter des molécules à l'intérieur du cerveau.

De plus, les CPPs sont utilisés pour délivrer des agents anti-tumoraux. Par exemple, le CPP Tat a été couplé à la protéine P53 ou P15 pour ré-induire l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* (Kristensen et al., 2016). La Doxorubicine a aussi été couplée à différents CPPs pour augmenter son passage à travers la BHE (Zou et al., 2013) et son entrée dans des cellules tumorales, ce qui a permis une réduction de la taille de la tumeur cérébrale (Guo et al., 2016). Le peptide Tat⁴⁸⁻⁶⁰ couplé au peptide P10 (peptide pro-apoptotique) cible les noyaux des cellules U251 (mais pas les noyaux des cellules T98G) et permet une réduction de la viabilité de ces cellules (Baker et al., 2007).

Les CPPs ont aussi été utilisés pour créer des cellules souches pluripotentes induites par un mécanisme plus sécuritaire et efficace que les méthodes classiques (Jo et al., 2014). Le CPP R9 (composé de 9 Arginines) a été conjugué aux protéines de reprogrammation cellulaire C-Myc, Sox2, Oct4 et Klf4, ce qui a permis l'entrée dans les fibroblastes humains nouveaux nés qui se sont différenciés en cellules souches pluripotentes (Kristensen et al., 2016).

Enfin, les CPPs ont montré un rôle dans l'apport de molécules anti-inflammatoires dans un modèle de souris de dystrophie musculaire de Duchenne, où l'association du CPP *Antp* avec la protéine NBD (molécule qui bloque la réaction inflammatoire) permet une réduction de l'inflammation (Guo et al., 2016).

3.3.3. Les CPPs pour la délivrance d'acides nucléiques

In vitro, il a été montré que des siRNA couplés à la pénétratine entrent dans les neurones de l'hippocampe et répriment l'expression de SOD1 (« Superoxyde Dismutase 1 ») et de la caspase-3 (Poillot and Waard, 2011). L'équipe de *Youn et al* en 2014 a démontré que la formation du complexe composé d'acide myristique, du CPP Transportant et du peptide ciblant le récepteur de la transferrine permet d'encapsuler et de protéger efficacement un siRNA ainsi que de le délivrer à des cellules neurales via le passage de la BHE (Youn et al., 2014).

Les acides nucléiques peptidiques (PNA en anglais pour « Peptide nucleic acids ») ont montré un effet dans l'inhibition d'expression de gènes d'*Escherichia Coli* et jouent ainsi un rôle anti-inflammatoire. La liaison de ces PNAs avec des CPPs a montré un effet antibiotique important *in vivo* en augmentant la pénétration de ces acides nucléiques (Guo et al., 2016). La pénétratine couplée à un oligonucléotide antisense APP a permis l'entrée de ce dernier dans des CSNs embryonnaires et de réduire leur prolifération et le niveau d'expression d'APP (Caillé et al., 2004; Lou et al., 2013).

3.3.4. Les CPPs pour la délivrance de nanoparticules

Grâce à leur grand potentiel physicochimique et leur petite taille, les nanocapsules sont très intéressantes pour des applications thérapeutiques et biomédicales, afin d'augmenter la délivrance et le ciblage de drogues spécifiques, tout en réduisant leur toxicité et en maintenant l'effet thérapeutique de la drogue (De Jong and Borm, 2008). Les CPPs ont la capacité de transférer des nanoparticules dans les cellules épithéliales, mais cette propriété dépend de la taille de la particule et reste très faible (Kamei et al., 2016). Les charges de surface de la nanoparticule, sa taille, ou les molécules absorbées à sa surface, influencent sa localisation intracellulaire et sa toxicité (De Jong and Borm, 2008; Lee and Tung, 2012). Enfin, les nanocapsules, par leurs charges, éviteraient le système endosomal de la cellules (De Jong and Borm, 2008; Zou et al., 2013).

Le CPP TAT couplé à des nanoparticules (formé par l'auto-association de PEG), ou à des liposomes, permet de traverser la BHE et d'emmener les nanoparticules à l'intérieur des noyaux de neurones (Zou et al., 2013). Les siRNAs, qui sont peu stables, peuvent être encapsulés dans les nanocapsules puis apportés dans les cellules grâce aux CPPs (Asai et al., 2014).

Actuellement, plusieurs stratégies de délivrance par les CPPs sont en cours d'essais cliniques pour des cancers, des maladies cardiovasculaires, la maladie de Duchenne ou encore les douleurs et les inflammations (Guidotti et al., 2017) (Tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Exemples de CPPs utilisés en clinique comme vecteurs.

Pharmaceutical organization	Compound	CPP-cargo	Therapeutic use	Status	ClinicalTrials.gov ID
Auris Medical	AM-111	TAT- \sim BD ₂₀ (D-JNK1-1)	Hearing loss	Phase II completed 2014	NCT00802425
CellGate, Inc.	PsorBan [®]	R7 -cyclosporin A	Psoriasis	Phase III recruiting 2015	NCT02561091 NCT02809118
Capstone Therapeutics	AZX100	PTD ₄ -HSP20 phosphopeptide	Scar prevention/ reduction	Phase IIb discontinued 2003	N/A
CDG Therapeutics, Inc.	p28	p28	Cancer	Phase IIa completed 2012	NCT00451256 NCT00892723 NCT00811577
KAI Pharmaceuticals	KAI-9803	TAT- δ PKC inhibitor	Myocardial infarction	Phase I completed 2014	NCT00914914
	KAI-1678	TAT- ϵ PKC inhibitor	Pain: postherpetic neuralgia, spinal cord injury, postoperative	Phase II completed 2011	NCT00785954
Revanche Therapeutics, Inc.	RT001	MTS-botulinum toxin A	Lateral canthal lines Crow's feet Facial wrinkles	Phase II completed 2011	NCT01106716 NCT01135108 NCT01015235
	RT002	TransMTS [®] -botulinum toxin A	Glabellar lines	Phase II completed 2013	NCT01064518 NCT00968942 NCT00968825 NCT00884234 NCT01124552 NCT01124565 NCT00907387 NCT00888914 NCT01940991
Sarepta Therapeutics	AM-4658	N/A	Cervical dystonia	Phase I/II completed 2016	NCT02303002
	AM-5126	(R-Ahx-R) ₄ -PMO	Duchenne muscular dystrophy	Phase II recruiting	NCT02706795
Xigen SA	XG-102	TAT- \sim BD ₂₀ (D-JNK1-1)	Inflammation	Phase I/II completed 2010 and 2015	NCT00159250 NCT00844597
			Cardiovascular disease Coronary artery bypass	Phase III recruiting	NCT02255552
			Inflammation	Phase II discontinued 2009	NCT00451256
			Intraocular inflammation and pain	Phase I completed 2012	NCT01570205
				Phase III completed 2016	NCT02235272

Cependant, les CPPs sont sujets à dégradation, ce qui limite leur utilisation thérapeutique. De nouvelles stratégies sont actuellement en cours d'étude pour améliorer la biodisponibilité des CPPs (temps de demi-vie et stabilité). Par exemple, en changeant leur conformation stœchiométrique, mais cette technique peut influencer la propriété d'internalisation du CPP. Une autre technique est de modifier certains acides aminés dans une séquence spécifique du CPP pour réduire la reconnaissance des sites clivables par les protéases ou pour transformer les CPPs linéaires en CPPs cycliques qui sont moins vite dégradés (Kristensen et al., 2016).

De plus certains peptides présentent des risques d'immunogénicité s'ils ne sont pas dérivés de l'humain. Des équipes essayent de créer des CPPs hydrophobes (pour améliorer leur stabilité et leur disponibilité) dérivés de protéines humaines comme la protéine Annexine (Kim et al., 2015) qui sont donc biocompatibles.

La non-spécificité des CPPs pour un type cellulaire en particulier est un obstacle important pour leur utilisation en clinique. Par exemple, dans le domaine oncologique, certains CPPs rentrent aussi bien dans les cellules tumorales que dans les cellules saines (Poillot and Waard, 2011). Ainsi, des « CPPs activables » consistent en un CPP poly-cationique associé à un poly-anion neutralisant via un lien clivable. Ce lien n'est clivé qu'en présence de la métalloprotéinase2 surexprimée par des cellules cancéreuses. L'entrée dans les cellules est inhibée jusqu'à rupture du lien. Ce CPP activable devient donc plus spécifique pour les cellules cancéreuses *in vivo* (Olson et al., 2009; Bechara and Sagan, 2013). Certains peptides semblent aussi être spécifiques pour les cellules à fort taux de prolifération comme les cellules cancéreuses par rapport aux cellules post-mitotiques comme les cellules saines du système nerveux central. C'est le cas du peptide NFL-TBS.40-63 issu des neurofilaments, et qui a été utilisé dans cette thèse (Berges et al., 2012a; Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013).

3.4. Les peptides issus des filaments intermédiaires

3.4.1. Découverte des peptides “TBS“ (pour “Tubulin-Binding sites“)

Différents travaux menés au laboratoire ont montré que les neurofilaments présents dans les neurones sont capables de moduler la polymérisation des microtubules par la fixation de la tubuline libre. Ainsi, chez les souris transgéniques NFH-LacZ, la déficience en neurofilaments dans les axones des neurones provoque une augmentation du nombre de microtubules polymérisés au sein de ces axones. A l’opposé, dans le corps cellulaire de ces animaux transgéniques, l’agrégation des neurofilaments provoque la rétention de tubuline qui se fixe sur les neurofilaments et donc ne peut pas se polymériser en microtubules (Bocquet et al., 2009). Il a été montré *in vitro* que les trois sous-unités des neurofilaments, ainsi que d’autres filaments intermédiaires (Vimentine, Kératine, Desmine et GFAP), sont capables de lier la tubuline. La technique du « peptide array » a notamment permis de mettre en évidence des sites de liaison à la tubuline (nommé TBS pour « Tubulin Binding Site ») sur les différents filaments intermédiaires (Bocquet et al., 2009). La technique du peptide array est décrite dans le schéma ci-dessous (Figure 3.5).

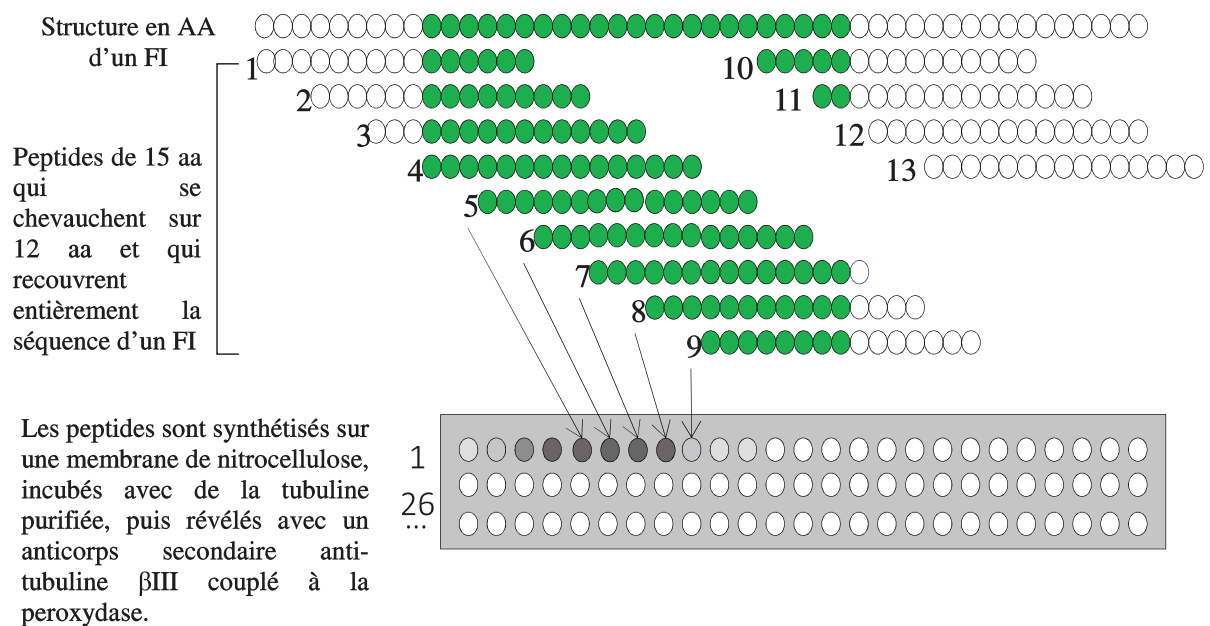


Figure 3.5 : Principe de la technique du peptide array.
AA: acide aminé; FI: Filament Intermédiaire.

Les différents peptides issus des filaments intermédiaires sont décrits dans le **Tableau 3.4**.

Tableau 3.4 : Nom des différents peptides issus des filaments intermédiaires.
(D'après Bocquet et al., 2009)

Nom du FI	Nom du peptide
Neurofilaments	NFL-TBS.4-27
	NFL-TBS.40-63
	NFM-TBS.13-51
	NFH-TBS.37-75
Desmine	Des-TBS.1-27
	Des-TBS.31-89
	Des-TBS.436-456
Vimentine	Vim-TBS.1-18
	Vim-TBS.58-81
	Vim-TBS.430-450
Kératine	Ker-TBS.1-54
	Ker-TBS.100-120
	Ker-TBS.453-482
GFAP	GFAP-TBS.1-24
	GFAP-TBS.19-54
	GFAP-TBS.394-414

Les différents peptides correspondant aux sites TBS ont ensuite été synthétisés et incubés avec de la tubuline libre. Ils ont montré la capacité d'inhiber la polymérisation des MTs *in vitro* alors qu'ils n'ont pas d'effet sur les MTs déjà formés (Figure 3.6). Ceci confirme l'hypothèse que les sites TBS agissent comme des réservoirs de dimères de tubulines libres (Bocquet et al., 2009).

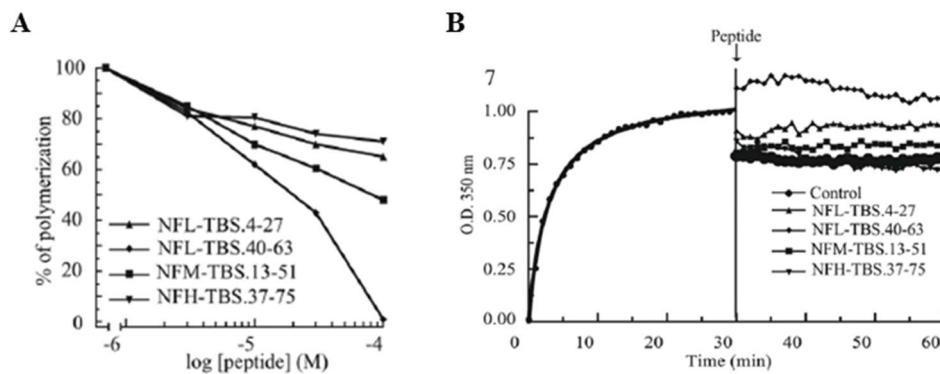


Figure 3.6 : Exemple des effets *in vitro* des peptides issus des neurofilaments.
(A) Exemple de l'inhibition de la polymérisation des microtubules des 4 peptides issus des neurofilaments. (B) Les peptides n'ont pas d'effet sur les microtubules déjà polymérisés.
(Modifiée d'après Bocquet et al., 2009)

3.4.2. Le peptide VIM-TBS.58-61

Le peptide VIM-TBS.58-61 correspond au site TBS localisé sur la protéine de filament intermédiaire Vimentine qui est exprimée principalement par les cellules mésenchymateuses, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Franke et al., 1978). Ce peptide est capable d'entrer massivement, par endocytose dépendante des cavéolines, dans les cellules de glioblastomes où il se localise dans le cytoplasme et le noyau cellulaire. Cependant, ce peptide n'a pas d'effet sur le réseau de microtubules des cellules de glioblastomes ni sur la prolifération ou la viabilité de ces cellules contrairement au peptide dérivé des neurofilaments (décrit ci-dessous) (Balzeau et al. 2012). Le peptide VIM présente une structure secondaire en hélice α (Saini, 2013).

La propriété de ciblage de ce peptide a été étudiée en le couplant au peptide P10. Le peptide P10 correspond à la région d'interaction entre les cycline et la protéine P21^{WAF1/CIP1} (Protéine qui bloque la réplication de l'ADN via l'inhibition des cyclines) (Warbrick et al., 1995; Baker et al., 2007). Le couplage du peptide VIM avec P10 permet d'améliorer l'entrée du peptide P10 dans les noyaux des cellules de glioblastomes T98G où il garde son activité pro-apoptotique ce qui permet de réduire la prolifération de ces cellules, contrairement au peptide Tat⁴⁸⁻⁶⁰ qui perd son activité de ciblage nucléaire lorsqu'il est couplé au peptide P10 puisqu'il est localisé dans le cytoplasme des cellules (Balzeau et al., 2012).

Ce peptide pourrait donc servir de vecteur pour apporter diverses molécules dans le noyau des cellules de glioblastome.

3.4.3. Le peptide NFL-TBS.40-63

3.4.3.1. Propriété anti-glioblastome du peptide NFL-TBS.40-63

Certains des peptides issus des filaments intermédiaires (le peptide NFL-TBS.40-63 et le peptide Ker-TBS.1-24) ont la capacité d'entrer sélectivement dans certaines cellules, d'y détruire le réseau de MT et d'inhiber la prolifération de ces cellules (cellules de glioblastomes et cellules du cancer du sein) (Bocquet et al., 2009; Berges et al., 2012a).

Ainsi, le peptide NFL-TBS.40-63 possède la capacité d'entrer dans différentes lignées de glioblastomes (humaine, souris et rat), en utilisant les trois voies d'endocytose, où il inhibe la capacité de migration et de prolifération de ces cellules et induit leur apoptose (Berges et al., 2012a) (**Figure 3.7**). La perturbation du réseau de microtubules affecte la distribution du réseau de mitochondries, ce qui entraîne une réduction de la respiration cellulaire des cellules de glioblastomes. De plus, le peptide provoque une réduction de l'expression de miRNAs qui sont impliqués dans la pathogénèse des glioblastomes et la résistance aux drogues (Rivalin et al., 2014).

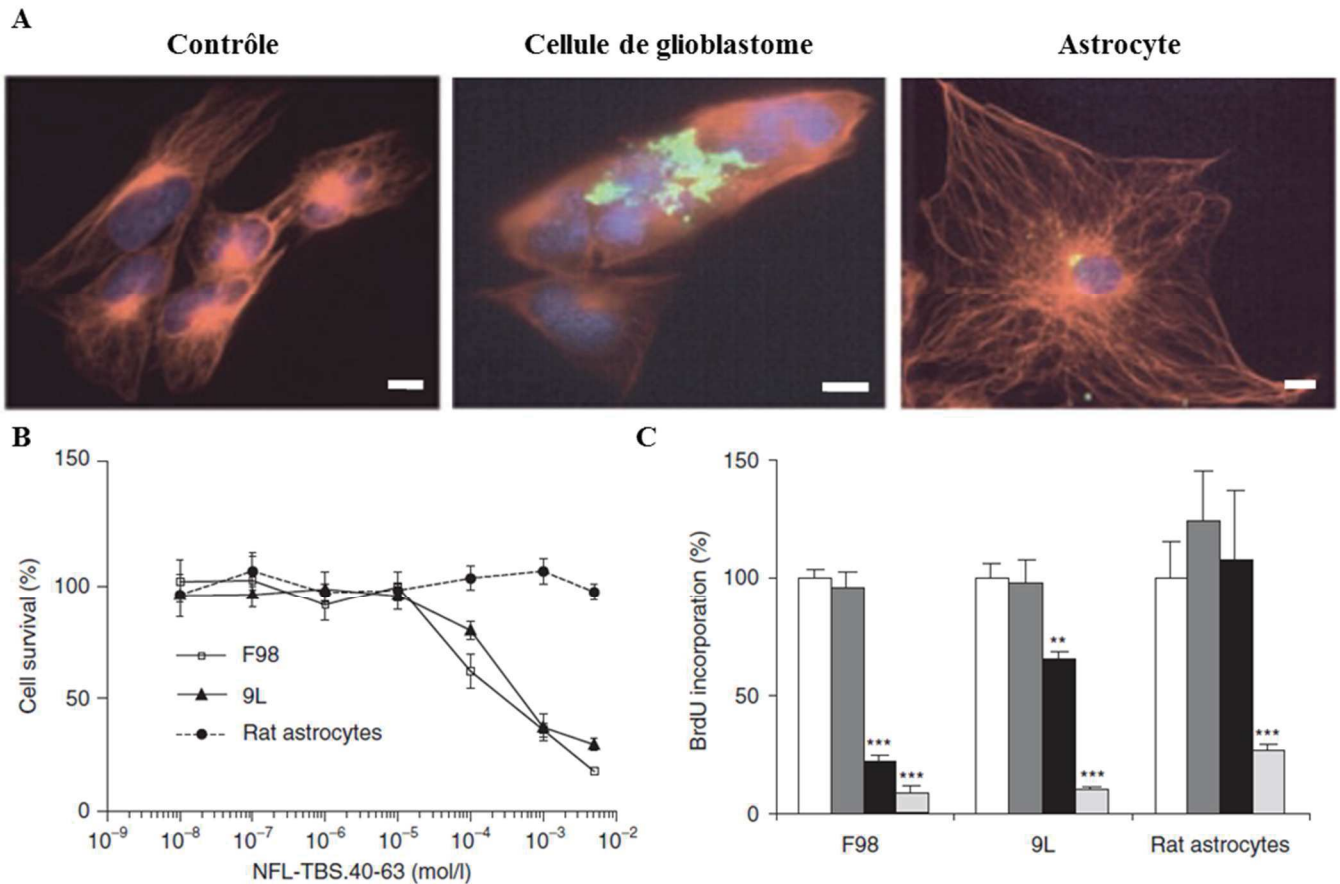


Figure 3.7 : Exemple des effets in vitro du peptide NFL-TBS.40-63.

(A) Destruction du réseau de microtubules des cellules de glioblastomes uniquement. (B) Le peptide réduit la viabilité des cellules de glioblastomes sans toucher celle des astrocytes et (C) réduit sélectivement la prolifération des cellules de glioblastomes.

(Modifiée d'après Berges et al., 2012a)

Par contre, ce peptide (NFL-TBS.40-63) n'est pas capable d'entrer dans les cellules saines du système nerveux central comme les neurones et les astrocytes (maximum 30% d'entrée) et n'affecte pas leurs réseaux de MT (Figure 3.7). Le peptide peut rentrer dans d'autres cellules saines comme les oligodendrocytes ou les CSNs ((Fressinaud and Eyer, 2015; Lépinoux-Chambaud et al., 2016). L'entrée du peptide est liée à l'activité hautement proliférative (lié à la surexpression du récepteur EGF) des cellules de glioblastomes, ce qui explique pourquoi il n'entre pas dans les cellules saines qui sont principalement des cellules post-mitotiques et donc qui ne se divisent pas ou peu (Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013).

Lorsque le peptide est injecté de manière locale dans un rat porteur de tumeur cérébrale, il reste localisé au sein de la tumeur et n'est pas retrouvé dans les tissus sains environnants (Figure 3.8-A). Ainsi, le peptide induit une réduction de la taille de la tumeur de 70% après 24 jours, comparé à des rats non traités (Figure 3.8-B et C). Cette réduction entraîne une augmentation de la survie des animaux traités (Berges et al., 2012a).

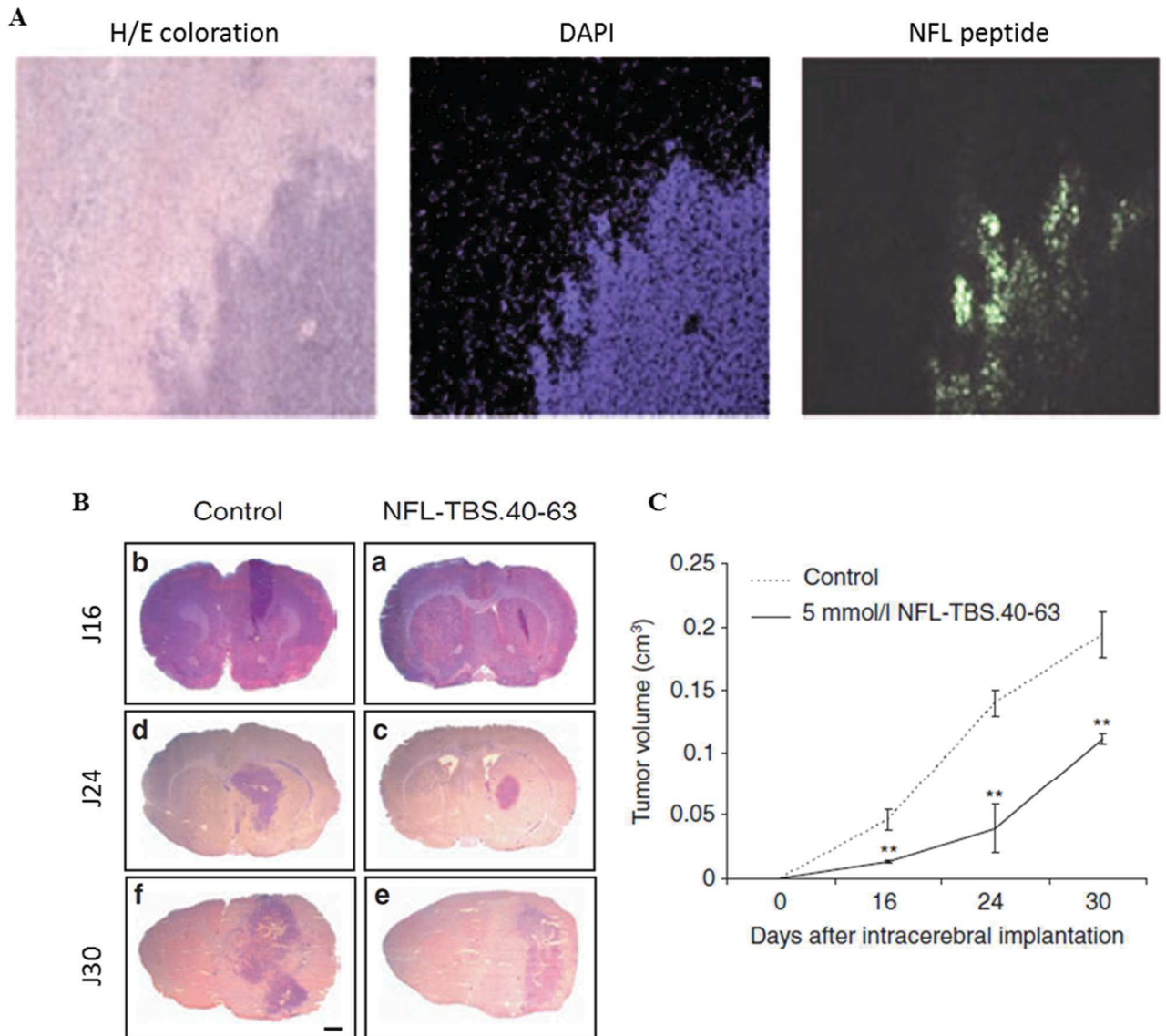


Figure 3.8 : Exemple des effets *in vivo* du peptide NFL-TBS.40-63.

(A) Localisation du peptide au niveau de la tumeur. La tumeur est visible par coloration Hématoxyline/ Eosine (H/E), par immunocytofluorescence, et avec le DAPI, tandis que le peptide marqué à la Biotine est visualisé avec la Streptavidine-Alexa488 (B-C). Le peptide réduit la taille de la tumeur (B) qui est mesurée après coloration H/E. (C) Quantification de la taille des tumeurs.

(D'après Berges et al., 2012a)

Les peptides « scramble » qui correspondent à des peptides ayant la même composition en acides aminés mais dans le désordre, perdent ces capacités d'internalisation et d'effets sur le réseau de MT (Bocquet et al., 2009; Berges et al., 2012b). De plus, l'utilisation de la technique « Alanine scanning » (qui consiste à remplacer un à un les acides aminés par une Alanine), a permis de montrer une réduction de l'entrée du peptide sauf pour les sérines en position 21 et 24. Cependant, les effets sur le réseau de microtubule sont perdus avec toutes les substitutions. Les mêmes résultats sont trouvés lorsque le peptide est phosphorylé sur les Sérines. Ces résultats prouvent que la séquence en acides aminés, et l'ordre de la séquence sont nécessaires pour l'entrée et l'efficacité du peptide. De plus, la structure

secondaire du peptide est aussi importante car en présence d'un milieu hydrophobe représentant la membrane, le peptide présente une hélice α et un feuillet β . Cette structure 3D est perdue lorsque les acides aminés sont modifiés (Berges et al., 2012b). L'ensemble de ces données montre une relation structure-fonction importante pour le peptide NFL-TBS.40-63 et son interaction avec la membrane plasmique et la tubuline dans les cellules de glioblastomes. Les structures potentielles du peptide NFL-TBS.40-63 sont illustrées dans la **Figure 3.9**.

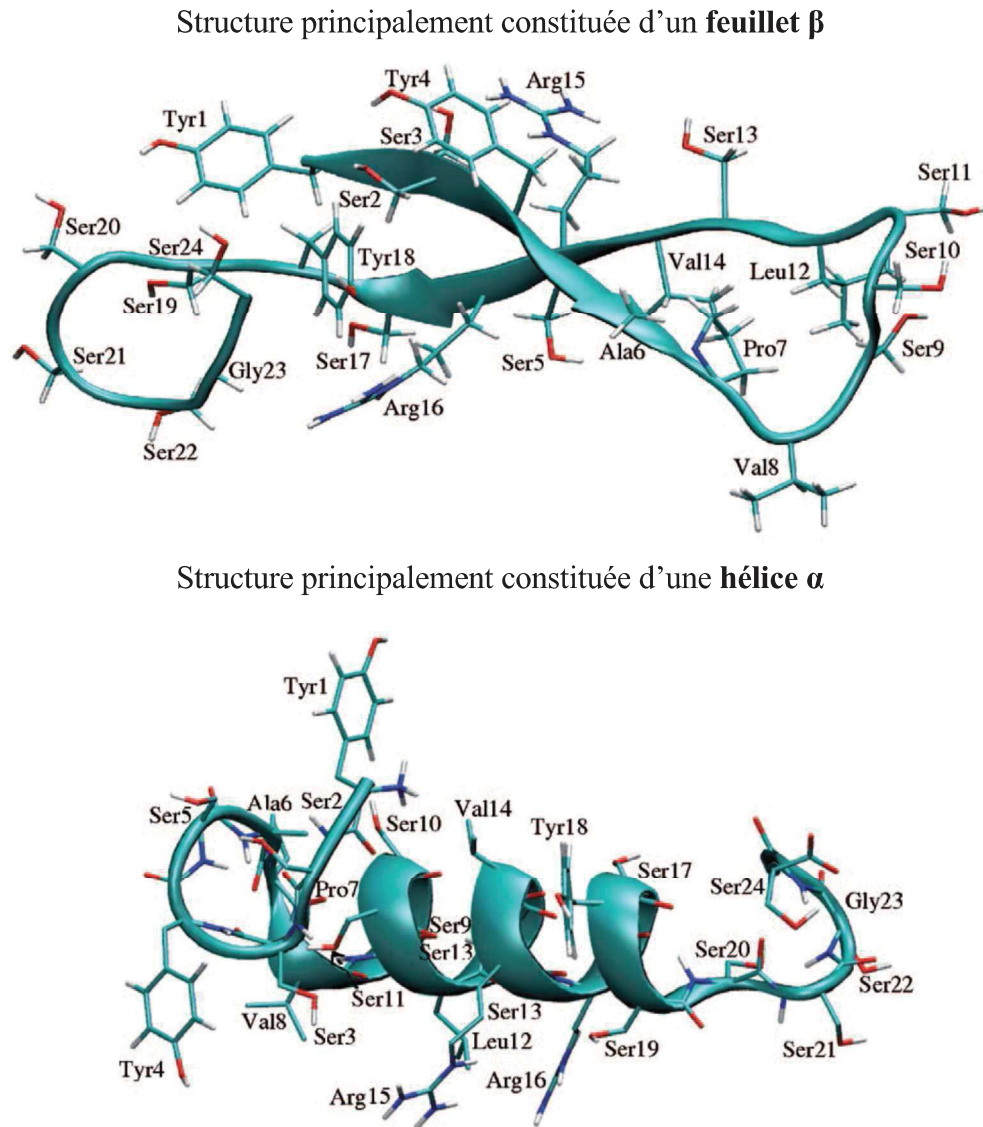


Figure 3.9 : Prédiction de la structure secondaire du peptide NFL-TBS.40-63.
(D'après Bergès et al., 2012b)

Il a également été montré que le peptide NFL-TBS.40-63 peut s'adsorber sur des nanocapsules lipidiques (LNCs pour « Lipid NanoCapsule ») afin d'améliorer l'entrée de ces LNCs dans les cellules de glioblastomes. Ce système permet de cibler les cellules de glioblastomes et d'apporter une drogue

(par exemple le Paclitaxel) spécifiquement dans les cellules de glioblastomes où elle provoque une réduction de la prolifération des cellules (Balzeau et al., 2013). Bien que les LNC-Paclitaxel fonctionnalisées avec le peptide NFL sont aussi capables d'entrer dans les astrocytes, elles n'ont pas d'effet sur ces cellules (Balzeau et al., 2013).

In vivo, sur des souris porteuses de tumeur, ce système de délivrance permet d'augmenter le ciblage des LNC-Paclitaxel pour les cellules de glioblastomes et montre une réduction de la taille de la tumeur d'environ 75% (contre 60% lorsque les LNCs ne sont pas fonctionnalisées avec le peptide) (Balzeau et al., 2013). Cette stratégie de nanocapsules fonctionnalisées permet donc d'augmenter la spécificité et l'efficacité de la drogue (Figure 3.10).

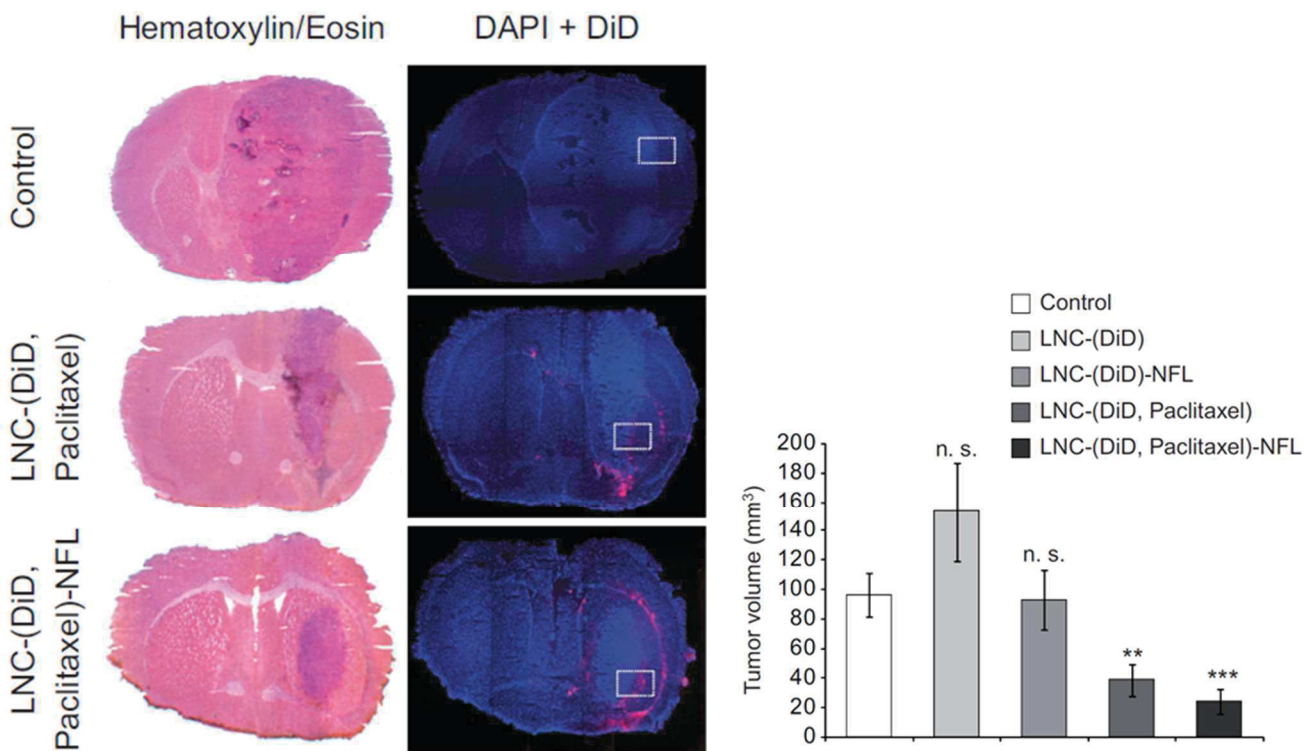


Figure 3.10 : Efficacité du système NFL-LNC-(Paclitaxel).
(D'après Balzeau et al., 2013)

3.4.3.2. Le rôle de neuro-modulation du peptide NFL.TBS.40-63

La myélinisation est un processus qui dépend du calibre axonal puisque les petits axones ne sont pas ou peu myélinisés (Fraher and Dockery, 1998). Il implique indirectement les neurofilaments et les microtubules qui sont impliqués dans le contrôle du calibre axonal et le transport axonal (Hoffman et al., 1987; Baas, 2002; Yuan et al., 2012).

Dans le cas de maladies démyélinisantes, comme la Sclérose en plaque, il a été noté une réduction de l'expression des neurofilaments ainsi que de la tubuline axonale suivi d'une libération de ces deux

protéines dans le milieu extracellulaire où leur présence dans le LCR est utilisé comme biomarqueurs de la maladie (Dujmovic, 2011) car le niveau d'expression est corrélé à la sévérité de la maladie (Abdelhak et al., 2015). De plus, les axones deviennent impropres à la myélinisation (Fressinaud, 2016). La différenciation des précurseurs d'oligodendrocytes est corrélée à la polymérisation spatio-temporelle des éléments du cytosquelette (microtubules et filaments d'actines) (Pedraza et al., 2014). Dans le but d'étudier le rôle des protéines axonales dans le processus de remyélinisation, notre laboratoire a étudié l'impact des protéines du cytosquelette (tubulines et neurofilaments) sur les précurseurs d'oligodendrocytes. Il a ainsi été montré au laboratoire que les neurofilaments et la tubuline purifiés provoquent une augmentation de la prolifération et de la maturation des progéniteurs d'oligodendrocytes (Fressinaud et al., 2012) et protègent les oligodendrocytes dans un modèle de démyélinisation par intoxication à la Lysophosphatidyl-choline (LPC) en augmentant leur prolifération et leur survie (Fressinaud and Eyer, 2013).

La réduction de l'expression des protéines du cytosquelette dans la sclérose en plaque pourrait être liée à la perte de la myélinisation des oligodendrocytes, et la balance entre la tubuline libre et liée aux neurofilaments pourrait moduler la réponse des oligodendrocytes à une remyélinisation des axones. Afin de confirmer cette hypothèse, il a été étudié si le peptide correspondant au site de liaison à la tubuline libre situé sur les neurofilaments (le peptide NFL-TBS.40-63) pouvait induire les mêmes résultats. Ainsi, il a été montré que le peptide NFL-TBS.40-63 est capable d'entrer par endocytose dépendante des clathrines dans les précurseurs d'oligodendrocytes et d'augmenter leur différenciation et leur maturation. De plus ce peptide protège les oligodendrocytes dans un modèle de démyélinisation (Fressinaud and Eyer, 2014, 2015).

Le peptide NFL-TBS.40-63 pourrait donc moduler la différenciation des progéniteurs neuraux. Ces données montrent aussi l'importance des interactions entre les protéines du cytosquelette (ici neurofilaments et microtubules) dans les pathologies démyélinisantes.

Chapitre 4

Projets de recherche

La médecine régénérative peut être définie comme la possibilité de restaurer la perte ou les dommages causés aux tissus/organes, et elle est de plus en plus étudiée comme traitement pour les maladies humaines. Les cellules souches sont considérées comme prometteuses pour cette médecine puisqu'elles ont la capacité de se différencier en cellules spécifiques de l'endroit où elles sont localisées. Par exemple, les cellules souches neurales (CSNs), localisées dans le cerveau sont capables de former les cellules du système nerveux central : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. Depuis leur découverte, les CSNs sont testées en essais clinique pour le traitement des maladies neurologiques. Dans la revue citée dans le chapitre suivant, nous avons résumé les principales études cliniques utilisant les CSNs (endogènes ou non) pour le traitement de ces maladies (Article de revue : Barreau K., Lépinoux-Chambaud C., Eyer J., JSM Biotechnol Bioeng 3(3): 1057 (2016)).

Actuellement, les CSNs les plus utilisées dans les études cliniques sont celles issues de fœtus car elles sont faciles à récupérer et ne forment pas de tumeur contrairement aux cellules issues d'embryons humains. Cependant, l'utilisation de cellules de fœtus est limitée à cause de problèmes éthiques que cela engendre. Les CSNs adultes sont aussi une source envisageable comme l'atteste quelques études cliniques. Cependant, ces cellules sont difficiles à isoler et à amplifier car elles sont localisées dans des zones très restreintes et elles ont une très faible capacité de prolifération *in vitro*. Une stratégie thérapeutique serait donc de stimuler directement les CSNs endogènes du cerveau qui sont localisées par exemple dans la zone sous ventriculaire. Cette zone est accessible en injectant des molécules dans les ventricules latéraux. Cette stratégie a déjà été utilisée dans une étude clinique pour des patients atteints de la Sclérose Latérale Amyotrophique où le G-CSF (« Granulocyte Colony Stimulating Factor ») est injecté dans le but de stimuler la différenciation neuronale des CSNs endogènes (NCT00397423) (Barreau et al., 2016).

En étudiant les interactions entre les microtubules et les neurofilaments, le laboratoire a découvert que chaque sous unité des neurofilaments, possède des sites de liaison à la tubuline (TBS) qui permettent de réguler *in vivo* la polymérisation des MTs (Bocquet et al., 2009). Un des peptides dérivés des sites TBS, le peptide NFL-TBS.40-63, qui correspond au TBS situé sur la sous unité légère des neurofilaments, est capable de pénétrer dans les cellules de glioblastomes et de détruire leur réseau de MTs et de mitochondries (Berges et al., 2012; Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013; Rivalin et al., 2014). *In vitro*, il induit une réduction de la prolifération, de la migration et de la viabilité de ces cellules. *In vivo*, 24 jours après une injection intra-tumorale chez le rat porteur d'une tumeur de glioblastome, le peptide réduit de 70% la taille de la tumeur et permet d'augmenter la survie des animaux traités (Berges et al., 2012). Le peptide NFL-TBS.40-63 a aussi montré la capacité d'entrer dans les progéniteurs des oligodendrocytes et d'induire leur différenciation et leur maturation (Fressinaud and Eyer, 2014).

La première partie de la thèse a été d'étudier les effets du peptide NFL-TBS.40-63 sur les cellules souches neurales *in vitro* et *in vivo* afin d'étudier ses capacités de différenciation. Dans un premier temps, nous avons utilisé les CSNs de rats nouveaux nés et adultes pour analyser le mécanisme d'entrée du peptide dans ces cellules. Après avoir validé que le peptide n'est pas toxique sur ces cellules, nous avons étudié les propriétés des CSNs pouvant être affectées par le peptide, comme la prolifération, l'auto-renouvellement et la différenciation de ces cellules. Nous avons enfin évalué la capacité du peptide à cibler les CSNs endogènes de la zone sous ventriculaire de rats adultes après injection dans le ventricule latéral. (1^{er} article scientifique : Lépinoux-Chambaud C., Barreau K., Eyer J., *Stem Cells Transl Med* 5, 901–913 (2016)).

Compte tenu des résultats très prometteurs sur les CSNs de rats, il était important de savoir si le peptide pouvait avoir un effet sur les cellules souches neurales humaines. La seconde partie de la thèse a donc consisté à étudier le peptide NFL-TBS.40-63 sur des cellules souches neurales humaines issues de fœtus. *In vitro*, ces cellules ont aussi la capacité de proliférer, de s'auto-renouveler et dans certaines conditions, de se différencier. Selon la même démarche, nous avons étudié l'entrée et le mécanisme d'entrée du peptide dans ces cellules, puis les effets sur les propriétés de ces cellules. Nos travaux ont permis de montrer que le peptide est un agent prometteur pour la stimulation de ces CSNs humaines (2^{ème} article scientifique : Barreau K., Montéro-Menei C., Eyer J., soumis à *PLOS One* (2017)).

La troisième partie de la thèse a été d'étudier la pharmacocinétique d'une molécule fluorescente qui est utilisée pour suivre des nanoparticules *in vitro* et *in vivo*. En effet, les nanocapsules lipidiques (LNC pour *Lipid NanoCapsules*) sont utilisées comme vecteur pour amener des drogues de manière plus efficace dans les cellules (Huynh et al., 2009). En vue de l'utilisation de ces LNCs pour amener des molécules dans les CSNs, il est important de déterminer les propriétés pharmacocinétiques des molécules encapsulées comme le DiD (1,10-Dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethylindodicarbocyanine 4-chlorobenzenesulfonate) qui est une des molécules fluorescentes qui permet de suivre les LNCs. Dans le 3^{ème} article scientifique, nous avons analysé l'entrée du DiD dans les CSNs de rats *in vitro* et *in vivo*. Cette étude a permis d'obtenir les informations essentielles concernant le DiD pour son utilisation seule ou encapsulée dans des nanoparticules (3^{ème} article scientifique : Carradori D., Barreau K., Eyer J., *Journal of Neuroscience Research* 94, 139–148 (2016)).

Enfin, un autre axe de recherche du laboratoire concerne l'étude du glioblastome, le cancer du cerveau de stade IV le plus foudroyant. Ce cancer est actuellement incurable avec une moyenne de survie d'environ 15 mois, malgré une chirurgie lorsque la localisation de la tumeur le permet, ainsi qu'une radiothérapie associée ou non à la chimiothérapie. De nouvelles stratégies thérapeutiques sont actuellement en essais cliniques (www.clinicaltrials.org) comme l'immunothérapie ou les vaccins. Nous avons résumé ces essais dans une revue, pour mettre en relief l'état actuel des techniques ainsi que les

nouveaux marqueurs pour diagnostiquer plus tôt ce cancer (2^{ème} article de revue : **Barreau K.**, Lépinoux-Chambaud C., Eyer J., en rédaction).

Résultats

1^{er} Article de revue

Review of clinical Trials Using Neural Stem Cells

Barreau K., Lépinoux-Chambaud C., Eyer J. (2016). *JSM Biotechnol Bioeng* 3(3): 1057.

Depuis la découverte des cellules souches (CSs) dans les années 1950, différents types de CSs ont été identifiées: les cellules souches totipotentes, pluripotentes ou encore multipotentes. En fonction du type de cellules, elles sont capables de donner différents lignages cellulaires (comme les cellules souches embryonnaires) ou un type de lignage spécifique (comme les cellules souches neurales). Ces cellules sont donc très intéressantes pour leur utilisation en médecine comme la régénération tissulaire. Les CSs sont localisées dans plusieurs tissus ou organes comme le sang, la moelle épinière, les dents ou encore le cerveau. Il existe de nombreuses études cliniques utilisant les CSs dans différentes maladies (maladies du poumon, des intestins, du système nerveux central ou encore des cancers). Nous avons étudié spécifiquement dans cette revue les essais cliniques utilisant des cellules souches neurales (CSNs). En se basant sur le site www.clinicaltrials.gov, il y avait en 2016, 37 études cliniques qui utilisent les CSNs sur la totalité de 5508 études portant sur les CSs toutes phases cliniques confondues. La plupart des études sont menées en Amérique du Nord, et ce sont principalement des études cliniques en phase I qui utilisent des CSNs dérivées d'autres cellules (fœtus, lignées cellulaires, moelles épinières, etc.) (Figure 1).

Dans cet article de revue nous avons développé quelques exemples de protocoles et résultats d'essais cliniques où les résultats ont été publiés, principalement sur la sclérose latérale amyotrophique (SLA). En effet, des patients atteints de SLA ont reçu une ou plusieurs injections unilatérales ou bilatérales dans la moelle épinière au niveau lombaire de CSNs isolées à partir de fœtus humains. Les premières phases cliniques permettent de montrer que les injections sont possibles et tolérées par les patients, sans effet toxique majeur. Les patients qui ont reçu plusieurs injections ont une progression de la maladie plus lente que ceux qui ont eu des injections uniques, suggérant un effet bénéfique des injections multiples. Ces essais sont actuellement en phase clinique II (NCT01730716). Le même essai clinique est actuellement en cours avec des CSNs qui sont issues de fœtus décédés spontanément *in utero*. L'utilisation de ces cellules est plus éthique car elles sont récupérées à partir d'une fausse couche et non d'un avortement.

Cette revue montre la nécessité de développer de nouvelles approches pour utiliser efficacement ces cellules souches en clinique. De plus, on constate que peu d'études utilisent les CSNs issues de cerveaux de patients (plus acceptable sur le point éthique) car elles sont localisées dans des zones restreintes et ont un faible taux de prolifération. Une stratégie plus efficace serait de stimuler directement la prolifération et différenciation des CSNs endogènes présentes dans la zone sous ventriculaire (ZSV) ou sous-granulaire des patients atteints de maladies neurodégénératives, en injectant directement l'agent thérapeutique/facteur stimulateur, dans le LCR (Carradori et al. 2016).

C'est un des objectifs principaux du laboratoire, en utilisant notamment le peptide issu des neurofilaments.

Review Article

Review of Clinical Trials Using Neural Stem Cells

Kristell Barreau^{1#}, Claire Lépinoux-Chambaud^{1,2#}, and Joël Eyer^{1*}

¹Laboratoire Neurobiologie and Transgenese, Institut de Biologie en Santé, France

²Laboratoire Neurobiologie and Transgenese, Université d'Angers, France

[#]Both authors are co-first authors

*Corresponding author

Eyer Joël, Laboratoire de Neurobiologie and Transgenese, L'UNAM, UPRES EA-3143, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment IBS-IRIS, 49033 Angers, France, Tel: 02 44 68 84 88; E-mail: joel.eyer@univ-angers.fr

Submitted: 11 June 2016

Accepted: 27 July 2016

Published: 28 July 2016

ISSN: 2333-7117

Copyright

© 2016 Eyer et al.

OPEN ACCESS

Keywords

- Brain disorders
- Brain tumours
- Clinical trials
- Neural stem cells
- Neurodegenerative diseases
- Stem cells

Abstract

The use of stem cells in clinical trials started several years ago for regenerative-based therapies or for the treatment of tumours. After brain injuries or neurodegenerative diseases, neural stem cells represent a promising strategy to repair the affected tissue and to replace degenerative cells. Neural stem cells can migrate and differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes, and thus could serve as promising therapeutic solutions. However, these cells can represent a potential source of cancer stem cells in tumour brain where they are responsible of recurrence, invasiveness and resistance to current treatments. Thus, few clinical trials involving endogenous, genetically modified- or derived-neural stem cells have been conducted in the world to treat brain disorders. According to the website www.clinicaltrials.gov only 37 clinical trials involving neural stem cells are listed. Most of them use derived-neural stem cells to treat brain disorders (neurodegenerative diseases, injuries or tumours). For the future, a better approach would be to target directly endogenous stem cells.

ABBREVIATIONS

ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis; G-SCF: Granulocyte-stimulating Factor; HSSC: Human Spinal cord derived-Stem Cell; HuCNS-Sc: Human Central Nervous System Derived-Stem Cell; INCL: Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis; iPSC: Induced-Pluripotent Stem Cell; MRI: Magnetic Resonance Imaging; NSC: Neural Stem Cell

INTRODUCTION

Stem cells are located in a lot of tissues or organs, including blood [1], teeth [2], bone marrow [3], brain [4] and human umbilical cord blood [5]. Their main properties are to divide, renew themselves and differentiate in specialized cells types.

Currently, 5508 clinical trials using stem cells are listed on the website www.clinicaltrials.gov, of which 320 studies are in phase 3 or 4 in many diseases including bacterial and fungal, central nervous system, lung, digestive diseases or cancer. Hematopoietic stem cells from peripheral blood or bone marrow are the most used, followed by mesenchymal stem cells. Neural stem cells (NSCs) represent an important source of stem cells from brain that can differentiate into neurons, oligodendrocytes or astrocytes, and they are responsible of neurogenesis in human adult brain. Moreover, several studies showed their ability to migrate to a lesion area following brain injuries, such as neurodegenerative diseases (Alzheimer, Parkinson), strokes, or brain tumours [6,7]. Unfortunately, it seems that this capacity

is too low to repair efficiently the injured tissue because no self-rescue has been shown yet in patients. These cells also represent a source for cancer stem cells, which are responsible of the tumour recurrence as they resist to current treatments [8]. Manipulating endogenous and genetically modified NSCs have been used in several studies to treat neurodegenerative disorders, spinal cord lesions, and malignant glioma [9,10]. These cells represent promising and innovative resource for anti-tumour and regenerative-based therapies in order to repair damaged brain. Here, we will review the completed or ongoing clinical trials using NSCs across the world and will describe some results of these clinical trials.

LISTING OF ALL CLINICAL TRIALS USING NEURAL STEM CELLS

Currently, there are 37 clinical trials involving NSCs in the world (Figure 1A). All of them are listed in tables 1 and 2. According to ClinicalTrials.gov, the first clinical use of NSCs started in 2006 at the Peking University, China, to treat adult patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), a fatal neurodegenerative disease. Participants received an injection of a neurotrophic factor (G-CSF, Granulocyte-Colony Stimulating Factor) to stimulate the neuronal differentiation of adult NSCs in the brain [11].

Since, other clinical trials using endogenous or derived NSCs were conducted in the world to treat several brain disorders.

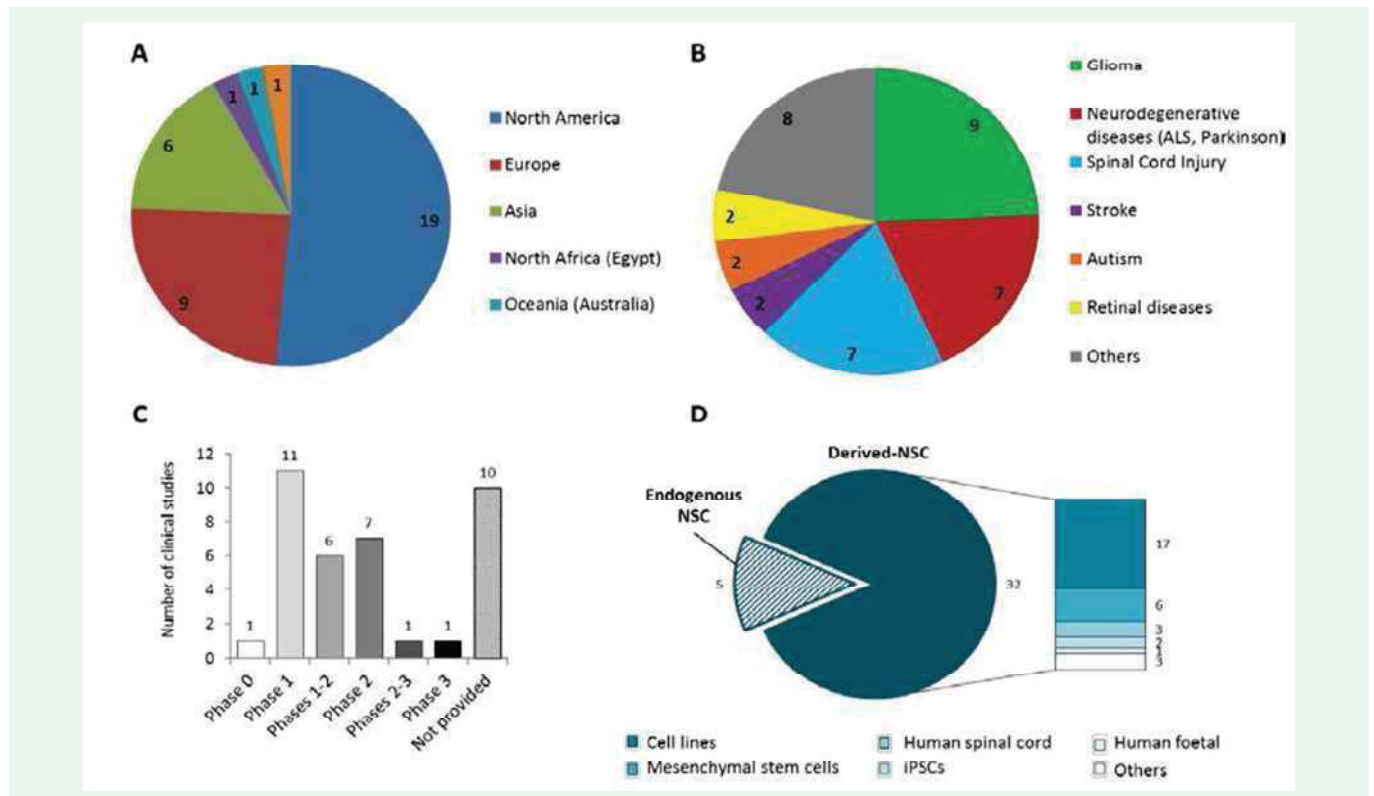


Figure 1 Clinical trials using neural stem cells in the world.

Distribution of clinical trials with neural stem cells by countries (A), according to diseases (B), and according their randomized phases (C). Distribution of clinical trials using endogenous neural stem cells, or derived-neural stem cells (D).

Abbreviations: ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis; iPSCs: induced Pluripotent Stem Cells; NSC: Neural Stem Cell.

Most of them were found in North America (19), few in Europe (United Kingdom (4), Switzerland (2), Italy (2) and Belgium (1)), and in Asia (China (4), India (1), Taiwan (1)). Isolated studies were initiated in Egypt, Australia, and Russian federation (Figure 1A). The use of NSCs in clinical trials were mainly developed against gliomas, neurodegenerative diseases (ALS and Parkinson), and spinal cord injuries. Other studies were conducted for the treatment of strokes, autism and retinal disorders (Figure 1B). Among these clinical studies, only one was in phase 3 and one in phases 2-3 (Figure 1C). Currently, 18 clinical trials are still progressing, for which first results and primary or final completion are expected in the next months or years.

Endogenous NSCs were not mainly involved in these clinical trials, whereas derived-NSCs were usually studied. Most clinical trials used NSCs derived from different cell lines, such as HuCNS-SC[®], CTX DP, HB1.F3.CD, hCE1m6, ISC-hpNSC, or AST-OPC1. Several studies also used mesenchymal stem cell-derived NSCs, human spinal cord-derived NSCs, induced pluripotent stem cells (iPSCs), or human foetal-derived NSCs. Only 5 clinical trials involved endogenous NSCs (Figure 1D).

SOME EXAMPLES OF CLINICAL TRIALS WITH NEURAL STEM CELLS

The first study using NSCs on children was in 2006 for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (INCL) (NCT00337636) [12]. This disease can affect the brain and the retina of persons

from infancy to adulthood age. In juvenile, it is caused by mutation in the CLN1 gene, which codes for a lysosomal protein. This mutation leads a loss of vision and blindness, epilepsy, motor coordination problems or emotional reactions like depression [13]. Human central nervous system-stem cells (HuCNS-SCs), *in vitro*, had been showed to secrete the enzyme deficient in INCL. In this clinical trial, HuCNS-SCs from single human foetal brain tissue have been transplanted in each lateral ventricle of infants. The procedure seemed both safe and well accepted by children. Only transitory moderate or severe adverse effects were observed, and these were not directly attributed to the transplantation. Importantly, discovery of HuCNS-SCs in post-mortem host brain 1-year after transplantation and long after the cancellation of immunosuppression suggested that this approach has a therapeutic potential for the treatment of human neurodegenerative disease, in children but also in adult. Currently, this investigation measures the post-transplantation disease progression under clinical trial protocol n°NCT01238315.

The ALS is a neurodegenerative disease caused by a progressive degeneration of motor neurons. The death is generally caused by respiratory failure few years after the appearance of first symptoms. The dysphagia and pneumonia are the most important symptoms, which both reach the life quality of patients. There is no cure for this disease except some management to reduce symptoms or the Riluzole[®] administration which counteracts the excitotoxicity and allows a low survival improvement (3-6 months) [14]. Thirty clinical trials have started

Table 1: Clinical trials that involved neural stem cells (according to the website: www.clinicaltrials.gov).

Identifier	Pathology	Phase	Age group	Study start	Country	Completion
NCT02055196	Recurrent high-grade gliomas	1	Adult	np	US	may 2014
NCT01172964	Recurrent high-grade gliomas	np	Child/Adult/Senior	2010	US	feb. 2015
NCT01478854	GBM (newly diagnosed)	np	Adult/Senior	2011	US	jan. 2016
NCT00581113	Brain metastases	3	Adult/Senior	2007	US	jun. 2009
NCT01251913	Ependymomas/Gliomas/ PNET/ Pineal Tumours/ PCNSL	np	Adult/Senior	2010	US	apr. 2015
NCT00397423	Amyotrophic Lateral Sclerosis	2	Adult	2006	CN	aug. 2007
NCT01640067	AmyotrophicLateralSclerosis	1	Adult/Senior	2011	IT	dec. 2015
NCT00976430	Parkinson	np	Adult/Senior	2009	IN	nov. 2011
NCT01321333	Thoracic Spinal Cord Injury	1 / 2	Adult	2011	CAN, CHE	apr. 2015
NCT01772810	Spinal Cord Injury	1	Adult	2014	US	mar. 2016
NCT02163876	Cervical Spinal Cord Injury	2	Adult	2014	US, CAN	may 2016
NCT01725880	Spinal Cord Injury	np	Adult	2012	CHE	may 2016
NCT01343511	Autism	1 / 2	Child	2009	CN	may 2011
NCT01632527	Age-related MD	1 / 2	Adult/Senior	2012	US	jun. 2015
NCT01432847	Retinal Disease	np	Child/Adult/Senior	2011	US	np
NCT01238315	NCL	1	Child	2010	US	apr. 2011
NCT01489267	Hereditary Cerebellar Ataxia	2	Adult	2011	CN	july 2014
NCT02387749	DPN	2 / 3	Adult	2014	EG	aug. 2016

Abbreviations: CAN: Canada; CHE: Switzerland; CN: China; DPN: Diabetic Peripheral Neuropathy; EG: Egypt; GBM: Glioblastoma Multiform; IN: India; IT: Italy; np: not provided; MD: Macular Degeneration; NCL: Neuronal Ceroid Lipofuscinosis; PCNSL: Primary CNS Lymphoma; PNET: Primitive Neuroectodermal Tumours; US: United States.

Table 2: Clinical trials currently ongoing that involve neural stem cells (according to the website: www.clinicaltrials.gov).

Identifier	Pathology	Phase	Age group	Study start	Country	Completion
NCT02458508	Glioblastoma	np	Adult/Senior	2015	IT	mar. 2017
NCT02015819	Recurrent high-grade gliomas	1	Adult/Senior	2014	US	oct. 2017
NCT02192359	Recurrent high-grade gliomas	1	Adult	2016	US	mar. 2019
NCT02177578	GBM (newly diagnosed)	2	Adult/Senior	2014	US	jun. 2020
NCT01730716	Amyotrophic Lateral Sclerosis	2	Adult/Senior	2013	US	nov. 2016
NCT01348451	Amyotrophic Lateral Sclerosis	1	Adult/Senior	2009	US	dec. 2016
NCT01329926	Parkinson	0	Adult/Senior	2011	US	oct. 2016
NCT02452723	Parkinson	1	Adult/Senior	2016	AU	mar. 2019
NCT02688049	Spinal Cord Injury	1 / 2	Adult	2016	CN	dec. 2017
NCT02302157	Spinal Cord Injury	1 / 2	Adult/Senior	2015	US	sept. 2018
NCT02326662	Spinal Cord Injury	1 / 2	Adult	2014	RU	dec. 2018
NCT02117635	Stroke	2	Adult/Senior	2014	GB	dec. 2017
NCT01151124	Stroke	1	Adult/Senior	2010	GB	mar. 2023
NCT01933802	Multiple Sclerosis	1	Adult/Senior	2014	US	jun. 2017
NCT02720939	Autism Spectrum Disorder	np	Child/Adult/Senior	2016	TWN	dec. 2016
NCT01392989	MDS/MPD	2	Adult Senior	2011	US	jan. 2018
NCT01916369	Peripheral Arterial Disease	1	Adult/Senior	2014	GB	dec. 2016
NCT02696746	Channelopathies	np	Adult Senior	2012	GB	jan. 2019
NCT02336802	Anxiety	np	Adult	2015	BEL	dec. 2018

Abbreviations: AU: Australia; BEL: Belgium; CN: China; GB: United Kingdom; GBM: Glioblastoma Multiform; IT: Italy; np: not provided; MDS: Myelodysplastic Syndromes; MPD: Myeloproliferative Disorders; RU: Russian Federation; TWN: Taiwan; US: United States

with different stem cells (hematopoietic, mesenchymal, neural or again adipocyte-derived stem cells). Three studies were well documented with NSCs that we will describe here.

The two first clinical trials (NS2008-1 and NCT01348451) used NSCs isolated from the cervico-thoracic spinal cord-derived from an 8-week gestation foetus (NSI-566RSC cell line). They were isolated and propagated *in vitro* in serum-free medium until 25 passages and used to be injected in patients. These human spinal cord-derived stem cells (HSSCs) have been used in clinical trials for 15 patients with ALS [15,16]. In these two trials, HSSCs were injected five times into the lumbar or cervical segments of the spinal cord of ALS patients by unilateral or bilateral injections. 6 patients received first either unilateral or bilateral lumbar injection [15]. In the second part of the trial, 3 patients who had already received bilateral injection in lumbar, received unilateral injection in cervical and 3 other patients received unilateral cervical injection [16].

The goal of these studies was to show the safety and tolerability of injection in lumbar or cervical spinal cords of patients and check the dual-targeting approach.

Firstly, some adverse events were noted like encephalopathy, bronchitis and pneumonia but these side effects were due to the ALS diseases. Most patients had mild and transient pain but the major toxicity was related to immunosuppressant drugs given to all patients. There was no evidence for decline in function or acceleration of progression after surgical intervention. More than 50% of patients had better outcomes than baseline until 15 months post-operation. Despite 7 deaths unrelated to HSSC use, the injection of stem cells in lumbar and cervical spinal cord of patients with ALS represented a significant advance in the cell therapy field. Survived-patients showed a slower progression of the disease and functional improvement. The three subjects who received more injections (bilateral and unilateral injections in lumbar and cervical, respectively) demonstrated the largest effects on progression rates, suggesting the beneficial of multiple injections. Following these clinical trials, phase 2 trial started in September 2013 (Protocol n° NCT01730716).

Another Phase 1 clinical trial started in 2012 (clinical trial number: NCT01640067) with ALS patients and similar transplantation method [17]. However, human NSCs were isolated from forebrain at gestational ages greater than 8th post-conceptional week with spontaneous in utero death. This source of cells could be more ethic because cells were recovered following miscarriage. Moreover, 5 times more cells were transplanted (750000 cells per patient) than the previous clinical trial described above (100 000 cells per patient) [16]. The goal of this study was to approve the safety of both cells and procedure of transplantation. No severe side effect was found except pain near the injection site, and the MRI did not show structural changes or tumour formation in brain or spinal cord after transplantation. This clinical trial reproduced the results from the previously quote clinical trial using other cells. Now, intraspinal injection was evaluated into the cervical spinal cord of 12 ambulatory patients with ALS.

Several investigations showed that NSCs and progenitor cells present in the subventricular zone of brain bearing glioblastoma

represent potential tumour-initiating cells (cancer stem cells) associated with a higher recurrence rate and shorter overall survival [18,19]. In the United States, a recent randomized phase 2 clinical trial, with primary completion in June 2020 (NCT02177578), is currently conducted in newly diagnosed glioblastoma patients, in order to treat endogenous NSCs in the subventricular zone with modified radiation treatment in addition to the standard chemotherapy (Temozolomide). A group of patients is treated with a higher radiation therapy plan, both directed against tumour and subventricular zone. And the control group is treated with standard radiation therapy, only directed against the tumour. The aim of this study is to examine the progression free survival between these two groups.

Several other studies concerning brain diseases like cerebellar atrophy [20], spinal cord injury [21], Pelizaeus-Merzbacher disease [22] or cerebral palsy [23] also showed safety of the procedure and efficiency of autologous or allogenic stem cells transplantation after expansion *in vitro*.

DISCUSSION & CONCLUSION

As documented above, derived-neural stem cells are mainly used for brain disorders like cancers, neurodegenerative diseases or diseases from the peripheral nervous system. Collecting endogenous NSCs cells directly from the brain is complicated and the use of derived-NSCs from other stem cells could lead mutation issues. One of the best strategies to reach NSCs without taking them out from their environment would be to target NSCs directly in the brain by intra-ventricular injection. Several experimental procedures were recently developed to target *in vitro* and *in vivo* NSCs and to induce their differentiation. For instance, aneurofilament derived-peptide, named NFL-TBS.40-63, is able to target NSCs from the subventricular zone. Moreover, *in vitro* the peptide decreased the self-renewal and proliferation of NSCs cells while their adhesion and differentiation were increased [24]. Another study showed that the forced neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells with neurogenic transcription factors inhibited their capacity to form orthotopic tumour *in vivo* [25]. Glioblastoma stem cells are implicated in the tumour recurrence and thus in the low survival rate of patients. Targeting these cells is a promising approach to treat this disease [26].

As describe above, the first clinical trial using a factor to stimulate endogenous NSCs started in 2006 in China in a cohort with ALS patients. This clinical trial in phase 2 was finished since 2007 (according to the website clinicaltrials.org), but no results are available. Since the first clinical trial involving NSCs in 2006, 36 others clinical trials came out, and only one is in phase 3. Unfortunately, most studies are outdated and only few results are published. The most promising strategy would be to target endogenous NSCs directly in the brain of patients by intraventricular injection to induce the differentiation in the case of neurodegenerative diseases or to stop their migration and tumorigenesis in the case of tumour.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by AFM (Association Française contre les Myopathies), ARC (Association de Recherche contre le Cancer), CIMATH (Ciblage Moléculaire et Thérapeutique), MATWIN

(Maturation & Accelerating Translation with Industry), and by UNAM (Université Nantes, Angers, Le Mans).

Barreau Kristell is supported by a grant of the University of Angers, in the framework of NanoFar “European Doctorate in Nanomedicine” EMJD programme funded by EACEA. Lépinoux-Chambaud Claire is supported by the “Société d’Accélération du Transfert de Technologie (SATT) Ouest Valorisation”.

REFERENCES

- Cheuk DK. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant.* 2013; 3: 99-112.
- Park Y-J, Cha S, Park Y-S. Regenerative Applications Using Tooth Derived Stem Cells in Other Than Tooth Regeneration: A Literature Review. *Stem Cells Int.* 2016: 9305986.
- BaghabanEslaminejad M, Malakooty Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World J Stem Cells.* 2014; 6: 344-354.
- Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, et al. Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J Physiol Sci.* 2016; 66: 197-206.
- Chang YS, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, et al. Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial. *J Pediatr.* 2014; 164: 966-972.
- Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C, Decker L, Seilhean D, Höglinger GU, et al. Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 4694-4699.
- Müller F-J, Snyder EY, Loring JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 75-84.
- Zong H, Parada LF, Baker SJ. Cell of Origin for Malignant Gliomas and Its Implication in Therapeutic Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7: 020610.
- Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathol.* 2013; 33: 491-504.
- Bexell D, Svensson A, Bengzon J. Stem cell-based therapy for malignant glioma. *Cancer Treat Rev.* 2013; 39: 358-365.
- Fan D, Zhang J, Deng M, Kang D, Zheng J, Xu Y, et al. Basic and clinical researches on amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2009; 41: 279-281.
- Selden NR, Al-Uzri A, Huhn SL, Koch TK, Sikora DM, Nguyen-Driver MD, et al. Central nervous system stem cell transplantation for children with neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurosurg Pediatr.* 2013; 11: 643-652.
- von Tetzchner S, Fosse P, Elmerskog B. Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis and education. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1832: 1894-1905.
- Orsini M, Oliveira AB, Nascimento OJM, Reis CHM, Leite MAA, de Souza JA, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: New Perspectives and Update. *Neurol Int.* 2015; 7: 5885.
- Glass JD, Boulis NM, Johe K, Rutkove SB, Federici T, Polak M, et al. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells.* 2012; 30: 1144-1151.
- Feldman EL, Boulis NM, Hur J, Johe K, Rutkove SB, Federici T, et al. Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase 1 trial outcomes. *Ann Neurol.* 2014; 75: 363-373.
- Mazzini L, Gelati M, Profico DC, Sgaravizzi G, ProgettiPensi M, Muzi G, et al. Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial. *J Transl Med.* 2015; 13: 17.
- Chen L, Guerrero-Cazares H, Ye X, Ford E, McNutt T, Kleinberg L, et al. Increased Subventricular Zone Radiation Dose Correlates with Survival in Glioblastoma Patients After Gross Total Resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013; 86: 616-622.
- Jafri NF, Clarke JL, Weinberg V, Barani IJ, Cha S. Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro Oncol.* 2013; 15: 91-96.
- Tian Z, Chen T, Zhong N, Li Z, Yin F, Liu S. Clinical study of transplantation of neural stem cells in therapy of inherited cerebellar atrophy. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2009; 41: 456-458.
- Moviglia GA, Fernandez Viña R, Brizuela JA, Saslavsky J, Vrsalovic F, Varela G, et al. Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy.* 2006; 8: 202-209.
- Gupta N, Henry RG, Strober J, Kang S-M, Lim DA, Bucci M, et al. Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 137.
- Chen G, Wang Y, Xu Z, Fang F, Xu R, Wang Y, et al. Neural stem cell-like cells derived from autologous bone mesenchymal stem cells for the treatment of patients with cerebral palsy. *J Transl Med.* 2013; 11: 21.
- Lépinoux-Chambaud C, Barreau K, Eyer J. The Neurofilament-Derived Peptide NFL-TBS-40-63 Targets Neural Stem Cells and Affects Their Properties. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 5: 901-913.
- Guichet P-O, Bieche I, Teiggell M, Serguera C, Rothhut B, Rigau V, et al. Cell death and neuronal differentiation of glioblastoma stem-like cells induced by neurogenic transcription factors. *Glia.* 2013; 61: 225-239.
- Pointer KB, Clark PA, Zorniak M, Alrfaei BM, Kuo JS. Glioblastoma cancer stem cells: Biomarker and therapeutic advances. *Neurochem Int.* 2014; 71: 1-7.

Cite this article

Barreau K, Lépinoux-Chambaud C, Eyer J (2016) Review of Clinical Trials Using Neural Stem Cells. *JSM Biotechnol Bioeng* 3(3): 1057.

1^{er} article scientifique

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

Lépinoux-Chambaud, C., Barreau, K., and Eyer, J. (2016). *Stem Cells Transl Med* 5, 901–913.

Les CSNs sont capables de se différencier en cellules du système nerveux central comme les astrocytes, les neurones ou les oligodendrocytes. De plus, il a été montré que les CSNs peuvent avoir un effet anti-tumorigène (Müller et al., 2006). Ces capacités leur confèrent un rôle important dans le traitement des maladies neurodégénératives et des cancers du cerveau. Les CSNs endogènes ont montré la capacité de migrer lors d'une neurodégénérescence (Müller et al., 2006; Nait-Oumesmar et al., 2007), mais cette capacité est trop faible pour être efficace. Cibler ces cellules représente donc un enjeu majeur pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives et/ou les tumeurs cérébrales.

Le peptide NFL-TBS.40-63 est capable de cibler spécifiquement et massivement les cellules de glioblastomes (Berges et al., 2012) et de détruire spécifiquement ces cellules (Berges et al., 2012; Balzeau et al., 2013; Rivalin et al., 2014) en comparaison aux neurones et aux astrocytes sains. D'autres travaux ont montré que le peptide induit une augmentation de la différenciation et de la maturation des précurseurs d'oligodendrocytes (Fressinaud and Eyer, 2014). Dans cet article, nous avons analysé l'entrée et les effets du peptide sur les CSNs de rats.

Les CSNs utilisées dans cet article sont issues de la ZSV de rats nouveaux nés (< 5 jours postnatal) ou de rats adultes. Après microdissection de la ZSV sous loupe binoculaire, les tissus ont été incubés dans un milieu défini pour la culture de CSNs. Les cellules forment des neurosphères après 7 jours en culture. L'entrée dans les cellules a été évaluée par cytométrie en flux (FACS) (Figure 1A) et validée par immunocytochimie en microscopie confocale (Figure 1B et C). L'entrée du peptide est dose-dépendante dans les CSNs de rats nouveaux nés ou adultes (Figure 1A et 4A, respectivement). Les marqueurs spécifiques des CSNs, comme SOX2 et CD133, ont permis de confirmer l'entrée dans les cellules *in vitro* (figure 1D) et *in vivo* (Figure 4B) par immunocytochimie. Le peptide scramble, qui correspond à la même charge et composition en acides aminés que le peptide NFL-TBS.40-63 mais avec les acides aminés dans le désordre, a été utilisé comme contrôle positif. Ainsi, ce peptide est plus faiblement internalisé dans les cellules de glioblastomes (Berges et al., 2012). Ici nous montrons aussi que l'entrée du peptide scramble est bien plus faible que l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63 (Figure 1E).

Afin de déterminer le mécanisme d'entrée du peptide dans les cellules, les voies actives ont été bloquées par l'incubation des cellules à 4°C ou dans un tampon permettant la déplétion en ATP. Ces deux conditions n'entraînent pas de diminution notable de l'internalisation dans les cellules (Figure 1F) suggérant un mécanisme passif d'entrée cellulaire. Pour confirmer cela, les cellules ont été

incubées en présence d'inhibiteurs des voies d'endocytose (Figure 1G). Aucun de ces inhibiteurs ne permet une diminution majeure de l'entrée du peptide dans les CSNs, confirmant que l'entrée du peptide se fait par voie passive contrairement aux cellules de glioblastomes où le peptide rentre par les différentes voies d'endocytose ((Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013).

Nous avons ensuite évalué les effets du peptide sur le cycle cellulaire, la viabilité et le réseau de microtubule des CSNs. Après 3 jours d'incubation avec le peptide à différentes concentrations, le cycle cellulaire des CSNs n'est pas altéré (Figure 2A) et le peptide à faible dose (inférieur à 40 $\mu\text{mol/l}$) n'affecte pas la viabilité des cellules, comme le montre la Figure 2C. De manière surprenante, le réseau de microtubules n'est pas altéré par le peptide (Figure 2B), comme cela a aussi été observé pour les astrocytes et les neurones. Ceci démontre que l'effet anti-microtubulaire du peptide NFL-TBS.40-63 est bien spécifique aux cellules de glioblastomes, comme cela avait été précédemment montré par (Berges et al., 2012)

Dans ces travaux précédents il avait été montré que le peptide réduit la prolifération et la migration des cellules de glioblastomes (Berges et al., 2012) tandis qu'il augmente la différenciation et la maturation des précurseurs d'oligodendrocytes (Fressinaud and Eyer, 2014). C'est pourquoi, nous avons analysé les effets du peptide sur les propriétés des CSNs de rats. La Figure 3C montre que la prolifération est réduite dès 10 $\mu\text{mol/l}$ de peptide et diminue en fonction de la concentration du peptide. Pour étudier la capacité de formation des sphères et d'auto-renouvellement, les cellules ont été extraites à partir de rats nouveaux nés puis directement mises en culture en présence de concentrations croissantes en peptide. Le nombre de sphères est compté après 7 jours de culture pour la formation des sphères. Les cellules ont ensuite été récoltées puis dissociées et mises en culture 7 jours sans peptide pour étudier la capacité d'auto-renouvellement. La Figure 3A montre que le peptide n'a pas d'action sur la formation des sphères, excepté à forte dose (100 $\mu\text{mol/l}$) où la concentration du peptide serait toxique pour les cellules. Cependant, la capacité d'auto-renouvellement des cellules est diminuée par le peptide (Figure 3B). Ceci est concordant avec une augmentation de l'adhésion cellulaire comme montré dans la Figure 3E. L'adhésion cellulaire est visualisée par microscopie directement dans les puits (Figure D), ainsi que par microscopie électronique à balayage (Figure F) et après immunocytofluorescence où l'on peut visualiser l'augmentation des prolongements (Figure 1G). L'augmentation de l'adhésion cellulaire est confirmée par la diminution de l'expression de la PSA-NCAM (Figure 3H), cette modification post-traductionnelle de la « Neural cell adhesion molecule » (NCAM) réduit les propriétés d'attachement de la NCAM (Sandi, 2004).

L'adhésion cellulaire peut être liée à une augmentation de la différenciation. La Figure 3I montre qu'une augmentation de la protéine CD90 (marqueurs des précurseurs neuronaux) et A2B5 (marqueurs des précurseurs gliaux) est proportionnelle à la concentration en peptide. L'augmentation des deux marqueurs indique une augmentation des voies de différenciation dans les voies neuronales et gliales, mais ne nous permet pas de différencier les astrocytes des oligodendrocytes, ni le niveau de maturation des cellules exprimant ces marqueurs. Pour compléter ces résultats, nous avons quantifié

par RT-PCR quantitative l'expression de gènes après une incubation de 7 jours avec le peptide. On observe une augmentation des marqueurs DCX et TUBB3 (marqueurs des neurones), ainsi que des marqueurs CNP et MBP (marqueurs des oligodendrocytes) en présence de 20 $\mu\text{mol/l}$ de peptide (Figure 3J). Cependant, l'expression de S100 β et GFAP (marqueurs des astrocytes) est diminuée. Ceci démontre que les cellules se différencient en neurones et oligodendrocytes mais pas en astrocyte. A 60 $\mu\text{mol/l}$ de peptide, l'expression des gènes est diminuée de manière générale, suggérant que la maturation des cellules n'est pas atteinte.

Les études *in vivo* montrent que lorsque le peptide est injecté dans le ventricule latéral il est capable de cibler les CSNs de la ZSV par rapport aux autres cellules du système nerveux central (Figure 5A). Une augmentation du temps d'incubation ne montre pas une meilleure internalisation du peptide, ni une augmentation de l'entrée dans les autres cellules (Figure 5A). Ceci confirme que le peptide n'est pas retrouvé dans d'autres zones du cerveau telles que le ventricule controlatéral ou les bulbes olfactifs (Figure 5B).

Pris ensemble, ces résultats montrent que le peptide NFL-TBS.40-63 peut cibler les CSNs de la ZSV de rats et modifier leurs propriétés. Ce peptide représente un outil thérapeutique innovant et performant pour cibler les cellules souches et induire une augmentation de leur différenciation.



The Neurofilament-Derived Peptide NFL-TBS.40-63 Targets Neural Stem Cells and Affects Their Properties

CLAIRE LÉPINOUX-CHAMBAUD,* KRISTELL BARREAU,* JOËL EYER

Key Words. Neural stem cells • NFL-TBS.40-63 peptide • Targeting • Subventricular zone • Differentiation • Proliferation

ABSTRACT

Targeting neural stem cells (NSCs) in the adult brain represents a promising approach for developing new regenerative strategies, because these cells can proliferate, self-renew, and differentiate into new neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Previous work showed that the NFL-TBS.40-63 peptide, corresponding to the sequence of a tubulin-binding site on neurofilaments, can target glioblastoma cells, where it disrupts their microtubules and inhibits their proliferation. We show that this peptide targets NSCs in vitro and in vivo when injected into the cerebrospinal fluid. Although neurosphere formation was not altered by the peptide, the NSC self-renewal capacity and proliferation were reduced and were associated with increased adhesion and differentiation. These results indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide represents a new molecular tool to target NSCs to develop new strategies for regenerative medicine and the treatment of brain tumors. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE 2016;5:1–13*

SIGNIFICANCE

In the present study, the NFL-TBS.40-63 peptide targeted neural stem cells in vitro when isolated from the subventricular zone and in vivo when injected into the cerebrospinal fluid present in the lateral ventricle. The in vitro formation of neurospheres was not altered by the peptide; however, at a high concentration of the peptide, the neural stem cell (NSC) self-renewal capacity and proliferation were reduced and associated with increased adhesion and differentiation. These results indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide represents a new molecular tool to target NSCs to develop new strategies for regenerative medicine and the treatment of brain tumors.

INTRODUCTION

It is a major challenge to treat chronic diseases of the central nervous system, because most active drugs do not pass the blood-brain barrier efficiently to allow sufficient bioavailability amounts in the brain. Another important issue is to deliver the highly bioactive molecules specifically to the desired site of action to avoid secondary or toxic effects. One promising strategy is to inject such molecules in the cerebrospinal fluid to target neural stem cells (NSCs). These cells are located in the neurogenic regions of the adult brain (subventricular zone [SVZ], dentate gyrus of the hippocampus) and along the central canal of the spinal cord [1–8]. The SVZ represents the most important pool of endogenous NSCs in the brain. They are characterized by their capacity to self-renew, form neurospheres in culture, proliferate, and differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes [9–11]. The use of normal or genetically modified NSCs has been described for the treatment of neurodegenerative disorders (Parkinson's, Huntington's, and Alzheimer's diseases, amyotrophic lateral sclerosis), spinal cord

lesions, and malignant glioma [12, 13]. Several studies have also showed the recruitment of endogenous NSCs in several brain disorders. For instance, in patients with multiple sclerosis, endogenous mobilization of NSCs from the SVZ to striatal lesions was observed [14]. Endogenous migration of NSCs to the glioma was also demonstrated [15]. A recent review of clinical trials reported the use of NSCs as a possible treatment of neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis, stroke, and spinal cord injury [16]. Therefore, the capacity to target and manipulate endogenous NSCs represents a promising avenue for regenerative-based therapies to increase their mobilization, stimulate neurogenesis, and avoid the occurrence of side effects [17].

A potential candidate to target NSCs is the NFL-TBS.40-63 peptide, which corresponds to the tubulin-binding site located on the light subunit of neurofilaments [18]. The peptide alone, as well as nanoparticles functionalized with the peptide, can massively enter glioblastoma cells in vitro and in vivo; however, the uptake is very low in healthy cells (astrocytes and neurons) [19–21].

Laboratoire Neurobiologie et Transgenèse, L'Université Nantes, Angers, Le Mans, Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur EA-3143, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

*Contributed equally.

Correspondence: Joël Eyer, Ph.D., Laboratoire Neurobiologie & Transgenèse, L'UNAM, UPRES EA-3143, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment IBS-IRIS, 49033 Angers, France. Telephone: 02-44-68-84-88. E-Mail: joel.eyer@univ-angers.fr

Received August 27, 2015; accepted for publication February 23, 2016.

©AlphaMed Press
1066-5099/2016/\$20.00/0

<http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2015-0221>

Moreover, this peptide disrupts the microtubule network of glioblastoma cells and reduces the tumor volume in animals bearing glioma but has no major toxicity on healthy cells. The peptide did not damage the tissue when injected into healthy brain [19–21]. Recent works have also shown that this peptide promotes the differentiation and maturation of oligodendrocytes derived from newborn rats *in vitro* [22, 23].

In the present study, we investigated the targeting capacity and potential effects of this peptide on NSCs. We show that the peptide is able to target NSCs isolated from newborn and adult animals *in vitro* and *in vivo* after its injection into the lateral ventricle of adult rats. Although the peptide showed a cytotoxic effect on the glioblastoma cells, it has no major effect on NSCs at concentrations less than 10 $\mu\text{mol/l}$. At higher concentrations, the peptide affects their self-renewal and proliferation ability and increases their adhesion and differentiation. Together, these results indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide represents a promising tool for targeting the delivery of biologically active proteins into NSCs and/or manipulating these cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Materials

Primary cultures of NSCs were derived from the SVZ of newborn (1–5 days) and adult (<4 months) Wistar rats, as previously described [24]. The dissociated cells were grown in minimal essential medium- α (Thermo Fisher Scientific Life Sciences, Waltham, MA, <http://www.thermofisher.com>) supplemented with 25 mmol/l D-glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, <http://www.sigmaaldrich.com>), 1 mmol/l sodium pyruvate, 15 mmol/l HEPES, 5% penicillin/streptomycin, 1% B27 (Thermo Fisher Scientific Life Sciences), and 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF; Promega, Madison, WI, <http://www.promega.com>). After 5–7 days, the stem cells formed floating neurospheres.

The NFL-TBS.40-63 peptide (YSSYSAPVSSLSVRRSYSSSSGS) is biotinylated or coupled to 5-carboxyfluorescein (5-FAM) and was synthesized by Millegen (Toulouse, France), Eurogentec (Seraing, Belgium, <http://www.eurogentec.com>), or GeneCust (Dudelange, Luxembourg, <http://www.genecust.com>). The peptides from these three companies showed similar results. A scrambled peptide (NFL-SCR:SLGSPSSSVRASYSRRSYVYSSS) coupled to 5-FAM was used as a control peptide. The composition of the NFL-SCR peptide is the same as the NFL-TBS.40-63 peptide but the sequence is in disorder (GeneCust). These peptides were dissolved in sterile water at a concentration of 1 mmol/l as stock solutions.

Chlorpromazine hydrochloride (50 $\mu\text{mol/l}$), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10 g/ml), and 5-(*N,N*-dimethyl) amiloride hydrochloride (DAM; 1 mmol/l; Sigma-Aldrich) were used to inhibit endocytosis. Wortmannin (100 nmol/l), U0126 (40 $\mu\text{mol/l}$), sunitinib (1 $\mu\text{mol/l}$; Sigma-Aldrich), genistein (400 $\mu\text{mol/l}$; Merck, Kenilworth, NJ, <http://www.merck.com>), and gefitinib (50 $\mu\text{mol/l}$; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, <http://www.scbt.com>) were used to inhibit the signaling pathway implicated in the endocytic machinery. These reagents do not induce major toxicity in cells at these concentrations.

Analysis of Neurosphere Formation and Self-Renewal

The neurosphere-forming properties were analyzed according to a previously described protocol [25] to quantify the number of primary and secondary neurospheres formed in culture. In brief, 5×10^3 SVZ cells were seeded per well in a 24-well plate in media containing

20 ng/ml EGF. The cells were incubated in the absence or presence of increasing concentrations of biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide or with 1 $\mu\text{g/ml}$ colchicine (Sigma-Aldrich). After 5–7 days, the total number of primary neurospheres and the percentage of adherent primary neurospheres were determined in each condition using microscope analysis. For the self-renewal assay, primary neurospheres were collected in each condition, dissociated into 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 using microscope analysis. The morphology of primary neurospheres was observed with an inverted microscope (Leica DMI6000; Leica Biosystems, Nussloch, Germany, <http://www.leicabiosystems.com>) equipped with a CoolSNAP-HQ2 camera and analyzed using MetaMorph, version 7.1.7.0, software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, <http://www.moleculardevices.com>). They were also observed using scanning electron microscopy.

Flow Cytometry (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

The uptake of 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 and NFL-SCR peptides was quantified in NSCs derived from newborn and adult rats. A total of 200–300 neurospheres were seeded in 35-mm dishes and cultured for 30 minutes at 37°C in media containing 5-FAM-labeled peptides. To quench the extracellular signal of the 5-FAM-labeled peptides, 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich) was added before analysis. To investigate the uptake molecular mechanism, neurospheres were preincubated at 4°C for 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 endocytosis and signaling pathway inhibitors for 30 minutes at 37°C, as previously described [21]. Next, 20 $\mu\text{mol/l}$ 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide was added to the cells for 30 minutes at 37°C. Subsequently, after centrifugation (5 minutes at 42g), the cells were dissociated mechanically and washed twice with PBS and then resuspended in 50 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich). The fluorescent-positive viable cells that incorporated the 5-FAM-labeled peptide were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, <http://www.bd.com>). The gating schemes for the flow cytometry analysis of each sample were included in supplemental online Figure 1.

The cell cycle of NSCs was analyzed after incubation for 48 hours with the biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide or with colchicine, and the DNA content was evaluated by flow cytometry. In brief, 200–300 neurospheres were seeded in 35-mm dishes and then treated with increasing concentrations of biotinylated peptide or with 1 $\mu\text{g/ml}$ colchicine for 48 hours at 37°C. The neurospheres were then collected in a microcentrifuge tube. After centrifugation (5 minutes at 42g), the cells were dissociated mechanically and permeabilized with PBS-Tween 0.5% and fixed with ethanol 70% before adding 1 mg/ml RNase (Thermo Fisher Scientific Life Sciences) for 30 minutes at 37°C. The cell suspension was diluted in 10 $\mu\text{g/ml}$ PI before DNA content analysis by flow cytometry to quantify the cells in the G₁, S, and G₂/M phases. The gating schemes for the flow cytometry analysis of each sample are shown in supplemental online Figure 2.

The expression of specific markers was evaluated after treating NSCs with the biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide for 7 days. Typically, 200–300 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% newborn calf serum (NBCS). After dissociation, the cells were incubated with the anti-polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), the

anti-A2B5 antibodies conjugated to *R*-phycoerythrin (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany, <http://www.miltenyibiotech.com>), or the anti-CD90.1-PerCP-Cy5.5 (Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific Life Sciences) for 10 minutes at 4°C, washed, and resuspended in 50 µg/ml PI or with calcein violet AM (Thermo Fisher Scientific Life Sciences). The fluorescent-positive viable cells that expressed the marker were analyzed by flow cytometry. The gating schemes for the flow cytometry analysis of each sample are shown in supplemental online Figure 3.

Cell Viability Assay

NSC viability was determined using the trypan blue (Sigma-Aldrich) exclusion technique. In brief, 200–300 neurospheres were seeded in 24-well plate and then treated with increasing concentrations of biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide or 1 µg/ml colchicine for 72 hours at 37°C. Next, the cells were harvested and dissociated mechanically. The number of viable cells (i.e., those not labeled with trypan blue) was manually counted and quantified by Trypan blue exclusion in each sample using a Zeiss microscope.

CyQUANT Cell Proliferation Assay

To analyze the peptide effect on the proliferation of NSCs, primary neurospheres were dissociated and 5×10^3 cells per well were plated on BD Cell-Tak (3.5 µg/cm² and 1.4 mg/ml; BD Biosciences, San Jose, CA, <http://www.bdbiosciences.com>) on a 96-well microplate. The cells were treated with increasing concentrations of biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide or 1 µg/ml colchicine for 72 hours at 37°C. After 3 washes with PBS, the cells were frozen at –80°C. Finally, the DNA concentration was analyzed using the CyQUANT cell proliferation assay kit (Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific Life Sciences).

Immunofluorescence and Microscopy

The uptake of the 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide was visualized in dissociated NSCs incubated for 30 minutes with 20 µmol/l peptide and then plated on BD Cell-Tak-coated coverslips in 24-well plates (5×10^4 cells per well) for 1 hour. After PBS washing, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and washed three times in PBS, before mounting coverslips with ProLong Gold antifade solution (Thermo Fisher Scientific Life Sciences). NSCs were observed with a confocal microscope (Leica TCS SP8; Leica Biosystems).

To visualize the peptide uptake by NSCs and the possible effect on their microtubule network, 100 neurospheres were plated in a 24-well plate on BD Cell-Tak coverslips in 24-well plates for 24 hours. They were then incubated for 30 minutes with 20 µmol/l 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide to evaluate the percentage of cells containing the peptide or for 6 hours with 40 µmol/l 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide to evaluate the effect of the peptide on the microtubule network. After PBS washing, the cells 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. The neurospheres were then incubated overnight at 4°C with a mouse anti- α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich) 1/1,000 or with a rabbit anti-SOX2 antibody (Thermo Fisher Scientific Life Sciences) 1/80. After three washes in PBS, tubulin or SOX2, respectively, were revealed using Alexa Fluor 568-labeled anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Thermo Fisher Scientific Life Sciences) at 1/200 dilution, for 2 hours.

Neurospheres were washed three times with PBS before adding 3 µmol/l 4'-6-diaminido-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) for 5 minutes. After PBS washing, coverslips were mounted with a ProLong Gold antifade solution. Finally, neurospheres were observed with an inverted fluorescent microscope (Leica DMI6000; Leica Biosystems) equipped with a CoolSNAP-HQ2 camera and analyzed using MetaMorph, version 7.1.7.0, software (Molecular Devices), or with a confocal microscope (Leica TCS SP8; Leica Biosystems).

The morphology of neurospheres was observed by incubating dissociated NSCs on 10 µg/ml of poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)-coated coverslips in 24-well plates (5×10^3 cells per well). The NSCs were treated with 0, 20, or 60 µmol/l biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide for 7 days to obtain neurospheres. Fluorescent neurospheres were obtained following washes, fixation, permeabilization, and saturation, as previously described, and incubated overnight at 4°C with rabbit anti-nestin antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, <http://www.rndsystems.com>) 1/100 and Alexa Fluor 568 anti-rabbit antibody (Thermo Fisher Scientific Life Sciences) 1/200 for 2 hours. After PBS washing, the neurospheres were incubated with 3 µmol/l DAPI for 5 minutes, and coverslips were mounted with a ProLong Gold antifade solution. They were finally observed with a fluorescent microscope (Leica DMR; Leica Biosystems) equipped with a Scion Corporation camera (BioVision Technologies, Frederick, MD, <http://www.biovision-technologies.com>) and analyzed with ImageJ, version 1.43, software (NIH, Bethesda, MD, <http://www.imagej.nih.gov>). Treated neurospheres were also prepared for scanning electron microscopy observation, after washes with 0.2 mol/l cacodylate buffer (pH 7.4), fixation with the cacodylate buffer supplemented with 2.5% glutaraldehyde for 16 hours at 4°C, and, finally, washes with this buffer.

RNA Isolation and Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analysis

The relative expression level of lineage-specific genes (*SSEA-1*, *NESTIN*, *S100 β* , *GFAP α* , *DCX*, *TUBB3*, *CNP*, and *MBP*), described in Table 1, was quantified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. The sequence of the primers were optimized by Plateforme d'Analyses Cellulaire et Moléculaire, University of Angers. The RT-PCR experimental protocol and the gene expression analysis were performed by this platform. Typically, dissociated NSCs (5×10^5 cells) were treated for 7 days at 37°C with or without biotinylated NFL-TBS.40-63 peptide (20 µmol/l and 60 µmol/l) or with 1% NBBS. After cell scraping, washing with PBS, and cryopreservation, total RNA was extracted and purified using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France, <http://www.qiagen.com>) and then converted into cDNA using the SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Life Sciences). The cDNAs were purified (Qiaquick PCR purification kit; Qiagen), and quantitative RT-PCR analysis was performed using Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas; Thermo Fisher Scientific Life Sciences) and primer mix. The amount of cDNA was normalized using the rat-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA. The gene relative expression levels were compared with the control condition.

Stereotaxic Injection of the Peptide and In Vivo Investigation

All experimental procedures and animal care were achieved in conformity with the guidelines of the French Government, with the approval of the Local Committee for Ethics on Animal Experiments

Table 1. Primer sequences used for reverse transcription-polymerase chain reaction

Gene	Full name	Description	NM accession no.
<i>SSEA-1</i>	SSEA-1	Carbohydrate epitope (NSC-specific)	NM_002219
<i>NESTIN</i>	Nestin	Intermediate filament (NSC-specific)	NM_001308239.1
<i>S100β</i>	S100β	Calcium binding protein (astrocyte-specific)	NM_013191.1
<i>GFAPα</i>	Glial fibrillary acidic protein α	Intermediate filament (astrocyte-specific)	NM_017009
<i>DCX</i>	Doublecortin	Microtubule-associated protein (neuron-specific)	NM_053379
<i>TUBB3</i>	Tubulin, β3 class III	Microtubule element (neuron-specific)	NM_139254.2
<i>CNP</i>	CNPase	Myelin-associated enzyme (oligodendrocyte-specific)	NM_012809.2
<i>MBP</i>	Myelin basic protein	Major constituent of myelin sheath (oligodendrocyte-specific)	NM_001025289.1

Abbreviations: CNPase, 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase; NM, natural mRNA; SSEA-1, stage-specific embryonic antigen 1.

(Comité d'Ethique en Expérimentation Animale des Pays-de-la-Loire). The peptide localization in the subventricular zone of adult Wistar rats was analyzed following its stereotaxic injection according to a previously described protocol [19].

Adult Wistar female rats were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine 10% (80 mg/kg) and xylazine 2% (10 mg/kg). The rats were then placed on a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, <http://www.kopfinstruments.com>), 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 or 2 mm lateral to the bregma to inject in the right lateral ventricle or in the subventricular zone, respectively). A 20-μl volume of the 5-FAM peptide 1 mmol/l was injected using a 10-μl Hamilton syringe (Hamilton glass syringe 70 RN) with a 32-gauge needle (VWR International, Radnor, PA, <http://www.us.vwr.com>) at a depth of 4.3 mm from the outer border of the cranium and connected through a cannula to a 100-μl Hamilton 22-gauge syringe (Hamilton glass syringe 810 RN; VWR International) containing the peptide. A slow infusion was performed by convection-enhanced delivery with an osmotic pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, <http://www.harvardapparatus.com>) at a flow rate of 0.5 μl/minute. After the injection and slow withdrawal of the needle (0.5 mm/minute), the head skin was sutured. The rats were killed 1, 24, or 48 hours after the injection, and the brains were removed and rapidly frozen using isopentane and liquid nitrogen. They were conserved in a −80°C freezer before sectioning them using a Leica cryostat (Leica Biosystems).

For immunohistochemistry, the brain sections (12 μm thick) were fixed with cold methanol for 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-glial fibrillary acidic protein (GFAP), mouse anti-vimentin (Sigma-Aldrich), mouse anti-nestin (R&D Systems), mouse anti-βIII tubulin (Sigma-Aldrich), rabbit anti-CD133 (Proteintech, Rosemont, IL, <http://www.ptglab.com>), or rabbit anti-Olig2 (Abcam, Cambridge, U.K., <http://www.abcam.com>) antibodies diluted 1/200, 1/200, 1/50, 1/200, 1/100, and 1/100, respectively, in PBS with 5% bovine serum albumin. After washing three times in PBS, primary antibodies were revealed using Alexa Fluor 568-labeled anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Thermo Fisher Scientific Life Sciences) at a 1/200 dilution in PBS containing 5% bovine serum albumin. They were incubated for 90 minutes at room temperature and then washed in PBS. The brain sections were then counterstained with 3 μmol/l DAPI for 5 minutes and rinsed twice with PBS. Finally, the slides were mounted with the ProLong Gold antifade reagent and observed with an inverted fluorescent

microscope (Leica DMI6000; Leica Biosystems) equipped with a CoolSNAP-HQ2 camera and analyzed with the MetaMorph, version 7.1.7.0, software (Molecular Devices) or with a confocal microscope (Leica TCS SP8; Leica Biosystems).

Statistical Analysis

All experiments were repeated at least three times. For fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis, 20,000 events per sample were analyzed. The results are presented as the mean ± SEM, and the data are presented as bar graphs. Statistical analysis was performed with the Student *t* test using Prism, version 3.00, software (GraphPad, San Diego, CA, <http://www.graphpad.com>).

RESULTS

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

In Vitro Peptide Uptake in NSCs Derived From Newborn Rats Occurs Through a Passive Transport

NSCs isolated from the SVZ from newborn rats were incubated with increasing concentrations of 5-FAM-labeled peptide for 30 minutes, and the peptide incorporation was evaluated using the sensitive FACS technique. Figure 1A shows a typical dose-dependent uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide in NSCs. At 5 μmol/l 5-FAM-labeled peptide, 38.72% ± 9.08% of NSCs internalized the peptide. At 40 μmol/l, almost all NSCs were labeled with the peptide (91.07% ± 5.13%). When 0.4% trypan blue was added before the FACS reading to quench the surface-bound fluorescence of the 5-FAM-labeled peptide. The results confirmed the intracellular fluorescence of the peptide (Fig. 1A). These results were also confirmed by confocal microscopy examination of dissociated NSCs or neurospheres (Fig. 1B, 1C). The observations clearly indicated that the peptide is mainly internalized in NSCs located in the neurosphere center (Fig. 1C).

The specific uptake of the peptide by NSCs was also confirmed using the stem cell-specific marker (SOX2). Figure 1D clearly shows colocalization of the FAM-fluorescent peptide (green) and the SOX2-labeled NSCs (red), which are mainly localized in the center of the neurosphere (Fig. 1D). As a control, we used a scrambled peptide (NFL-SCR), which contains the same amino acids as the

NFL-TBS.40-63 peptide but in a disorganized sequence. Previous studies showed that the NFL-SCR peptide enters much less in glioblastoma cells compared with the massive uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide [19]. Using FACS analysis, Figure 1E shows that the NFL-SCR peptide uptake in NSCs is significantly lower than that of the NFL-TBS.40-63 peptide, with $51.23\% \pm 5.23\%$ uptake for NFL-SCR and $87.57\% \pm 3.75\%$ for NFL-TBS.40-63 (at $20 \mu\text{mol/l}$ peptide). These results have confirmed the importance of the sequence and structure of the NFL-TBS.40-63 peptide for its selective entry into NSCs, which was also demonstrated for glioblastoma cells [19, 26].

Next, we investigated the molecular mechanism responsible for the selective uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide. In particular, we evaluated endocytosis and direct translocation, two main pathways known for the uptake of cell-penetrating peptides [27]. The cellular uptake was first evaluated by incubating the cells at 4°C or in an ATP-depleted buffer for 30 minutes before adding the peptide. Then, the peptide was added, and the cells were further incubated in the same conditions for 30 minutes. In these conditions, it is known that endocytosis, an active transport (energy- and temperature-dependent), is blocked, but direct translocation, a passive transport (energy- and temperature-independent), is not [28, 29]. The peptide uptake was not significantly affected by incubation at 4°C or in the ATP-depletion buffer, indicating that the internalization of the peptide in NSCs occurs mainly through a passive mechanism (Fig. 1F). To further confirm the passive transport of the peptide into NSCs, we also tested a panel of inhibitors for each endocytic pathway, as well as inhibitors of signaling pathways involved in the endocytic mechanism. Chlorpromazine, PMA, and DAM inhibit clathrin-dependent endocytosis, caveolin-dependent endocytosis, and micropinocytosis, respectively [30–32]. Genistein inhibits receptor tyrosine kinase activation, sunitinib inhibits VEGF receptor/platelet-derived growth factor receptor activation, and gefitinib inhibits EGF receptor activation. The endocytosis-associated PI3K/Akt and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are inhibited with Wortmannin and U0126, respectively [33–36]. Figure 1G shows that NFL-TBS.40-63 peptide uptake is poorly affected by the presence of these inhibitors and confirms that endocytosis is not responsible for the internalization of this peptide in NSCs.

NFL-TBS.40-63 Peptide Has No Major Effect on the Cell Cycle or Microtubule Network of NSCs Derived From Newborn Rats but Decreases Their Viability

To investigate the possible effects of the NFL-TBS.40.63 peptide on NSCs, we analyzed their cell cycle using FACS. Apart from colchicine, used as a positive control to disrupt the microtubule network, the cell cycle of NSCs was not significantly affected by the presence of the NFL-TBS.40-63 peptide (60%–65% of cells in G_1 phase, 10% in S phase, and 7% in G_2/M phases; Fig. 2A). These results clearly show that in contrast to glioblastoma cells [18], the peptide has no major effect on the cell cycle of NSCs. Moreover, examination with the inverted fluorescent microscope (Leica DMI6000; Leica Biosystems) indicates that the cell shape and microtubule network of NSCs are not affected by the peptide, and colchicine provokes profound alterations (Fig. 2B).

To evaluate the viability of NSCs in the presence of increasing concentrations of the peptide, we used the trypan blue exclusion technique (trypan blue penetrates only in dead cells). Typically, in the presence of low concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide (10 and $20 \mu\text{mol/l}$), no major effect on NSC viability is observed after 72 hours at 37°C (Fig. 2C). However, the number of viable NSCs was significantly reduced following their incubation with

higher concentrations of the peptide. At $40 \mu\text{mol/l}$ peptide, only $44.71\% \pm 7.046\%$ of the cells were viable (compared with $71.36\% \pm 7.923\%$ of viable cells in the control condition). A strong cytotoxic effect was observed with $100 \mu\text{mol/l}$ NFL-TBS.40-63 peptide (only $29.53\% \pm 6.536\%$ of NSCs were viable). As a positive control, we incubated NSCs with $1 \mu\text{g/ml}$ colchicine, which provokes a strong cytotoxic effect (only $15.70\% \pm 2.277\%$ of viable cells; Fig. 2C).

Other Effects of the NFL-TBS.40-63 Peptide on NSCs Derived From Newborn Rats

When NSCs are exposed to increasing concentrations of the peptide, the number of primary neurospheres (manually counted using the inverted Leica microscope) was not profoundly affected, except at $100 \mu\text{mol/l}$ (Fig. 3A). In contrast, when primary neurospheres were first cultured in the presence of the peptide and were then dissociated and incubated only in the normal culture medium, NSCs generated a significantly lower number of secondary neurospheres compared with the control (Fig. 3B). As a positive control, NSCs were incubated with $1 \mu\text{g/ml}$ colchicine, which disrupts both primary and secondary neurosphere formation (Fig. 3A, 3B). Together, these results show that the peptide has no major effect on the formation of primary neurospheres (except at high concentrations) but affects their self-renewal.

The self-renewal disruption of NSCs was associated with a significant decrease in their proliferation when incubated with the peptide (Fig. 3C). Colchicine also significantly decreased the NSC proliferation (Fig. 3C); however, unlike the peptide, this effect was associated with cell cycle alteration and microtubule disruption (Fig. 2A, 2B).

When NSCs were treated for 7 days with increasing concentrations of peptide, the typical spherical shape of neurospheres was modified into a more flattened shape, surrounded by increased adherent cells and cellular extensions. This phenomenon was first observed at $20 \mu\text{mol/l}$ and was amplified with higher concentrations of the peptide (Fig. 3D). The number of adherent neurospheres was significantly increased at peptide concentrations of $40 \mu\text{mol/l}$ and $60 \mu\text{mol/l}$ and no floating neurospheres could be observed (Fig. 3E). Using scanning electron microscopy, we confirmed this atypical shape of the adherent NSCs, together with multiple cellular extensions, compared with the typical spherical shape of NSCs incubated without the NFL-TBS.40-63 peptide (Fig. 3F; supplemental online Fig. 3). Some of these adherent cells were more elongated with high peptide concentrations, and they still expressed nestin, which is the intermediate filament expressed specifically by NSCs [37] (Fig. 3G).

The increased attachment of NSCs at high peptide concentrations is related to a weak decrease of the PSA-NCAM expression, which was also observed when NSCs were incubated with 1% NBCS (Fig. 3H). Finally, higher amounts of glial and neuronal progenitor markers (A2B5 and CD90, respectively) were detected by FACS when NSCs were incubated with increasing concentrations of the peptide (Fig. 3I).

Interestingly, RT-PCR analysis revealed that the lineage of NSC differentiation was differently affected after incubation with the NFL-TBS.40-63 peptide for 7 days. A significant downward expression of the astrocyte-lineage specific genes (*S100 β* and *GFAP α*) is observed when primary NSCs were incubated with 20 or $60 \mu\text{mol/l}$ the NFL-TBS.40-63 peptide, but these genes were overexpressed when NSCs were incubated with serum (Fig. 3J). Moreover, for some genes, differential expression was observed depending on

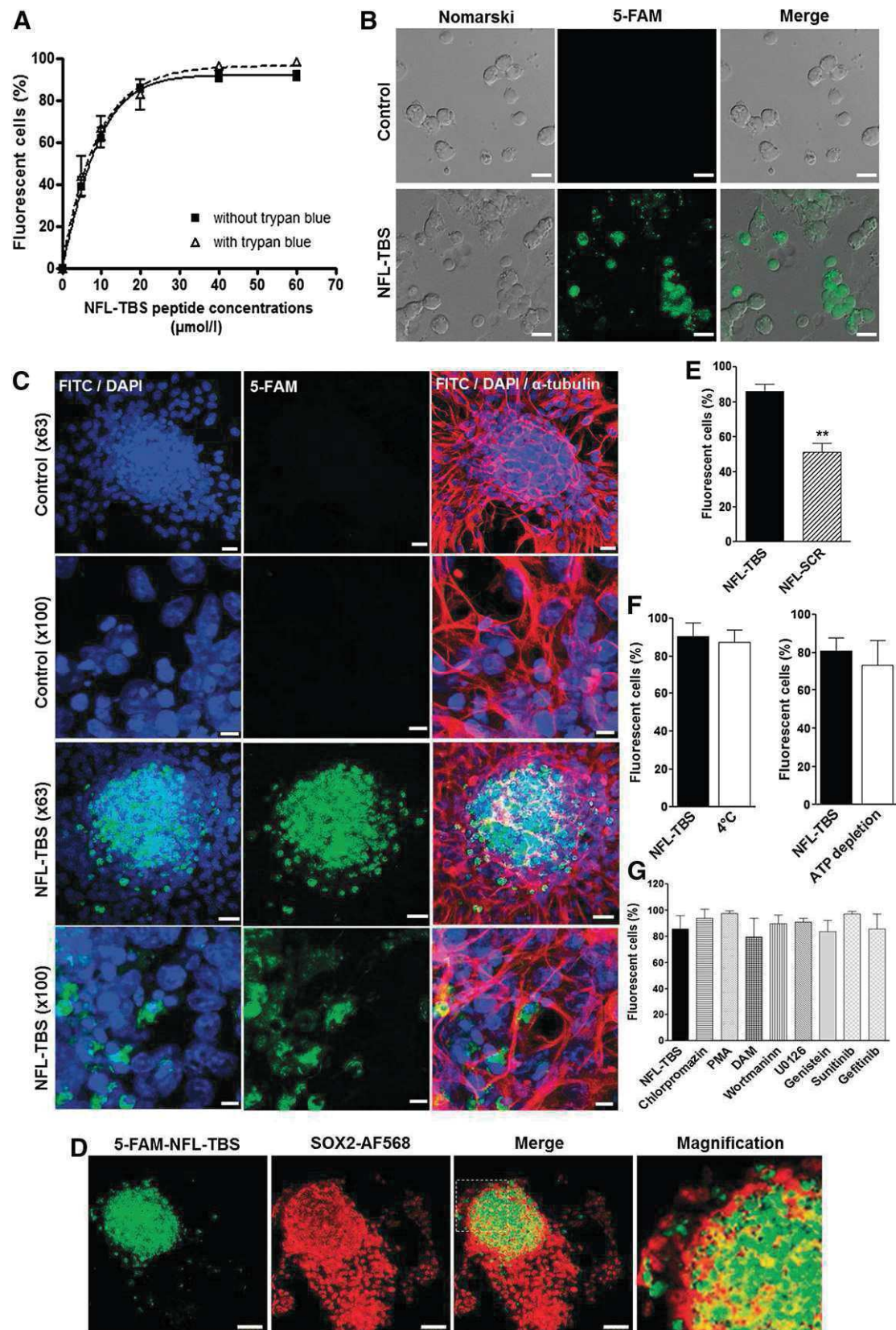


Figure 1. Uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide in neural stem cells from newborn rats. **(A):** The percentage of neural stem cells (NSCs) incorporating 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide, with (dark curve) and without (dotted curve) 0.4% trypan blue, was analyzed using the fluorescence-activated cell sorting technique. **(B):** Confocal microscopy of NSCs incubated with or without 20 $\mu\text{mol/l}$ 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (Figure legend continues on next page.)

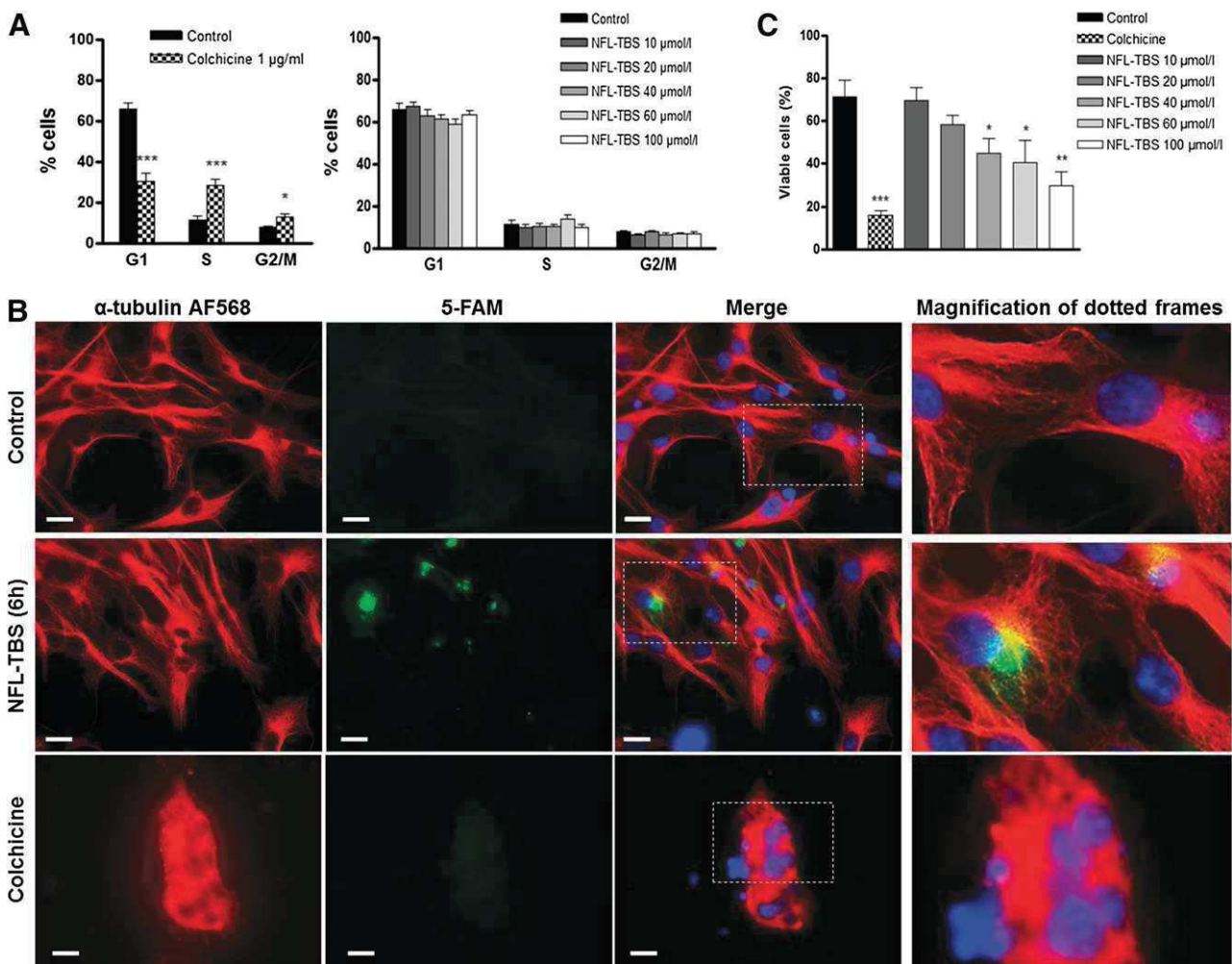


Figure 2. The NFL-TBS.40-63 peptide has no detectable effect on the microtubule network and reduces the viability of neural stem cells. **(A):** The percentages of neural stem cells (NSCs) at G₁, S, or G₂/M phases of the cell cycle after treatment with colchicine or increasing concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide. **(B):** NSCs were incubated with 20 $\mu\text{mol/l}$ 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (green) and immunostained to reveal the microtubule network with an anti- α -tubulin (red). The nuclei were stained with 4' 6-diaminido-2-phenylindole (blue). A magnification of a region of interest is included (dotted framed images). Scale bars = 20 μm . **(C):** Percentages of viable NSCs after treatment with colchicine or increasing concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide. Data are presented as mean \pm SEM. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$. Abbreviation: 5-FAM, 5-carboxyfluorescein.

the peptide concentration. For instance, with the NFL-TBS.40-63 peptide at 20 $\mu\text{mol/l}$, an increased expression of stem cell markers (*SSEA-1* and *NESTIN*), neuronal-lineage markers (*DCX* and *TUBB3*), and oligodendrocyte-lineage markers (*CNP*) was observed. However, at a higher concentration (60 $\mu\text{mol/l}$), the peptide reduces the expression of *DCX* and *TUBB3*, the markers of mature neurons. Finally, at high concentration, the peptide promoted an increased expression of *CNP*, a marker of premature oligodendrocytes. In contrast, the expression of *MBP*, a marker of mature oligodendrocytes, was downregulated (Fig. 3J). Together, these results indicate

that the NFL-TBS.40-63 peptide modulates the different NSC differentiation pathways in a concentration-dependent fashion.

In Vitro and In Vivo Peptide Uptake in NSCs Derived From Adult Rats

We also analyzed the NFL-TBS.40-63 peptide uptake in adult NSCs in vitro by flow cytometry and in vivo by stereotaxic injection of the peptide in the subventricular zone or in the lateral ventricle of adult rats, followed by immunohistochemistry.

(Figure legend continued from previous page.)

(C): Confocal microscopy of neurospheres incubated without (control) or with 20 $\mu\text{mol/l}$ 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (green) immunostained with anti- α -tubulin (red) to reveal the microtubule network. The nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars = 20 μm (original magnification $\times 63$) and 5 μm (original magnification $\times 100$). **(D):** Confocal microscopy of neurospheres incubated with 20 $\mu\text{mol/l}$ 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (green) immunostained with an anti-SOX2 antibody (red) to reveal stem cells. The nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars = 50 μm . **(E):** Percentages of NSCs that incorporate 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 or scrambled peptides (20 $\mu\text{mol/l}$). Percentages of NSCs that incorporate 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (20 $\mu\text{mol/l}$), after pretreatment in an ATP-depleted buffer or at 4°C **(F)** or with different endocytosis and signaling pathway inhibitors **(G)**. Data are presented as mean \pm SEM. **, $p < .01$. Abbreviations: 5-FAM, 5-carboxyfluorescein; DAM, 5-(*N,N*-dimethyl) amiloride hydrochloride; DAPI, 4' 6-diaminido-2-phenylindole; FITC, fluorescein isothiocyanate; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

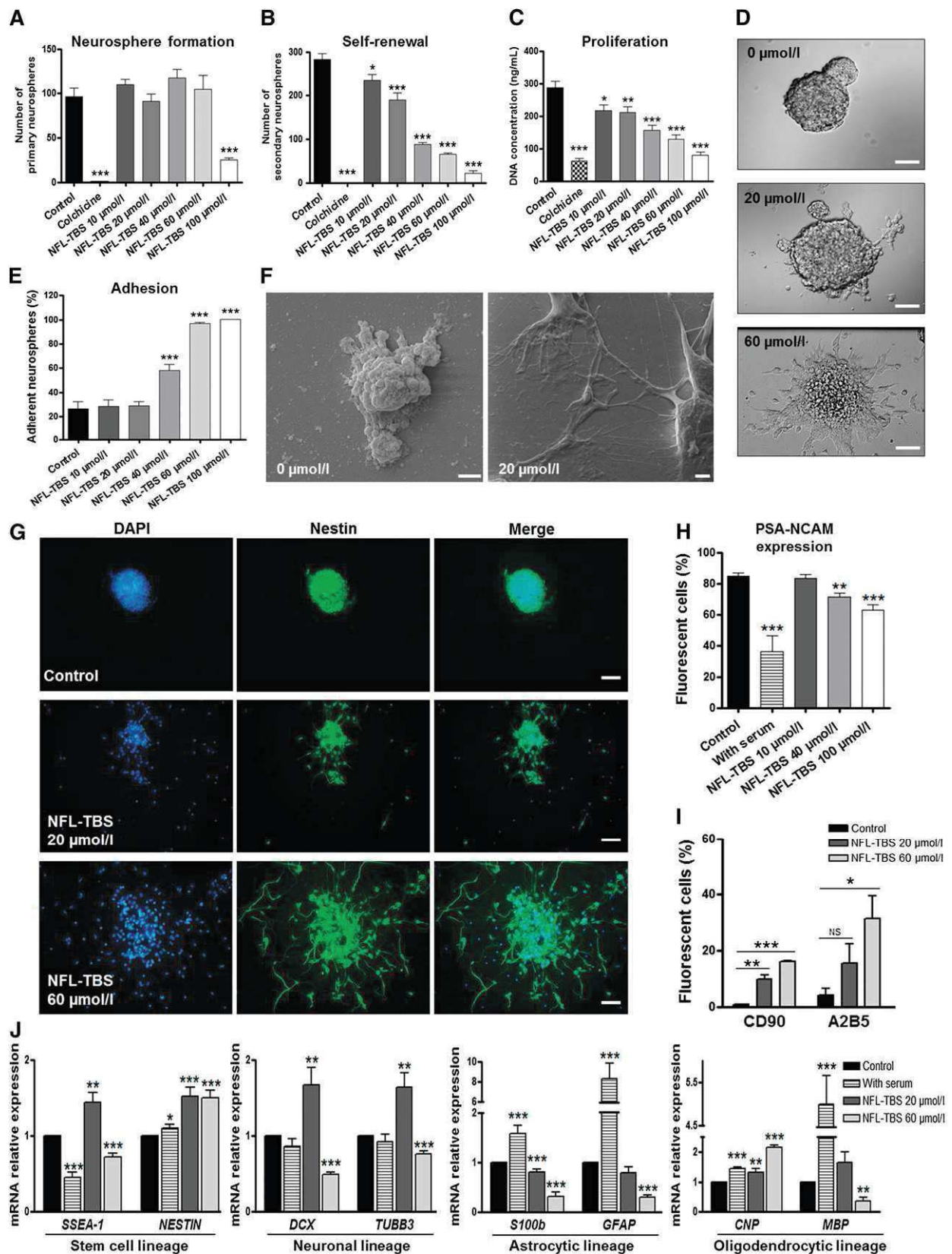


Figure 3. Effects of the NFL-TBS.40-63 peptide on neural stem cell properties. **(A):** Number of primary neurospheres formed after incubation of neural stem cells (NSCs) with colchicine or increasing concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide. **(B):** Self-renewal was evaluated by manually counting the numbers of secondary neurospheres after dissociation of the primary neurospheres that were previously treated with colchicine or (Figure legend continues on next page.)

The NSCs were isolated from the SVZ of adult rats and incubated with increasing concentrations of 5-FAM-labeled peptide for 30 minutes. The incorporation evaluated by the sensitive FACS technique showed a dose-dependent uptake of the peptide in these cells, with typically $92.74\% \pm 2.51\%$ of cells containing the peptide at $40 \mu\text{mol/l}$, results similar to the uptake observed for NSCs isolated from newborn rats (Figs. 1A, 4A).

The possibility to target *in vivo* the uptake of the peptide by adult NSCs was then tested. Typically, when the NFL-TBS.40-63 peptide ($20 \mu\text{l}$, at 1 mmol/l) is directly injected in the subventricular zone, 48 hours later, the peptide was colocalized mainly with the neural stem cell marker (CD133) but poorly or not at all with differentiated cells (astrocytes [GFAP], oligodendrocytes [Olig 2], and neurons [β III-tubulin; Fig. 4B).

The NFL-TBS.40-63 peptide ($20 \mu\text{l}$, at 1 mmol/l) was also injected in the right lateral ventricle of adult rats, and its localization was examined 1 and 24 hours after its injection (Fig. 5A). The SVZ was separated from the lateral ventricles by a layer of ciliated ependymal cells that express vimentin, with GFAP-expressing cells in the subependymal zone [7]. NSCs can be recognized with the anti-nestin antibody. The brain sections revealed that 1 hour after its injection, the peptide was localized in the right lateral ventricle, in the ependymal cells of the SVZ, and in the subependymal zone (Fig. 5A). At high magnification, confocal microscope analysis indicated that the peptide is present in ependymal cells (vimentin-positive cells), and some amount of peptide can cross the ependymal barrier to penetrate the subependymal zone (GFAP-positive cells), where NSCs and progenitors are found (nestin-positive cells), without causing detectable cytotoxicity, even 24 hours later. When other areas of the brain were examined at different time points (typically 24 hours later; Fig. 5B) and at the studied concentration ($20 \mu\text{l}$, at 1 mmol/l), the peptide was found only in the subventricular zone close to the right lateral ventricle, but no peptide was observed in the other brain areas (left lateral ventricle, striatum, olfactory bulbs, and hippocampus).

DISCUSSION

In the present study, we showed that the NFL-TBS.40-63 peptide is taken up by a high percentage of NSCs derived from newborn and adult rats through a dose-dependent uptake, as already described for glioblastoma cells [19]. Recent studies also showed *in vitro* peptide uptake by astrocytes and neurons but at a much lower amount compared with glioblastoma cells [18, 19]. However, when injected in the striatum of normal rats, the peptide is not found in healthy tissue [19]. These observations were confirmed after the injection of the peptide directly in the subventricular zone, where the peptide only colocalized with NSCs but not with differentiated neural cells. Recent studies also

indicated that the peptide can penetrate *in vitro* in oligodendrocytes, preferentially differentiated oligodendrocytes than progenitors and can promote their growth and survival [23]. Taken together, these data indicate that the NFL-TBS.40-63 peptide massively targets glioblastoma and NSCs both *in vitro* and *in vivo*, but it can also penetrate in low amounts in other type of neural cells. *In vivo*, when injected in the lateral ventricle, the NFL-TBS.40-63 peptide is found in vimentin-positive ependymal cells and can cross the ependymal wall to target NSCs that are nestin-positive (Fig. 5). Finally, when the peptide is directly injected into the subventricular zone, it preferentially targets CD133-positive NSCs compared with other neural cells (Fig. 4).

As previously suggested, the high proliferative activity of glioblastoma cells could account for the massive internalization of the peptide; however, interestingly, the uptake molecular mechanism in NSCs was fundamentally different from that of glioblastoma cells. In glioblastoma cells, the peptide is internalized mainly by endocytosis [21], and in NSCs, 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. It indicates that the peptide uses a unique entry pathway that is different from other cell-penetrating peptides, such as R8 and Tat, which transduce in induced pluripotent stem cells through macropinocytosis, an endocytic pathway [38]. One possibility could be that a particular composition of these cells for lipids or phospho-lipids that might modulate the translocation of the peptide [39, 40]. Moreover, when injected in the lateral ventricle of adult rats, the NFL-TBS.40-63 peptide is located in the ependymal layer and a part of it in the subependymal area, showing that the peptide can also enter *in vivo* in the SVZ to target NSCs. It is important to note that the ependymal cells of the SVZ express CD133, a stem cell marker, and can also represent a population of NSCs in the SVZ [41]. To our knowledge, the present study is the first time that a peptide has been shown to enter so specifically and massively *in vitro* and *in vivo* in NSCs.

As previously described, the NFL-TBS.40-63 peptide has several specific effects on glioblastoma cells, in particular the disruption of their microtubule network associated with a decrease of proliferation, migration, and viability at low peptide concentrations (from 5 to $10 \mu\text{mol/L}$) [18, 19]. Such a disruption of the microtubule network and, consequently, the alteration of the cell cycle were not observed in NSCs. Tubulin immunostaining in NSCs revealed a normally organized microtubule network after peptide incubation. Longer treatment with the peptide did not affect the cell cycle of NSCs. This suggests that the peptide interacts with a tubulin strongly expressed in glioblastoma cells that is absent or at low concentration in healthy cells. High levels of β III-tubulin were found in glioblastoma, and β II-tubulin was expressed mainly in NSCs [42, 43].

(Figure legend continued from previous page.)

increasing concentrations of peptide. **(C):** Proliferation was evaluated by measuring the DNA concentration of NSCs treated with colchicine or increasing concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide. **(D):** Morphology of neurospheres after incubation of NSCs without or with 20 or $60 \mu\text{mol/l}$ NFL-TBS.40-63 peptide. Scale bars = $30 \mu\text{m}$. **(E):** Percentages of adherent primary neurospheres after incubation of NSCs with increasing concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide. **(F):** Scanning electron microscopy of NSCs treated without or with $20 \mu\text{mol/l}$ NFL-TBS.40-63 peptide. Scale bars = $2 \mu\text{m}$. **(G):** Primary neurospheres, treated without (control) or with 20 or $60 \mu\text{mol/l}$ NFL-TBS.40-63 peptide, were immunostained with anti-nestin (green) and DAPI (blue). Scale bars = $40 \mu\text{m}$. Percentages of NSCs that expressed PSA-NCAM **(H)**, CD90, or A2B5 **(I)** after treatment with increasing concentrations of the NFL-TBS.40-63 peptide or 1% new born calf serum (serum). Data are presented as mean \pm SEM. **(J):** The relative expression level of *SSEA-1*, *NESTIN*, *S100 β* , *GFAP α* , *DCX*, *TUBB3*, *CNP*, and *MBP* was quantified via quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis in NSCs treated without (control) or with $20 \mu\text{mol/l}$ and $60 \mu\text{mol/l}$ the NFL-TBS.40-63 peptide or with 1% new born calf serum (serum). The gene relative expression levels were compared with the control condition. Data are presented as mean \pm SEM. *, $p < .05$; **, $p < .01$; ***, $p < .001$. Abbreviations: DAPI, 4'-6-diamidino-2-phenylindole; PSA-NCAM, polysialylated-neural cell adhesion molecule.

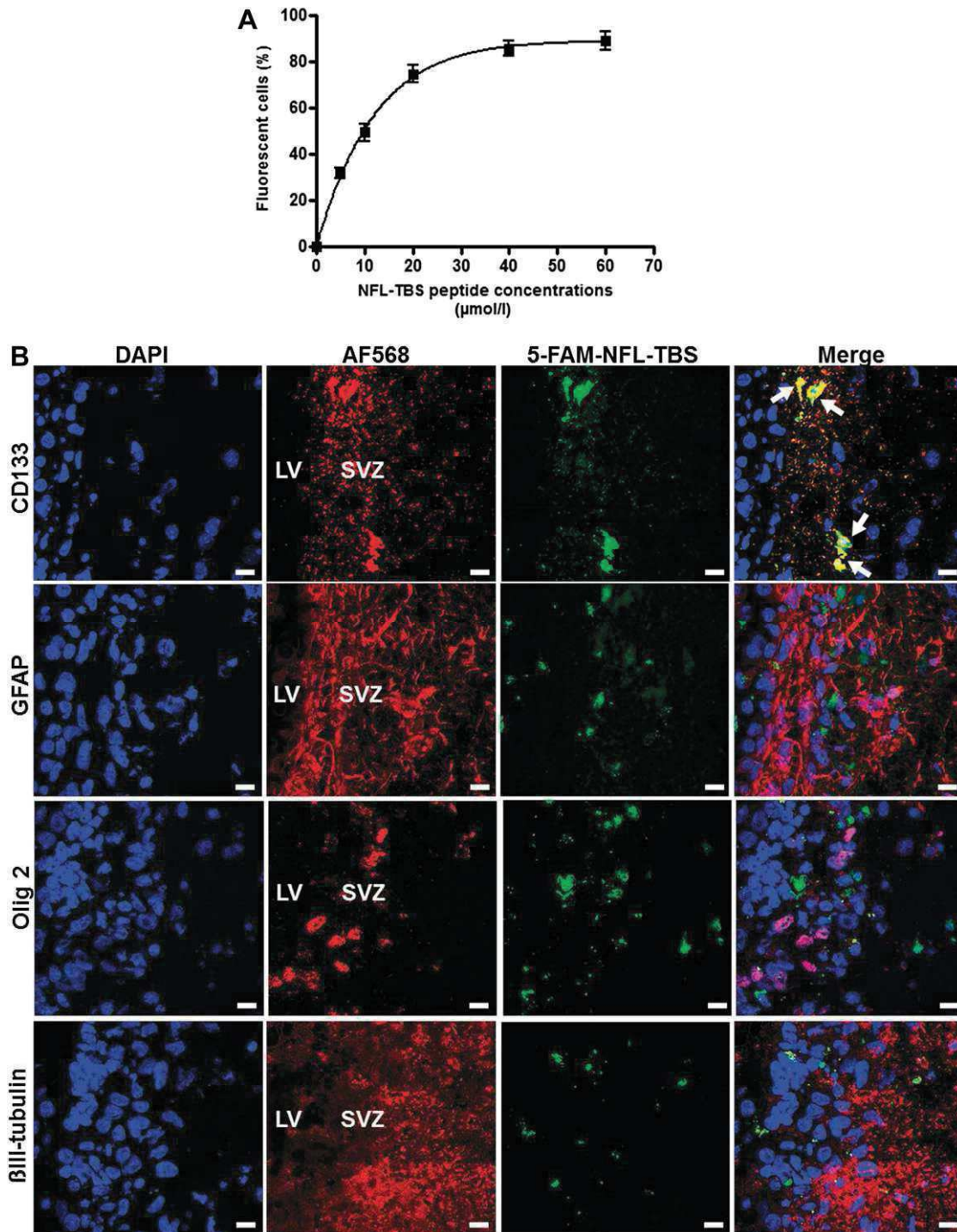


Figure 4. In vitro and in vivo uptake of the NFL-TBS.40-63 peptide in neural stem cells (NSCs) from adult rats. **(A):** Percentages of adult NSCs that incorporated the 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide. Data are presented as mean \pm SEM. **(B):** Confocal microscope localization of the 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (green) after its injection in the SVZ of adult rats. At 48 hours after peptide injection, immunohistochemistry was performed to reveal neural stem cells (CD133; red), astrocytes (GFAP; red), oligodendrocytes (Olig 2; red), neurons (β III-tubulin; red), and nuclei (DAPI; blue). White arrows indicate colocalization of the peptide with NSCs. Scale bars = 10 μm . Abbreviations: 5-FAM, 5-carboxyfluorescein; DAPI, 4'6-diaminido-2-phenylindole; GFAP, glial fibrillary acidic protein; LV, lateral ventricle; SVZ, subventricular zone.

However, the viability of NSCs is affected at high concentrations of the peptide, as observed in glioblastoma cells, but no major toxicity was observed in other healthy neural cells at high peptide concentrations (100 $\mu\text{mol/l}$ and greater) [19]. Recent work has shown a beneficial effect of the peptide on the maturation and

differentiation of oligodendrocytes, as well as their protection against lysophosphatidylcholine treatment [22, 23].

Finally, we investigated the effects of the NFL-TBS.40-63 peptide on neurosphere formation, self-renewal proliferation, and differentiation. When incubated in serum-free medium and EGF,

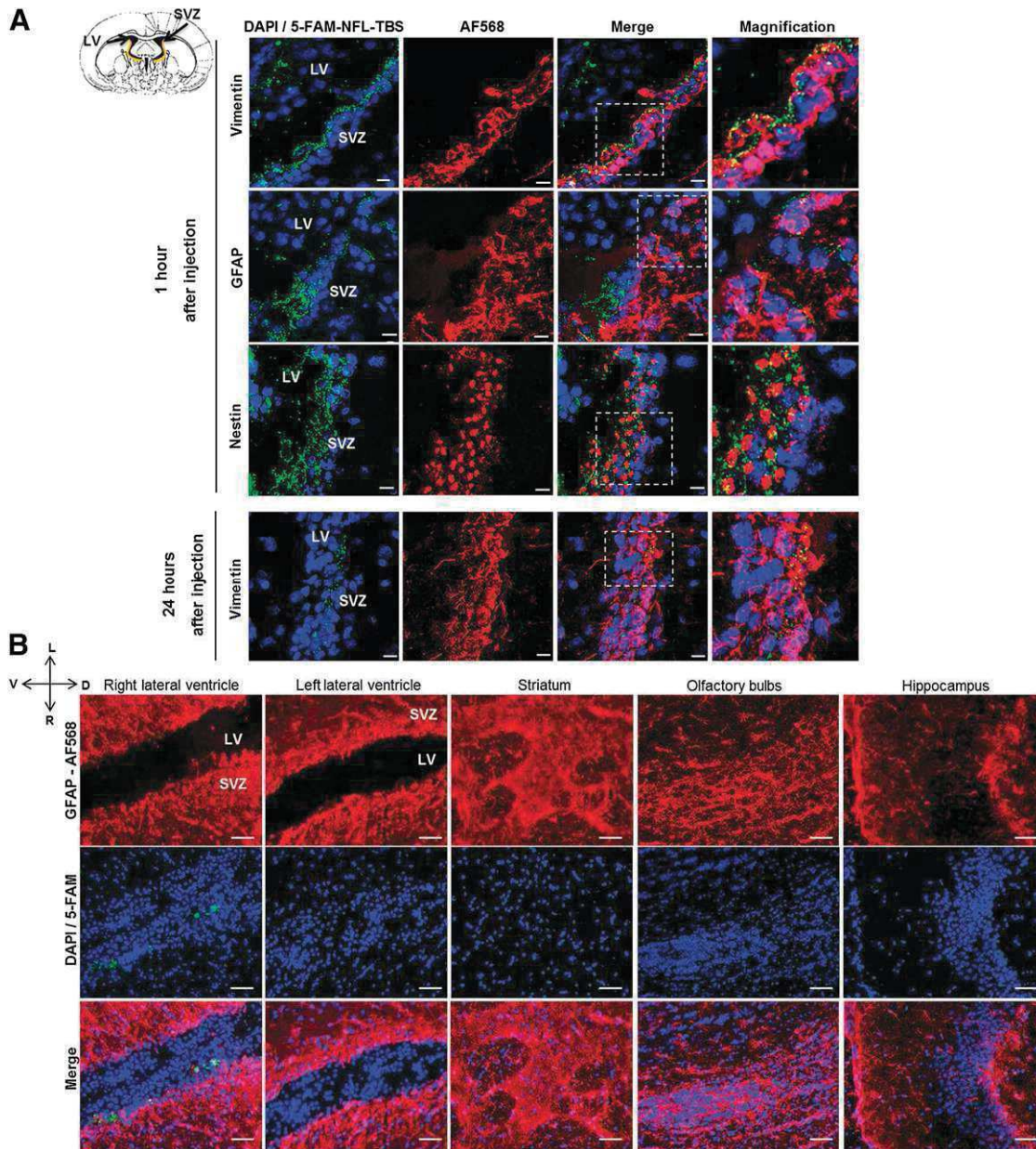


Figure 5. In vivo localization of the NFL-TBS.40-63 peptide after injection in the right lateral ventricle of adult rats. **(A):** Confocal microscope localization of the 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (green) in the subventricular zone of adult rats 1 and 24 hours after its injection in the right lateral ventricle. Immunofluorescence analysis of vimentin (red; ependymal cells), GFAP (red; subependymal cells), nestin (red; neural stem cells), and DAPI (blue). Scale bars = 10 μm . **(B):** Confocal microscope localization of the 5-FAM-labeled NFL-TBS.40-63 peptide (green) in different brain areas after injection in the right lateral ventricle. Immunohistochemistry was performed to reveal astrocytes (GFAP; red) and DAPI (nuclei; blue). Scale bars = 50 μm . Abbreviations: 5-FAM, 5-carboxyfluorescein; D, dorsal; DAPI, 4'6-diaminido-2-phenylindole; GFAP, glial fibrillary acidic protein; L, left; LV, lateral ventricle; R, right; SVZ, subventricular zone; V, ventral.

NSCs proliferated and formed typical neurospheres. After dissociation, secondary spheres were formed from NSCs. Our results show that the peptide has no major effect on primary neurosphere formation, except at very high concentrations (100 $\mu\text{mol/l}$). Moreover, at high concentrations (greater than 40 $\mu\text{mol/l}$), the peptide disturbs the self-renewal capacity of NSCs, decreasing the number of secondary neurospheres compared with untreated cells. This effect is associated with fewer viable cells and decreased expression of PSA-NCAM, together with increased cell attachment. The PSA-NCAM protein characterizes the NSC growth with limited cell-cell interactions and lower interactions

of cells with the extracellular matrix [44]. Increased NSC adhesion was also reported when the cells were cultured on phospholipid bilayers functionalized with different RGD-containing peptides, probably because of increased peptide interactions with receptors on the NSC surface [45]. Unlike these RGD peptides, the NFL-TBS.40-63 peptide was internalized in NSCs, promoting adhesion. Moreover, the peptide can modulate NSC differentiation in a concentration-dependent manner. The differentiation of neurons and oligodendrocytes can be induced with a low peptide concentration. A similar effect (at 10 $\mu\text{mol/l}$ NFL-TBS.40-63 peptide) has already been described for the maturation

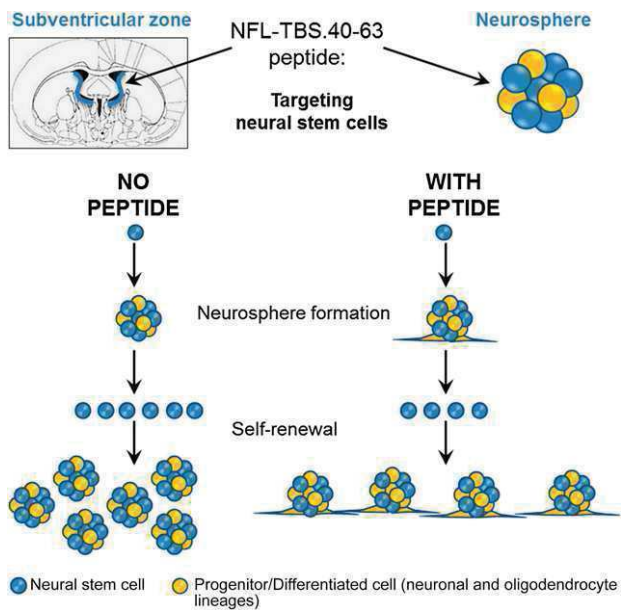


Figure 6. Schematic representation of the NFL-TBS.40-63 peptide effects on neural stem cells (NSCs). The NFL-TBS.40-63 peptide targets NSCs *in vitro* and *in vivo*. In culture, the neurosphere formation was not affected by the peptide, and the self-renewal capacity was reduced, with increased stem cell attachment and differentiation.

and differentiation of oligodendrocytes from glial cell cultures derived from newborn rats [22, 23]. However, at higher concentrations, the peptide can only promote the differentiation of cells from the oligodendrocyte lineage but reduces their maturation. Further investigations are necessary to determine the molecular mechanism involved in these effects. As demonstrated in a previous study, the NFL-TBS.40-63 peptide can modulate the expression of a particular microRNA involved in glioblastoma pathogenesis [46]. Thus, one possibility could be that this peptide could induce post-translational regulation of NSCs, especially on microRNAs, which represent key regulators of NSC properties [47].

CONCLUSION

Taken together, our data show that the NFL-TBS.40-63 peptide can target *in vitro* and *in vivo* NSC and modulate their properties (Fig. 6), as previously shown with the Tat and RGD peptides for mesenchymal stem cells [48–50]. However, to our knowledge, the Tat peptide did not show the same *in vitro* and *in vivo* NSC

targeting capacity as that with the NFL-TBS.40-63 peptide. One possibility could be to use the NFL-TBS.40-63 peptide to functionalize lipid nanoparticles to target their entry into NSCs, as previously shown for glioblastoma cells [20]. Complexes of plasmid DNA and nanoparticles functionalized with the cell-penetrating Tat peptide were proposed to genetically modify glioblastoma and NSC cell lines [51]. Therefore, the NFL-TBS.40-63 peptide represents a promising new selective delivery system for NSCs and a new potential application for stem cell-based therapeutic strategies in several pathological conditions such as brain tumors and neurodegenerative disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the assistance of Rodolphe Perrot and Guillaume Mabilieu from Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques, Catherine Guillet and Jérôme Cayon from Plateforme d'Analyses Cellulaire et Moléculaire, and the staff from Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire. This work was supported by Association Française contre les Myopathies, Association pour la Recherche sur le Cancer, Ciblage Moléculaire et Thérapeutique, Maturation & Accelerating Translation With Industry, L'Université Nantes, Angers, Le Mans, and "Région des Pays de la Loire" to J.E. C.L.-C. was supported by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche," by Association pour la Recherche sur le Cancer, and by the "Sociétés d'Accélération du Transfert de Technologie Ouest Valorisation." K.B. is supported by a grant from the University of Angers, in the framework of NanoFar "European Doctorate in Nanomedicine" Erasmus Mundus Joint Doctorates program funded by the Education, Audiovisual and Culture Executive Agency.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.L.-C.: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; K.B.: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; J.E.: conception and design, financial support, provision of study material, manuscript writing, final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965;124:319–335.
- 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;137:433–457.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998;4:1313–1317.
- Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5768–5773.
- Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4752–4757.
- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287:1433–1438.
- Hamilton LK, Truong MK, Bednarczyk MR et al. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience* 2009;164:1044–1056.
- Miller FD, Gauthier-Fisher A. Home at last: Neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell* 2009;4:507–510.
- Hall PA, Watt FM. Stem cells: The generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619–633.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707–1710.
- Azari H, Rahman M, Shariffar S et al. Isolation and expansion of the adult mouse neural stem cells using the neurosphere assay. *J Vis Exp* 2010;2393.
- Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 2013;33:491–504.
- Bexell D, Svensson A, Bengzon J. Stem cell-based therapy for malignant glioma. *Cancer Treat Rev* 2013;39:358–365.

- 14** Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C et al. Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: Evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:4694–4699.
- 15** Müller FJ, Snyder EY, Loring JF. Gene therapy: Can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci* 2006;7:75–84.
- 16** Nam H, Lee KH, Nam DH et al. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect. *World J Stem Cells* 2015;7:126–136.
- 17** Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration 2014;32:795–803.
- 18** Bocquet A, Berges R, Frank R et al. Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J Neurosci* 2009;29:11043–11054.
- 19** Berges R, Balzeau J, Peterson AC et al. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol Ther* 2012;20:1367–1377.
- 20** Balzeau J, Pinier M, Berges R et al. The effect of functionalizing lipid nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials* 2013;34:3381–3389.
- 21** Lépinoux-Chambaud C, Eyer J. The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm* 2013;454:738–747.
- 22** 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;92:243–253.
- 23** Fressinaud C, Eyer J. Neurofilaments and NFL-TBS.40-63 peptide penetrate oligodendrocytes through clathrin-dependent endocytosis to promote their growth and survival in vitro. *Neuroscience* 2015;298:42–51.
- 24** Coronas V, Bantubungi K, Fombonne J et al. Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem* 2004;91:1292–1301.
- 25** Nicoleau C, Benzakour O, Agasse F et al. Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal. *STEM CELLS* 2009;27:408–419.
- 26** Berges R, Balzeau J, Takahashi M et al. 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* 2012;7:e49436.
- 27** Stewart KM, Horton KL, Kelley SO. Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem* 2008;6:2242–2255.
- 28** Mano M, Teodósio C, Paiva A et al. On the mechanisms of the internalization of S4(13)-PV cell-penetrating peptide. *Biochem J* 2005;390:603–612.
- 29** Derossi D, Calvet S, Trembleau A et al. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 1996;271:18188–18193.
- 30** Duchardt F, Fotin-Mlecsek M, Schwarz H et al. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 2007;8:848–866.
- 31** Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* 1996;7:1825–1834.
- 32** Koivusalo M, Welch C, Hayashi H et al. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol* 2010;188:547–563.
- 33** Eierhoff T, Hrincius ER, Rescher U et al. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001099.
- 34** Dimitropoulos K, Giannopoulou E, Argyriou AA et al. The effects of anti-VEGFR and anti-EGFR agents on glioma cell migration through implication of growth factors with integrins. *Anticancer Res* 2010;30:4987–4992.
- 35** Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:112–126.
- 36** Colin D, Limagne E, Jeanningros S et al. Endocytosis of resveratrol via lipid rafts and activation of downstream signaling pathways in cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4:1095–1106.
- 37** Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60:585–595.
- 38** Yukawa H, Noguchi H, Nakase I et al. Transduction of cell-penetrating peptides into induced pluripotent stem cells. *Cell Transplant* 2010;19:901–909.
- 39** Terrone D, Sang SL, Roudaia L et al. Penetratin and related cell-penetrating cationic peptides can translocate across lipid bilayers in the presence of a transbilayer potential. *Biochemistry* 2003;42:13787–13799.
- 40** Henriques ST, Castanho MA. Translocation or membrane disintegration? Implication of peptide-membrane interactions in pep-1 activity. *J Pept Sci* 2008;14:482–487.
- 41** Coskun V, Wu H, Bianchi B et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1026–1031.
- 42** Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E et al. Expression of tubulin beta II in neural stem/progenitor cells and radial fibers during human fetal brain development. *Lab Invest* 2003;83:479–489.
- 43** Katsetos CD, Dráberová E, Legido A et al. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin. *J Cell Physiol* 2009;221:505–513.
- 44** Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U et al. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem* 2005;280:137–145.
- 45** Ananthanarayanan B, Little L, Schaffer DV et al. Neural stem cell adhesion and proliferation on phospholipid bilayers functionalized with RGD peptides. *Biomaterials* 2010;31:8706–8715.
- 46** Rivalin R, Lépinoux-Chambaud C, Eyer J et al. The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide disrupts microtubule and mitochondrial networks in the T98G glioma cell line. *PLoS One* 2014;9:e98473.
- 47** Ji F, Lv X, Jiao J. The role of microRNAs in neural stem cells and neurogenesis. *J Genet Genomics* 2013;40:61–66.
- 48** Shah BS, Clark PA, Muioli EK et al. Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots. *Nano Lett* 2007;7:3071–3079.
- 49** Lei Y, Tang H, Yao L et al. Applications of mesenchymal stem cells labeled with Tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body. *Bioconjug Chem* 2008;19:421–427.
- 50** Jo J, Song H, Park SG 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* 2012;30:1703–1713.
- 51** Song HP, Yang JY, Lo SL et al. Gene transfer using self-assembled ternary complexes of cationic magnetic nanoparticles, plasmid DNA and cell-penetrating Tat peptide. *Biomaterials* 2010;31:769–778.



See www.StemCellsTM.com for supporting information available online.

Supplemental Figures – Eyer et al.

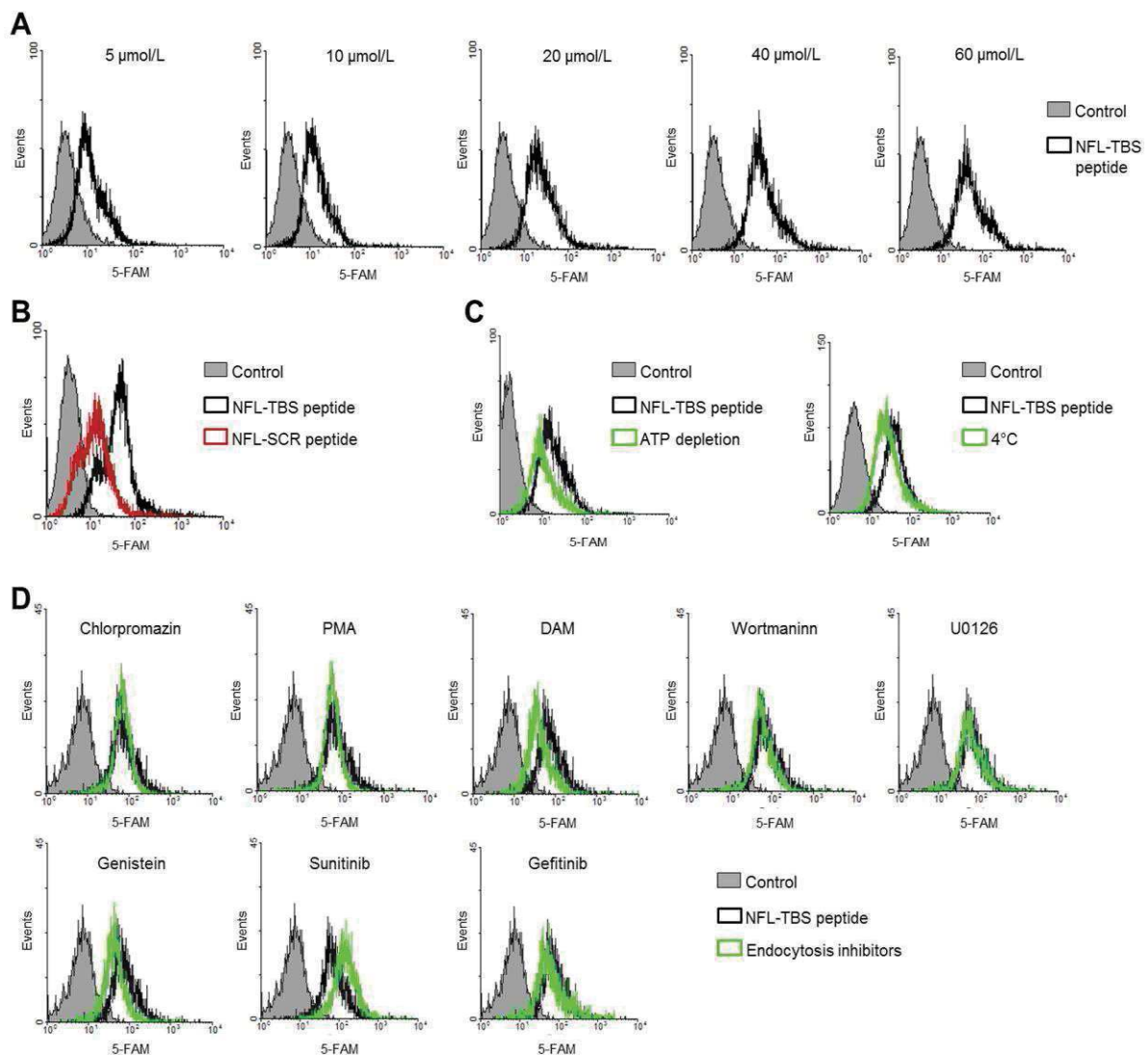


Figure S1: Flow cytometry analysis of peptide uptake. The negative control used is the unstained NSCs. The gated analyzed excluded the dead cells that are stained with propidium iodide (PI) and included more than 50% of viable cells. **(A)** Gating schemes of each sample for the flow cytometry analysis of NFL-TBS.40-63 peptide uptake at increasing concentrations. **(B)** Gating schemes for the flow cytometry analysis of the NFL-TBS.40-63 and NFL-SCR peptide uptake. **(C)** Gating schemes of each sample for the flow cytometry analysis of the NFL-TBS.40-63 peptide uptake in an ATP-depletion buffer or at 4°C. **(D)** Gating schemes of each sample for the flow cytometry analysis of the NFL-TBS.40-63 peptide uptake in the presence of different endocytosis inhibitors.

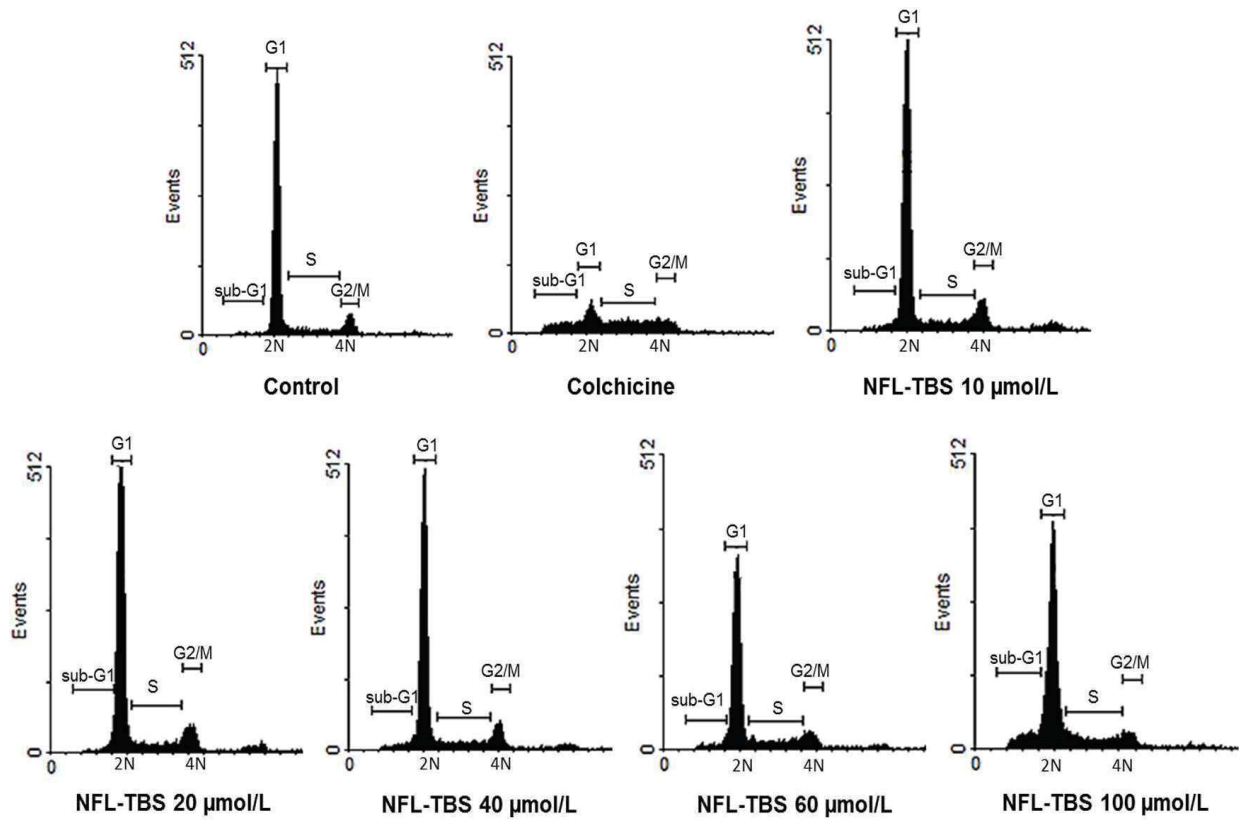


Figure S2: Flow cytometry analysis of the cell cycle. Gating schemes for the flow cytometry analysis of each sample. Cell repartition in the different phases of the cell cycle according to the DNA count. Doublet/triplet discrimination was performed to exclude false positives, before to analyze the different phases of the cell cycle.

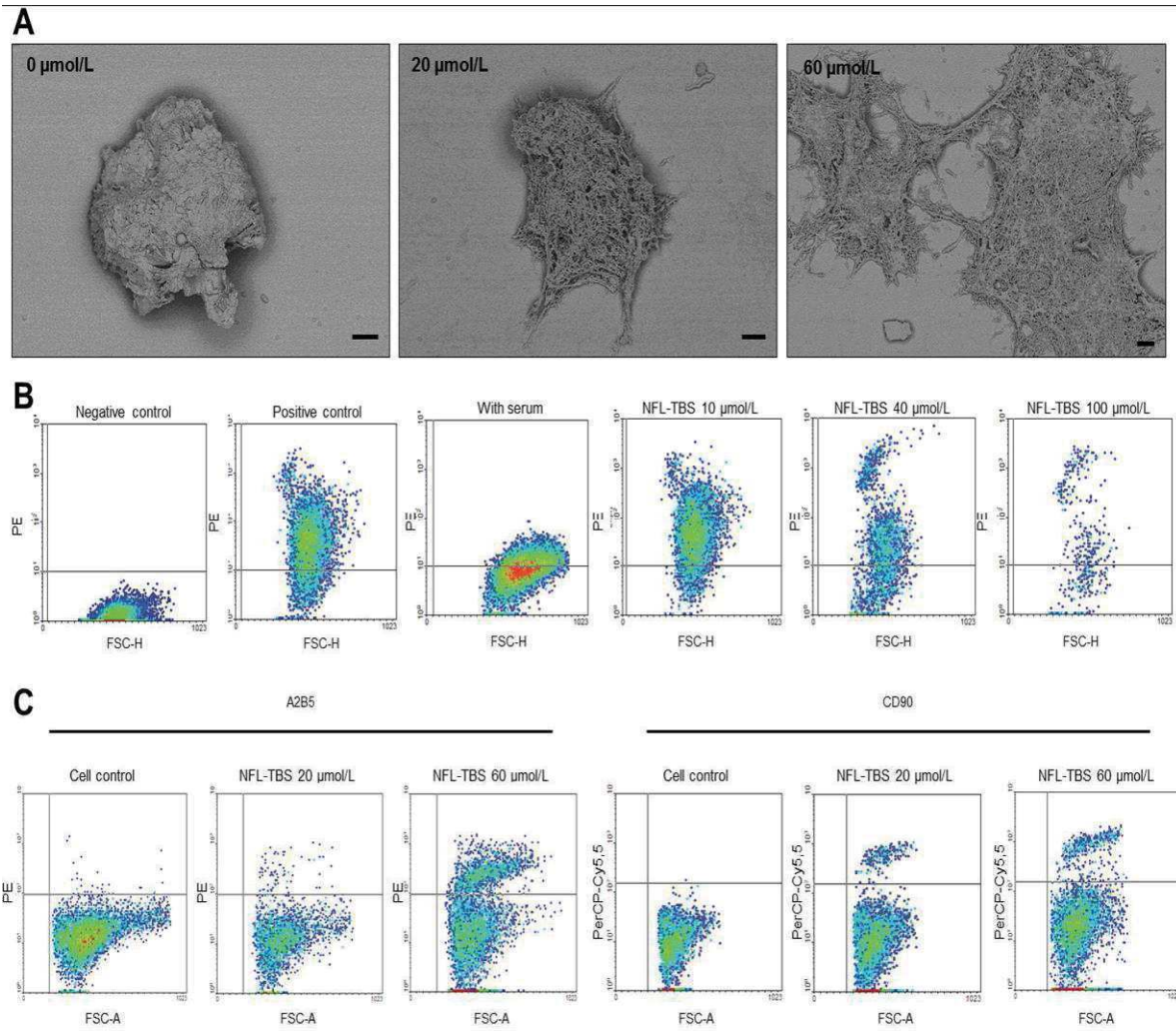


Figure S3: Scanning electron microscopy and flow cytometry analysis. (A) NSCs were treated for 7 days without or with 20 $\mu\text{mol/L}$ or 60 $\mu\text{mol/L}$ of NFL-TBS.40-63 peptide and examined by scanning electron microscopy. Scale bar: 10 μm . **(B)** Gating schemes for the flow cytometry analysis of the PE labeled PSA-NCAM expression in NSCs of each sample. This analysis required compensation matrix (FL2 (PE) -87% FL3; FL3 (PI) -9%FL2), and the negative control used was the unstained NSCs. The gated analyzed events excluded the dead cells stained with PI and included more than 50 % of viable cells, except at 100 $\mu\text{mol/L}$ (toxic effect with less than 30 % of viable cells). **(C)** Gating schemes for the flow cytometry analysis of PE labeled A2B5 and PerCP-Cy5.5 labeled CD90 expressions in NSCs of

each sample. The negative control used was the unstained NSCs. The gated events analyzed included more than 50 % of viable cells stained with calcein-violet AM.

2^{ème} article scientifique

The neurofilament derived-peptide NFL-TBS.40-63 enters in-vitro in human neural stem cells and increases their differentiation

Barreau K., Montero-Menei C. and Eyer J., (2017) – (Soumis à PLOS One / en cours de révision).

La médecine régénérative est de plus en plus étudiée depuis la découverte de la présence de cellules souches dans la plupart des organes humains. Ces cellules sont indifférenciées et ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules de l'organe où elles sont situées, comme les cellules souches neurales (CSNs) qui peuvent se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Nam et al., 2015). Les CSNs endogènes, sont situées au niveau de la zone sous ventriculaire (ZSV) ou de la zone sous granulaire du cerveau, et ont la capacité de migrer vers une zone lésée dans le cas de maladies neurologiques bien que cette aptitude soit trop faible pour être efficace (Müller et al., 2006; Nait-Oumesmar et al., 2007; Barreau et al., 2016). En clinique, la majorité des CSNs utilisées sont issues de fœtus car les CSNs adultes sont localisées dans des zones restreintes et ont une faible capacité de prolifération *in vitro* ce qui limite le nombre de cellules pour une réimplantation (Casarosa et al., 2014). Une approche thérapeutique intéressante serait de stimuler directement la capacité de migration et de différenciation des CSNs endogènes après injection dans le ventricule latéral par exemple.

Pour cela, le peptide NFL-TBS.40-63 serait un agent intéressant car il a montré la capacité de cibler les CSNs de la ZSV de rats adultes *in vitro* et *in vivo* après injection dans le ventricule latéral. De plus, *in vitro*, ce peptide induit la différenciation neuronale et oligodendrocytaire des CSNs de rat (Lépinoux-Chambaud et al., 2016).

Dans cet article, nous avons étudié l'entrée et les effets du peptide sur des CSNs humaines (hCSNs) afin d'avoir la preuve de concept que ce peptide pourrait stimuler les CSNs endogènes de patients. Pour cela, nous utilisons des CSNs issues de fœtus humains car elles sont plus faciles à isoler et cultiver (Autorisation n° AC-2012-1507 par l'Hôpital Henri Mondor, Paris, France).

Tout d'abord, nous avons étudié l'entrée et le mécanisme d'entrée du peptide dans les hCSNs par cytométrie en flux et par immunocytofluorescence confocale grâce au peptide couplé à la fluorescéine. Nous avons ainsi montré que le peptide entre de manière dose dépendante dans les cellules. Grâce à des marqueurs spécifiques des CSNs (CD133 et Nestine) nous pouvons confirmer que le peptide rentre dans les hCSNs. En incubant les cellules à 4°C, en déplaçant l'ATP, ou en présence d'inhibiteurs des 3 voies d'endocytose, nous avons observé que l'entrée du peptide n'est pas altérée. Ces résultats montrent que le peptide est internalisé par translocation directe (Figure 1).

Nous avons ensuite étudié si le peptide avait un effet sur la viabilité ou le réseau de microtubules des hCSNs. En effet, il a été montré que le peptide NFL-TBS.40-63 détruit le réseau de microtubules des cellules de glioblastomes et inhibe leur viabilité alors qu'il n'a pas d'effet sur les CSNs de rats. Dans cette étude, nous montrons que le peptide n'a pas d'action sur le réseau de microtubules des cellules,

ni sur leur viabilité (Figure 2). Ce peptide pourrait donc être utilisé comme agent de ciblage pour les hCSNs.

Étant donné que le peptide modifie les propriétés des CSNs de rats, nous avons aussi évalué les effets potentiels du peptide sur les cellules humaines. Après incubation du peptide pendant 72 heures, nous notons une réduction du nombre de cellules (Figure 3) mais une augmentation du nombre de cellules adhérentes (Figure 4). Afin de caractériser la division cellulaire, nous avons analysé l'incorporation de BrdU (5 heures) après 72 heures d'incubation en présence du peptide. Le nombre de cellules marquées au BrdU est corrélé à la concentration en peptide (Figure 3). De plus, nous avons observé que l'auto-renouvellement des cellules (la capacité d'un clone à créer le même clone) est réduite en présence du peptide pendant 7 jours (Figure 4). Ce résultat est concordant avec la réduction de la prolifération après 3 jours.

Nous avons aussi noté une augmentation du nombre de cellules adhérentes en présence du peptide. Sachant que les cellules adhérentes peuvent être des cellules différenciées, nous avons évalué la différenciation des cellules par deux techniques. Tout d'abord, par FACS nous avons montré que l'expression de protéines exprimées par les progéniteurs neuronaux (CD90) et gliaux (A2B5 et O4) est augmentée en présence du peptide. Ces marqueurs sont exprimés par les progéniteurs et le marqueur A2B5 ne permet pas de distinguer les astrocytes par rapport aux oligodendrocytes.

Pour mieux caractériser la différenciation, nous avons analysé l'expression de gènes impliqués dans les 4 lignées neurales (cellules souches, neurones, astrocytes et oligodendrocytes). Nous notons une réduction du marqueur CD133 (marqueur spécifique des CSNs) et une augmentation des marqueurs neuronaux (β III tubuline, DCX) et astrocytaires (GFAP et CD44). Les marqueurs des oligodendrocytes ne sont pas ou peu modifiés par la présence du peptide (Figure 5).

Ces résultats indiquent que le peptide induit une perte du caractère souche des CSNs et stimule la différenciation de ces cellules. Afin d'expliquer ces résultats, nos hypothèses sont 1- que le peptide inhibe la division symétrique proliférative des hCSNs, 2- et/ou stimule leur division symétrique différenciative afin de créer deux cellules différenciées, 3- et/ou stimule leur division asymétrique (production d'une cellule souche et d'une cellule différenciée) (Figure 6). Ce peptide pourrait donc être un agent prometteur pour stimuler les CSNs humaines dans le cas de maladies neurodégénératives.

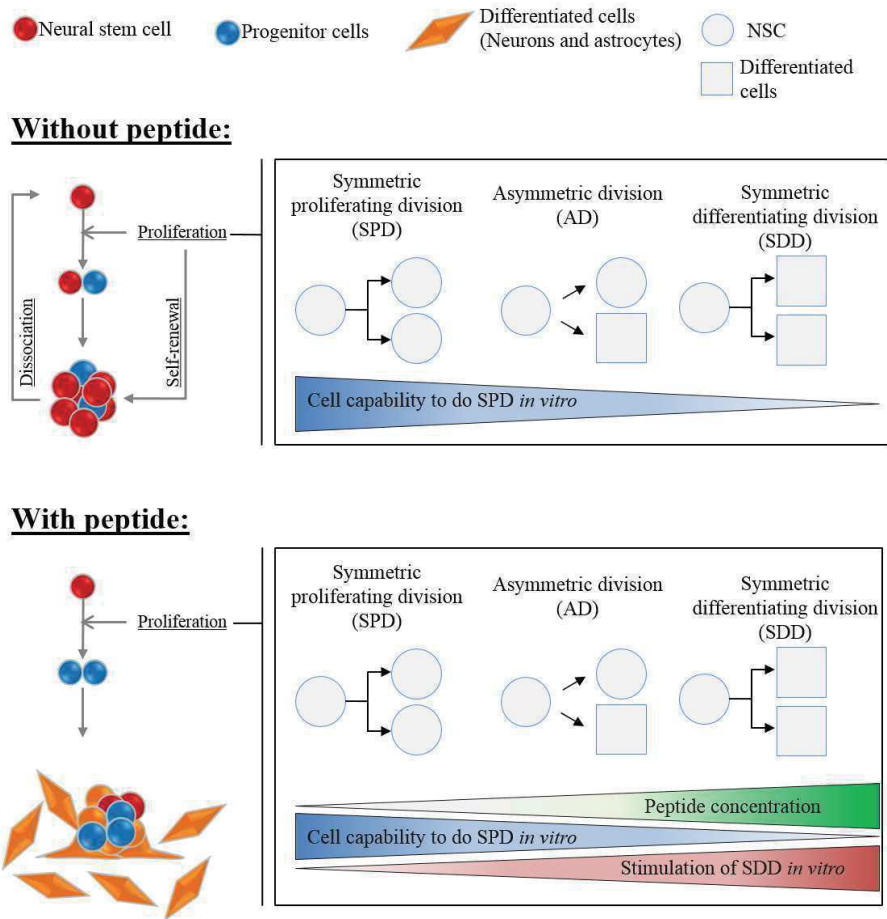


Figure R1 : Hypothèse du mécanisme d'action du peptide NFL-TBS.40-63 sur les hCSNs
 (Figure 6 de l'article)

1 **Title: The neurofilament derived-peptide NFL-TBS.40-63 enters in-vitro in human neural stem cells**
2 **and increases their differentiation**

3 Kristell Barreau¹; Claudia N. Montero- Menei²; Joël Eyer^{1,*}

4 ¹ Kristell Barreau (KB) and Joël Eyer (JE), Laboratoire Micro et Nanomédecines Translationnelles
5 (MINT), Inserm 1066, CNRS 6021, Institut de Recherche en Ingénierie de la Santé, Bâtiment IBS Institut
6 de Biologie de la Santé, Centre Hospitalier Universitaire, 49033 Angers, FRANCE 49033 Angers, France.
7 kristell.barreau@etud.univ-angers.fr, joel.eyer@univ-angers.fr

8 ² Claudia N. Montero-Menei (CMM), CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers,
9 49033 Angers, France, claudia.montero-menei@univ-angers.fr

10

11 ***Corresponding author:** Eyer Joël, Laboratoire de Neurobiologie and Transgénése, L'UNAM, UPRES
12 EA-3143, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment
13 IBS-IRIS, 49033 Angers, France.

14 Tel: 02 44 68 84 88

15 E-mail: joel.eyer@univ-angers.fr

16

17 **Author contributions:**

18 Conceptualization: KB; CMM and JE. Formal Analysis: KB. Funding Acquisition: CMM and JE.
19 Investigation: KB. Methodology: KB; CMM; JE. Supervision: CMM and JE. Validation: KB; CMM and
20 JE. Visualization: KB. Writing – Original Draft Preparation: KB. Writing – Review & Editing: KB; CMM
21 and JE.

22

23 **Short title: The NFL-TBS.40-63 peptide is internalized by hNSCs and affects their properties**

24 **Abstract**

25 Regenerative medicine is a promising approach to treat neurodegenerative diseases by replacing
26 degenerating cells like neurons or oligodendrocytes. Targeting human neural stem cells directly in the
27 brain is a high purpose in such a strategy. A novel tool to reach and manipulate neural stem cells is the
28 neurofilament derived NFL-TBS.40-63 peptide. Previous studies showed that this peptide can be
29 internalized by neural stem cells from rats *in vitro* and *in vivo*. It induces a decrease of the proliferation
30 and self-renewal and an increase of differentiation. In this study, we analysed the uptake and potential
31 effects of the NFL-TBS.40-63 peptide on human neural stem cells isolated from human foetus. We
32 showed that the peptide decreases the proliferation and the self-renewal, which is consistent with an
33 increase of the cell adhesion and differentiation. These results confirm that the peptide could be a
34 promising molecule to target and manipulate human neural stem cells and thus could serve as a strategic
35 tool for regenerative medicine.

36 **Introduction**

37 Prevalence of people with neurodegenerative diseases increases constantly and efficient treatments are
38 lacking. Regenerative therapy could help to reduce symptoms and reverse the disease progression by
39 replacing degenerative-cells. Since several years, neural stem cells (NSCs) are considered as a key factor
40 for this regenerative therapy of neurodegenerative diseases (1). These cells can self-renew, proliferate,
41 migrate and differentiate in the central nervous system into neurons, astrocytes or oligodendrocytes.
42 Moreover, some studies showed that endogenous or exogenous NSCs are able to migrate to brain tumour
43 to protect the environment from the tumour (2). Currently, preclinical studies investigate the therapeutic
44 effect of foetal NSCs in neurodegenerative diseases like Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Indeed,
45 they are used in phase 1 clinical trial on ALS-patients after injection in lumbar or cervical segments of the
46 spinal cord (3). Increasing clinical studies use NSCs principally for neurology diseases like
47 neurodegenerative diseases, spinal cord injury or brain tumour (5).

48 The potential source for cell therapy clinical studies in the central nervous system includes human NSCs
49 from foetus or adults (1) or pluripotent stem cells (4). Even if the latter are currently investigated in cell
50 therapy clinical trials, they present a risk of developing tumours, and induced pluripotent stem cells may
51 cause immune rejection after transplantation, when compared to embryonic pluripotent stem cells (5). The
52 main source of endogenous NSC in the human adult brain is in the subventricular and subgranular zones.
53 These cells thus need to be isolated from foetal tissue or from adults after biopsy, grown *in vitro* and then
54 transplanted into patients (6). Although it is possible in theory, this procedure is difficult due to the low
55 availability of brain tissues and the strong ethical issues. Targeting and manipulating directly in the brain
56 NSCs, that will then migrate and differentiate into neurons or oligodendrocytes at the site of injury
57 without taking them out from their endogenous environment represents a promising strategy for improving
58 regenerative medicine.

59 A potential candidate for such an objective is the NFL-TBS.40-63 peptide, which corresponds to the
60 sequence of the tubulin-binding site (TBS) located on the neurofilament light subunit (NFL) between the

61 amino acids 40 and 63 (7). Previous works showed that this peptide targets specifically glioblastoma cells
62 (when compared to healthy cells like neurons or astrocytes), and reduces their viability, proliferation, and
63 migration. When injected in the intracerebral tumour, it reduces by 70% the tumour volume after 24 days
64 of treatment (8). This peptide also increases oligodendrocyte differentiation and maturation and it protects
65 oligodendrocytes in a demyelination model (9). Recently we showed that the peptide can target newborn
66 and adult rats NSCs (rNSCs) and can modify their properties, in particular their differentiation *in vitro*
67 (10).

68 In order to translate this approach into a clinical setting it is crucial to obtain the proof of concept that the
69 NFL-TBS.40-63 peptide can also enter in human NSCs, and it is important to evaluate its possible effects
70 in these cells. Here, we investigated the *in vitro* internalization of the NFL-TBS.40-63 peptide in human
71 NSCs (hNSCs) isolated from human foetus and its potential effects on their properties. We showed that
72 the NFL-TBS.40-63 peptide enters massively by direct translocation in these cells without major effect on
73 their viability at low concentration (less than 40 μ m). At higher concentrations, the peptide induces a
74 decrease of their proliferation and their self-renewal, which is consistent with an increase of their adhesion
75 and differentiation in the neuronal and astrocytic pathways. To our knowledge, it is the first time that a
76 peptide is shown to enter into hNSCs where it induces their differentiation. This provides a promising tool
77 to target and manipulate such cells for regenerative therapy.

78 **Materials & Methods**

79 **Ethics statement**

80 Human foetuses were obtained after legal abortion with written informed consent of the patient. The
81 procedure for the procurement and use of human foetal central nervous system tissue was approved and
82 monitored by the “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale” of
83 Henri Mondor Hospital, France. They are declared at the “Centre des Ressources Biologiques” of the
84 University Hospital in Angers with reference numbers at the Research Ministry: declaration N° DC-2011-
85 1467; authorization N° AC-2012-1507.

86

87 **Cell culture and materials**

88 The hNSCs used in this study were prepared from the central nervous system of first-trimester human
89 foetuses, as previously shown (11). Briefly, the cortex was dissected and cut into 1-mm³ tissue pieces.
90 After mechanical dissociation, single-cell suspensions were cultured in 3V of Dulbecco’s modified Eagle
91 medium with L-glutamine (DMEM; Lonza, Levallois-Perret, France) and 1V Ham’s F12 (Lonza)
92 supplemented with 1X B27 (Invitrogen Life Technologies, Saint Aubin, France), Epidermal Growth
93 Factor (EGF) (20 ng/ml; R&D systems), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) at 20 ng/ml (R&D
94 systems, Minneapolis, MN 55413, USA), Heparin (5 µg/ml, Merck Millipore, île-de-France, France), 100
95 U Penicillin, and 1,000 U Streptomycin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). This cell suspension
96 generated proliferating clones containing hNSCs in floating spheres (termed neurospheres). Cells were
97 further expanded and maintained in suspension as neurospheres in uncoated tissue culture dishes and the
98 medium was changed 2 times a week. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere
99 containing 5% CO₂.

100 The conditioned medium was composed by DMEM/F12 (1:1) (Lonza) added by 1X B27 and 1X 100 U
101 Penicillin, and 1,000 U Streptomycin. This medium induced the adhesion and differentiation of hNSCs
102 after 10 days in culture as previously shown (12,13).

103 Peptides were synthesized by Genecust (Dudelange, Luxembourg), Genosphere (Paris, France) or
104 Polypeptide (Strasbourg, France). The NFL-TBS.40-63 peptide (YSSYSAPVSSSLSVRRSYSSSSGS)
105 was coupled to 6-carboxy-fluorescein (FAM) or biotin, and dissolved in sterile water at 0.5 mmol/L.

106 Chlorpromazine hydrochloride (50 μ mol/L), Nystatine (25 μ g/ml), 5(N,N-dimethyl) amiloride
107 hydrochloride (DMA, 1 mmol/L), Sodium azide (10 mmol/L) and d-glucose (6 mmol/L) were obtained
108 from Sigma. Paclitaxel (Life technologies, Illkirch, France) or colchicine (Sigma) was used as positive
109 control in some techniques.

110

111 **Internalization in cells**

112 The uptake of peptide by hNSCs was measured using the flow cytometer technique. Briefly, hNSCs were
113 seeded in 6-wells plate and treated with increasing concentrations of FAM- coupled NFL-TBS.40-63
114 peptide during 1 hour at 37°C. To analyse the internalization mechanism, cells were pre-incubated at 4°C,
115 with an ATP-depleted buffer (sodium azide at 10 mmol/L and D-glucose at 6 mmol/L) or with a panel of
116 endocytosis inhibitors during 30 minutes before the addition of the peptide at 20 μ mol/L. Incubation with
117 peptide was realized in the same condition. Cells were recovered, washed once with PBS (Phosphate
118 Buffered Saline), and pelleted (1200 rpm – 5 minutes). They were dissociated with a needle 26G and
119 incubated with 150 nmol/L calcein violet (Invitrogen) during 20 minutes before their analysis by
120 Fluorescence-Activated Cell Sorting or flow cytometry (FACS).

121 To visualize the FAM-labelled peptide in hNSCs, cells were dissociated and seeded during 1 hour on
122 coverslips coated with BD Cell-Tak (3.5 μ g/cm²) (Corning, Bedford, United Kingdom). Then, they were
123 incubated during 1 hour at 37°C with 20 or 60 μ mol/L of FAM-labelled peptide. Cells were washed twice
124 with PBS and fixed with Paraformaldehyde 4% (PFA) (Fisher scientific, Illkirch, France) during 20

125 minutes. After washing, coverslips were mounted with a Prolong Gold antifade solution (Life
126 technologies). Finally, neurospheres were observed with a confocal microscope (Leica TCS SP8; Leica
127 Biosystems, Nanterre, France).

128 The peptide was also visualized in hNSCs together with different markers using immune-
129 cytofluorescence. For this purpose, cells were seeded on coverslips coated with BD Cell-Tak as described
130 above, and then incubated 1 hour with FAM-labelled peptide and washed twice. Then, they were fixed
131 with PFA 4%, permeabilized 10 minutes with MTSB (PIPES 50 mmol/L; MgSO₄ 5 mmol/L and EGTA 5
132 mmol/L) in PBS and saturated with BSA 4% in PBS. Two washes were realized between each step. Cells
133 were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (rabbit anti α -tubulin 1/500 (SAB3501072-
134 Sigma); rabbit anti nestin 1/100 (N5413-sigma); or rabbit anti CD133 1/100 (18470-1-AP-Proteintech
135 (Manchester – United Kingdom)). After washing two times, cells were incubated with AlexaFluor 568-
136 coupled anti-rabbit antibodies 1/200 (Invitrogen) during 90 minutes in the dark and washed twice. Finally,
137 cells were counterstained with 3 μ mol/L 4'6-diaminido-2-phenylindole (DAPI; Sigma) during 7 minutes
138 and the coverslips were mounted with Prolong.

139

140 **Viability of cells and microtubule network**

141 The cell viability was evaluated with the AnnexinV-FITC Kit (Miltenyi, Paris, France) after 72 hours
142 incubation of the cells with NFL-TBS.40-63 peptide or Paclitaxel. In short, cells were seeded in 6 wells
143 plate and incubated with increasing concentrations of biotinylated peptide or Paclitaxel (0.1 μ mol/L)
144 during 72 hours at 37°C. Cells were recovered and centrifuged at 1200 rpm during 10 minutes. Following
145 washing and centrifugation (1200 rpm – 10 minutes), they were stained with FITC-Annexin-V during 10
146 minutes at room temperature in the dark. Then, they were washed, dissociated, counterstained with
147 Propidium Iodide (PI) (1 μ g/ml - Sigma) and analysed by FACS.

148 The possible effect of the peptide on the microtubule network was analysed by immunocytofluorescence.
149 Cells were first incubated 24 hours with the FAM-NFL peptide, and then stained with the anti- α -tubulin

150 (1/500 T6199-Sigma). Primary antibody was revealed using the AlexaFluor 568-coupled anti-mouse
151 antibody 1/200 (Invitrogen), which was incubated during 90 minutes in the dark. After washing and
152 counterstaining with DAPI, cells were visualized and analysed by confocal microscopy. We counted
153 manually the number of cells with disrupted microtubule network.

154

155 **Proliferation of cells and cell cycle**

156 To analyse the effect on the cell cycle, hNSCs were seeded in 6-wells plate and treated during 72 hours
157 with increasing concentrations of biotinylated-NFL-TBS.40-63 peptide, or with colchicine at 1µg/ml.
158 Cells were recovered and centrifuged at 1200 rpm during 10 minutes. They were dissociated and
159 permeabilized with Tween 0.1% in PBS. Then, they were fixed with Ethanol 70%, centrifuged and
160 suspended in RNase 1 mg/ml during 30 minutes at 37°C. They were analysed by FACS after adding 10
161 µg/ml of PI. Proliferation of hNSCs was analysed by two techniques: the Trypan blue exclusion test and
162 the CyQUANT assay kit (Fisher).

163 For the Trypan Blue exclusion test, neurospheres were seeded in 24-wells plate and treated during 72
164 hours with increasing concentrations of biotinylated peptide or colchicine 1 µg/mL. Neurospheres were
165 dissociated with Accumax enzyme, and the number of cells was counted following Trypan blue (Sigma,
166 dilution 1:2) staining. At least three wells per condition were realized.

167 For the CyQUANT assay test, cells were dissociated with Accumax enzyme, seeded and treated with
168 colchicine (1 µg/L) or increasing concentrations of NFL-TBS.40-63 peptide in a black 96-wells plate.
169 After 72 hours, supernatants were transferred on black 96-wells plate coated with BD Cell-Tak (3.5
170 µg/cm²), and cells were incubated during 1 hour to adhere. Then, wells were washed twice with PBS and
171 frozen at -80°C at least 24 hours. 200 µl of CyQUANT GR dye buffer was added per well, and the
172 fluorescence was measured with a fluorescence microplate reader (Spectra max M2; Molecular Devices,
173 Sunnyvale, USA) (excitation: 480 nm; emission: 520 nm). All experiments were performed at least 3
174 times.

175 The number of cells in mitosis was analysed by BrdU fixation (colorimetric technic) or by EdU (FACS)
176 labelling. FACS was realized thanks to the Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits (Fischer)
177 following 72 hours incubation of increasing concentrations of NFL peptide or with 1 µg/ml of colchicine.
178 Briefly, after 72 hours of treatment, cells were incubated with 10 µmol/l of EdU during 5 hours. Cells
179 were harvested and washed with 1% BSA in PBS by centrifugation at 800g during 10 minutes. Cells were
180 fixed and permeabilized, with washing between all stages. Then, they were incubated with the detect EdU,
181 washed and analyzed by FACS.

182 BrdU labelling was evaluated using the BrdU cell proliferation ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK).
183 Briefly, cells were incubated with 1 µg/ml of colchicine or increasing concentrations of NFL peptide
184 during 72 hours on a BDcellTak coated 96 wells plate. Incubation of BrdU was performed during 5 hours.
185 Then cells were fixed and their DNA was denatured during 30 minutes with the fixative solution. Cells
186 were washed and incubated with the anti-BrdU antibody during 1 hour. BrdU was revealed using the HRP
187 conjugated antibody and its TMB substrate. Positive BrDU cells were analysed by colorimetry
188 (absorbance reading at 450 nm) with a fluorescence microplate reader.

189

190 **Self-renewal**

191 The self-renewal was analysed by counting neurospheres after 7 days in the presence of biotinylated-
192 peptide. Briefly, cells were dissociated with Accumax enzyme and seeded in a 24-wells plate. Each well is
193 divided in 5 squares. Cells were treated with increasing concentrations of peptide or with colchicine (1
194 µg/ml) during 7 days with a medium changed after 4 days. Then, each well was photographed with a
195 Power Stat G15 digital camera 5 times. The number and size of neurospheres were measured with the
196 ImageJ software (NIH, USA). The number of neurospheres was reported by cm² of surface. The
197 experiments were repeated at least 3-times.

198

199 **Cell adhesion**

200 To measure the number of cells that had adhered, the CyQUANT cell Proliferation Assay Kit (Molecular
201 Probes, Oregon, US) has been used. Briefly, cells were dissociated and seeded in a black 96-wells plate
202 (10,000 cells/well). hNSCs were treated with increasing concentrations of peptide or colchicine (1 µg/ml)
203 during 72 hours. Then, wells were washed twice with PBS and frozen at -80°C at least 24 hours. 200 µl of
204 CyQUANT GR dye buffer were added in each well, and the fluorescence was measured with a
205 fluorescence microplate reader (Spectra max M2) (excitation: 480 nm; emission: 520 nm). All
206 experiments were performed at least 3 times.

207 The cell adhesion was also investigated by immunocytofluorescence. Briefly, cells were treated with
208 increasing concentrations of biotinylated peptide or colchicine on coverslips without coating. After 72
209 hours, all supernatants were transferred onto coverslips coated with BD Cell-Tak to allow adhesion of
210 cells. All coverslips were fixed with PFA 4%, washed and incubated 10 minutes with permeabilized
211 buffer. After washing with PBS, cells were stained with Phalloïdine TRITC (P1951-Sigma) during 1 hour,
212 washed and counterstained with DAPI.

213

214 **Cell differentiation**

215 To analyse the effect of the peptide on cell differentiation, hNSCs were seeded in 6-wells plate and treated
216 with 20 or 60 µmol/L of biotinylated peptide during 5 days. Cells were recovered and centrifuged at 1200
217 rpm during 10 minutes. They were dissociated during 10 minutes at 37°C with Accumax enzyme
218 (Stemcell technologies, Grenoble, France) and centrifuged at 2000 rpm during 10 minutes. Cells were
219 incubated 10 minutes in the dark with buffer (0.5% BSA / 2 mmol/L EDTA in PBS) containing A₂B₅-PE
220 (10 µg/ml) (Miltenyi Biotec, Auburn, USA) at or CD90-PerCP-Cy5.5 (0.4 µg/ml) (Miltenyi Biotec) or at
221 4°C in the dark during 10 minutes with buffer (0.5%BSA in PBS) containing O4-PE at 1/100 (Miltenyi
222 Biotec). 1 mL of buffer was added before centrifugation at 2000 rpm during 10 minutes. Cells were
223 stained with calcein violet and analysed by FACS after 20 minutes waiting. The graphics are realized with
224 FCS express 6 Flow Cytometry software.

225 To study if peptide loses its efficiency in a conditioned medium that induces the differentiation of cells,
226 we incubated cells in conditioned medium with or without peptide during 10 days. Briefly, 6-wells plates
227 were coated with poly-D-lysine (100µg/ml Sigma) during 1 hour at 37°C before seeding hNSCs in the
228 conditioned medium alone (control), or containing 20 µmol/l NFL peptide or 60 µmol/l NFL peptide. The
229 medium was changed every 4-5 days until experimentation. The same protocol was used to evaluate the
230 differentiation by FACS with CD90, A₂B₅ and O4.

231 The differentiation was also investigated by RT-PCR (Reverse Transcription polymerase chain reaction)
232 with different probes from the four nervous system lineages (stem cell, neuron, astrocyte and
233 oligodendrocyte), after 5 days in the presence of increasing concentrations of peptide. All probes came
234 from the “Plateforme d’Analyses Cellulaire et Moléculaire“ (PACEM), University of Angers and they are
235 detailed in Table 1. Briefly, cells were seeded in 6-wells plate and treated during 5 days with 20 or 60
236 µmol/L of NFL biotinylated peptide. Cells were washed with PBS and frozen in dry pellet before RNA
237 extraction and purification. The total RNA extraction was realized with the RNeasy Micro kit (Quiagen,
238 Courtaboeuf, France) and the total extract was recovered in 14 µl. The reverse transcription in cDNA was
239 done with Reverse Transcriptase SuperScriptII Kit (Invitrogen). The purification of cDNA was realized
240 with the QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen). In total, 40 µl of purified cDNA were recovered.
241 Quantitative RT-PCR was achieved with the Maxima SYBR Green qPCR master mix
242 (Fermantas/ThermoFisher Scientific). The amount of cDNA was normalized with the glyceraldehyde-3-
243 phosphate dehydrogenase (GAPDH), and the relative gene expression was compared to the control
244 condition thanks to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (14).

245

Table 1. Primers used for reverse transcription-polymerase chain reaction

Gene	Full name	NM accession no
CD133	Prominin 1	NM 006017.2
CD44	CD44 molecule	NM 001202557.1

CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase	NM 033133.4
DCX	Doublecortin	NM 001195553.1 NM 000555.3 NM 178153.2 NM 178152.2 NM 178151.2
GALC	Galactosylceramidase	NM 000153.3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM 001256799.1 NM 002046.4
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	NM 002055.4
GLAST	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter)	NM 001166696.2
NCAM	Neural cell adhesion molecule 1	NM 001242608.1 NM 001242607.1 NM 001076682.3 NM 181351.4 NM 000615.6
Nestin	Nestin	NM 006617.1
Sox2	SRY-box2	NM 003106.3
TubIII	Tubulin, beta 3 class III	NM 006086.3

246

247 **Statistical analysis**

248 All analyses by FACS were performed with a BD FACSCanto II (BD Biosciences, Le Pont de Claix,
249 France) and a minimum of 10.000 events by sample were analysed. Results were analysed with the
250 flowing Software (version 2.5.1).

251 All experiments were repeated at least three times. Results were presented as mean \pm standard error of the
252 mean (SEM). Statistical analyses were realized by Student *t* test using Prism version 4.0 (GraphPad
253 software). Asterisks indicate significantly different results compared to controls: ns: no significant; *
254 P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001.

255 **Results**

256 We first investigated the uptake of the neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63 in hNSCs and its
257 internalization mechanism. Then, we analysed the effects of this peptide on viability and properties of
258 hNSCs.

259 260 **The uptake of NFL-TBS.40-63 peptide by hNSCs occurs by a passive** 261 **direct translocation.**

262 Cells were incubated during 1 hour with increasing concentrations of FAM-labelled NFL-TBS.40-63
263 peptide, and the percentage of labelled-cells was analysed by flow cytometry. Fig 1A shows a dose-
264 response curve of peptide internalization. At 5 $\mu\text{mol/L}$, the peptide was internalized by $38.38 \pm 2.90\%$ of
265 cells, whereas at 20 $\mu\text{mol/L}$ it was internalized by $76.34 \pm 1.62\%$ of cells. A maximum was reached for 40
266 $\mu\text{mol/L}$ of peptide. These results were confirmed by microscopy after incubation of cells during 1 hour
267 with the FAM-peptide and visualization by confocal microscopy (Fig 1B).

268 The influence of low temperature, ATP depletion and endocytosis inhibitors were analysed to see if the
269 internalization depends on endocytosis pathways. Unlike endocytosis pathways, the direct translocation is
270 an energy and temperature independent pathway. Thus, reducing temperature at 4°C or depleting ATP
271 (source of energy), allow to show the direct translocation mechanism of penetration (15).

272 First, we studied the temperature and energy dependent pathways by pre-treatment of NSCs during 30
273 minutes at 4°C or with buffer containing 10 mmol/L sodium azide and 6 mmol/L 2-deoxy-D-glucose
274 (ATP-depleted buffer), before adding the NFL peptide (20 $\mu\text{mol/L}$) in the same conditions during 1 hour.

275 As shown in Fig 1C, neither the low temperature nor the ATP depletion condition modified the peptide
276 internalization ($81.29 \pm 6.89\%$ and $88.76 \pm 1.53\%$, respectively, against $77.80 \pm 1.70\%$ in control). Those
277 results indicate that the peptide uptake by hNSCs occurs by a direct translocation passive mechanism.

278 When compared to the control, ATP depletion provides a significant low increase of the peptide uptake.

279 This may be due to an increase of the permeability of the membrane cell as already showed with the
280 potassium (16). To really exclude the active pathways, cells were pre-incubated with a complete panel of
281 inhibitors against the three principal endocytosis pathways: chlorpromazine, nystatin and DMA (17).
282 Chlorpromazine inhibits the clathrin dependent endocytosis by reversible translocation of clathrin and its
283 adapter proteins from the membrane to intracellular vesicles (18). Nystatin inhibits caveolin dependent
284 endocytosis by depletion of cholesterol from caveolae (19), while DMA is known to inhibit
285 micropinocytosis by inhibition of the NA^+/H^+ exchange. The presence of these inhibitors did not prevent
286 the peptide internalization (Fig 1D), which stained approximately 80% of the cells. These data confirmed
287 that the uptake of NFL peptide in hNSCs occurs by a passive pathway. The peptide can be visualized by
288 immunocytofluorescence thanks to the fluorescein, and cells were also stained with α -tubulin (Fig 1F) or
289 with specialized-NSCs markers: Nestin and CD133 (Fig 1E).

290

291 **Fig 1. Uptake of the FAM-labelled NFL-TBS.40-63 peptide in hNSCs.** (A) Percentage of FAM-
292 labelled NFL-TBS.40-63 internalized by hNSCs with increasing concentrations of peptide after 1 hour
293 incubation at 37°C. (B) Visualization of the FAM-labelled peptide after 1 hour incubation with 20 or 60
294 μ mol/L of peptide. Scale bar: 50 μ m. Green: FAM-labelled peptide (C) Internalization of 20 μ mol/L of
295 peptide after pre-treatment at 4°C or ATP depletion or (D) in the presence of inhibitors of the endocytosis
296 pathways. Data are presented as means \pm SEM. *P<0.05. (E-F) Immunocytofluorescence after incubation
297 of cells during 1 hour with 20 or 60 μ mol/L FAM-labelled peptide. Cells were stained with specific neural
298 stem cells markers: Nestin and CD133 (E) or with α -tubulin (F). Images were taken with the confocal
299 microscope. Red: Nestin, CD133 or α -tubulin; Green: FAM-labelled peptide; Blue: DAPI. Scale bar: 50
300 μ m. *P<0.05.

301

302 **The NFL-TBS.40-63 peptide has no effect on viability and**
303 **microtubule network.**

304 Paclitaxel (Taxol) (for the viability) or colchicine (for all other experiments) were used as positive
305 controls. To study potential effects of the peptide on hNSCs, we evaluated the viability of hNSCs after 72
306 hours incubation with the NFL peptide, at different concentrations, by the flow cytometry technique using
307 the Annexin-V-FITC/PI assay kit. The Fig 2A shows the percentage of viable cells (control: $80.31 \pm$
308 3.585%). Taxol at $0.1 \mu\text{mol/L}$ was used as a positive control to reduce viability ($50.92 \pm 3.122\%$). The
309 NFL peptide has no major effect on the viability of cells up to $40 \mu\text{mol/L}$ (74.10 ± 2.888 at $20 \mu\text{mol/L}$ and
310 68.99 ± 7.922 at $40 \mu\text{mol/L}$). At $60 \mu\text{mol/L}$, the viability was reduced at $50.94 \pm 4.207\%$. These results
311 show that the NFL-TBS.40-63 peptide has no major effect on viability of hNSCs below $40 \mu\text{mol/L}$ (Fig
312 2A and S1A Fig).

313 Then, we investigated the effect on microtubule network by incubating hNSCs with increasing amount of
314 peptide (20 or $60 \mu\text{mol/L}$) during 24 hours. Figures 2B and 2C show the microtubule network of cells
315 stained with an anti- α -tubulin antibody and their quantification. The microscopy visualization showed that
316 no major difference was observed between control cells and those treated with the NFL peptide unlike
317 with colchicine where there are fewer extensions and an altered microtubule network (Fig 2B). The
318 quantification confirmed that only the colchicine treatment was able to alter the microtubule network
319 ($13.67 \pm 2.455\%$ against $38.29 \pm 7.781\%$, control condition and colchicine respectively. 13.56 ± 1.853 and
320 $15.40 \pm 2.789 \%$ corresponding to NFL 20 and $60 \mu\text{mol/l}$, respectively) (Figure 2C). These results
321 demonstrate that the peptide had no major effect on microtubule network.

322
323 **Fig 2. The NFL-TBS.40-63 peptide has no toxic effect on the viability and the microtubule network.**

324 (A) Percentage of viable cells was evaluated after incubation during 72 hours with increasing
325 concentrations of NFL-TBS.40-63 peptide or with Taxol ($0.1 \mu\text{mol/L}$). The viability was measured by
326 FACS (Annexin-V-FITC / PI assay kit). (B) Effect of 20 or $60 \mu\text{mol/L}$ of FAM peptide (green) on the
327 microtubule network (α -tubulin: red; NFL FAM peptide: green) after 24 hours. Images were taken with
328 the confocal microscope. Scale bar: $20 \mu\text{m}$. (C) Percentage of cells with a disrupted microtubule network
329 in control condition, or with different treatments (colchicine, NFL 20 or $60 \mu\text{mol/l}$).

330

331 **Effects of the NFL-TBS.40-63 peptide on the proliferative properties**
332 **of hNSCs.**

333 We analysed the effect on cell cycle of the presence during 72 hours of increasing concentrations of
334 peptide (Fig 3A). We used colchicine as a positive control to block cells in the G₂/M phase (20) (13.70
335 ±1.97% against 5.9 ±0.76%, in respectively colchicine or control conditions). As shown in Fig 3A, the
336 NFL-TBS.40-63 peptide has no particular effect on the cell cycle of hNSCs (G₀/G₁ phase: 80.53±4.62%
337 against 68.5±3.84%, S phase: 13.57±4.14% against 20.07±4.04%, G₂/M phase: 5.9±0.76% against
338 11.43±2.7%, condition control and NFL-TBS.40-63 at 20 µmol/L, respectively). All those data show that
339 the peptide has no effect on hNSCs cell cycle.

340 Next, we determined if the proliferation could be affected by the presence of the peptide. For that, we
341 quantified the cell number after 72 hours incubation by two techniques. The first approach was the cell
342 quantification by the Trypan blue exclusion (Fig 3B). The number of cells in each experiment was
343 compared to the number of cells in the control condition. The presence of colchicine reduced the cell
344 proliferation by about 75% when compared to control (35.09 ± 8.68%). When cells were incubated with
345 increasing concentrations of peptide, the proliferation was significantly reduced in a dose dependent
346 manner (Fig 3B) (20 µmol/L: 47.68 ± 14.59% and 60 µmol/L: 24.48 ± 9.79%). Similar results were
347 obtained using the second method, where nuclei were stained with a fluorescent probe (CyQUANT GR)
348 (Fig 3C). The number of nuclei after 72 hours was gradually decreased when hNSCs were incubated with
349 increasing concentrations of peptide, thus confirming the anti-proliferative effect of the peptide on hNSCs
350 (117.2 ± 20.38 AU in control condition against 88.53 ± 10.39 AU at 20 µmol/L; 61.28 ± 8.607 AU at 40
351 µmol/L and 49.86 ± 8.023 AU at 60 µmol/L).

352 We also analysed the incorporation of thymidine analogues (BrdU and EdU – 5 hours incubation) after 72
353 hours of treatment with the NFL peptide. We noticed that the integration of both analogues seemed to be
354 increased with peptide, while the incorporation was reduced in the presence of colchicine (Figs 2D and E

355 and S1B Fig). Indeed, EdU incorporation went up from 24.7 ± 7.605 % in control to 50.11 ± 13.04 or
356 62.38 ± 11.11 with respectively 20 or 60 $\mu\text{mol/l}$ of peptide, and went down at 0.65 ± 0.2723 with
357 colchicine.

358

359 **Fig 3. The NFL-TBS.40-63 peptide affects the proliferation of hNSCs.** (A) Percentage of hNSCs at
360 G0/G1, S or G2/M of the cell cycle after treatment with colchicine (1 $\mu\text{g/ml}$) or increasing concentrations
361 of biotinylated-NFL-TBS.40-63 peptide. Data are presented as means \pm SEM. ****P<0.001.** (B-C) Cell
362 proliferation: Number of cells after 72 hours incubation with the NFL peptide was quantified using the
363 Trypan blue exclusion (B) or using the CyQUANT assay (C). (D-E) Thymidine analogue incorporation:
364 The number of BrdU (D) or EdU positive cells (E) was counted after 72 hours incubation with 1 $\mu\text{g/ml}$ of
365 colchicine or with increasing concentrations of peptide, and compared to the control condition. Thymidine
366 analogues were incubated 5 hours before the end of the test. Data presented as means \pm SEM. *P<0.05,
367 **P<0.01, ***P<0.001.

368

369 **Effect on self-renewal of hNSCs**

370 Then, we evaluated the ability of hNSCs to self-renew. Each dissociated cell can create a clone of itself in
371 proliferative medium to form a neurosphere. After 7 days of culture in the presence of increasing
372 concentrations of peptide or colchicine (1 $\mu\text{g/ml}$), we quantified the cell number and the size of spheres.
373 Fig 4A represents the average number of spheres by square centimetre after 7 days of culture. The number
374 of cells was significantly decreased with 20 $\mu\text{mol/L}$ of NFL-TBS.40-63 peptide, and fewer neurospheres
375 survived in the presence of 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide. Moreover, the size of neurospheres was also reduced in
376 the presence of peptide (Fig 4B). Both number and size of neurospheres after 7 days of culture with 1
377 $\mu\text{g/ml}$ of colchicine was reduced by 60%. Fig 4C represents typical neurospheres after 7 days in control
378 conditions, or in the presence of colchicine, or with 20 and 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide. In control condition, the
379 neurospheres were round, while only individual cells were found in the presence of colchicine. The

380 presence of 20 $\mu\text{mol/L}$ or 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide induced an increased number of adhesive cells, which lost
381 their round shape typical of neurospheres (Fig 4C).

382 We also quantified the number of cells that are still adhering by the CyQUANT assay kit. The number of
383 adherent cells proportionally increased with the increased concentration of the peptide. We noticed a
384 significant increase of the cell adhesion with 40 $\mu\text{mol/L}$ of peptide (from 256.0 ± 25.11 in control
385 condition to 385.4 ± 31.49 with 40 $\mu\text{mol/L}$ of NFL peptide) (Fig 4A). Using immunocytofluorescence on
386 coverslips without any coating we further confirmed these results. Figure 4D (left panels) shows that an
387 increased number of cells was systematically observed in the presence of 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide, and when
388 compared to the absence of peptide. To be sure that the same number of cells was seeded on coverslips, all
389 supernatants were transferred on BD Cell-Tak coated coverslips (Fig 4E, right panels), and then incubated
390 during 1 hour before being stained. Thus, neurospheres that were floating in the control condition (without
391 peptide) were all observed because they adhere on BD Cell-Tak coverslips. On the opposite, no
392 neurosphere was floating in the presence of 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide, because no neurosphere was observed
393 when the supernatant was transferred on BD Cell-Tak coated coverslip. No major difference was observed
394 between control (no peptide) and 20 $\mu\text{mol/L}$ of peptide, as shown after quantification with the CyQUANT
395 assay kit (256.0 ± 25.11 UA against 301.6 ± 28.34 UA in control or with 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively). All
396 together these data indicate that the peptide induces an increased cell adhesion. Since the increased
397 adherence of cells can be correlated with an increased number of differentiating cells, we next evaluated
398 the effect of the peptide on the differentiation process.

399

400 **Fig 4. The NFL-TBS.40-63 peptide affects the self-renewal of hNSCs and increases their adhesion.**

401 (A-C) Self-renewal of hNSCs: quantification of the number of neurospheres by square centimetre (A) and
402 their size (B) after 7 days incubation with increasing concentrations of the peptide, or with 1 $\mu\text{g/ml}$ of
403 colchicine. Scale bar: 150 μm . (C) Morphology of neurospheres observed after 7 days incubation in
404 normal conditions, or with colchicine, or with the NFL peptide at 20 or 60 $\mu\text{mol/L}$. (D-E) Quantification
405 of adherent cells after 72 hours with increasing concentrations of NFL peptide using the CyQUANT assay

406 (D) or by immunostaining of cells after 72 hours with increasing concentrations of biotinylated peptide
407 (E). Adherent cells were observed on coverslips without coating (top pictures), while no-adherent
408 (floating) cells were recovered following centrifugation and 1 hour incubation on BD Cell-Tak coated
409 coverslips (Bottom pictures). Cells were visualized by Phalloidin staining (red) and DAPI staining the
410 nucleus (blue). Scale bar: 100 μ m. Data presented as means \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

411

412 **Effect on differentiation of hNSCs**

413 We first investigated the neural/neuronal or glial differentiation of hNSCs by quantifying the glial or
414 neuronal progenitor markers (A2B5 and CD90, respectively) and the pre-oligodendrocyte marker (O4), by
415 FACS technique after 5 days in culture in a proliferative medium containing 20 or 60 μ mol/l of peptide.
416 We show that all the markers were increased by the presence of peptide (Fig 5A) in a proliferative
417 medium (CD90: 0.0825 ± 3.663 in control vs 3.663 ± 0.556 at 20 μ mol/l and 18.65 ± 3.983 at 60 μ mol/l;
418 A2B5: 1.193 ± 0.4333 in control vs 4.037 ± 1.687 at 20 μ mol/l and 30.21 ± 4.939 at 60 μ mol/l; O4: 0.847
419 ± 0.5733 in control vs 10.47 ± 2.504 at 20 μ mol/l and 24.07 ± 3.344 at 60 μ mol/l). These results indicate
420 an increased number of differentiated cells after 5 days in the presence of the peptide. No specific pathway
421 seems to be induced by the peptide since the three markers were similarly increased.

422 We also determined if the fate of hNSCs in a conditioned medium could be affected by the presence of the
423 peptide. We observed that in a conditioned medium (control condition), cells express more markers of
424 differentiation than in proliferative medium (CD90: 1.453 ± 0.9157 ; A2B5: 9.817 ± 5.486 ; O4: $3.217 \pm$
425 2.409 in conditioned medium). Moreover, the presence of peptide does not seem to induce a specific
426 differentiating way when cells are incubated in the conditioned versus the proliferative medium. However,
427 the differentiation was more boosted by the peptide in the conditioned medium than in the proliferative
428 medium (for both peptide concentrations). The conditioned medium stimulates the differentiation of cells
429 in the three pathways, and the peptide over-stimulates this differentiation, but without increasing a
430 selective pathway.

431
432 To better characterize the differentiation of hNSCs after 5 days in the presence of the NFL-peptide, a RT-
433 qPCR screening was performed using different markers from the four differentiation pathways (stem cell,
434 neuron, astrocyte or oligodendrocyte) (Fig 5B). At 20 $\mu\text{mol/L}$ of peptide, the gene expression of *NESTIN*
435 and *SOX2* were increased, while it was not increased at 60 $\mu\text{mol/L}$. The peptide at both concentrations
436 decreased the expression of the *CD133* marker. The neuron-specific markers *β III-tubulin* and *DCX* were
437 increased at 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide, indicating a commitment towards the neuronal differentiation pathway.
438 While the astrocyte markers (*GFAP* and *CD44*) were overexpressed (more than 10 times compared to the
439 control condition) with increasing concentrations of peptide, the *GLAST* marker was reduced. The
440 oligodendrocyte marker *CNP* was not modified by the presence of the peptide unlike the *GALC* marker,
441 which was decreased with 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide. Immunocytofluorescence using antibodies revealed
442 similar effects, but the differences were not as obvious as the RT-qPCR technique because of the very
443 slow growth of these cells (not shown).

444
445 **Fig 5. The NFL-TBS.40-63 peptide increases differentiation of hNSCs. (A-B)** Differentiation of cells
446 induced after 5 days by increasing concentrations of NFL peptide in a proliferative or conditioned
447 medium. (A) Percentage of cells which express the neuronal marker CD90 (top graph), the glial marker
448 A2B5 (medium graph) or the oligodendroglial marker O4 (bottom graph) after 5 days in the presence of
449 the NFL peptide at 20 or 60 $\mu\text{mol/L}$ in the proliferative medium (white bars) or the conditioned medium
450 (dark bar). Markers were analysed by FACS technique and some examples are given in the left part of
451 each graph. (B) The relative expression level of *CD133*, *Nestin*, *Sox2*, *β III tubulin*, *DCX*, *NCAM*, *GFAP*,
452 *CD44*, *GLAST*, *GALC*, *CNP* gene was quantified by reverse transcription polymerase chain reaction after
453 5 days with 0 (control condition), 20 or 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide. The gene relative expression was compared
454 with control condition after normalization with the *GAPDH* gene (value of the control condition = 1)
455 thanks to the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. All data were presented as means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

456

457 **Discussion**

458 The possibility of manipulating NSCs directly in the brain for neurodegenerative therapies would be a
459 major breakthrough in the context of neurological disorders. As previously shown, the NFL-TBS.40-63
460 peptide is a promising tool to target newborn or adult rat NSCs and modify their behaviour (10). It is
461 however essential to first evaluate the potential of this peptide to modify human NSCs before considering
462 this approach for a clinical use. Here we show that the peptide NFL-TBS.40-63 is able to enter by direct
463 translocation in hNSCs without major effect on their viability at low concentration. However, at higher
464 concentration the peptide decreases their proliferation and their self-renewal, which is consistent with an
465 increase of their adhesion and differentiation in the neuronal and astrocytic pathways. Taken together,
466 those results show for the first time that a peptide is well internalized in NSCs from human foetus and it
467 modifies their properties including proliferation, self-renewal and differentiation.

468
469 The peptide NFL-TBS.40-63 is able to enter in NSCs from human foetus in a dose-depend manner (Fig 1)
470 as previously shown for NSCs from newborn and adult rats (10) or for glioblastoma cells (21,22). It was
471 also internalized by oligodendrocytes (23) and certain human tumour cell lines (Hela, MCF7, LNCaP)
472 (7,21), while its internalization was very low in healthy astrocytes or neurons (9,21). However, the
473 internalization pathway was not the same for all these cells. While the NFL-TBS.40-63 uptake occurs
474 through clathrin endocytosis in oligodendrocytes (23), or through the three endocytosis pathways in
475 glioblastoma cells (22), it was internalized by direct translocation (an energy and temperature independent
476 pathway), both in human and rat derived NSCs (Fig 1) (10). These different uptake mechanisms could be
477 due to the composition of the membrane. Indeed, interactions between the charges of the peptide and
478 membrane can be affected by the membrane components, as already shown for other cell-penetrating
479 peptides (24). Furthermore, as previously described, the high proliferation activity of glioblastoma cells
480 can account for the massive NFL peptide internalization (22). Stem cells (25) and tumour cells are also
481 proliferative cells, when compared to neurons (26) or astrocytes (27) that progressively diminish their

482 proliferation rate when they differentiate. This observation supports the idea that this peptide at low
483 concentration would be a promising tool to target NSCs of the central nervous system without affecting
484 neurons and astrocytes. Interestingly, the viability of hNSCs was not particularly affected by the peptide,
485 except at high concentration (60 $\mu\text{mol/L}$) where half of the cells survived (Fig 2). We used Paclitaxel
486 instead of colchicine to study the viability because colchicine did not affect significantly the viability as
487 already reported for other cells like HL-1 cells (28). The effect of Paclitaxel was not very important, and
488 this could be due to the strong resistance of stem cells to these drugs as shown previously for
489 mesenchymal stem cells (29).

490

491 The NFL-TBS.40-63 peptide has multiple effects on glioblastoma cells where it enters massively. In
492 particular, it destroys their microtubule network, stops their cell cycle, and reduces their proliferation and
493 migration (21). Here, we showed that the microtubule network of hNSCs is not affected by the peptide
494 even at high concentrations (Fig 2), while the microtubule network in glioblastoma cells is affected even
495 at low concentrations (10 $\mu\text{mol/L}$) (21). This differential effect on the microtubule network could be
496 explained by a specific-tubulin expression in glioblastoma cells, which is not present in NSCs. Indeed,
497 docking experiments between the NFL peptide and tubulin indicate that the peptide binds on a site located
498 near the β -tubulin C-terminal end (30). Moreover, similar docking experiments showed that the
499 conformation of the β -tubulin C-terminal domain is important for the binding of the peptide. Indeed, the
500 C-terminal region of βI tubulin, but not of βIII tubulin, forms internal contacts preventing the binding of
501 the peptide on tubulin (31). Finally it was shown that β -tubulins are differently expressed depending on
502 the tissue (32). The βII -tubulin isotype is found in NSCs (33), while βIII -tubulin is overexpressed in
503 human glioblastoma cells and breast cancer cells (34), where the NFL-TBS.40-63 peptide affects the
504 microtubule network (7). Interestingly, the NFL-TBS.40-63 peptide does not affect microtubules in
505 neurons, which express βIII -tubulin (21). All together, these data suggest that the specific effect of the
506 peptide on microtubules may be due to a specific post-transcriptional modification of the βIII -tubulin,
507 which is present in several cancer cells but absent in NSCs.

508

509 When investigating the effect of the peptide on properties of hNSCs, our data show that they lose their
510 stem cell characteristics. Using FACS analysis (Propidium Iodide incorporation) we observed that the cell
511 cycle (G0/G1, G2/M, S phases) was not modified by the presence of the peptide (Fig 3), while the
512 presence of the peptide, even at low concentrations (20 $\mu\text{mol/L}$) in the culture medium of hNSCs during 3
513 days, induces a significant decrease of the number of hNSC (Trypan blue and Cyquant tests). The effect
514 with 60 $\mu\text{mol/L}$ of peptide was comparable to the effect of colchicine. We also measured the incorporation
515 of two thymidine analogues (BrdU and EdU) to investigate the mitosis activity of cells. Such analogues
516 are incorporated only in the replicative stage of the DNA (during mitosis stage – phase S). Here, we
517 observed that the peptide increased the incorporation of these analogues after 72 hours (Fig 3). We
518 expected to also have an increased number of cells in phase S with the FACS technique because of the
519 observed BrdU and EdU increase. This was not the case, and it could be explained by the fact that FACS
520 is a technique, which takes cells in a punctual point compared to BrdU/EdU, where cells are incubated
521 during 5 hours. Cells could finish their phase S during this period and be in phase G2/M or return to phase
522 G0 (differentiated cells for example). Thus, at the time of FACS measurement, BrdU positive cells could
523 be detected as G2/M cells or G0/G1 cells. Moreover, the FACS method does not allow distinguishing
524 early and late phase S (late phase G1 and early phase G2, respectively).

525

526 When incubated in the right medium, NSCs form neurospheres in suspension after few days, but fewer
527 neurospheres were formed in the presence of peptide. These results are consistent with the decrease of the
528 proliferation and the increase of the adhesion after 72 hours. Moreover, the size of neurospheres was also
529 reduced as a consequence of the decrease of cell proliferation as soon as 72 hours as previously described
530 (35). This decrease in size could be explained by the uptake of the NFL peptide in the fast dividing cells as
531 previously shown (22). Indeed, there are heterogeneous cells in sphere, a small proportion are a slow
532 dividing cells and the other are fast dividing cells and the proportion of each cells modify the size of the
533 sphere (36). We do not know exactly the mechanism of inhibition of the proliferation of hNSCs, but it can

534 be a consequence of the effect of NFL-TBS.40-63 peptide on mitochondria network as previously
535 observed on glioblastoma (37). Indeed, the mitochondria network is closely linked to the proliferation
536 mechanism thanks to the aspartate synthesis (38), and thus the peptide at low concentration could affect
537 the mitochondria in hNSCs inducing a reduction of their proliferation. Reduction of the proliferation was
538 consistent with the increase of cell adhesion. One hypothesis is that the peptide affects the symmetric
539 division of hNSCs by reducing the proliferation rate and thus increasing the production of differentiated
540 cells, which are shown by adhesive cells. These results could be consistent with a reduction of the number
541 of cells after 72 hours: peptide induces production of differentiated cells, which are post-mitotic cells
542 Several peptides, endogenous or not, were shown to promote proliferation and migration of these cells
543 (39,40) but none of them had an inhibitory effect on proliferation. To check that adhered cells are more
544 differentiated cells, we studied the expression of some differentiation markers. We first investigated the
545 expression of neuronal (CD90) and glial (A2B5 and O4) progenitor markers. We showed an increase of
546 neuronal and glial markers in treated cells after 5 days confirming a differentiation towards the neuronal
547 and glial pathways. This technique does not allow discriminating between astrocytic and oligodendrocytic
548 pathways. We further investigated the gene expression of the four pathways (stem cell, neuron, astrocyte
549 and oligodendrocyte). Interestingly, the RT-PCR analysis showed a decreased expression of *CD133*, a
550 stem cell specific marker. The *NESTIN* and *SOX2* expression were increased after treatment, but both
551 markers are also expressed by neural progenitors (41) suggesting a neuronal commitment of the cells. The
552 mRNA of early neuronal markers Tubulin β III and *DCX* were both increased at 60 μ mol/L of NFL
553 peptide, validating the neuronal differentiation of cells. *NCAM* which was not modified with the peptide,
554 is expressed particularly by mature neurons, suggesting that cells do not differentiate towards a mature
555 neuronal phenotype (42). The astrocyte marker *GFAP* was increased with both concentrations of NFL
556 peptide, while *CD44* was only increased at 60 μ mol/L, suggesting an astrocytic differentiation of the cells.
557 To be sure that we visualized only the GFAP expressed by astrocytes, we did not study the delta isoform
558 of *GFAP* which is expressed by neural stem cells (43). *GLAST* is expressed by fetal stem cells (44), and
559 thus the decrease of *GLAST* expression induced by the peptide could supports the loss of stem cell

560 properties. A study has already shown that some human neural stem cells can express the GALC marker
561 (45). The oligodendrocyte pathway did not seem to be modified by the presence of the peptide in hNSCs.
562 This data explains the expression of GALC in our cells and the decreased expression with 60 $\mu\text{mol/L}$ of
563 peptide.

564 We evaluated also whether cells growing in a conditioned medium with peptide could induce their
565 differentiation in a specific way. Even if we had more differentiated cells in the conditioned medium
566 (versus the proliferating medium), the addition of the peptide does not induce cell differentiation in a
567 particular pathway after 10 days in culture. The conditioned medium stimulates the differentiation of cells
568 in the three pathways, and the peptide over-stimulates this differentiation, but without increasing a
569 selective pathway.

570

571 To resume, in the presence of peptide, the number of cells was reduced after 3 days of culture as well as
572 the self-renewal while the BrdU/EdU incorporation was increased as well as the differentiation.

573 Our hypothesis, explained in Figure 6, is that the peptide induces a modification in the mode of cell
574 division. The symmetric proliferating division creates two stem cells, which will form two neurospheres in
575 culture. Each new created cell can also divide to provide two new stem cells. The symmetric
576 differentiating division (or symmetric terminal division) creates two cells engaged in the differentiation
577 pathways as previously shown (46). These differentiated cells will not divide (or less) because they soon
578 become post-mitotic cells (26). Thus, to explain the observed results, the NFL-TB.40-63 peptide could
579 stimulate the symmetric differentiating division or decrease the symmetric proliferating division of hNSCs
580 (Fig 6). It could be interesting to confirm that the cells which are BrdU+ are also positive for
581 differentiation markers.

582 To our knowledge, it is the first time that a peptide is shown to penetrate so efficiently in NSCs. It has no
583 major effect on these cells at low concentration (less than 20 $\mu\text{m/L}$), while at higher concentration it
584 inhibits their proliferation and self-renewal and increases their adhesion and differentiation in a
585 proliferative medium. Indeed, all experiments were done in proliferative medium, and because this peptide

586 is able to push the hNSCs to differentiate in this medium, it would be interesting to counteract the
587 inconvenient transfer of cells in defined medium and it can act as a substrate. Indeed, this peptide could be
588 an interesting tool to target and differentiation endogenous NSCs after intraventricular injection in human
589 patient with neuronal disease, since it is not able to penetrate inside healthy astrocytes or neurons (21).
590 Further experimentation will be done to describe and detail the mechanism of action of NFL-TBS.40-63
591 peptide.

592

593 **Fig 6: Model proposed to explain the effect of the NFL peptide on human neural stem cells. *In vitro*,**
594 without peptide (top diagram), cells proliferate mainly following a symmetric proliferating division mode
595 (SPD) to create proliferating clones and thus neurospheres (the self-renewal). The asymmetric division
596 (AD) and symmetric differentiating division (SDD) are very low because cells are growing in a
597 proliferative medium containing EGF and FGF, which maintain undifferentiated cells. The presence of the
598 NFL peptide (bottom diagram) prevents self-renewal – the SPD. The adhesion of cells and their
599 differentiation were stimulated in the presence of peptide. Our hypothesis is that the peptide promotes the
600 AD or SDD to stimulate the differentiation of cells, and/or reduces the SPD.

601

602

603 **Conclusions**

604 Previous works showed that the NFL-TBS.40-63 peptide penetrates in NSCs from newborn and adult rats,
605 where it affects their properties, in particular it increases their differentiation in neural pathways (10).
606 Here, we show that this peptide enters also by direct translocation in human NSCs in a dose dependent
607 manner. The peptide induces a decrease of the self-renewal and proliferation of hNSCs, consistent with an
608 increase of adhesion and differentiation in the neuronal and astrocytic pathways. The peptide could change
609 the division of cells from symmetric proliferating division to symmetric differentiating division. This
610 peptide could be used as a targeting tool following its absorption on nanoparticles as previously shown on
611 glioblastoma cells (47) or on rat NSCs (48). Therefore, this peptide represents a new promising tool to
612 target and manipulate NSCs in the case of neurodegenerative diseases, as well as to bring nanoparticles
613 selectively in such cells.

614 **Acknowledge**

615 We gratefully acknowledge PACeM (Plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire) and especially
616 Catherine Guillet for her help using cytometer, Jérôme Cayon and Camille Taillandier for their help
617 concerning the RT-PCR. We also acknowledge Rodolphe Perrot from SCIAM (Service Commun
618 d'Imageries et d'Analyses Microscopique) for all images done by confocal microscopy. We are grateful to
619 L. Sindji and P. Saulnier for advice in cell culture (INSERM U1066, Angers) and statistical analysis
620 respectively, as well as the members of the laboratory (Dr C. Fressinaud, F. Letournel, D. Carradori and
621 C. Lépinoux-Chambaud).

622

623 This work was supported by AFM (Association Française contre les Myopathies), ARC (Association de
624 Recherche contre le Cancer), Ligue contre le cancer 49 and 85, MATWIN (Maturation & Accelerating
625 Translation With Industry), LUNAM (L'université Nantes, Angers, Le Mans) and « Région des Pays de la
626 Loire » to EYER. J. BARREAU. K is supported by a grant from the University of Angers, in the
627 framework of NanoFar 'European Doctorate in Nanomedicine' Erasmus Mundus Joint Doctorates
628 program funded by the education, Audiovisual and Culture Executive Agency.

629 Bibliographie

- 630 1. Chiu I-M, Hsu Y-C, Chen S-L, Wang D-Y. Stem Cell-Based Therapy in Neural Repair. *Biomed J.*
631 2013;36(3):98.
- 632 2. Müller F-J, Snyder EY, Loring JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci.*
633 2006 Jan;7(1):75–84.
- 634 3. Mazzini L, Gelati M, Profico DC, Sgaravizzi G, Progetti Pensi M, Muzi G, et al. Human neural stem
635 cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial. *J Transl Med.* 2015;13:17.
- 636 4. Kishk N, Abokrysha N. Stem cell in neurological disorders. In: *Stem Cells in Clinic and Research*
637 [Internet]. InTech; 2011 [cited 2017 Aug 25]. p. 363–400. Available from:
638 <https://www.intechopen.com/download/pdf/18231>
- 639 5. Song L, Goldman E. Induced pluripotent stem cells are induced pluripotent stem cell-like cells. *J*
640 *Biomed Res.* 2015 Jan;29(1):1–2.
- 641 6. Guillaume DJ, Huhn SL, Selden NR, Steiner RD. Cellular therapy for childhood neurodegenerative
642 disease. Part I: rationale and preclinical studies. *Neurosurg Focus.* 2008;24(3–4):E22.
- 643 7. Bocquet A, Berges R, Frank R, Robert P, Peterson AC, Eyer J. Neurofilaments bind tubulin and
644 modulate its polymerization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2009 Sep 2;29(35):11043–54.
- 645 8. Berges R, Balzeau J, Takahashi M, Prevost C, Eyer J. Structure-function analysis of the glioma
646 targeting NFL-TBS.40-63 peptide corresponding to the tubulin-binding site on the light
647 neurofilament subunit. *PloS One.* 2012;7(11):e49436.
- 648 9. Fressinaud C, Eyer J. Neurofilament-tubulin binding site peptide NFL-TBS.40-63 increases the
649 differentiation of oligodendrocytes in vitro and partially prevents them from lysophosphatidyl
650 choline toxicity. *J Neurosci Res.* 2014 Feb;92(2):243–53.
- 651 10. Lépinoux-Chambaud C, Barreau K, Eyer J. The Neurofilament-Derived Peptide NFL-TBS.40-63
652 Targets Neural Stem Cells and Affects Their Properties. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Jul;5(7):901–
653 13.
- 654 11. Brnic D, Stevanovic V, Cochet M, Agier C, Richardson J, Montero-Menei CN, et al. Borna Disease
655 Virus Infects Human Neural Progenitor Cells and Impairs Neurogenesis. *J Virol.* 2012 Mar
656 1;86(5):2512–22.
- 657 12. Hu Y, Hung AC, Cui H, Dawkins E, Bolos M, Foa L, et al. Role of Cystatin C in Amyloid Precursor
658 Protein-induced Proliferation of Neural Stem/Progenitor Cells. *J Biol Chem.* 2013 Jun
659 28;288(26):18853–62.
- 660 13. Narayanan G, Yu YH, Tham M, Gan HT, Ramasamy S, Sankaran S, et al. Enumeration of Neural
661 Stem Cells Using Clonal Assays. *J Vis Exp [Internet].* 2016 Oct 4 [cited 2017 May 15];(116).
662 Available from: [http://www.jove.com/video/54456/enumeration-of-neural-stem-cells-using-clonal-](http://www.jove.com/video/54456/enumeration-of-neural-stem-cells-using-clonal-assays)
663 [assays](http://www.jove.com/video/54456/enumeration-of-neural-stem-cells-using-clonal-assays)

- 664 14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time
665 Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
- 666 15. Guo Z, Peng H, Kang J, Sun D. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and
667 therapeutic applications. *Biomed Rep*. 2016 May;4(5):528–34.
- 668 16. Tosteson DC. *Transport Across Single Biological Membranes*. Springer Science & Business Media;
669 2012. 459 p.
- 670 17. Drin G, Cottin S, Blanc E, Rees AR, Tamsamani J. Studies on the Internalization Mechanism of
671 Cationic Cell-penetrating Peptides. *J Biol Chem*. 2003 Aug 15;278(33):31192–201.
- 672 18. Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, et al. The Use
673 of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol Ther*.
674 2010 Mar;18(3):561–9.
- 675 19. Chen C-L, Hou W-H, Liu I-H, Hsiao G, Huang SS, Huang JS. Inhibitors of clathrin-dependent
676 endocytosis enhance TGF signaling and responses. *J Cell Sci*. 2009 Jun 1;122(11):1863–71.
- 677 20. Boquest AC, Day BN, Prather RS. Flow Cytometric Cell Cycle Analysis of Cultured Porcine Fetal
678 Fibroblast Cells. *Biol Reprod*. 1999 Apr 1;60(4):1013–9.
- 679 21. Berges R, Balzeau J, Peterson AC, Eyer J. A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting
680 their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*.
681 2012 Jul;20(7):1367–77.
- 682 22. Lépinoux-Chambaud C, Eyer J. The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in
683 glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm*. 2013 Oct 1;454(2):738–47.
- 684 23. Fressinaud C, Eyer J. Neurofilaments and NFL-TBS.40-63 peptide penetrate oligodendrocytes
685 through clathrin-dependent endocytosis to promote their growth and survival in vitro. *Neuroscience*.
686 2015 Jul 9;298:42–51.
- 687 24. Bechara C, Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett*. 2013
688 Jun 19;587(12):1693–702.
- 689 25. Cooper GM. *Cell Proliferation in Development and Differentiation*. 2000 [cited 2016 Jul 12];
690 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/books/NBK9906/>
- 691 26. Ajioka I. Coordination of proliferation and neuronal differentiation by the retinoblastoma protein
692 family. *Dev Growth Differ*. 2014 Jun 1;56(5):324–34.
- 693 27. Guizzetti M, Kavanagh TJ, Costa LG. Measurements of astrocyte proliferation. *Methods Mol Biol*
694 Clifton NJ. 2011;758:349–59.
- 695 28. Margolis G, Hertzberg-Bigelman E, Levy R, Ben-Shoshan J, Keren G, Entin-Meer M. Differential
696 Effects of Colchicine on Cardiac Cell Viability in an in vitro Model Simulating Myocardial
697 Infarction. *Cardiology*. 2016 Feb 17;134(1):57–64.
- 698 29. Bosco DB, Kenworthy R, Zorio DAR, Sang Q-XA. Human Mesenchymal Stem Cells Are Resistant
699 to Paclitaxel by Adopting a Non-Proliferative Fibroblastic State. *PLoS ONE [Internet]*. 2015 Jun 1
700 [cited 2017 Apr 14];10(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452335/>

- 701 30. Laurin Y, Savarin P, Robert CH, Takahashi M, Eyer J, Prevost C, et al. Investigating the Structural
702 Variability and Binding Modes of the Glioma Targeting NFL-TBS.40-63 Peptide on Tubulin.
703 *Biochemistry (Mosc)*. 2015 Jun 16;54(23):3660–9.
- 704 31. Laurin Y, Eyer J, Robert CH, Prevost C, Sacquin-Mora S. Mobility and Core-Protein Binding
705 Patterns of Disordered C-Terminal Tails in β -Tubulin Isoforms. *Biochemistry (Mosc)*. 2017 Mar
706 28;56(12):1746–56.
- 707 32. Leandro-García LJ, Leskelä S, Landa I, Montero-Conde C, López-Jiménez E, Letón R, et al.
708 Tumoral and tissue-specific expression of the major human β -tubulin isoforms. *Cytoskeleton*. 2010
709 avril;67(4):214–23.
- 710 33. Nakamura Y, Yamamoto M, Oda E, Yamamoto A, Kanemura Y, Hara M, et al. Expression of
711 Tubulin Beta II in Neural Stem/Progenitor Cells and Radial Fibers During Human Fetal Brain
712 Development. *Lab Invest*. 2003 Apr;83(4):479–89.
- 713 34. Katsetos CD, Dráberová E, Šmejkalová B, Reddy G, Bertrand L, de Chadarevian J-P, et al. Class III
714 β -Tubulin and γ -Tubulin are Co-expressed and Form Complexes in Human Glioblastoma Cells.
715 *Neurochem Res*. 2007 Aug;32(8):1387–98.
- 716 35. Guichet P-O, Guelfi S, Teigell M, Hoppe L, Bakalara N, Bauchet L, et al. Notch1 Stimulation
717 Induces a Vascularization Switch With Pericyte-Like Cell Differentiation of Glioblastoma Stem
718 Cells: Notch1 Vascularization of Glioma Stem Cells. *STEM CELLS*. 2015 Jan;33(1):21–34.
- 719 36. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as
720 an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2011 May;8(5):486–98.
- 721 37. Rivalin R, Lepinoux-Chambaud C, Eyer J, Savagner F. The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma
722 peptide disrupts microtubule and mitochondrial networks in the T98G glioma cell line. *PLoS One*.
723 2014;9(6):e98473.
- 724 38. Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM. An Essential Role of
725 the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis.
726 *Cell*. 2015 Jul;162(3):540–51.
- 727 39. Geloso MC, Corvino V, Di Maria V, Marchese E, Michetti F. Cellular targets for neuropeptide Y-
728 mediated control of adult neurogenesis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 Mar 16 [cited 2016 Jul
729 26];9. Available from:
730 http://www.frontiersin.org/Cellular_Neuroscience/10.3389/fncel.2015.00085/abstract
- 731 40. Itokazu Y, Yu RK. Amyloid β -Peptide 1–42 Modulates the Proliferation of Mouse Neural Stem
732 Cells: Upregulation of Fucosyltransferase IX and Notch Signaling. *Mol Neurobiol*. 2014
733 Aug;50(1):186–96.
- 734 41. Remaud S, López-Juárez SA, Bolcato-Bellemin A-L, Neubergh P, Stock F, Bonnet M-E, et al.
735 Inhibition of Sox2 Expression in the Adult Neural Stem Cell Niche In Vivo by Monoclonal-based
736 siRNA Delivery. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013 Apr;2(4):e89.
- 737 42. Zhang J, Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and
738 Neurogenesis. *BioMed Res Int*. 2015 Sep 1;2015:e727542.

- 739 43. Alvarez-Palazuelos LE, Robles-Cervantes MS, Castillo-Velazquez G, Rivas-Souza M, Guzman-
740 Muniz J, Moy-Lopez N, et al. Regulation of neural stem cell in the human SVZ by trophic and
741 morphogenic factors. *Curr Signal Transduct Ther*. 2011 Sep 1;6(3):320–6.
- 742 44. Moreno-Estellés M, González-Gómez P, Hortigüela R, Díaz-Moreno M, San Emeterio J, Al C, et
743 al. Symmetric Expansion of Neural Stem Cells from the Adult Olfactory Bulb Is Driven by
744 Astrocytes Via WNT7A. *STEM CELLS*. 2012 Dec 1;30(12):2796–809.
- 745 45. Oikari LE, Okolicsanyi RK, Griffiths LR, Haupt LM. Data defining markers of human neural stem
746 cell lineage potential. *Data Brief*. 2016 Jun;7:206–15.
- 747 46. Costa MR, Ortega F, Brill MS, Beckervordersandforth R, Petrone C, Schroeder T, et al. Continuous
748 live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development*. 2011
749 Mar 15;138(6):1057–68.
- 750 47. Balzeau J, Pinier M, Berges R, Saulnier P, Benoit J-P, Eyer J. The effect of functionalizing lipid
751 nanocapsules with NFL-TBS.40-63 peptide on their uptake by glioblastoma cells. *Biomaterials*.
752 2013 Apr;34(13):3381–9.
- 753 48. Carradori D, Saulnier P, Pr eat V, des Rieux A, Eyer J. NFL-lipid nanocapsules for brain neural stem
754 cell targeting in vitro and in vivo. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2016 Sep
755 28;238:253–62.

756

757

758 **S1 Fig. FACS Data for viability (A) and EdU incorporation (B).** Data were created from FCS Express
759 6 software.

Figures :

Figure 1 :

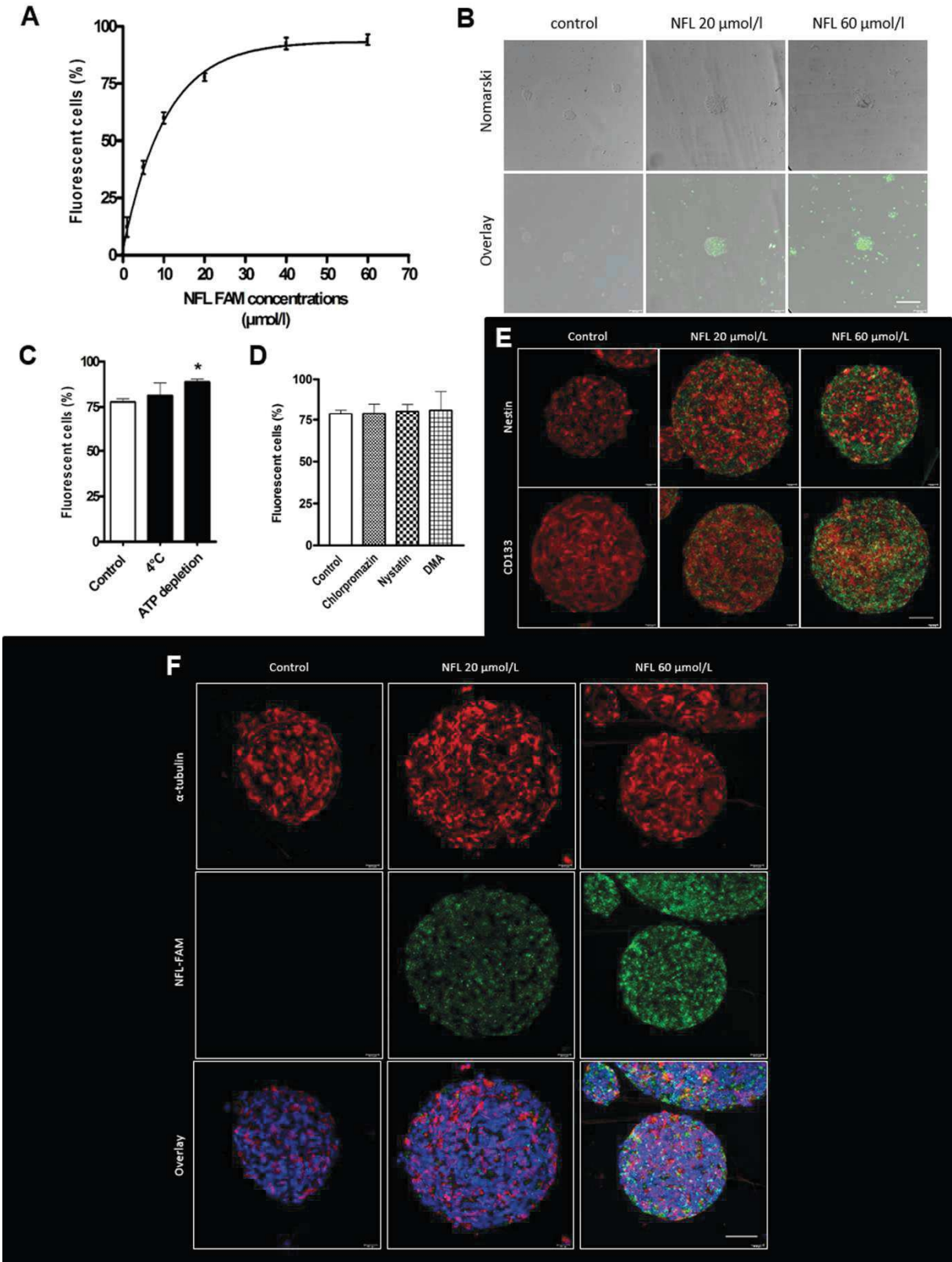


Figure 2 :

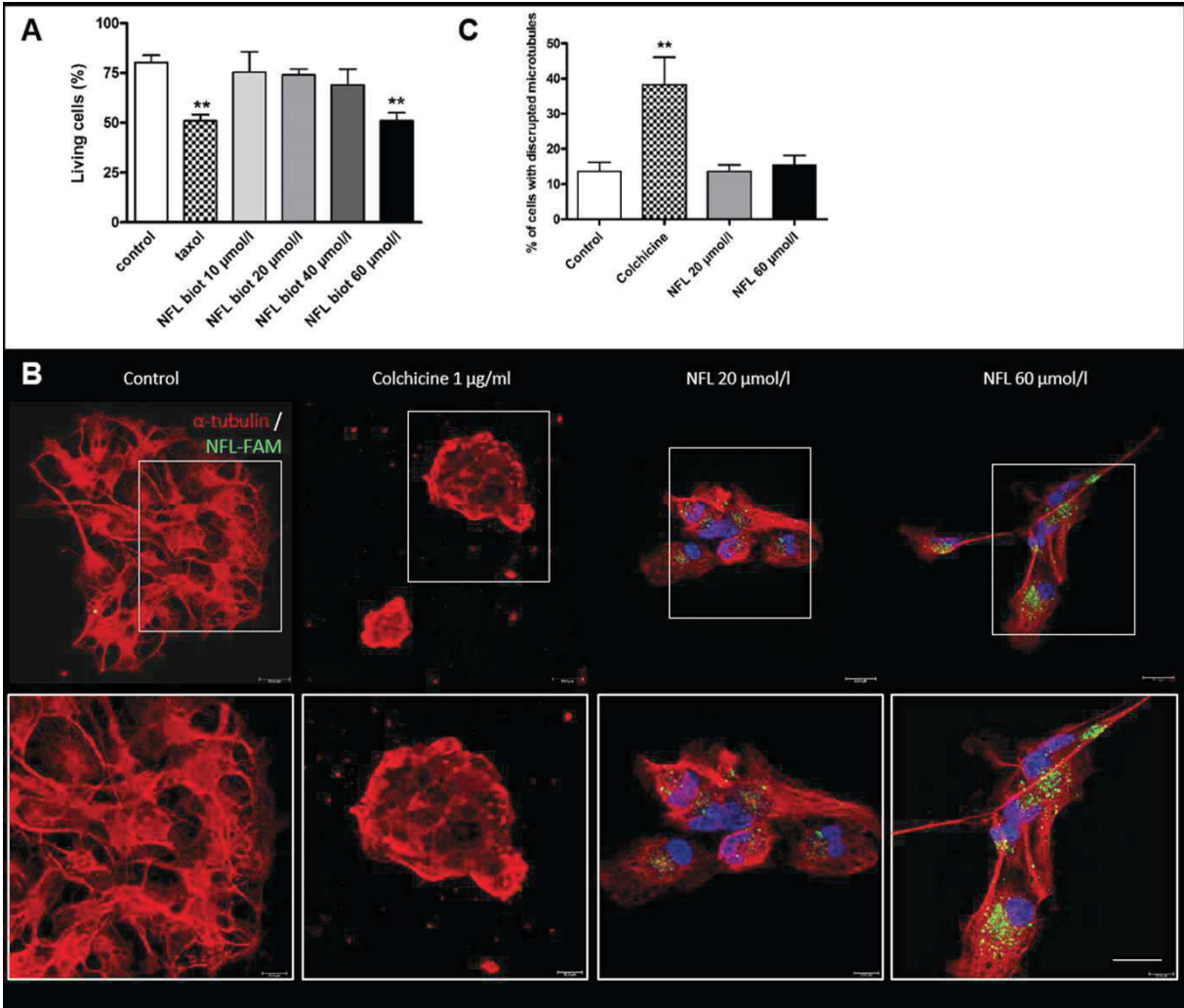


Figure 3 :

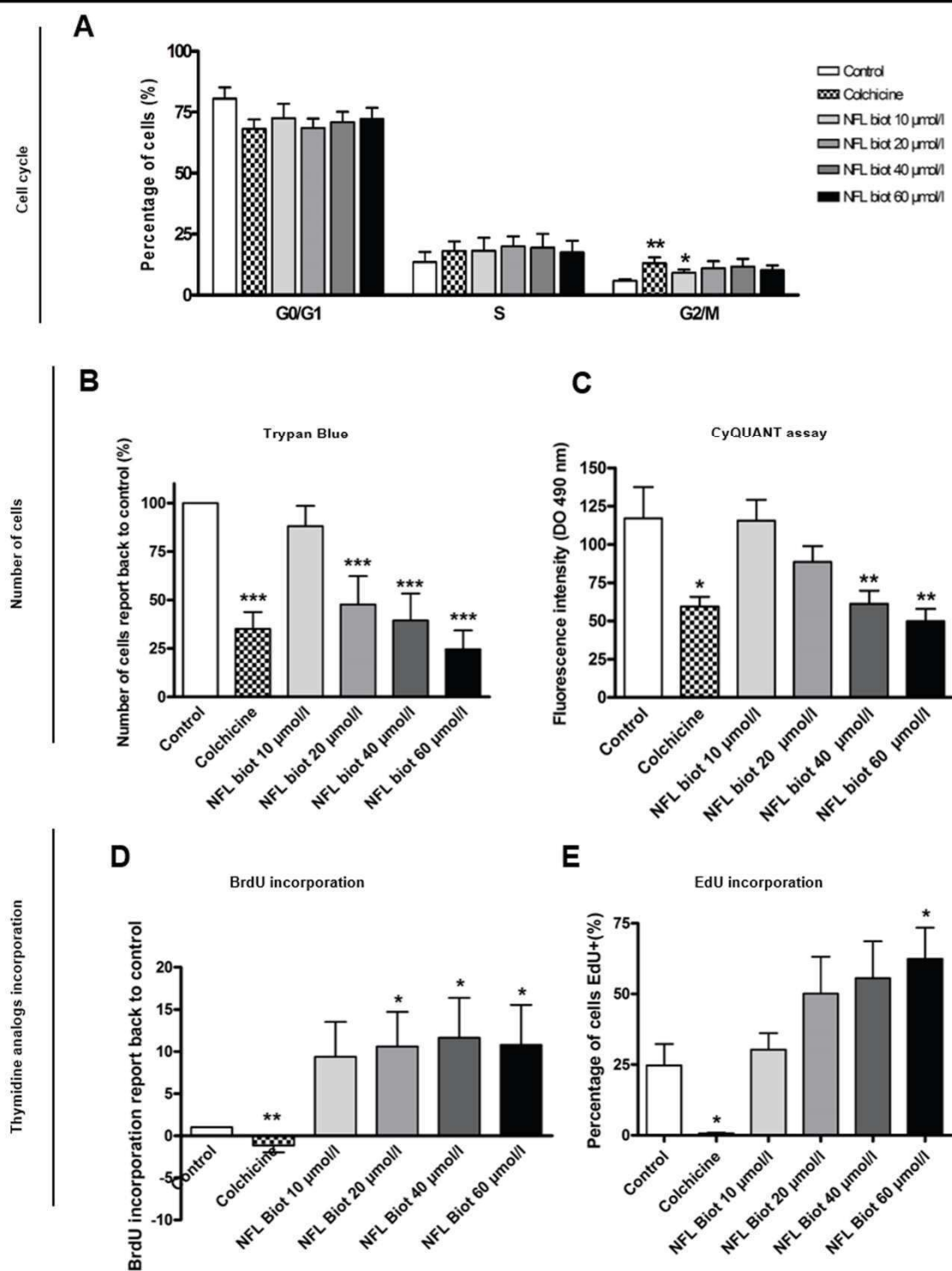


Figure 4 :

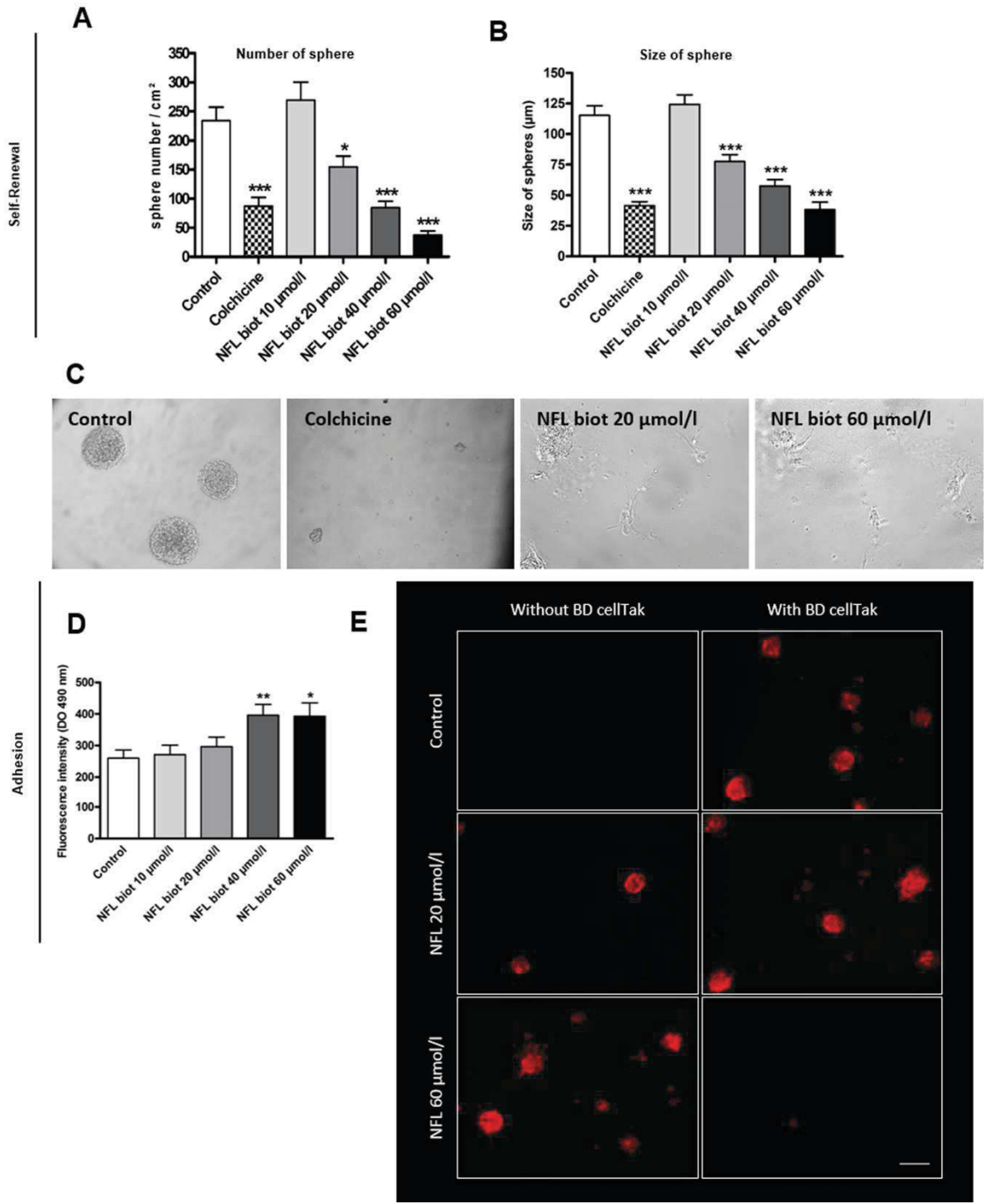


Figure 5 :

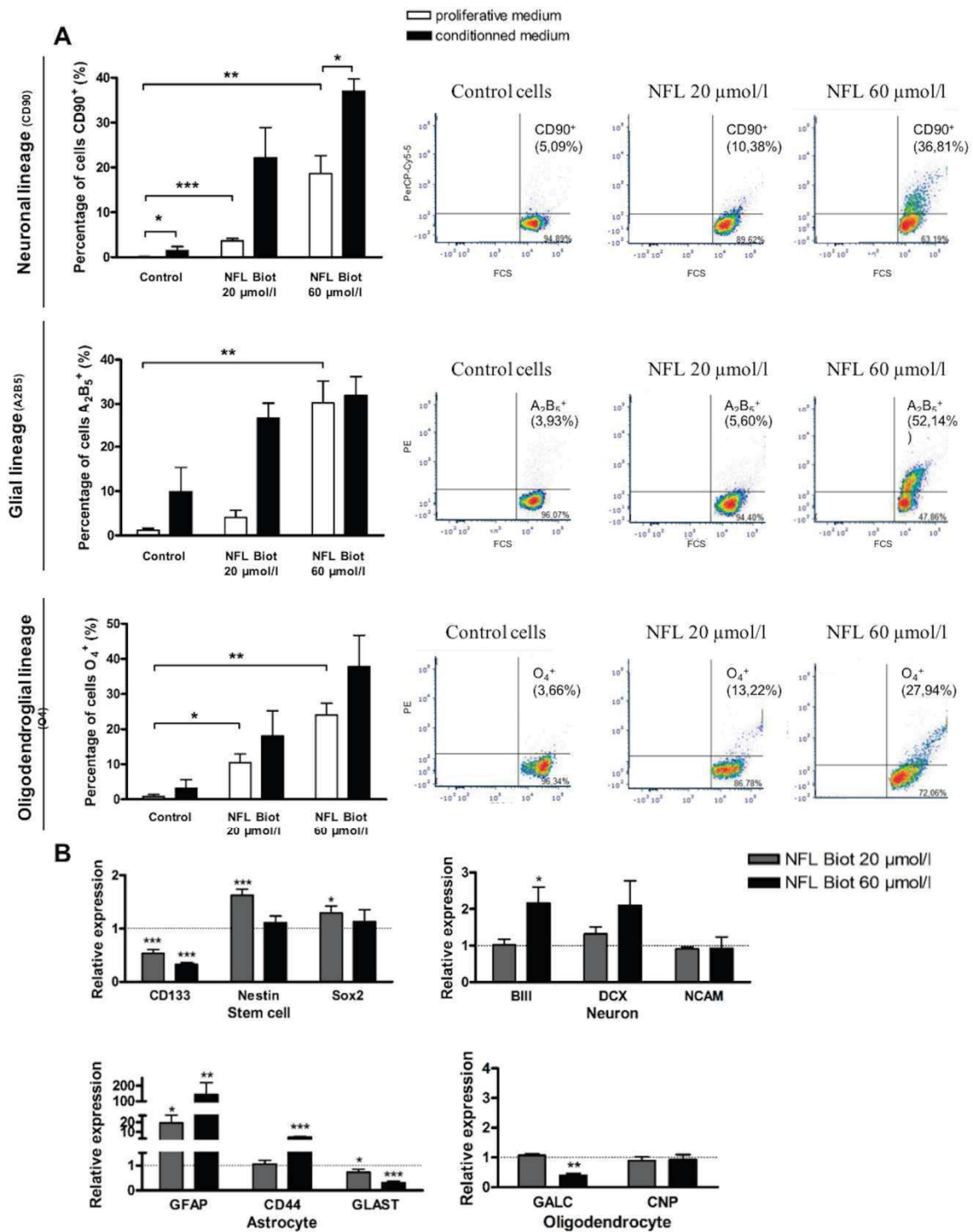
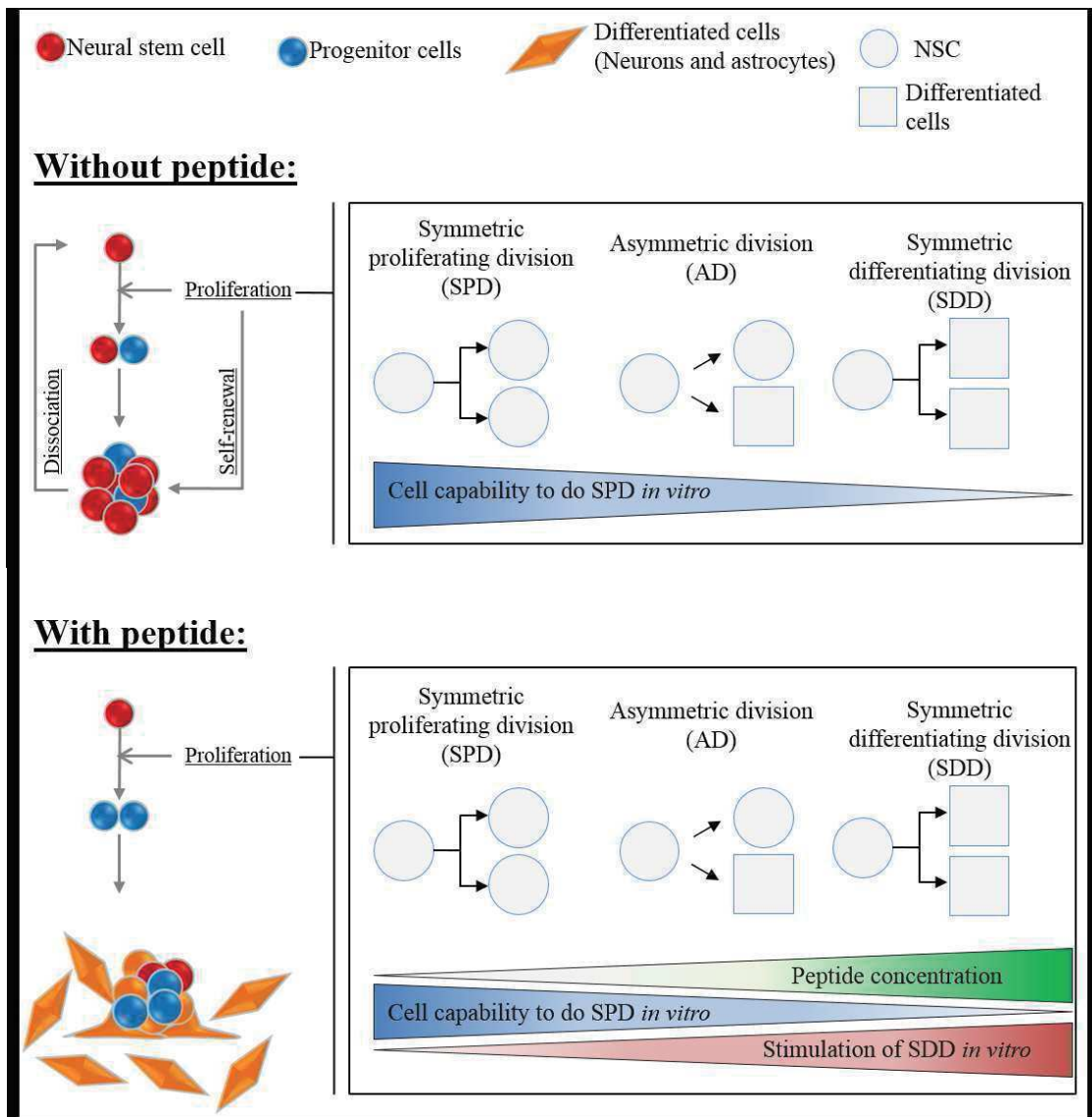
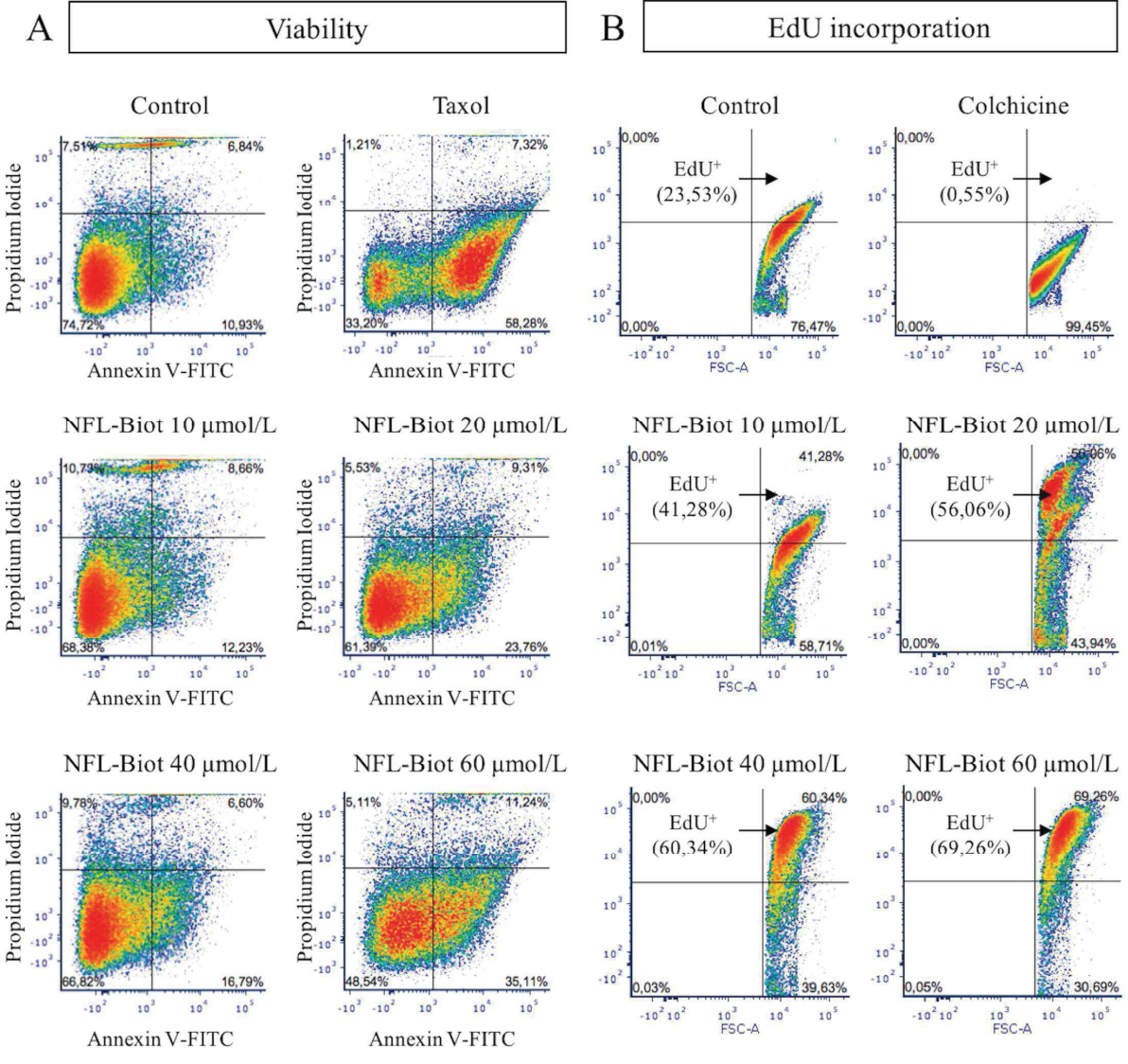


Figure 6 :



Supplementary Figure :



3^{ème} article scientifique

The carbocyanine dye DiD labels *in vitro* and *in vivo* neural stem cells of the subventricular zone as well as myelinated structures following *in vivo* injection in the lateral ventricle

Carradori, D., Barreau, K., and Eyer, J. (2016). *J. Neurosci. Res.* 94, 139–148.

Les cellules souches neurales (CSNs) sont très étudiées pour leur utilisation dans le traitement des maladies du système nerveux central comme les cancers ou les maladies neurodégénératives grâce à leur capacité à se différencier en neurones, en astrocytes ou en oligodendrocytes. Apporter des facteurs de différenciation ou de croissance via des nanoparticules dans les CSNs endogènes est un objectif attendu pour le traitement des maladies neurodégénératives.

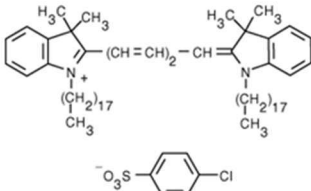
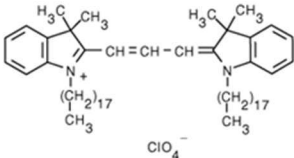
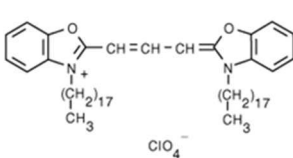
Dans ce cadre, au laboratoire il a été montré que lorsque le peptide NFL-TBS.40-63 est injecté dans le ventricule latéral du cerveau, il rentre sélectivement dans les cellules souches neurales tapissant la ZSV (Lépinoux-Chambaud et al. 2016). L'idée a donc été d'utiliser ce peptide afin de fonctionnaliser des nanocapsules lipidiques pour cibler leur entrée dans ces CSNs.

Pour suivre *in vitro* ou *in vivo* ces nanoparticules, souvent elles sont remplies de marqueurs fluorescents, comme le DiD. Or, de manière surprenante nous n'avions pas trouvé de données sur la pharmacocinétique, les concentrations et les protocoles d'utilisation concernant l'utilisation de DiD seul et injecté dans le ventricule latéral. Une telle étude était donc indispensable pour servir de "contrôle" dans le cadre de nanocapsules remplies de DiD et fonctionnalisées ou non avec le peptide NFL-TBS.40-63.

Le DiD fait partie des carbocyanines lipophiliques comme le DiI, le DiA ou le DiO, et qui sont utilisées depuis les années 1980 pour le traçage antérograde et rétrograde des neurones et de leurs prolongements (Honig and Hume, 1989). A l'origine, les carbocyanines permettaient l'étude de la structure et de la dynamique des membranes, car elles diffusent dans les membranes par des phénomènes de flip-flop et par diffusion latérale (Vercelli et al., 2000). De plus, elles sont très utilisées *in vivo* à cause de leur faible toxicité et de leur diffusion rapide. Le DiD est un composé intéressant de la famille des carbocyanines car il a une longueur d'onde plus grande que les autres carbocyanines, ce qui permet un meilleur marquage des tissus auto-fluorescents.

Les caractéristiques de certaines carbocyanines sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Tableau R1 : Caractéristiques de certaines carbocyanines.

Nom	DiD	DiA	DiO
Nom complet	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- Tetramethylindodicarbocya nine, 4- Chlorobenzenesulfonate Salt	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- Tetramethylindodicarbocyan ine Perchlorate	(3,3'- Dioctadecyloxacarbohya nine Perchlorate)
Formule	C ₆₇ H ₁₀₃ ClN ₂ O ₃ S	C ₅₉ H ₉₇ ClN ₂ O ₄	C ₅₃ H ₈₅ ClN ₂ O ₆
Structure			
λ_{ex} (nm)	644	456	484
λ_{em} (nm)	665	590	501
PM (g/mol)	1052.0753	933.8793	881.7173
Hydrophobicité	hydrophobe	hydrophobe	Hydrophobe

λ_{em} = Longueur d'onde d'émission; λ_{ex} = Longueur d'onde d'excitation; PM = Poids moléculaire

Nous montrons dans cet article que le DiD est capable de marquer les CSNs de rats nouveaux nés *in vitro* après isolement à partir de leur ZSV, et aussi *in vivo* après son injection stéréotaxique dans le ventricule latéral d'un rat adulte. De plus, nous avons montré que le DiD marque des structures myélinisées dans le caudoputamen, indiquant qu'il est capable de traverser la couche de cellules épendymaires qui tapisse le ventricule latéral.

Le DiD à faible concentration (0.015 $\mu\text{mol/L}$) peut entrer assez rapidement (< 6 heures) dans la totalité des CSNs de rats *in vitro* sans différencier les différents sous-types présents dans les neurosphères (Figures 1A). Le temps d'entrée du DiD dans les CSNs peut être réduit par l'augmentation de sa concentration. En effet, il y a plus de 70% d'entrée dans les cellules à 0.06 $\mu\text{mol/L}$ après 1 heure d'incubation (Figure 1B). Ces différentes concentrations et temps d'incubations ne semblent pas altérer les cellules (Figure 3G-I). Le DiD est donc adapté pour des expériences l'utilisant, comme les nanocapsules.

Cependant, il est important de contrôler les conditions expérimentales, car elles peuvent influencer la diffusion, la détection et la visualisation du DiD. Par exemple, l'entrée du DiD peut être inhibée en incubant les cellules à 4°C (Figure 1C). De plus, la visualisation du DiD est modifiée selon le protocole de perméabilisation utilisé. Nous avons ainsi montré que certains perméabilisants ne sont pas compatibles avec l'utilisation du DiD (Figure 2). La Sopamine et la Digitonine agissent tous les deux sur les cholestérols présents dans la membrane lipidique des cellules. Cependant, la Sopamine

solubilise le cholestérol entraînant une destruction de la bicouche lipidique et permettant au DiD de diffuser à l'extérieur de la cellule, tandis que la Digitonine forme un complexe avec le cholestérol permettant de garder le DiD à l'intérieur de la cellule. Le cholestérol joue donc un rôle important dans la détection et la visualisation du DiD dans les cellules.

Nous avons ensuite déterminé si le DiD était capable d'entrer dans les CSNs *in vivo* chez des rats adultes. Pour cela, il a été injecté à différentes concentrations dans le ventricule latéral, et les rats ont ensuite été sacrifiés à différents temps. Nous avons observé que le DiD est retrouvé en moins d'une heure dans la ZSV. Nous montrons par immunocytofluorescence qu'il n'a pas de préférence pour l'une ou l'autre des cellules de la ZSV : les cellules gliales exprimant les Gliofilaments (GFAP+), les cellules précurseurs de neurones exprimant la Vimentine (Vim+) ou les cellules souches exprimant la Nestin (Nestin+) (Figure 4A et 4C). Ce manque de spécificité est sûrement dû à la composition membranaire similaire des différentes cellules présentes dans cette zone (GFAP+; Vim+ et Nestin+).

Après 6 heures d'injection, le DiD se retrouve principalement dans le caudoputamen (Figure 4B et D) et dans certaines structures de cette région (Figure 5). Nous trouvons une disposition symétrique de ces structures prises sur des coupes consécutives, montrant que ce sont des structures en 3 dimensions définies par l'accumulation de DiD. Le marquage au Luxol Fast Blue (Figure 5) nous a permis de montrer que ce sont des structures myélinisées. L'accumulation dans ces structures peut s'expliquer par les propriétés de la myéline qui est principalement constituée de lipides, et notamment les cholestérols.

Ainsi, dans cet article, nous montrons que le DiD est capable d'entrer *in vitro* dans les CSNs de rat d'une manière dose et temps dépendants. Il est compatible et miscible dans le liquide céphalorachidien après injection dans la ZSV de rat adulte et ne semble pas toxique. Nous avons montré qu'il a la capacité de traverser la couche épendymaire et de diffuser dans le parenchyme cérébral pour marquer des structures myélinisées du caudoputamen.

Ces caractéristiques sont propres au DiD ce qui permet de l'adapter pour des marquages du système nerveux central dans différentes situations, contrairement aux autres colorants qui sont spatialement limités tels que le DiI et la Rhodamine qui restent localisés aux niveaux des couches épendymaires (Doetsch et al., 1999). Ainsi, les résultats de ce travail ont été utiles dans une autre étude effectuée par un autre doctorant du laboratoire, et où il a été montré que l'encapsulation de DiD dans des nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec le peptide NFL-TBS.40-63 permet de cibler ces nanocapsules dans les CSNs tant *in vitro* qu'*in vivo* (Carradori et al. 2016; Lépinoux-Chambaud et al. 2016).



The Carbocyanine Dye DiD Labels In Vitro and In Vivo Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as Well as Myelinated Structures Following In Vivo Injection in the Lateral Ventricle

Dario Carradori, Kristell Barreau, and Joël Eyer*

Laboratoire Neurobiologie and Transgénèse, LUNAM, INSERM, UPRES-EA3143, Institut de Biologie en Santé, Bâtiment PBH-IRIS, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Carbocyanines are fluorescent lipophilic cationic dyes used since the early 1980s as neuronal tracers. Several applications of these compounds have been developed thanks to their low cell toxicity, lateral diffusion within the cellular membranes, and good photostability. 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine 4-chlorobenzenesulfonate (DiD) is an interesting component of this family because, in addition to the classic carbocyanine properties, it has a longer wavelength compared with its analogues. That makes DiD an excellent carbocyanine for labeling cells and tissues with significant intrinsic fluorescence. Drug encapsulation, drug delivery, and cellular transplantation are also fields using DiD-based systems where having detailed knowledge about its behavior as a single entity is important. Recently, promising studies concerned neural stem cells from the subventricular zone of the lateral ventricle in the brain (their natural niche) and their potential therapeutic use. Here, we show that DiD is able to label these stem cells in vitro and present basilar information concerning its pharmacokinetics, concentrations, and microscope protocols. Moreover, when DiD is injected in vivo in the cerebrospinal fluid present in the lateral ventricle of rat, it also labels stem cells as well as myelinated structures of the caudoputamen. This analysis provides a database to consult when planning experiments concerning DiD and neural stem cells from the subventricular zone. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: neural stem cells; subventricular zone; myelin; carbocyanine; DiD

Carbocyanines represent a large class of lipophilic dyes composed of two positively charged indole groups connected by a short, unsaturated chain of carbon atoms. They can be partially soluble or insoluble in water depending on the length of the hydrocarbon chain, short in the first case, long in the second case. Initially these compounds were used to study the potential of cellular membranes (Sims et al., 1974) and diffusion within them (Axelrod et al., 1978). The main application that made

these compounds popular was staining neurites (Schwartz and Agranoff, 1981). Because of their low toxicity, carbocyanines were also used in anterograde and retrograde neuron tracing (Hoing and Hume, 1986). The results suggested that these compounds diffused within cellular membranes through a translocation mechanism based on lateral diffusion. This hypothesis was then confirmed as a new method to stain neurons in fixed tissues (Godement et al., 1987). All these works focused on DiI (excited in green) and DiO (excited in blue), the most often used carbocyanines in that decade. During 1990s the number and type of applications increased: immunocytochemistry

SIGNIFICANCE

This work shows that SVZ SCs can be easily labeled in vitro as well as in vivo by the carbocyanine DiD. We highlight the critical points in the interpretation of the results produced by DiD labeling and provide detailed procedures as well as explications to avoid experimental errors. We also describe the interesting ability of DiD to identify and define myelinated structures in the caudoputamen. This property makes DiD a helpful tool in the study of neurodegenerative diseases, especially those characterized by alterations of myelinated structures.

Contract grant sponsor: NanoFar “European Doctorate in Nanomedicine” EMJD programme funded by EACEA (to D.C.); Contract grant sponsor: University of Angers, in the framework of NanoFar “European Doctorate in Nanomedicine” EMJD programme funded by EACEA (to K.B.); Contract grant sponsor: Association Française contre les Myopathies; Contract grant sponsor: CIMATH (Région des Pays-de-la-Loire); Contract grant sponsor: Maturation and Accelerating Translation With Industry (to J.E.)

*Correspondence to: Joël Eyer, Laboratoire Neurobiologie and Transgénèse, LUNAM, INSERM, UPRES-EA3143, Institut de Biologie en Santé, Bâtiment PBH-IRIS, Centre Hospitalier Universitaire, 49033 Angers, France. E-mail: joel.eyer@univ-angers.fr

Received 30 May 2015; Revised 24 September 2015; Accepted 21 October 2015

Published online 14 November 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23694

and immunohistochemistry (Holmquist et al., 1992), intracellular labeling (Terasaki and Jaffe, 1991), cellular migration (Ragnarson et al., 1992), cellular transplantation (Heredia et al., 1991), cell–cell interactions (Spötl et al., 1995), and cell adhesion (Ramanathan et al., 1996). At the end of the twentieth century, DiI was used to stain ependymal cells of the subventricular zone (SVZ), focusing on astrocytes, which were identified as acting as stem-like cells (Doetsch et al., 1999). After 1999 carbocyanines were no longer related strictly to SVZ stem cells (SCs), but their application in neurobiology continued (Gan et al., 2000; Matsubayashi et al., 2008; Cheng et al., 2014).

DiD is an interesting component of this family of dyes because it has a longer wavelength compared with the other carbocyanines, which makes it better for labeling cells and tissues with important autofluorescence (The Molecular Probes Handbook, 2010). It shows less fluorescence when it is in water than when it is associated with cellular membranes (Simon et al., 2006), and it is a suitable probe for long-term labeling (Mäkinen et al., 2013). It also shows the typical carbocyanine characteristics, including low cell toxicity and lateral diffusion within the cellular membranes.

The recent interest in neural SCs is due largely to their potential application in therapy and as promising targets. In particular for CNS therapy, SVZ SCs were subjected to several manipulations (Ladran et al., 2013; Gage and Temple, 2013; Cave et al., 2014; Guerra, 2014). Surprisingly, although carbocyanine-based systems are developing rapidly (micelles: Yang et al., 2013; nanocapsules: Groo et al., 2013; virus: Soto et al., 2006) and their application will soon concern SVZ SCs, no detailed information is available concerning carbocyanines' properties as free molecules. In particular, it is important to determine their pharmacokinetic properties, concentrations, potential toxicity, and microscope visualization in order to elaborate adequate and powerful carbocyanine-based systems.

Here we show that DiD alone is able to label in vitro neural SCs isolated from the SVZ of newborn rats or in vivo following its stereotaxic injection in the lateral ventricle of adult rats. Moreover, we show that DiD is able to label myelinated structures surrounding the ven-

tricular zone, indicating that this product is able to pass through the monolayer of ependymal cells lining the ventricular cavity. These in vitro and in vivo experiments provide basic and fundamental information concerning the pharmacokinetic, concentrations, protocols, and microscope imaging of this carbocyanine, which are essential for further use of this fluorescent marker alone or together with other systems including micelles or nanoparticles.

MATERIALS AND METHODS

Primary antibodies used in this work are described in Table I and secondary antibodies in Table II.

Animals

Primary SVZ SC cultures and in vivo experiments were performed according to Directive 2010/63/EU and to guidelines of the French Government following the approval by the local committee of Pays de la Loire for Ethics in Animal Experiments.

DiD Solution

DiD solid (Life Technologies, Grand Island, NY) was dissolved in 10 ml ethanol and then sonicated for 15 min. The final concentration was 1 mM. For the in vitro experiments, DiD solution was diluted in H₂O MilliQ. For the in vivo experiments, DiD solution was diluted in physiological sterile water.

Isolation of SVZ SCs

Neural SCs were isolated from the SVZ by using the protocol of Guo et al. (2012). Briefly, newborn rats (1–5 days old) were sacrificed by decapitation. The brain was removed and placed in the dissection buffer (1.25 ml D-glucose 1 M, 750 μ l HEPES, and 500 μ l Pen/Strept in 50 ml Hank's medium; Life Technologies). The brain was then cut into 400- μ m coronal sections, and the SVZ was microdissected and placed in a tube filled with 1 ml dissection buffer. The tube was centrifuged for 5 min at 344g. The supernatant was removed, and 1 ml SC culture medium (1.25 ml of D-glucose 1 M, 750 μ l HEPES, 500 μ l Pen/Strept, 500 μ l Na pyruvate, 500 μ l B27, and 5 μ l epidermal growth factor (EGF) in 50 ml MEM; Life Technologies) was added. The pellet was mechanically triturated with a syringe. The cells were counted in a counting chamber, seeded at 2–3 $\times 10^5$ cells/60-mm-diameter Petri dish, and incubated at 37°C. SVZ SCs were cultivated as floating neurospheres, which appeared after 5 days. All in vitro experiments used 6- and 7-day-old neurospheres.

TABLE I. Primary Antibodies Used in This Work

Name	Target	Host	Cat. N°
Anti- α -tubulin	α -Tubulin	Mouse	T9026
Anti-GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Mouse	G3893
Antinestin	Nestin	Rabbit	N5413
Antivimentin	Vimentin	Mouse	V6630

TABLE II. Secondary Antibodies Used in This Work

Name	Target	Host	Catalog No.	Manufacturer	RRID	Clone	Dilution
Alexa Fluor 488	Anti-mouse IgG IgM (H+L)	Goat	A10680	Life Technologies	AB11180055	Unknown	1/200
Alexa Fluor 488	Anti-rabbit IgG (H+L)	Goat	A11008	Life Technologies	AB10563748	Unknown	1/200

In Vitro FACS Analysis

Six-well plates were used for these experiments (1.5 ml/well), with a cellular concentration of $0.59\text{--}0.66 \times 10^6$ cells/well, or 4,390–4,850 neurospheres/well. For each condition, the dilution of the compound was 1/100 (15 μl /well). For the pharmacokinetic studies, SVZ SCs were incubated with DiD (0.015 μM) at 37 °C for different times (5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 hr, and 8 hr). For the concentration study, SVZ SCs were incubated for 1 hr at 37 °C with different DiD concentrations (0.00075, 0.00375, 0.0075, 0.03, 0.06, and 0.15 μM). For the diffusion study in unfavorable conditions, SVZ SCs were incubated for 1 hr at 4 °C with DiD at 0.015 μM . A BD FACSCalibur flow cytometry system (RRID:SciRes_000153) was used for the evaluation.

In Vitro Confocal Imaging

Twenty-four-well plates and lamellae (13 mm diameter) were used in these experiments (0.5 ml/well), with a cellular concentration of $0.19\text{--}0.22 \times 10^6$ cells/well or 1,463–1,616 neurospheres/well. The lamellae were coated with BD CellTak (BD Biosciences) before cell seeding. For each condition, the dilution of the compounds was 1/100 (5 μl /well). For the imaging evaluation, SVZ SCs were incubated at 37 °C for different times (20 min, 1 hr, and 6 hr) with different DiD concentrations (0.015, 0.15, and 1.5 μM). A TCS-SP8 Leica confocal microscope (RRID:SciRes_000154) was used for the observations, and pictures were taken at $\times 63$ magnification.

In Vitro Confocal Imaging Immunocytochemistry Protocol

At the end of the incubation, the lamellae were washed with SC culture medium three times (5 min each). The neurospheres were fixed with 4% paraformaldehyde for 15–20 min and then washed three times with PBS (5 min each). They were incubated for 30 min with different permeabilization agents (Triton 0.5%, saponin 1%, digitonin 0.01%, and no permeabilizer), then saturated with bovine serum albumin (BSA) 1% for 60 min and incubated overnight at 4 °C with a mouse anti α -tubulin solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; catalog No. T9026 RRID:AB_477593; 1/1,000 in 1% BSA). The neurospheres were washed three times with PBS (5 min each) and incubated in the dark for 90 min with an Alexa Fluor 488 solution (Life Technologies; catalog No. A10680; RRID:AB_11180055; 1/200 in 1% BSA). They were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; 5 min each) and incubated for 5 min in DAPI solution (Life Technologies; catalog No. D3571; RRID:AB_2307445; 1/300 in PBS). The neurospheres were washed once in PBS (for 5 min). The lamellae were finally removed from the wells, covered with ProLong Gold antifade (Life Technologies), and fixed on microscope slides.

In Vivo Intraventricle Injection

Sprague female rats (2–3 months old) were used for in vivo intraventricle injection. The animals were anesthetized with 1 μl /g ketamine:xylazine solution (50:50) by intraperitoneal injection. The head was stabilized in a stereotactic frame.

The stereotactic coordinates were -0.8 mm AP, 1.5 mm ML, and 4 mm DV with respect to the bregma. The injection was made with a CED microinjection apparatus (Harvard) at 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ rate (needle diameter 1.457 mm) for a total injected volume of 20 μl , as previously described for such injection protocols according to the good practices for animal experimentation by Wolfensohn and Lloyd (2008). Different concentrations of DiD solution were used (0.015 μM , 0.15 μM , and 1.5 μM). The animals were sacrificed 1 or 6 hr after the end of the injection. The brains were then removed and stored at -80 °C.

Ex Vivo Confocal Imaging

Approximately 150–210 sections (12 μm thick) were collected from each brain using a CM3050S Cryostat Leica and placed on microscope slides (three sections/slide). A preliminary screening verified the homogeneity of the distribution of DiD; the sections were analyzed by taking just a few of them at specific intervals to cover the whole series. The sections were fixed in methanol for 10 min, washed once in PBS for 5 min, stained with DAPI solution (1/300 in PBS) for 5 min, washed once in PBS for 5 min, covered with ProLong Gold antifade, and overlaid with coverslips. Once we had identified the range at which DiD signal was most visible, an immunohistochemistry protocol was performed on the sections. The evaluation used a Leica TCS SPE (RRID:SciRes_000154). Pictures were taken at different magnifications, $\times 7.5$, $\times 20$, and $\times 40$.

Ex Vivo Confocal Imaging Immunohistochemistry Protocol

The sections were fixed in methanol for 10 min and then washed three times in PBS (3 min each). The sections were saturated with BSA 5% for 30 min and incubated overnight with different primary antibodies (one antibody for one slide): mouse anti-GFAP (Sigma-Aldrich; catalog No. G3893; RRID:AB_477010; 1/200 in 5% BSA), rabbit antineurin (Sigma-Aldrich; catalog No. N5413; RRID:AB_1841032; 1/50 in 5% BSA), and mouse antivimentin (Sigma-Aldrich; catalog No. V6630; RRID:AB_477627; 1/200 in 5% BSA). The slides were washed three times with PBS (5 min each) and incubated at 4 °C in the dark for 90 min with Alexa Fluor 488 (Life Technologies; catalog No. A10680; RRID:AB_11180055; 1/200 in 5% BSA) for mouse anti-GFAP and for mouse antivimentin, Alexa Fluor 488 (Life Technologies; catalog No. A11008; RRID:AB_10563748; 1/200 in 5% BSA) for rabbit antineurin. They were washed three times with PBS (3 min each) and incubated for 5 min with a DAPI solution (Life Technologies; catalog No. D3571; RRID:AB_2307445; 1/300 in PBS). The sections were finally covered with ProLong Gold antifade and overlaid with coverslips.

Myelin Identification

The sections were incubated 18 hr at 56 °C in a Luxol fast blue (BDH) solution according to Klüver and Barrera (1953). The slides were rinsed twice in alcohol 95% until complete rehydration differentiated first in lithium carbonate and then in alcohol 70%. They were rinsed in distilled water for 5 min before the counterstaining with nuclear red (Sigma). Slides

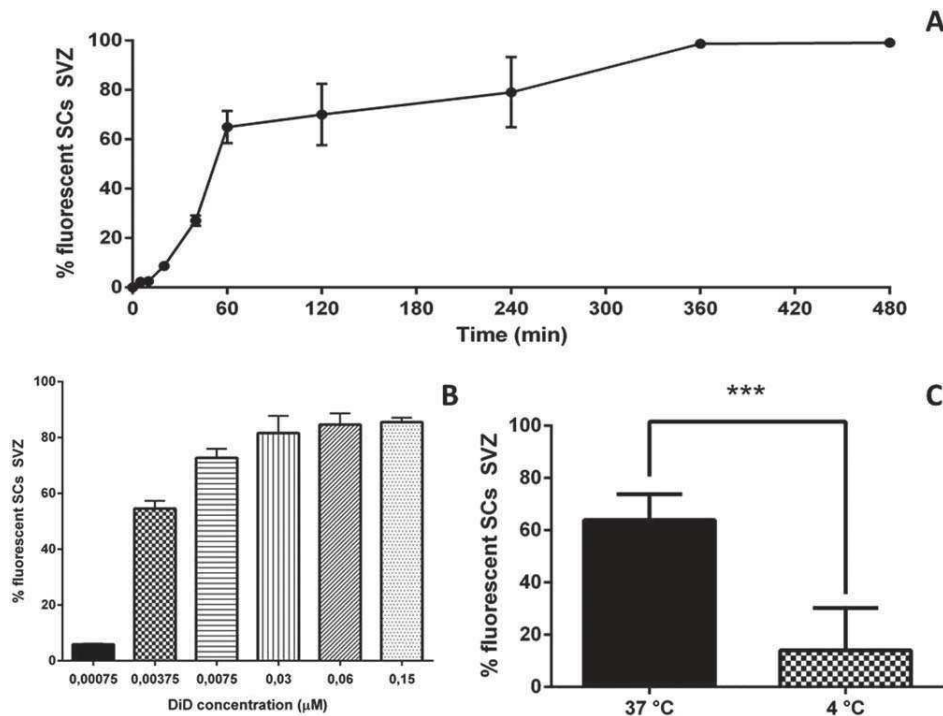


Fig. 1. **A:** Evolution of fluorescent stem cells (in percentage) after different incubation times at 37°C with 0.015 μM DiD. **B:** Percentage of fluorescent SVZ SCs after 1 hr incubation at 37°C with different DiD concentrations. **C:** Percentage of fluorescent SVZ SCs after 1 hr incubation at 37°C or 4°C with DiD 0.015 μM. *** $P < 0.001$.

were then washed in water and dehydrated by consecutive incubation with alcohol 70% (5 min), alcohol 95% (5 min), alcohol 100% (5 and 10 min) and xylene (10 and 15 min). The sections were covered with Eukitt and overlaid with coverslips. Pictures were taken with an Olympus BX50 microscope at $\times 10$.

Statistical Analyses

All the experiments were performed at least three times for each condition. For the FACS analysis, 40,000 events/condition were analyzed. Error bars were produced using the standard error of mean (SEM) method. Statistical analysis in Figure 1C was performed with Student's *t*-test in Graphpad Prism (RRID:rid_000081; $n = 4$). For the confocal in vitro examination, at least two pictures/condition were taken randomly, and for the ex vivo observation several pictures of the lateral ventricle were taken for each condition and at different magnification of the SVZ and its periphery (caudoputamen and lateral septal nucleus).

RESULTS

In Vitro FACS Evaluation of SC Labeling by DiD

The pharmacokinetic study shows a progressively increased percentage of fluorescent SVZ SCs following their incubation with DiD at 0.015 μM (Fig. 1A). At this concentration no major difference or relevance was observed in terms of the percentage of fluorescent SVZ

SCs between 5 min and 10 min of incubation. The fluorescence started to be clearly measurable by FACS after 20 min of incubation, and 100% of cells were labeled after 6 hr. The concentrations study (Fig. 1B) shows that no relevant fluorescence was observed in cells with 0.00075 μM of DiD, whereas at concentrations over 0.06 μM no significant difference of fluorescent SVZ SCs (approximately 80%) was noted. In the range of 0.00375–0.03 μM, the percentage of fluorescent cells is related to the concentration of DiD. Under unfavorable conditions, a huge decrease of DiD diffusion in SVZ SCs occurred following 1 hr incubation at 4°C compared with the incubation at 37°C (Fig. 1C). According to the sensitivity of the instrument and to the experimental conditions, DiD could or could not be detected.

In Vitro Confocal Microscopy Analysis of DiD Labeling

Different labeling of SCs by DiD can be obtained depending on the nature of the membrane permeabilization protocol. In particular, the immunocytochemistry protocols, which include Triton 0.5% or saponin 1%, are not suitable for visualizing DiD (Fig. 2A,B). On the other hand, good labeling occurred with digitonin 0.01%, or without membrane permeabilization (Fig. 2C,D). Although Triton has a nonspecific dissolving action on

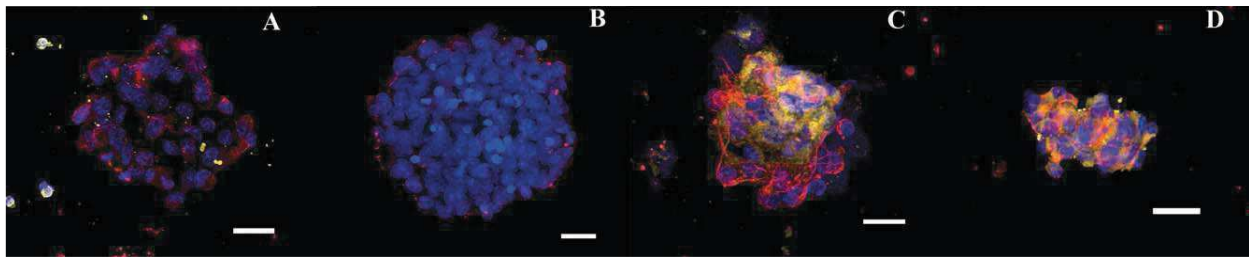


Fig. 2. SVZ SCs were incubated during 1 hr with DiD 1.5 μ M and then treated with different permeabilizant agents at the beginning of the immunocytochemistry protocol, Triton 0.5% (A), saponin 1% (B), or digitonin 0.01% (C) or without permeabilizant agent (D). Blue is DAPI: nucleus. Red is anti- α -tubulin: cytoskeleton. Yellow is DiD. Scale bars = 20 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

the lipid bilayer, saponin and digitonin are specific permeabilizants, which act mostly on cholesterol.

Confocal microscopic analysis also shows that the DiD signal in neural SCs depends on the duration of incubation and DiD concentration. Although the very sensitive FACS analysis showed that most cells (approximately 60%) are labeled after 1 hr of incubation with 0.015 μ M DiD (Fig. 1B), the confocal microscopic examination indicates that at this concentration only a faint labeling of cells occurred (Fig. 3D), whereas after 6 hr of incubation a massive penetration of DiD in all cells was observed for all the concentrations (Fig. 3G–I). Moreover, at 0.015 μ M DiD (Fig. 3G), the visualization of the dye is more punctiform than at 1.5 μ M DiD (Fig. 3H), which appears well diffused within cellular membranes. At higher concentration (1.5 μ M DiD), the fluorescent dye massively penetrates in all cells after less than 20 min of incubation (Fig. 3C). Therefore, the 0.15 μ M concentration of DiD is the best condition to avoid overpenetration in cells and saturation of the signal. To visualize SVZ SCs incubated for 6 hr with DiD at 1.5 μ M, the gain of the confocal apparatus was significantly decreased because of signal saturation.

In Vivo Confocal Microscopic Analysis of Neural SCs Labeling Following Injection of DiD in the Lateral Ventricle

The labeling of the different types of cells by DiD after its stereotaxic injection in the lateral ventricle was evaluated by immunohistology with different antibodies. In particular, we detected the intermediate filaments specifically expressed by the different cells present in this region of the central nervous system: gliofilaments expressed in glial cells (GFAP⁺), vimentin expressed in neuronal precursor cells (Vim⁺), and nestin present in bona fide SCs (nestin⁺). As a general observation, the diffusion of the DiD from the lateral ventricle to the SVZ occurred without any particular preferences for one of the three type of cells identified by the expression of their characteristic intermediate filaments (Fig. 4). Moreover, in the immunolabeled pictures (nestin, vimentin, GFAP), DiD seems to be compartmentalized in some regions and

not in others. In fact, the reason is that the dye is passing from one layer to the next, apparently accumulating in them but in reality diffusing and labeling all of the cells step by step. The lack of a compartmentalization of the fluorophore probably is due to a similar composition of the cellular membranes of GFAP⁺, nestin⁺, and Vim⁺ cells, which allows DiD diffusion without specific obstacles or orientation in this zone.

The diffusion of DiD from the ventricle to the SVZ occurred in less than 1 hr (Fig. 4A,C), and its diffusion in the whole caudoputamen and lateral septal nucleus (LSr) occurred in less than 6 hr (Fig. 4B,D). In the first case DiD signal is well defined and limited to the SVZ, but in the second case the signal is weaker and widely diffused in the CP and the LSr. At concentrations higher than 1.5 μ M, DiD causes a saturation of the signal, which makes these high concentrations useless for confocal evaluation under these conditions.

DiD signal is more accentuated around the injection zone (top of the lateral ventricle), but its diffusion along the whole surface of the ventricle is evident. To visualize DiD 1.5 μ M, the gain was significantly decreased (not shown) because of the saturation of the signal. Brain sections of rats sacrificed 1 hr after the intraventricular injection show similar results but with different intensity according to the DiD concentration used: DiD signal is mostly limited to the subependymal zone. Nevertheless, a small portion of DiD diffused in the deep CP. Brain sections of rats sacrificed 6 hr after the intraventricular injection show, also in this case, similar results but with different intensity according to the DiD concentration used; if on one hand an increase of the diffusion was observed in the CP, on the other hand a general decrease of the signal intensity in the SVZ was observed as well.

During the confocal microscopic analysis for the evaluation of the DiD pharmacokinetics and distribution after its injection in the lateral ventricle, we noticed that characteristic DiD labeling was systematically present in the sections, with high or low intensity depending on the concentration of DiD used for the lateral ventricle injection. Because the localization was present only in the CP and not in the LSr, we further investigated these labeled structures. First, we found a symmetric disposition of

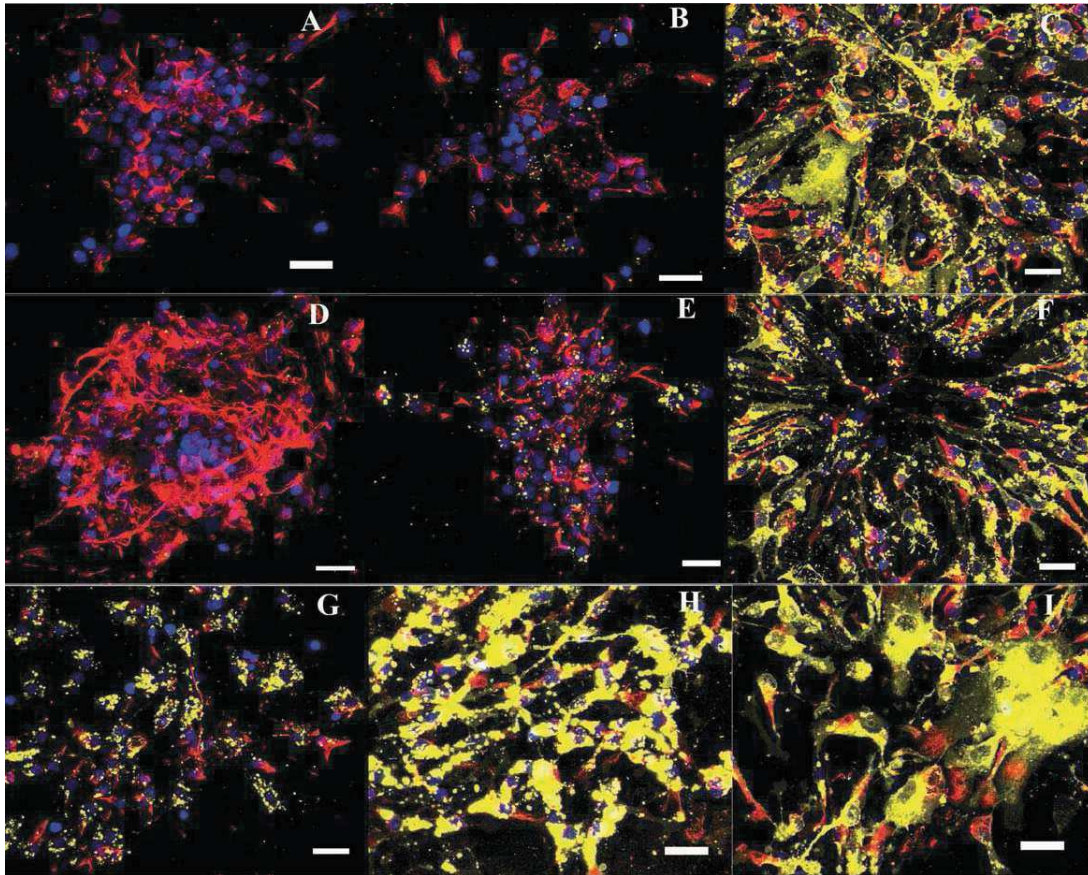


Fig. 3. SVZ SCs were incubated for different times (20 min, **A–C**; 1 hr, **D–F**; 6 hr, **G–I**) and with different DiD concentrations (0.015 μM , **A,D,G**; 0.15 μM , **B,E,H**; 1.5 μM , **C,F,I**). Blue is DAPI: nucleus. Yellow is DiD. Red is anti- α -tubulin: cytoskeleton. Scale bars = 20 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

these spots in brain sections taken consecutively (Fig. 5A,B) suggesting that they were actually 3D structures defined by DiD accumulation within them. Second, we identified the nature of these structures by staining them with Luxol fast blue, a dye attracted by the bases that compose the lipoproteins of the myelin sheath. The colocalization between the structures labeled by DiD and also by Luxol fast blue demonstrates that these structures are composed of myelin (Fig. 6).

DISCUSSION

Several *in vitro* and *in vivo* labeling methods of neural SCs have recently been developed, but they present many limitations or are particularly laborious. For instance, MRI or PET are necessary for the SPIO labeling (Guzman et al., 2007) or the magnetic nanoparticle labeling (Wang et al., 2006). Moreover, BrdU (Lehner et al., 2011) labels only the nucleus and not the whole architecture of cells, although the gene-gun device for biolistic labeling (Zhang et al., 2003) needs sophisticated equipment for its development. In comparison with these methods, DiD labeling has several advantages, including a

simple protocol to use (incubation) and to evaluate (fluorescent microscopy), as well as the capacity to label the whole cellular architecture.

As described by Guo et al. (2012), the cells isolated by this protocol are 99.8% positive for nestin and 88.2% positive for Sox. With all the precautions needed for the best *in vitro* evaluation of the labeling, we found by FACS (Fig. 1 A) and confocal microscopy (Fig. 3G–I) that neurospheres can be 100% labeled by DiD, with no evidence of their alteration (such as microtubule alteration after α -tubulin labeling). Moreover, there is no evidence that DiD labels only some cell subpopulations of the neurosphere. Finally, we showed that DiD can be injected directly in the lateral ventricle of live animals where it keeps its fluorescent properties, is compatible and miscible with the cerebrospinal fluid, and has the capacity to cross the ependymal layer of the SVZ and to diffuse within the cerebral parenchyma (Fig. 4). Overall, these data indicate that DiD is a particularly interesting and suitable dye when planning DiD-based experiments (functionalized nanoparticles, virus, neural SCs and their niche). It is also particularly simple to use and analyze.

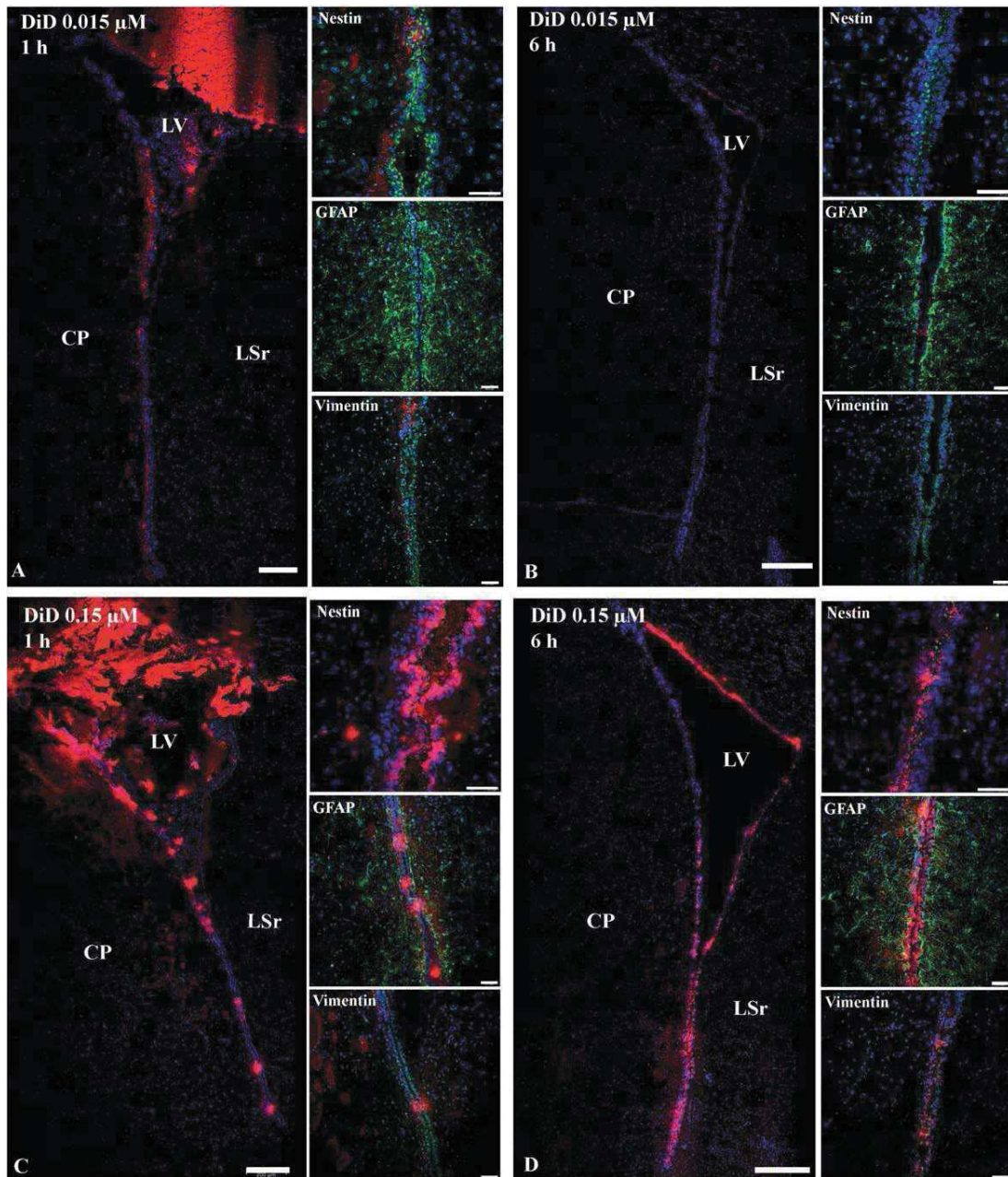


Fig. 4. Brain sections of rats examined at different times after intraventricular injections of different DiD concentration. CP, caudoputamen; LSr, lateral septal nucleus, rostral; LV, lateral ventricle. DiD 0.015 μM after 1 hr (A) and 6 hr (B). DiD 0.15 μM after 1 hr (C) and 6 hr (D).

Blue is DAPI: nucleus. Red is DiD. For each time and concentration, nestin⁺, Vim⁺, and GFAP⁺ cells are indicated in green, which is Alexa Fluor 488. Scale bars = 20 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Aside from these advantages, it is important to control the experimental conditions because they can influence DiD diffusion and thus its detection and visualization. For instance, low temperature (4°C) decreases cellular membrane fluidity, preventing transversal DiD diffusion within the lipid bilayer when performing in vitro experiments. Moreover, the use of harsh permeabilization agents (e.g., Triton) during immunocytochemistry can

partially dissolve cellular membranes, disrupting the lipid bilayer and allowing DiD to diffuse out of cells. Saponin and digitonin are cholesterol-specific permeabilization agents, but they provide different results. As proposed by Matsubayashi et al. (2008) for DiI, the reason could be the differential action of these permeabilization agents on cholesterol. Saponin solubilizes cholesterol, allowing DiD to escape from the cellular membrane, whereas digitonin

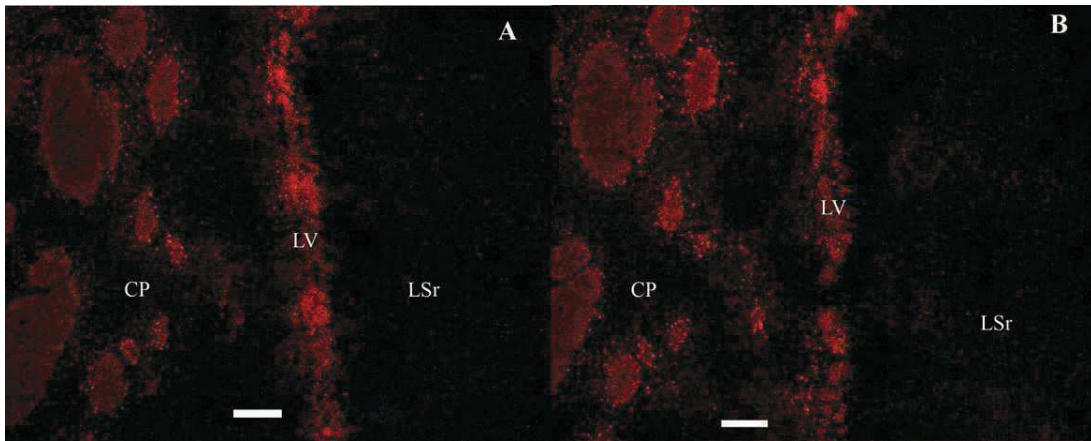


Fig. 5. **A,B**: Spots of DiD in two consecutive brain sections. Scale bar = 50 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

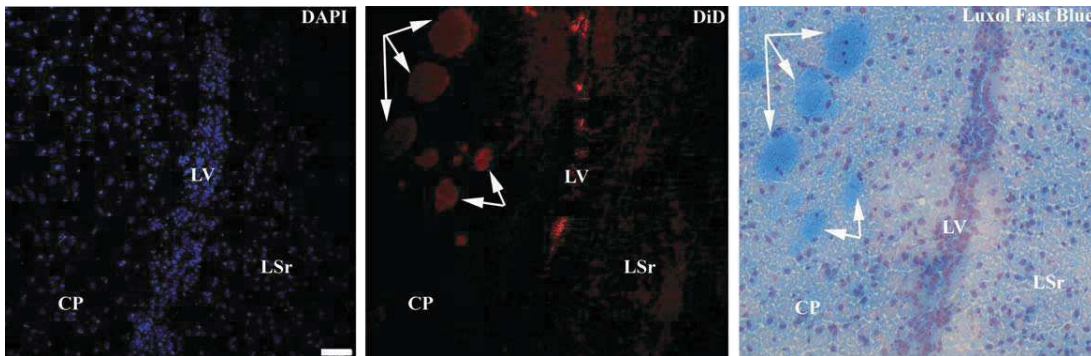


Fig. 6. Different staining of consecutive brain sections: DAPI, DiD, and Luxol fast blue. Scale bar = 50 μm . [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

makes a complex with cholesterol, allowing DiD to remain within the membrane. This result also indicates that cholesterol plays a critical role in the diffusion and detection of DiD within the cellular membranes. However, it is possible to avoid the permeabilization step if it does not affect confocal visualization, as evidenced by anti- α -tubulin and DAPI, which are clearly visible without cell permeabilization.

Two different patterns of *in vitro* DiD labeling were visible on SVZ SCs, punctiform labeling for cells incubated with low concentrations of DiD and uniform labeling for cells incubated with higher concentration of DiD. One possibility is the ratio of ethanol in the final solutions of DiD (1.5/999.5 for 0.015 μM DiD, 15/985 for 0.15 μM DiD, and 150/850 for 1.5 μM DiD). A higher amount of ethanol could also facilitate the diffusion within the cellular membranes by increasing the cellular membrane permeability and by improving DiD dissolution in aqueous solution. Another possible explanation is the accumulation of the fluorescent dye in the cytoplasmic organelles, as previously shown in several studies

concerning carbocyanines (Zorov et al., 2004). The preferential mitochondrial accumulation of DiO for low concentrations was also demonstrated by Terasaki et al. (1984), and the reason is probably the high membrane potential of these organelles (Johnson et al., 1981). Overall, this *in vitro* investigation shows that, if DiD can easily be used to label SVZ SCs, it is important to control the experimental conditions that could influence the labeling or its visualization significantly.

The *in vivo* intraventricular injection experiment led us to discover several interesting properties of DiD. First, it is compatible with the cerebrospinal fluid and does not show a major toxic or lethal effect for the animals. Moreover, the fluorescent profile of DiD and its capacity to label cellular membranes are not affected. Cerebrospinal fluid did not affect the diffusion from the lateral ventricle to the SVZ. Also, DiD is able to cross cellular and tissue barriers of the SVZ, and its diffusion in the whole caudoputamen and lateral septal nucleus occurs rapidly (less than 6 hr). At longer times, the fluorescent signal of DiD decreases, and this is due mainly to dye dilution through

the cerebral parenchyma. In comparison with other dyes used under the same conditions (Doetsch et al., 1999), this behavior is characteristic of DiD. The passage through the ependymal layer makes DiD a suitable tool for central nervous system labeling in many more circumstances than the current dyes, which are spatially limited. It also provides a suitable (positive) tool for a spatially limited labeling of structures in the central nervous system (e.g., functionalized nanovectors). DiD can cross the ependymal barrier of the lateral ventricle and diffuse in the CP and LSr, indicating that the lipid profiles among the components of the SVZ (ependymal cells, stem cells, glial cells, etc.) are not different enough to orientate the diffusion or the accumulation of DiD in a specific compartment of the SVZ. Finally, once in the CP, the fluorescent dye is able to accumulate into myelinated structures. This property could be due to the specific composition of myelin, which is mainly cholesterol based (Gesine et al., 2005). As hypothesized in the case of saponin, which acts on cholesterol, the role of this lipid could be crucial for the diffusion and detection of DiD in cells and tissues.

With regard to the *in vivo* and *ex vivo* parts of this article, DiD shows very interesting compatibility with most of the experiments. Its capacity to define myelinated structures in the CP was unexpected but could be particularly useful for other purposes. In the neurodegenerative diseases field, for example, multiple sclerosis or Huntington's disease that are characterized by "demyelination" (Bartzokis et al., 2007), it would be worthwhile to investigate the possible application of DiD for the definition of such myelinated structures and their abnormal patterns.

CONCLUSIONS

Compared with other fluorescent dyes used for the same purpose, the carbocyanine DiD can easily label SVZ SCs *in vitro* as well as *in vivo*. Once injected into the cerebrospinal fluid of the lateral ventricle, it labels most of the cellular constituents of the SVZ and also shows the capacity to cross the different barriers and define myelinated structures present in the CP. These interesting properties of DiD allow for its promising application for labeling SVZ SCs during primary culture or for investigating their *in vivo* biology following injection of the fluorescent probe in the lateral ventricle.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge PACeM (Plateforme d'Analyses Cellulaire et Moléculaire), SCIAM (Service commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques), and SCAHU (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire) for their technical assistance as well as the members of the laboratory (Dr Catherine Fressinaud, Franck Letournel, and Claire Lepinoux-Chambaud) for their scientific and technical advice.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

All participants in this work declare no affiliation or financial involvement with any organization or entity with a direct financial or any other interest in the subject or materials discussed here.

ROLE OF AUTHORS

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: JE. Acquisition of data: DC, KB. Analysis and interpretation of data: JE, DC. Drafting of the manuscript: DC. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: JE. Statistical analysis: DC. Obtained funding: JE. Administrative, technical, and material support: JE, DC, KB. Study supervision: JE.

REFERENCES

- Axelrod D, Wight A, Webb W, Horwitz A. 1978. Influence of membrane lipids on acetylcholine receptor and lipid probe diffusion in cultured myotube membrane. *Biochemistry* 17:3604–3609.
- Bartzokis G, Lu PH, Tishler TA, Fong SM, Oluwadara B, Finn JP, Huang D, Bordelon Y, Mintz J, Perlman S. 2007. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem Res* 32:1655–1664.
- Cave JW, Wang M, Baker H. 2014. Adult subventricular zone neural stem cells as a potential source of dopaminergic replacement neurons. *Front Neurosci* 8:1–8.
- Cheng C, Trzcinski O, Doering LC. 2014. Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye DiI. *Front Neuroanat* 8:1–8.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716.
- Gage FH, Temple S. 2013. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* 80:588–601.
- Gan WB, Grutzendler J, Wong WT, Wong RO, Lichtman JW. 2000. Multicolor DiOlastic labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 27:219–225.
- Gesine S, Brügger B, Lappe-Siefke C, Möbius W, Tozawa R, Wehr MC, Wieland F, Ishibashi S, Nave K. 2005. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 4:468–475.
- Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F. 1987. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* 101:697–713.
- Groo AC, Saulnier P, Gimel JC, Gravier J, Ailhas C, Benoit JP, Lagarce F. 2013. Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery. *Int J Nanomed* 8:4291–4302.
- Guerra M. 2014. Neural stem cells: are they the hope of a better life for patients with fetal-onset hydrocephalus? *Fluids Barriers CNS* 11:1–10.
- Guo W, Patzlaff NE, Jobe EM, Zhao X. 2012. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. *Nat Protoc* 7:2005–2012.
- Guzman R, Uchida N, Bliss TM, He D, Christopherson KK, Stellwagen D, Steinberg GK. 2007. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10211–10216.
- Heredia M, Santacana M, Valverde F. 1991. A method using DiI to study the connectivity of cortical transplants. *J Neurosci Methods* 36:17–25.

- Hoing MG, Hume RI. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 103:171–187.
- Holmquist BI, Ostholm T, Ekstrom P. 1992. Dil tracing in combination with immunocytochemistry for analysis of connectivities and chemoarchitectonics of specific neural systems in teleost, the Atlantic salmon. *J Neurosci Methods* 42:45–63.
- Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. 1981. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescent microscopy. *J Cell Biol* 88:526–535.
- Klüver H, Barrera E. 1953. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12:400–403.
- Ladran I, Tran N, Topol A, Brennand KJ. 2013. Neural stem and progenitor cells in health and disease. *Wiley Interdisc Rev Syst Biol Med* 5:701–715.
- Lehner B, Sandner B, Marschallinger J, Lehner C, Furtner T, Couillard-Despres S, Aigner L. 2011. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res* 345:313–328.
- Mäkinen M, Joki T, Ylä-Outinen L, Skottman H, Narkilahti S, Äänismaa R. 2013. Fluorescent probes as a tool for cell population tracking in spontaneously active neural networks derived from human pluripotent stem cells. *J Neurosci Methods* 215:88–96.
- Matsubayashi Y, Iwai L, Kawasaki H. 2008. Fluorescent double-labeling with carbocyanine neuronal tracing and immunohistochemistry using a cholesterol-specific detergent digitonin. *J Neurosci Methods* 174:71–81.
- Ragnarson B, Bengtsson L, Haegerstrand A. 1992. Labeling with fluorescent carbocyanine dyes of cultured endothelial and smooth muscle cells by growth in dye-containing medium. *Histochemistry* 97:329–333.
- Ramanathan R, Wilkemeyer MF, Mittal B, Perides G, Charness ME. 1996. Alcohol inhibits cell–cell adhesion mediated by human L1. *J Cell Biol* 133:381–390.
- Schwartz M, Agranoff BW. 1981. Outgrowth and maintenance of neurites from cultured goldfish retinal ganglion cells. *Brain Res* 206:331–343.
- Simon GH, Daldrup-Link HE, Kau J, Metz S, Schlegel J, Piontek G, Pichler BJ. 2006. Optical imaging of experimental arthritis using allogeneic leukocytes labeled with a near-infrared fluorescent probe. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 33:998–1006.
- Sims PJ, Waggoner AS, Wang CH, Hoffman JF. 1974. Studies on the mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 13:3315–3329.
- Soto CM, Blum AS, Vora GJ, Lebedev N, Meador CE, Won AP, Ratna BR. 2006. Fluorescent signal amplification of carbocyanine dyes using engineered viral nanoparticles. *J Am Chem Soc* 128:5184–5189.
- Spötl L, Sarti A, Dierich MP, Möst J. 1995. Cell membrane labeling with fluorescent dyes for the demonstration of cytokine-induced fusion between monocytes and tumor cells. *Cytometry* 21:160–169.
- Terasaki M, Jaffe LA. 1991. Organization of the sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization. *J Cell Biol* 114:929–940.
- Terasaki M, Song J, Wong JR, Weiss MJ, Chen LB. 1984. Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 38:101–108.
- The Molecular Probes Handbook. 2010. A guide to fluorescent probes and labeling technologies, 11th ed. Grand Island, NY: Life Technology. p 575–577.
- Wang FH, Lee IH, Holmström N, Yoshitake T, Kim DK, Muhammed M, Kehr J. 2006. Magnetic resonance tracking of nanoparticle labeled neural stem cells in a rat's spinal cord. *Nanotechnology* 17:1911–1915.
- Wolfensohn S, Lloyd M. 2008. Handbook of laboratory animal management and welfare. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Yang H, Mao H, Wan Z, Zhu A, Guo M, Li Y, Chen H. 2013. Micelles assembled with carbocyanine dyes for theranostic near-infrared fluorescent cancer imaging and photothermal therapy. *Biomaterials* 34:9124–9133.
- Zhang RL, Zhang L, Zhang ZG, Morris D, Jiang Q, Wang L, Chopp M. 2003. Migration and differentiation of adult rat subventricular zone progenitor cells transplanted into the adult rat striatum. *Neuroscience* 116:373–382.
- Zorov DB, Kobrin E, Juhaszova M, Sollott SJ. 2004. Examining intracellular organelle function using fluorescent probes from animalcules to quantum dots. *Circ Res* 95:239–252.

2^{ème} article de revue

Review on glioblastoma management and new challenges

Barreau K., Lépinoux-Chambaud C. and Eyer J. (2017) (Soumis à publication)

Le glioblastome est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive du système nerveux central chez l'adulte. La moyenne de survie d'environ 12 à 15 mois reste très faible malgré des traitements agressifs comprenant la chirurgie lorsque la localisation de la tumeur la permet, ainsi qu'une radiothérapie associée ou non à la chimiothérapie (Louis et al., 2016). La cause principale de ce faible pronostic est la résistance des cellules aux traitements actuels et une récurrence de la tumeur.

Le glioblastome est une tumeur très hétérogène, tant au niveau inter-patient qu'au niveau intra-patient. En effet, d'un patient à l'autre la tumeur n'est pas caractérisée par les mêmes altérations génétiques, ce qui permet de classer les tumeurs en sous-groupes moléculaires (classique, mésenchymateux, neural ou pro-neural). De plus, à l'intérieur d'une même tumeur, il y a différents types de cellules qui n'ont pas les mêmes caractéristiques, comme les cellules souches de glioblastomes, qui peuvent s'auto-renouveler comme les cellules souches neurales (Friedmann-Morvinski, 2014).

Dans cette revue, nous montrons qu'il est important de prendre en compte la classification des glioblastomes mais aussi l'âge du patient pour orienter le patient vers le meilleur traitement possible. Les glioblastomes « classiques » sont caractérisés par une surexpression de l'EGFR, une amplification du chromosome 7 et une perte du chromosome 10. Cependant, ces deux derniers paramètres peuvent être observés dans d'autres types de glioblastomes, comme les glioblastomes « mésenchymateux » qui présentent une mutation/délétion de NF1, une surexpression de MET et TNF et une activation des voies de signalisation Akt. Alors que les glioblastomes « neuraux » sont peu caractérisés, les glioblastomes « proneuronaux » ont des mutations dans les gènes IDH1. Les glioblastomes « proneuronaux » ont un meilleur pronostic que les autres car ce sont des tumeurs qui répondent aux traitements actuels (Verhaak et al., 2010; Theeler and Gilbert, 2015). La chimiothérapie avec le Bévécizumab (à la place du Témazolomide) est plus efficace sur les patients avec le gène *IDH1* non muté, d'où l'importance de bien caractériser les glioblastomes (Sandmann et al., 2015; Polivka et al., 2017)

Il est important de valider plusieurs biomarqueurs pour une meilleure classification des sous-groupes de glioblastomes (Figure 1 et 2). Pour cela, de nouveaux systèmes plus rapides et sensibles sont en cours de développement comme la « biopsie liquide » qui permet de détecter par test sanguin, des marqueurs libérés par la tumeur comme l'ADN ou l'ARN circulants ou des vésicules extracellulaires qui représentent l'hétérogénéité de la tumeur (Westphal and Lamszus, 2015).

Les traitements actuels sont aussi améliorés pour augmenter l'efficacité du traitement. Par exemple, les chirurgies peuvent se faire sous sédation légère (ou chirurgie sur patients éveillés) pour éviter les effets

néfastes liés à une anesthésie générale (Young et al., 2015). Il est aussi possible d'associer l'imagerie directement à la chirurgie pour retirer un maximum de cellules tumorales (Roder et al., 2014).

La radiothérapie ciblée est actuellement en cours de développement afin de minimiser les effets secondaires liés aux effets toxiques sur les cellules saines. La méthode consiste à utiliser un anticorps qui cible spécifiquement les cellules de glioblastomes et qui est couplé à un isotope radioactif. Les radiations cibleront donc plus spécifiquement les cellules de glioblastomes (Harris et al., 2009)..

Dans cette revue, nous avons aussi décrit de nouvelles techniques qui sont développées pour modifier l'approche thérapeutique. Par exemple, le système NovoTTF-100A qui utilise des champs électriques alternatifs de faibles intensités qui interfèrent spécifiquement avec les cellules à fortes divisions comme les cellules tumorales (Stupp et al., 2012). Des stratégies immunitaires spécifiques à chaque patient sont aussi développées. Le DCVas-L est un vaccin personnalisé créé à partir des cellules dendritiques et tumorales du patient. Cette méthode permet d'avoir un traitement spécifique à chaque patient à partir du moment où le patient peut être opéré (Turner et al., 2014).

L'ensemble de cette revue tente de résumer les connaissances principales sur le glioblastome, ainsi que les enjeux actuels pour traiter au mieux les patients atteints de ce cancer du système nerveux qui reste fatal.

Title: Review on glioblastoma management and new challenges

Kristell KB Barreau ^{a§}, Claire CLC Lépinoux-Chambaud ^{ab§}, and Joël JE Eyer ^{a*}

^a Micro et Nanomédecines Translationnelles, INSERM 1066, CNRS 6021, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment IBS-IRIS, 49033 Angers, France. kristell.barreau@etud.univ-angers.fr, joel.eyer@univ-angers.fr

^b SATT Ouest-Valorisation, 14C Rue du Pâtis Tatelin, Metropolis 2, CS 80 804, 35708, Rennes, France. claire.lepinoux-chambaud@ouest-valorisation.fr

§ Co-first authors

*Corresponding author:

Dr. Eyer Joël : Micro et Nanomédecines Translationnelles, INSERM 1066, CNRS 6021, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Centre Hospitalier Universitaire, Bâtiment IBS-IRIS, 49033 Angers, France.

Tel: 02-44-68-84-88; Fax: 02-44-68-84-89; E-mail joel.eyer@univ-angers.fr

ABSTRACT

Glioblastoma represent the most frequent and aggressive tumours of the nervous system, with a low median survival of 12 to 15 months. The current treatment involves a surgical resection when possible, associated with radiotherapy and chemotherapy. Unfortunately, this first-line treatment does not prevent a systematic recurrence. Current radiotherapies and chemotherapies have poor specificity to glioblastoma cells and cause high toxicity to surrounding healthy tissue, with side effects affecting the quality of life and the outcome of patients. Here, we review the major changes and challenges to improve glioblastoma management and patient survival. The detectable tumour biomarkers in solid and liquid biopsies represent good predictive indicators for glioblastoma diagnostic and prognostic. The complexity and heterogeneity of glioblastoma tumours implicate an individualized management involving multifactorial elements (age, KPS, glioblastoma subclasses, and biomarkers). Moreover, innovative imaging tools can improve surgery, and new therapeutic strategies are developed to target specifically glioblastoma cells. These considerations are necessary to improve treatment adjustments, quality of life and outcome of patients.

Keywords: Glioblastoma; management; therapy; biomarkers; diagnostic, clinical trials

LIST OF ABBREVIATIONS

CDKN1/2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 1/2A; CHI3L1: chitinase 3 like 1; EGFR: epidermal growth factor receptor; EGFRvIII: epidermal growth factor receptor variant III; GABRA1: gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1; GAS1: growth arrest specific 1; GLI2: zinc finger protein GLI2; IDH1/2: isocitrate dehydrogenase 1/2; JAG1: jagged1; LFNG: O-fucosylpeptide-3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase; KPS: Karnofsky performance score; MET: MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase; NFL: neurofilament, light polypeptide; NF1: neurofibromin 1; MGMT: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase; NFkB: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells; NOTCH3: Notch3 receptor protein; NKX2-2: NK2 homeobox 2; OLIG-2: oligodendrocyte lineage transcription factor 2; PDGFRA: platelet derived growth factor receptor alpha; PTEN: phosphatase and tensin homolog; SLC12A5: solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 5; SMO: smoothened, frizzled class receptor; SYT1: synaptotagmin 1; TNF: tumour necrosis factor; TP53: tumor protein p53.

INTRODUCTION

Gliomas are brain tumours affecting glial cells (astrocytes or oligodendrocytes) indexed in 4 grades by the World Health Organization. Glioblastoma (GBM) is the most frequent and aggressive form (grade IV), and it constitutes more than 54 % of all malignant glioma, with a median survival of only 12-15 months [1]. Its incidence is approximately 3:100,000 in the United States and in Europe [2], [3]. Patients with symptoms of brain tumour have complete neurological and clinical examinations, including scanner and magnetic resonance imagery to confirm the tumour presence. A surgery or a biopsy are realized for anatomo-pathological examination if the localisation of the tumour allows it. The Karnofsky performance score (KPS) is performed to evaluate the general well-being and daily activities. KPS is ranked from 0 (dead) to 100 (full functional capacity to carry on normal daily activities without clinical evidence) [4]. Despite a standard treatment (the Stupp's protocol) involving surgery followed by radiotherapy and chemotherapy, the median survival remains low with many side effects [5].

Here, we review some changes and challenges in GBM management by considering the subclasses of GBM patients (mutations and biomarkers), their age, their KPS, the therapeutic adjustments, and some promising technologies. This multifactorial management should be adapted to perform an individualized therapy. A major challenge is to develop therapeutic molecules targeting specifically tumour cells without affecting healthy cells. We also described some ongoing clinical III trials for innovative treatments.

Identification of biomarkers to improve glioblastoma management

New glioblastoma biomarkers are crucial to detect, confirm and improve the management of patients. They help to determine accurately the glioma grade and subtype, the tumour progression or recurrence, and the optimal therapeutic strategy.

Four GBM transcriptional subclasses are defined according to the altered genes (Figure 1) : about 49 % were classical, 26 % mesenchymal, 12 % neural, and 13 % proneural. The GBM subclass is an indicator of overall survival (OS) (proneural > neural > mesenchymal > classical) and prognosis [6]. The classical GBM is characterized by EGFR (epithelial growth factor receptor) amplification associated with CDKN2A deletion, several mutations (especially the EGFRvIII mutant), and PTEN loss in 40-50 % of GBM patients. All classical GBM subtypes are characterized by amplification of chromosome 7 and loss of chromosome 10, but these alterations are not exclusive to this subclass. Moreover, different genes associated with stem cell signalling pathways are overexpressed in classical GBM, including Notch signalling (NOTCH3, JAG1, LFNG) and Sonic hedgehog signalling (SMO, GAS1, GLI2) [7]. The mesenchymal GBM presents a mutation/deletion of NF1, an

overexpression of CHI3L1, MET, TNF, and NFκB, as well as activation of the Akt signalling pathway [8], [9]. The neural GBM is characterized by overexpression of neuron markers (NFL, GABRA1, SYT1, and SLC12A5 [7]), but this subtype needs a better definition. The proneural GBM is characterized with mutations in IDH1, longer OS and improved prognosis. This subclass is also characterized by IDH2 mutations, amplification of PDGFRA, NKX2-2 and OLIG-2, TP53 mutations, down-regulation of CDKN1A, and the presence of the glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP) [7], [9]. The G-CIMP positive tumours are found in younger patients, associated with IDH1 mutations and a favourable prognosis [10]. IDH1 mutant GBM is often frontally located, and generates a tumour metabolite 2-hydroxyglutarate (2-HG) used as a marker to better monitor surgery using desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS). It allows a better resection and consequently a longer survival [11]. Another prognostic and predictive factor for patient outcome, associated with a better survival, is the MGMT promoter methylation status which can be monitored in tumour tissue and plasma [12].

Improved choice of treatment

The use of “liquid biopsy” represents a non-invasive blood-test for various markers released by the tumour (circulating tumour cells and tumour-specific DNA/miRNAs, and extracellular vesicles) [13]. Extracellular vesicles are secreted by cancer cells in plasma or cerebrospinal fluid (CSF) and they could contribute to the tumour growth through the transport of some proteins, RNA or DNA [14]. Thus, they provide crucial information for the best therapeutic strategy and patient outcomes. The number of extracellular vesicles (microvesicles and exosomes) and their components (protein, DNA, miRNA, RNA, and lipids that are protected from extracellular degradation), reflect the tumour secretome and heterogeneity by miming the original cells [13] and predict the treatment responses [15]. Indeed, some molecules in extracellular vesicles from body fluids of GBM patients have been identified as potential markers for either their monitoring (EGFR, EGFRvIII, PDPN, IDH1R132H), prognosis (EGFRvIII and miR-21) or diagnosis (miR-21, RNU6-1, miR-320, miR-574-3p, miR-21) [16]. Evaluating tumour progression or regression is easier by collecting blood or CSF than tumour tissue [14]. miRNAs are significantly more enriched in exosomes from CSF than plasma, suggesting that the clinical diagnostics should be based mainly on CSF exosomes [17]. Moreover, circulating biomarkers can distinguish the true tumour progression from pseudo-progression. For instance, brain MRI images with increased contrast enhancement is observed in 30% of GBM patients after standard therapy, and can reflect a real tumour progression or a pseudo-progression caused by higher tumour vasculature [18]. An increased number of Annexin V positive microvesicles in the blood from newly diagnosed GBM (nGBM) patients during chemo-radiation therapy reflects a true tumour progression, an earlier recurrence and a shorter OS [19], [20]. MRI demonstrated a better accuracy for the pseudo-progression detection on methylated-MGMT group than nonmethylated-MGMT but the dynamic susceptibility contrast perfusion MRI (DSC-MRI) shows highest diagnostic accuracy for the pseudo-progression in both groups than DWI (Diffusion-weighted imaging) or DCE-MRI (Dynamic contrast-enhanced MRI) [21].

Some biomarkers from imagery are also developed like the fraction of hypoperfused tumor volume from DSC MRI which are relevant to anticipate the GBM progression [22]. Thanks to these new techniques and biomarkers, a significant time gain for the management of glioblastoma can be reached.

Further characterizations of the different extracellular vesicles, their relative abundance and their composition are essential for a better GBM management. The first “liquid biopsy” have been commercialized in January 2016 in US for the lung tumour [14]. A major challenge is to achieve an accurate “liquid biopsy” kit to determine the different type of glioblastoma.

STANDARD TREATMENT ADJUSTMENTS

Classically, GBM management involves tumour removal by surgery (if possible), followed by radiotherapy and chemotherapy with Temozolomide (TMZ). Treatment adjustments are now performed for each patient as described below and in figures 1 and 2.

Surgery

It allows the removal of most of the tumour, with increased survival of 4.2 months if more than 98% of tumour is resected. Biopsy is performed if tumour localization of the health’s patients do not allow a safe resection. Both permit to determine the phenotype of cancer cells [23]. Currently, craniotomy is done on light sedation which allows less complication and a better recovery. Moreover, surgeon can exactly determine the tumour localization and plan incision by intra-operation system, allowing a reduced operation time and a smaller size of incision [23].

Significant advances in neuroimaging are also crucial during surgery. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is taken up and transformed into fluorescent molecule by GBM cells. It facilitates and improves the surgical removal of residual cancer cells. Future approaches propose to use more sensitive fluorescent imaging techniques, including the confocal microscopy that is currently evaluated for GBM resection [24]. A recent study showed a better resection of the tumour using intraoperative MRI (iMRI)-assisted surgery (74%), compared to 5-ALA-assisted (46%) or white-light surgery (13%) [25].

The DESI-MS can be used under ambient conditions for rapid detection in real-time, with high sensitivity and specificity, without complex tissue preparation. It provides a faster molecular characterization compared to standard histopathological techniques and provides information about diagnosis and prognostic [26] because it indicates subtype, grade, recurrence, tumour cell concentration, EGFR, MGMT or 1p/19q statuses or p53 immunoreactivity. All these informations allow to classify patients into subtypes and provide them a targeted treatment [27].

Discrimination of tumour from infiltrated tumour is also feasible with this technique. Specific signatures of tumour compared to healthy tissues could help to margin the tumour directly during the surgery.

The discovery of other GBM-specific markers detectable by DESI-MS represent a promising approach to better define the spatial distribution of the tumour, to improve intraoperative surgical decisions, diagnosis and GBM management [11]. Associating the intraoperative MRI with DESI-MS could help detecting residual tumour cells. Unfortunately, this technique is expensive and not worldwide available [26].

Radiotherapy

Following surgery, radiotherapy is usually performed. Current radiotherapy is 40 Gy in 15 daily fractions over 3 weeks (around 2 Gy per day, five times per week), increasing the survival from 3-4 months to 7-12 months [28]. However, radiation has no specific targets and causes side effects due to healthy tissue destruction around the tumour. Several clinical trials are in progress to improve administration, like intraoperative radiotherapy (NCT02685605) or intensity-modulated radiotherapy guided by MRI (NCT01507506). Targeted radiotherapy is a major challenge of future medicine, like Cotara® treatment that is ongoing clinical trials (NCT00677716).

Targeted Radiotherapy

Cotara® is a radioactive isotope (iodine 131) linked to a monoclonal antibody against DNA-histone H1 complex called TNT-1, to target tumour cells and deliver radiation directly to the center of the tumour mass, with minimum effect on healthy tissues. It can destroy the tumour from the inside by targeting the necrotic portion of tumours [29], [30]. Phase II trial showed a median survival of 41 weeks, and 2 patients surviving at least 3 years, with minimum side effects (headache principally) [30].

Chemotherapy

TMZ is an orally active alkylating agent approved in 2005 by the US Food and Drug Administration (US-FDA) for standard treatment of nGBM. It is usually administered with radiotherapy and then alone. This drug leads survival benefit in progression-free survival (PFS) (6.9 vs 5 months) and OS (14.6 vs 12.1 months) when added at radiotherapy [28]. However, some GBM subtypes, such as unmethylated MGMT, are resistant to TMZ but some inhibitory molecules like O6-benzylguanine offer promising avenues to increase the TMZ efficiency [28]. Some clinical trials are ongoing to improve the results like an earlier TMZ administration: after promising results with an

early TMZ within 2 weeks post-surgery (NCT00686725) [31], a phase IV clinical trial is studying the benefit effects of administration within 24 hours post-surgery (NCT02520635).

Chemotherapy with Bevacizumab (BVZ) (Avastin®) was approved by the US-FDA in 2009 for recurrent GBM (rGBM) in United States and Canada, and targets vascular endothelial growth factor. It doesn't increase the OS but can be beneficial for patients with large and aggressive tumours that are not eligible for surgical resection [32]. Patients expressing IDH1 wild type show good response to BVZ when associated with radiotherapy and/or TMZ, while those with mutated IDH1 show good response to TMZ alone, illustrating how tumour phenotyping guides the best therapy [33], [34].

Age Consideration

The age and KPS are important prognostic factors in adult. An elevated KPS is associated with longer OS and longer PFS [35]. Elderly patients with nGBM do not receive active treatment (re-surgery after standard treatments) due to their poor vital prognosis and their bad health status. Patients aged over 65 years with KPS less than or equal to 60 represent an important clinical subgroup of patients developing more toxicity following treatment. One clinical trial evaluates the improvement from a surgery on elderly patients (> 70 ans) (NCT02892708). Changes in the management of elderly GBM patients are essential, with an optimal treatment based on multifactorial analysis, including KPS consideration, the extent of tumour resection, and the MGMT promoter status [9]. Elderly patients with methylated MGMT promoter should receive exclusively TMZ chemotherapy, while those with unmethylated MGMT promoter should receive only radiotherapy [36], [37].

The phase III study (CT1450449) demonstrates that an active therapy for some patients is more beneficial than the best supportive care [38]. Nevertheless, illegible patients for active therapy are parsimonious because the KPS must be over 60. Chemotherapy is more beneficial than local treatment for weak patients with poor KPS (<60) [38]. For elderly patients, hypo-fractionated radiotherapy (25 Gy in 5 daily fractions over 1 week) is more efficient than current radiotherapy [38], [39]. Finally, active therapy may be favourable in elderly patients with increasing quality of life and the survival-treatment ratio [38], [39].

Despite several advances for the treatment adaptation according to the tumour phenotype or the age, radiotherapy and chemotherapy are toxic for healthy tissue, leading increased side effects. Therefore, it is important to develop treatments with increased specificity and targeting activities. Some therapies are currently tested in clinical phase III trials. Here, we explain some clinical trials on the fifties currently described on the www.clinicaltrials.org website.

PHASE III ONGOING WITH NEW THERAPIES

Alternative Electric Field

The NovoTTF-100A system (or TTFields, Tumour Treating Fields) is delivering low intensity (1-3V/cm), intermediate frequency (100-300 kHz) and alternating electric fields using non-invasive transducer placed on the shaved head [40]. Different from standard therapy, it could represent a real progress against cancer. The physical fields interfere specifically with division of cancer cells [41] because cancer cells have high mitotic nature compared to quiescent healthy cells [42].

This system has been accepted in April 2011 by the US-FDA for GBM patients refractory to surgery and radiotherapy [42]. Results of clinical trials show a better efficiency (OS improvement and 1 or 2 year survival) and safety than standard chemotherapy [43]. Moreover, TTFields are more beneficial for certain patient subgroups with either early age (<60 years), KPS \geq 80, prior low-grade and tumour size <18 cm² [44]. Another clinical trial showed a synergy between TTFields and TMZ or BVZ [45]. A significant decrease of tumour size (50%) was observed when NovoTTF-100A and BVZ are combined with a regimen consisting of 6-thioguanine, lomustine, capecitabine and celecoxib [46].

The long term benefit of the NovoTTF-100A is a lower toxicity compared to chemotherapy because of its local use and its punctuate effects. However, there are several limitations with this system: (1) exposition of at least 18 hours per day during 4 weeks is necessary to reduce tumour growth [42], (2) 23% of patients stopped the treatment due to contact dermatitis and the inability to handle the device and (3) the price is estimated at \$20.000 per month [47]. This device is currently in clinical IV trials (NCT01756729 [48]) and offers an alternative treatment for intolerant to standard treatment. Other studies are conducted to optimize the delivery of charge in the tumour [49].

Immunotherapy strategies

DCVax-L

DCVax-L (NorthWest) is a personalized vaccine, created by the contact of dendritic cells with brain tumour cells, both isolated from the same patient [49]. Then, dendritic cells differentiated *ex vivo* from patient monocytes, are pulsed *ex vivo* with glioma lysate and “trained” to recognize patient tumour cells. This process can produce enough vaccine for at least one year of treatment [50], [51]. Following subcutaneously or intradermal injection to the

patient, dendritic cells activate both CD8 (killer) T-cells and CD4 (helper) T-cells, which can cross the blood-brain barrier and target the tumour [50]–[52]. Generally, the treatment starts after current treatment and at least five doses of vaccine are required [50]. Blood is always collected before and after vaccination to monitor immune responses. Phase II clinical trial showed a low toxicity (fever, irritation and skin rash near the injection zone as side effects) and an effective induction of anti-tumour immunity, correlated with clinical improvements and increase average survival times [50]–[52]. There is also synergic effects between DCVax-L and chemotherapy [50], [51].

DCVax-L is currently in clinical III trial (NCT00045968 [53]) and first results showed similar encouraging patient outcomes [50]. Finally, the only risk is the inclusion of normal brain cells in the antigen source.

ICT-107

ICT-107 (ImmunoCellular Therapeutics) is a vaccine from autologous dendritic cells directed against six immunogenic epitopes overexpressed by glioblastoma cells (HER2, TRP-2, gp100, MAGE-1, ILI3R α 2 and AIM-2 [54]. The patient dendritic cells are pulsed with synthetic peptides corresponding to these six epitopes, and then four intradermal injections are realized. Phase II trials showed the safety of ICT-107 and an improvement of OS and PFS. ICT-107 is actually in phase III trials (NCT02546102), and designed to follow surgical resection together with TMZ in nGBM [55].

Targeted therapy by specified peptide

CDX-110

Overexpression of mutant EGFRvIII represents 25% of GBM patients, and thus specific immunotherapies were developed against this receptor [56], [57]. CDX-110 (Rindopepimut, Celldex therapeutics) is an injectable neoantigen-specific peptide vaccine targeting this receptor [56], [58]. After passing the clinical phase II trials with great results [56], [58], this vaccine has just failed in phase III clinical trial because no improvement of OS was observed for EGFRvIII positive GBM patients [59].

Peptide therapeutics will be a promising approach in medicine due to their highly selectivity and efficacy as well as their safe and tolerated aspects [60]. Recently, several data revealed a new promising peptide called NFL-TBS.40-63, which selectively and massively targets GBM cells compared to healthy cells. This peptide specifically disrupts the microtubule networks of GBM cells and inhibits their proliferation [61]–[64]. Injecting directly in the brain of rats-bearing tumour, it induces a 70% reduction of the tumour size [61]. This peptide is currently in preclinical studies and is a promising agent to target and destroy GBM cells without effect on healthy environmental cells.

In addition to the various molecules mentioned above and summarized in figures 1 and 2, there are other clinical phase II trials with vaccine, immune checkpoint inhibitors, gene therapy to target nGBM, or again virotherapy for the rGBM [65].

CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

Glioblastoma management aims to increase the median survival of patients and their quality of life by treatment adjustments according to the subtype, age, KPS, and tumour progression. Recently, the the World Health Organization has changed the classification of glioma to integrate this molecular parameters in addition to histological parameters [66].

Several advances are made to improve diagnosis and surgery, and by using more specific and efficient therapeutic strategies. One future challenge is to target and eradicate GBM stem cells, which are implicated in GBM initiation, maintenance, and recurrence due to their resistance and invasiveness. A complete surgical resection is particularly difficult because these cells are present in the periphery of GBM [67], [68]. Another challenge is to cross the blood-brain barrier to improve delivery of therapeutic drugs. Several methods are tested, including intra-arterial infusion of osmotic agents, focused ultrasound, laser interstitial thermotherapy, or non-thermal irreversible electroporation. Further optimization is necessary to use them in clinic [68].

Finally, a great challenge is to establish an individualized-therapy for each GBM patient combining identified tumour biomarkers, innovative diagnostic and surgical techniques, as well as new immunotherapy strategies.

Altogether, numerous research and clinical advances showed a real benefit as evidenced by a significant increased OS of GBM patients during the last 10-year period (from 1999 to 2010) [69], but a curative GBM treatment is still missing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by AFM (Association Française contre les Myopathies), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), MATWIN (Maturation & Accelerating Translation With Industry), UNAM (Université Nantes, Angers, Le Mans), "Région des Pays de la Loire", and La Ligue contre le Cancer to Eyer Joël.

Barreau Kristell is supported by a grant of the University of Angers, in the framework of NanoFar "European Doctorate in Nanomedicine" EMJD programme funded by EACEA. Lépinoux-Chambaud Claire is supported by the "Société d'Accélération du Transfert de Technologie (SATT) Ouest Valorisation".

REFERENCES

Journal References:

- [1] D. N. Louis *et al.*, "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 114, no. 2, pp. 97–109, Jul. 2007.
- [2] Q. T. Ostrom *et al.*, "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010," *Neuro-Oncol.*, vol. 15, no. suppl 2, pp. ii1-ii56, Nov. 2013.
- [3] E. Crocetti *et al.*, "Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe," *Eur. J. Cancer*, vol. 48, no. 10, pp. 1532–1542, Jul. 2012.
- [4] A. H. Friendlander and R. L. Ettinger, "Karnofsky performance status scale," *Spec. Care Dentist.*, vol. 29, no. 4, pp. 147–148, Jul. 2009.
- [5] R. Nishikawa, "Standard therapy for glioblastoma--a review of where we are," *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, vol. 50, no. 9, pp. 713–719, 2010.
- [6] N. Lin, W. Yan, K. Gao, Y. Wang, J. Zhang, and Y. You, "Prevalence and Clinicopathologic Characteristics of the Molecular Subtypes in Malignant Glioma: A Multi-Institutional Analysis of 941 Cases," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e94871, Apr. 2014.
- [7] R. G. W. Verhaak *et al.*, "Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 1, pp. 98–110, Jan. 2010.
- [8] H. S. Phillips *et al.*, "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis," *Cancer Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 157–173, Mar. 2006.
- [9] B. J. Theeler and M. R. Gilbert, "Advances in the treatment of newly diagnosed glioblastoma," *BMC Med.*, vol. 13, no. 1, Dec. 2015.
- [10] H. Noushmehr *et al.*, "Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 5, pp. 510–522, May 2010.
- [11] S. Santagata *et al.*, "Intraoperative mass spectrometry mapping of an onco-metabolite to guide brain tumor surgery," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 30, pp. 11121–11126, Jul. 2014.
- [12] V. Fiano *et al.*, "MGMT promoter methylation in plasma of glioma patients receiving temozolomide," *J. Neurooncol.*, vol. 117, no. 2, pp. 347–357, Apr. 2014.
- [13] M. Westphal and K. Lamszus, "Circulating biomarkers for gliomas," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 11, no. 10, pp. 556–566, Sep. 2015.
- [14] C. Sheridan, "Exosome cancer diagnostic reaches market," *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 4, pp. 359–360, 2016.

- [15] H. Shao *et al.*, “Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy,” *Nat. Med.*, vol. 18, no. 12, pp. 1835–1840, Nov. 2012.
- [16] T. An *et al.*, “Exosomes serve as tumour markers for personalized diagnostics owing to their important role in cancer metastasis,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 4, no. 0, Jun. 2015.
- [17] J. C. Akers *et al.*, “miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients,” *J. Neurooncol.*, vol. 123, no. 2, pp. 205–216, Jun. 2015.
- [18] E. Van Mieghem *et al.*, “Defining pseudoprogression in glioblastoma multiforme,” *Eur. J. Neurol.*, vol. 20, no. 10, pp. 1335–1341, Oct. 2013.
- [19] C. J. Koch *et al.*, “Microvesicles as a Biomarker for Tumor Progression versus Treatment Effect in Radiation/Temozolomide-Treated Glioblastoma Patients,” *Transl. Oncol.*, vol. 7, no. 6, pp. 752–758, Dec. 2014.
- [20] S. M. Evans *et al.*, “Initial evidence that blood-borne microvesicles are biomarkers for recurrence and survival in newly diagnosed glioblastoma patients,” *J. Neurooncol.*, Jan. 2016.
- [21] R. G. Yoon, H. S. Kim, W. Paik, W. H. Shim, S. J. Kim, and J. H. Kim, “Different diagnostic values of imaging parameters to predict pseudoprogression in glioblastoma subgroups stratified by MGMT promoter methylation,” *Eur. Radiol.*, vol. 27, no. 1, pp. 255–266, Jan. 2017.
- [22] J. Khalifa *et al.*, “Identification of a candidate biomarker from perfusion MRI to anticipate glioblastoma progression after chemoradiation,” *Eur. Radiol.*, vol. 26, no. 11, pp. 4194–4203, Nov. 2016.
- [23] R. M. Young, A. Jamshidi, G. Davis, and J. H. Sherman, “Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma,” *Ann. Transl. Med.*, vol. 3, no. 9, Jun. 2015.
- [24] J. Guyotat, “Prise en charge chirurgicale des glioblastomes: les évolutions technologiques Surgical management for glioblastoma: technological evolutions,” *E-Mém. Académie Natl. Chir.*, vol. 12, no. 2, pp. 067–072, 2013.
- [25] C. Roder *et al.*, “Maximizing the extent of resection and survival benefit of patients in glioblastoma surgery: High-field iMRI versus conventional and 5-ALA-assisted surgery,” *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO*, vol. 40, no. 3, pp. 297–304, Mar. 2014.
- [26] W. B. Pope, “Intraoperative mass spectrometry of tumor metabolites,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 30, pp. 10906–10907, Jul. 2014.
- [27] L. S. Eberlin *et al.*, “Classifying Human Brain Tumors by Lipid Imaging with Mass Spectrometry,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 3, pp. 645–654, Feb. 2012.
- [28] “Glioblastoma Multiforme Treatment & Management: Medical Care, Surgical Care, Consultations,” Jan. 2016.
- [29] D. A. Harris *et al.*, “In-Line Radiolabeling: A Novel Continuous-Flow System for Commercial-Scale Protein Labeling,” *J. Nucl. Med.*, vol. 50, no. 7, pp. 1178–1186, Jul. 2009.
- [30] A. Hdeib and A. Sloan, “Targeted radioimmunotherapy: the role of ¹³¹I-chTNT-1/B mAb (Cotara®) for treatment of high-grade gliomas,” *Future Oncol.*, vol. 8, no. 6, pp. 659–669, juin 2012.
- [31] Y. Mao *et al.*, “Does Early Postsurgical Temozolomide Plus Concomitant Radiochemotherapy Regimen Have Any Benefit in Newly-diagnosed Glioblastoma Patients? A Multi-center, Randomized, Parallel, Open-label, Phase II Clinical Trial,” *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 128, no. 20, pp. 2751–2758, Oct. 2015.
- [32] A. Hawkins-Daarud, R. Rockne, D. Corwin, A. R. A. Anderson, P. Kinahan, and K. R. Swanson, “In silico analysis suggests differential response to bevacizumab and radiation combination therapy in newly diagnosed glioblastoma,” *J. R. Soc. Interface R. Soc.*, vol. 12, no. 109, p. 20150388, Aug. 2015.
- [33] J. Polivka *et al.*, “Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme,” *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 21–33, Jan. 2017.

- [34] T. Sandmann *et al.*, “Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 25, pp. 2735–2744, Sep. 2015.
- [35] G. Yazici *et al.*, “High-grade glioma in children and adolescents: a single-center experience,” *Childs Nerv. Syst.*, Dec. 2015.
- [36] R. Stupp, M. Brada, M. J. van den Bent, J.-C. Tonn, G. Pentheroudakis, and on behalf of the ESMO Guidelines Working Group, “High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up,” *Ann. Oncol.*, vol. 25, no. suppl 3, pp. iii93-iii101, Sep. 2014.
- [37] J. Gallego Perez-Larraya and J.-Y. Delattre, “Management of Elderly Patients With Gliomas,” *The Oncologist*, vol. 19, no. 12, pp. 1258–1267, Dec. 2014.
- [38] J. Socha *et al.*, “Outcome of treatment of recurrent glioblastoma multiforme in elderly and/or frail patients,” *J. Neurooncol.*, Nov. 2015.
- [39] W. Roa *et al.*, “International Atomic Energy Agency Randomized Phase III Study of Radiation Therapy in Elderly and/or Frail Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 35, pp. 4145–4150, Dec. 2015.
- [40] A. M. Davies, U. Weinberg, and Y. Palti, “Tumor treating fields: a new frontier in cancer therapy,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1291, pp. 86–95, Jul. 2013.
- [41] R. Stupp *et al.*, “NovoTTF-100A versus physician’s choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality,” *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 48, no. 14, pp. 2192–2202, Sep. 2012.
- [42] A. A. Rehman, K. B. Elmore, and T. A. Mattei, “The effects of alternating electric fields in glioblastoma: current evidence on therapeutic mechanisms and clinical outcomes,” *Neurosurg. Focus*, vol. 38, no. 3, p. E14, Mar. 2015.
- [43] M. M. Mrugala *et al.*, “Clinical practice experience with NovoTTF-100A™ system for glioblastoma: The Patient Registry Dataset (PRiDe),” *Semin. Oncol.*, vol. 41 Suppl 6, pp. S4–S13, Oct. 2014.
- [44] A. A. Kanner, E. T. Wong, J. L. Villano, Z. Ram, and EF-11 Investigators, “Post Hoc analyses of intention-to-treat population in phase III comparison of NovoTTF-100A™ system versus best physician’s choice chemotherapy,” *Semin. Oncol.*, vol. 41 Suppl 6, pp. S25-34, Oct. 2014.
- [45] R. Stupp *et al.*, “Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial,” *JAMA*, vol. 314, no. 23, p. 2535, Dec. 2015.
- [46] E. T. Wong, E. Lok, and K. D. Swanson, “Clinical benefit in recurrent glioblastoma from adjuvant NovoTTF-100A and TCCC after temozolomide and bevacizumab failure: a preliminary observation,” *Cancer Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 383–391, Mar. 2015.
- [47] C. Printz, “Electrical device for patients with glioblastoma met with support, skepticism: Some question the device’s efficacy, others tout it as a new standard of care,” *Cancer*, vol. 121, no. 7, pp. 969–970, 2015.
- [49] S. G. Turner, T. Gergel, H. Wu, M. Lacroix, and S. A. Toms, “The effect of field strength on glioblastoma multiforme response in patients treated with the NovoTTF™-100A system,” *World J Surg Oncol*, vol. 12, no. 1, p. 162, 2014.
- [50] S. Polyzoidis and K. Ashkan, “DCVax®-L--developed by Northwest Biotherapeutics,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 10, no. 11, pp. 3139–3145, 2014.
- [51] C. J. Wheeler and K. L. Black, “DCVax® -Brain and DC vaccines in the treatment of GBM,” *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 18, no. 4, pp. 509–519, Apr. 2009.
- [52] S. Polyzoidis *et al.*, “Active dendritic cell immunotherapy for glioblastoma: Current status and challenges,” *Br. J. Neurosurg.*, vol. 29, no. 2, pp. 197–205, Apr. 2015.

- [53] J. Badhiwala, W. K. Decker, M. E. Berens, and R. D. Bhardwaj, "Clinical trials in cellular immunotherapy for brain/CNS tumors," *Expert Rev. Neurother.*, vol. 13, no. 4, pp. 405–424, Apr. 2013.
- [54] S. Phuphanich *et al.*, "Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma," *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 62, no. 1, pp. 125–135, Jan. 2013.
- [56] J. Schuster *et al.*, "A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study," *Neuro-Oncol.*, vol. 17, no. 6, pp. 854–861, Jun. 2015.
- [57] M. R. Neagu and D. A. Reardon, "Rindopepimut vaccine and bevacizumab combination therapy: improving survival rates in relapsed glioblastoma patients?," *Immunotherapy*, vol. 7, no. 6, pp. 603–606, Jul. 2015.
- [58] M. R. Neagu and D. A. Reardon, "An Update on the Role of Immunotherapy and Vaccine Strategies for Primary Brain Tumors," *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 16, no. 11, Nov. 2015.
- [59] H. Malkki, "Trial Watch: Glioblastoma vaccine therapy disappointment in Phase III trial," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 12, no. 4, pp. 190–190, Mar. 2016.
- [60] "Peptide therapeutics-Fosgerau et Hoffmann-2015.pdf" .
- [61] R. Berges, J. Balzeau, A. C. Peterson, and J. Eyer, "A tubulin binding peptide targets glioma cells disrupting their microtubules, blocking migration, and inducing apoptosis," *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, vol. 20, no. 7, pp. 1367–1377, Jul. 2012.
- [62] C. Lépinoux-Chambaud and J. Eyer, "The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis," *Int. J. Pharm.*, vol. 454, no. 2, pp. 738–747, Oct. 2013.
- [63] R. Rivalin, C. Lepinoux-Chambaud, J. Eyer, and F. Savagner, "The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide disrupts microtubule and mitochondrial networks in the T98G glioma cell line," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e98473, 2014.
- [64] Y. Laurin *et al.*, "Investigating the Structural Variability and Binding Modes of the Glioma Targeting NFL-TBS.40–63 Peptide on Tubulin," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 54, no. 23, pp. 3660–3669, Jun. 2015.
- [65] "Currently Recruiting Trials – Glioblastoma | Astrocytoma Options." .
- [66] D. N. Louis *et al.*, "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 131, no. 6, pp. 803–820, Jun. 2016.
- [67] M. Glas *et al.*, "Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma," *Ann. Neurol.*, p. n/a-n/a, Apr. 2010.
- [68] A. Rodriguez, S. Tatter, and W. Debinski, "Neurosurgical Techniques for Disruption of the Blood–Brain Barrier for Glioblastoma Treatment," *Pharmaceutics*, vol. 7, no. 3, pp. 175–187, Aug. 2015.
- [69] R. M. deSouza *et al.*, "Has the survival of patients with glioblastoma changed over the years?," *Br. J. Cancer*, vol. 114, no. 2, pp. 146–150, Jan. 2016.

URL (Web Page):

- [48] "Post-approval Study of NovoTTF-100A in Recurrent GBM Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov." [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01756729?term=NovoTTF-100A&rank=2>. [Accessed: 03-Feb-2016].
- [55] "Overview of ImmunoCellular Therapeutics' immunotherapy product candidate ICT-107." [Online]. Available: <http://www.imuc.com/pipeline/ict-107>. [Accessed: 06-Mar-2017].

Figures :

Graphical abstract :

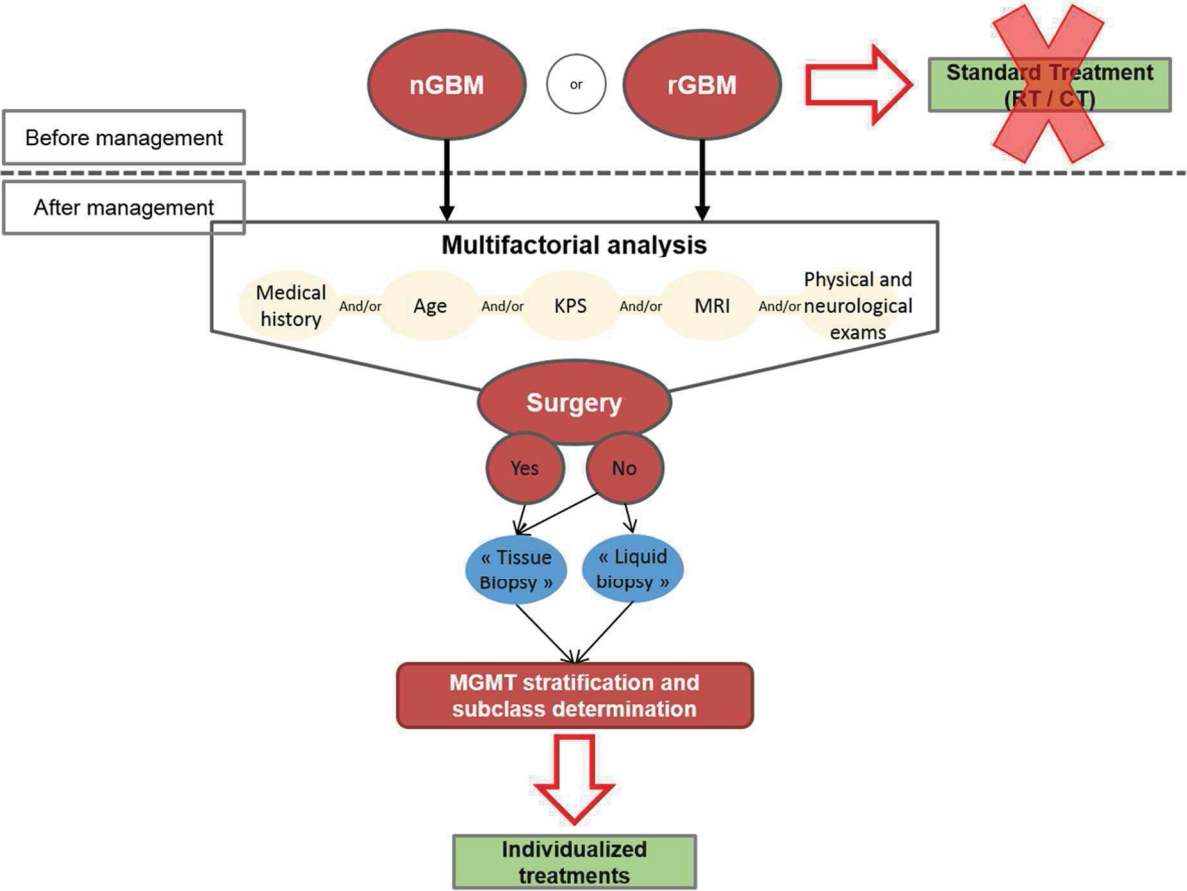


Figure 1 :

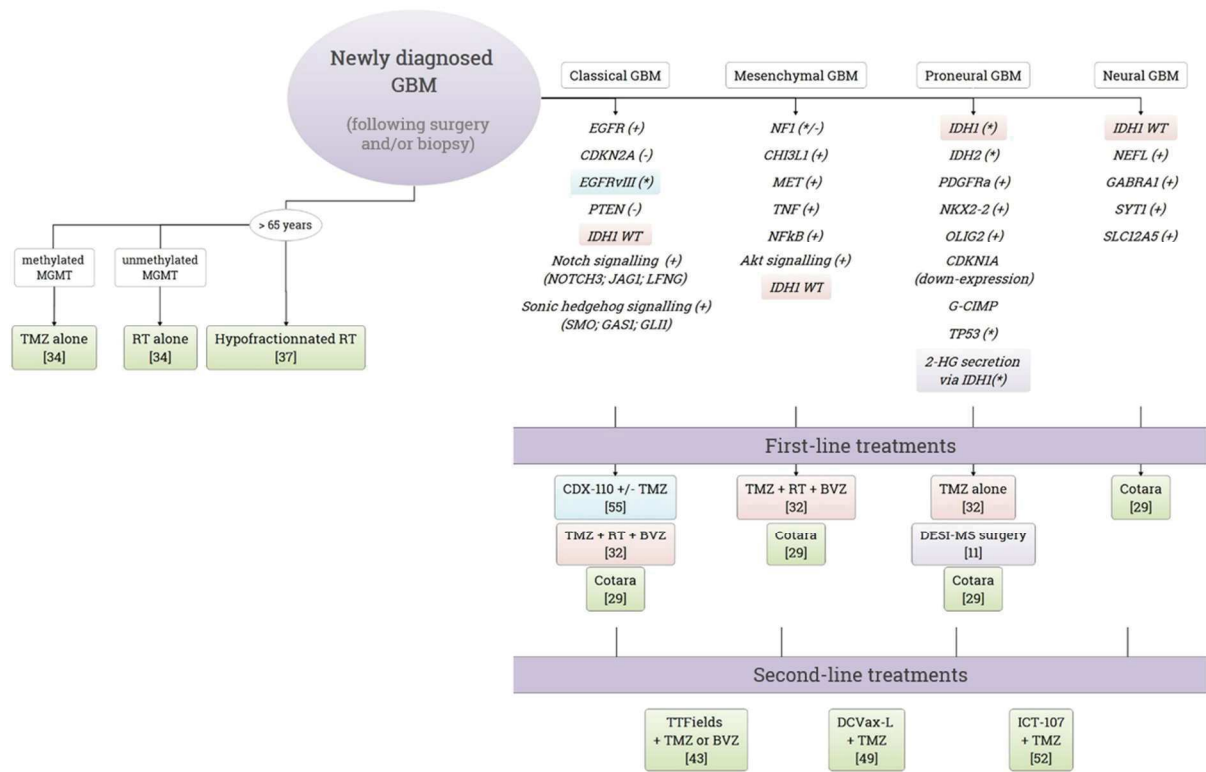
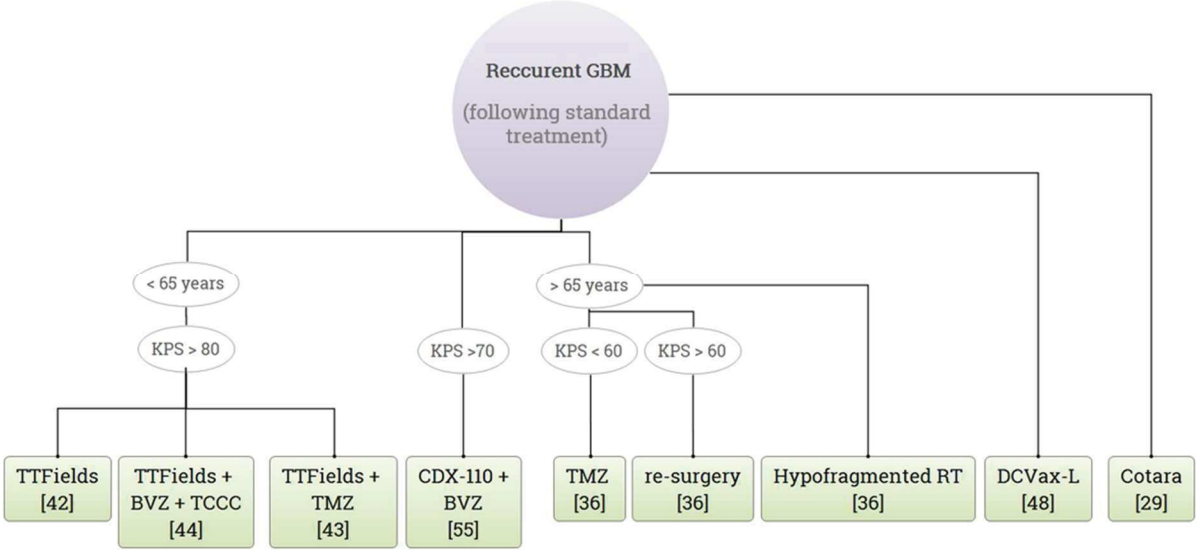


Figure 2 :



Discussion

Origine et effets multiples du peptide NFL-TBS.40-63

Un axe important du laboratoire a été d'étudier les interactions entre les protéines du cytosquelette neuronal, en particulier entre les microtubules (MTs) et les neurofilaments (filaments intermédiaires spécifiquement exprimés par les neurones). Dans ce cadre, des souris transgéniques ont été créées et qui expriment un gène de fusion NFH-LacZ codant pour la protéine NFH partiellement tronquée et liée de la β -galactosidase. Ces souris sont viables, mais présentent des agrégats de neurofilaments dans le corps cellulaire, une réduction des neurofilaments dans les axones où il y a une augmentation des MTs (Eyer and Peterson, 1994).

Plus tard il a été montré que l'expression et la distribution des tubulines ne sont pas altérées dans ces souris transgéniques NFH-LacZ, même si les MTs sont anormalement nombreux dans ces axones déficients en neurofilaments (Bocquet et al., 2009). Pour comprendre ce paradoxe, il a été montré qu'il y a des sites conservés sur la partie N-terminale des trois sous-unités des neurofilaments, qui permettent à la tubuline libre de se fixer sur les neurofilaments. On nomme ces sites « TBS » pour *Tubulin Binding Site*. *In vitro*, les peptides qui correspondent à ces sites inhibent la polymérisation de la tubuline en MT, mais n'ont pas d'action sur les MTs déjà assemblés. Cette étude indique que les neurofilaments présents dans les axones permettent de fixer la tubuline libre (non polymérisée), et ainsi modulent l'équilibre d'assemblage local des MTs (Bocquet et al., 2009).

Puis, il a été montré qu'un de ces peptides, le peptide NFL-TBS.40-63 est capable de pénétrer par les trois voies d'endocytoses dans les cellules de gliomes de rats, souris ou encore humains. Il y provoque la destruction du réseau de MTs et de mitochondries et réduit la prolifération, la migration et la viabilité de ces cellules (Bocquet et al., 2009; Berges et al., 2012a; Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013; Rivalin et al., 2014). *In vivo*, après injection intra-tumorale chez des rats porteurs d'une tumeur, le peptide induit une réduction de la taille de la tumeur d'environ 70% et une amélioration de la survie des animaux après 24 jours (Berges et al., 2012a). Cependant, sa capacité de pénétration est limitée dans d'autres types cellulaires comme les neurones et les astrocytes, et le peptide n'y a pas d'effet notable sur le réseau de MT, ni sur la survie de ces cellules. Ainsi, les capacités de ciblage de ce peptide en font un agent particulièrement prometteur pour le traitement du glioblastome, cette tumeur cérébrale qui est la plus fréquente et la plus agressive (Berges et al., 2012a).

Dans la sclérose en plaque, la remyélinisation des axones par les oligodendrocytes est incomplète et il y a une réduction de l'expression intracellulaire des protéines du cytosquelette (les trois sous unités des neurofilaments, ainsi que la tubuline) qui sont présentes de façon anormalement élevée dans le liquide céphalorachidien (LCR). Cette augmentation dans le LCR est généralement corrélée avec la

sévérité de la maladie (Teunissen et al., 2005). De plus, l'altération des axones les rends impropres à la myélinisation (Chang et al., 2002). Puisque le calibre axonal dépend des neurofilaments, qui sont libérés dans le LCR dans le cas de la SEP, et qui sont déterminants pour la myélinisation, une étude au laboratoire a montré que ces neurofilaments peuvent réguler le destin des oligodendrocytes en augmentant leur prolifération et leur différenciation (Fressinaud et al., 2012). De plus, il a été montré que le peptide NFL-TBS.40-63 prévient les oligodendrocytes d'une toxicité et augmente leur différenciation et maturation (Fressinaud and Eyer, 2014).

Sauf erreur de notre part, la nature précise des neurofilaments (ou leurs fragments) présents dans le LCR en situation normale ou pathologique, n'est toujours pas connue, notamment leur séquence et/ou leurs possibles modifications. Cependant, les résultats sur le peptide NFL-TBS.40-63 montrent clairement que celui-ci possède des propriétés sélectives et différentes selon le type de cellule du système nerveux considéré. C'est dans ce contexte scientifique que les travaux de la thèse ont contribué à poursuivre les possibles effets du peptide sur les cellules souches neurales, et leur potentiel de valorisation en particulier dans le cadre de la médecine régénérative. Ces travaux ont ainsi permis de montrer que le peptide est capable de pénétrer dans les cellules souches neurales issues de la zone sous ventriculaire de rats et de fœtus humains, et d'induire leur différenciation sans affecter leur viabilité.

Ciblage des cellules par le peptide NFL-TBS.40-63

Il avait été montré au laboratoire que le peptide NFL-TBS.40-63 entre de façon dose-dépendante et par les trois voies d'endocytose dans les cellules de glioblastome alors qu'il n'est pas capable d'entrer par translocation directe dans les cellules de glioblastome humain U87MG contrairement au peptide de pénétration cellulaire très connu TAT.48-60 (Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013). Comme d'autres CPPs (Peptide de pénétration cellulaire ou *Cell Penetrating Peptide*), la voie d'endocytose utilisée par le peptide NFL-TBS.40-63 est différente en fonction de sa concentration extracellulaire (Duchardt et al., 2007; Jiao et al., 2009; Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013). Bien que ce peptide n'entre pas ou peu dans les neurones ou les astrocytes (Berges et al., 2012a), il utilise uniquement la macropinocytose pour traverser la bicouche lipidique de ces cellules (Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013). Ce peptide pénètre aussi dans les précurseurs d'oligodendrocytes par la voie dépendante des clathrines (Fressinaud and Eyer, 2015).

Nos travaux ont permis de montrer que le peptide était aussi capable d'entrer dans les cellules souches neurales (CSNs) de rats ou humaines grâce à un mécanisme indépendant de l'endocytose (1^{er} et 2^{ème}

articles scientifiques). De plus, *in vivo*, après injection dans le ventricule latéral de rats adultes, le peptide est localisé principalement dans les CSNs de la zone sous ventriculaire et ne semble pas entrer dans les autres cellules présentes dans cette niche (1^{er} article scientifique). À l'opposé, le peptide ne pénètre pas dans les CSNs de la moelle épinière (Carradori et al., 2016). L'ensemble de ces données indique que le peptide cible précisément certaines cellules du système nerveux central.

Ces différents travaux montrent que le peptide pénètre sélectivement dans différents types de cellules par des mécanismes moléculaires différents. Les voies d'endocytoses impliquées dans l'internalisation du peptide dans les cellules de glioblastome suggèrent qu'un récepteur est impliqué. En effet, il semble qu'un récepteur de type tyrosine kinase soit impliqué dans la reconnaissance du peptide tel que le récepteur EGFR qui est connu pour être surexprimé dans les cellules de glioblastomes (Ekstrand et al., 1991; Heimberger et al., 2005; Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013). Par contre, nos travaux n'ont pas encore permis de confirmer l'implication de ce récepteur, et/ou la liaison du peptide à un tel récepteur.

De manière générale, le peptide semble entrer préférentiellement dans les cellules du système nerveux qui prolifèrent, ce qui pourrait expliquer qu'il n'entre pas dans les neurones et les astrocytes, qui sont des cellules post-mitotiques (Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013). Cependant, il faut noter que la pénétration du peptide par translocation directe dans les CSNs n'implique pas de récepteur, suggérant une autre spécificité liée à ces cellules. Des analyses sont actuellement en cours pour étudier si la présence de certains lipides membranaires pourrait expliquer l'entrée préférentielle du peptide dans les CSNs par rapport aux neurones et aux astrocytes, comme cela a déjà été montré pour le peptide Tat, R9 ou d'autres poly-arginines (Simon et al., 2009; Falanga et al., 2015; Wang and Pellois, 2016; Wallbrecher et al., 2017). En effet, l'entrée de Tat dans les cellules du système nerveux dépend de l'expression des glycosaminoglycane des différents types cellulaires (Simon et al., 2009). De plus, le peptide R9, à faible concentration, est capable d'entrer par translocation directe dans les cellules HEK mais pas dans les cellules Hela où il doit être à forte concentration pour entrer par translocation directe. L'hypothèse pour le peptide R9 est que l'expression de sphingomyéline par les cellules Hela jouerait un rôle crucial dans la perméabilité membranaire au R9. En effet, dans les cellules Hela, les sphingomyélines sont converties en céramide, et cette conversion est corrélée à l'entrée par translocation directe. Cette donnée suggère que les sphingomyélines jouent un rôle important dans la perméabilité membranaire (Wallbrecher et al., 2017). De plus, l'entrée des peptides poly-arginines dépend du statut d'oxydation de la membrane plasmique (Wang and Pellois, 2016). Il est donc possible que la présence de sphingomyélines sur les membranes des neurones et des astrocytes et/ou l'oxydation de la membrane empêchent l'entrée du peptide NFL-TBS.40-63.

Afin de mieux cerner les composés moléculaires impliqués dans l'entrée sélective du peptide, il sera réalisé des études d'interaction entre le peptide NFL-TBS.40-63 et les différents composants membranaires de différents types cellulaires par Biacore et par spectrométrie de masse comme précédemment montré (Bechara and Sagan, 2013; Galdiero et al., 2013; Figueira et al., 2017; Wallbrecher et al., 2017). Nous espérons que ces travaux permettront de préciser le mécanisme de l'internalisation du peptide NFL-TBS.40-63 et ainsi de mieux comprendre la spécificité d'entrée du peptide dans les cellules de glioblastome ou les CSNs par rapport aux neurones et aux astrocytes.

De plus, il est important de déterminer la localisation intracellulaire du peptide ainsi que le devenir du peptide dans ces deux types de cellules afin d'obtenir des informations cruciales sur sa pharmacocinétique. Il est particulièrement important de caractériser l'état du peptide à l'intérieur de la cellule pour être certain qu'au cours de nos expériences nous visualisons le peptide entier et non une forme protéolysée. En effet, le peptide est généralement couplé soit à la fluorescéine soit à la biotine, et donc la visualisation du peptide fluorescent à l'intérieur de la cellule par microscopie confocale ne nous indique pas si le peptide reste entier, ou si nous ne visualisons que le devenir de la fluorescéine. Ceci dit, une étude des relations structure/fonction de ce peptide a clairement indiqué que si le peptide est tronqué en partie N ou C-terminale, il perd son activité d'entrée cellulaire et son activité anti-microtubulaire (Berges et al. 2012b).

Dans le même cadre de problématique, nous avons montré qu'une molécule fluorescente, le DiD, est capable d'entrer de manière dose et temps dépendants dans les CSNs de la zone sous ventriculaire (ZSV) de rats *in vitro* et *in vivo* (3^{ème} article scientifique). *In vivo*, lorsqu'il est injecté dans un ventricule latéral, le DiD est localisé au niveau de la ZSV et est capable de traverser le putamen et de se localiser au niveau de structures myélinisées. Le DiD est utilisé entre autre, comme molécule fluorescente pour suivre les nanocapsules lipidiques (LNC) car il est facilement encapsulé. Lors de l'utilisation de nanoparticules, ces résultats indiquent qu'il est très important de réaliser des analyses complémentaires pour valider que les nanocapsules sont visualisées et non pas la molécule fluorescente qui peut être libérée après dégradation de ces LNC. Dans le même cadre, pour valider les effets du peptide nous utilisons systématiquement comme contrôles les peptides "scramble", qui ont la même composition en acides aminés que le peptide NFL-TBS.40-63, mais dans le désordre.

Considérant les propriétés de ciblage de ce peptide, il semble un agent thérapeutique intéressant pour apporter des molécules à l'intérieur de certaines cellules comme les glioblastomes ou les CSNs. Il est en effet possible de coupler des protéines ou d'autres peptides à des CPPs afin d'augmenter la biodisponibilité de ces molécules. Par exemple le CPP Tat ou VIM-TBS.58-81 (un peptide dérivé du filament intermédiaire Vimentine) peuvent être couplés au peptide P10 afin d'induire l'apoptose des cellules tumorales (Baker et al., 2007; Balzeau et al., 2012; Kristensen et al., 2016). Ce système

permet d'amener efficacement le peptide P10 dans les noyaux où il garde son activité biologique. L'efficacité de tels systèmes reste dépendante du type cellulaire comme le prouve l'inefficacité du couplage TAT⁴⁸⁻⁶³-P10 pour les cellules T98G alors qu'il est efficace contre les cellules U251 (Baker et al., 2007; Balzeau et al., 2012). Ceci peut être dû à la composition de la membrane nucléaire. Il est aussi intéressant d'utiliser les CPPs comme vecteurs pour modifier les CSNs spécifiquement, sans atteindre les autres cellules, comme le montre l'efficacité d'un couplage CPP-protéine (R7-CARM1 (pour *Co-activator-associated arginine methyltransferase 1*)) pour induire la différenciation des cellules souches mésenchymateuses humaines (Jo et al., 2012). Il serait donc intéressant d'étudier l'efficacité d'un système NFL-TBS.40-63-protéine pour induire l'apoptose des cellules de glioblastome ou la différenciation des CSNs *in vitro* et *in vivo*, sans affecter les cellules environnantes (neurones et astrocytes).

Dans ce cadre, le laboratoire a montré que le peptide NFL-TBS.40-63 peut être particulièrement bien utilisé avec des nanocapsules lipidiques (LNCs). En effet, la fonctionnalisation des LNCs par le peptide permet d'augmenter considérablement (6 fois en moyenne) leur internalisation dans les cellules de glioblastome de souris et les astrocytes. Lorsque le Paclitaxel, drogue du cytosquelette, est encapsulé à l'intérieur des LNCs, le couplage LNC-NFL permet d'augmenter efficacement le ciblage pour les cellules de glioblastomes. *In vivo*, les LNCs fonctionnalisées et remplies de Paclitaxel sont plus efficaces de 50% que les LNCs non fonctionnalisées (Balzeau et al., 2013). De plus, les LNCs fonctionnalisées semblent cibler spécifiquement les cellules de glioblastome car on ne les retrouve pas du côté controlatérale à la tumeur contrairement aux LNCs non fonctionnalisées (Balzeau et al., 2013).

Ce système a aussi montré son efficacité pour les CSNs de la ZSV. En effet, les mêmes nanocapsules fonctionnalisées avec le peptide NFL-TBS.40-63 permettent d'augmenter par 4 fois leur internalisation dans les CSNs de la ZSV de rats, *in vitro* et *in vivo* après injection dans le ventricule latéral. Cependant, elles sont incapables de pénétrer dans les CSNs de la moelle épinière *in vitro* (Carradori et al., 2016). Ainsi, les nanocapsules fonctionnalisées avec le peptide NFL-TBS.40-63 pourraient être chargées en acide rétinoïque ce qui augmenterait la spécificité pour les CSNs de la ZSV et leur différenciation en neurones (Carradori et al., 2017) comme précédemment démontré (Ferreira et al., 2016).

A notre connaissance, c'est la première fois qu'il a été montré qu'un peptide puisse cibler de manière aussi sélective les CSNs comparé aux autres cellules de la zone sous ventriculaire, ainsi qu'aux autres cellules saines du système nerveux central.

Les CPPs, comme pVEC, Trans ou encore Tat, sont capables de passer à travers la barrière hématoencéphalique où 80% semble atteindre le parenchyme cérébral (Stalmans et al., 2015). Des

études sont actuellement en cours au laboratoire pour étudier le passage de la BHE par le peptide NFL-TBS.40-63.

Effets induit par le peptide NFL-TBS.40-63

Effets sur le réseau de microtubules des cellules

C'est en 2009 pour la première fois qu'il a été montré que le peptide NFL-TBS.40-63 est capable d'inhiber la formation du réseau de MTs des cellules de glioblastome, ce qui provoque leur apoptose. De plus, le peptide réduit la prolifération, la migration (Berges et al., 2012a) et la respiration mitochondriale de ces cellules (Rivalin et al., 2014). Lorsque le peptide est injecté directement dans la tumeur cérébrale de rat, il y a une réduction de la taille de la tumeur de 70% par rapport aux rats non traités avec le peptide (Berges et al., 2012a). Cependant, le peptide n'a pas d'effet sur le réseau de MTs des autres cellules saines du système nerveux, en particulier les précurseurs d'oligodendrocytes (Fressinaud and Eyer, 2014).

Nos études sur les CSNs ont montré que le peptide n'a pas d'effet sur leur réseau de MTs, ni sur leur cycle cellulaire ou leur viabilité, que ce soit les cellules de rats ou humaines (1^{er} et 2^{ème} articles scientifiques). Une hypothèse de travail serait que le peptide lie une isoforme de tubuline spécifiquement exprimée par les cellules de glioblastomes et non exprimée par les autres types cellulaires, ce qui empêcherait la polymérisation des MTs. En effet, à l'origine, il a été montré que le peptide est capable de lier la tubuline libre *in situ* et empêche la polymérisation des MTs (Bocquet et al., 2009). Ces expériences ont été effectuées principalement avec de la tubuline isolée de cerveaux de rats, et contenant entre autre de la tubuline β III. La tubuline β III serait une isoforme qui pourrait permettre d'expliquer cet effet spécifique pour les cellules de glioblastomes. En effet, il a été montré que les cellules de glioblastomes sur-expriment la tubuline β III (Katsetos et al., 2003) tout comme les cellules d'adénocarcinome de seins humains (cellules MCF-7) (Stengel et al., 2010) où le peptide a un effet (Bocquet et al., 2009). A l'opposé, le peptide n'a pas d'effet sur le réseau de MTs des cellules HeLa ou les CSNs qui n'expriment pas la tubuline β III (1^{er} et 2^{ème} articles scientifiques) (Nakamura et al., 2003; Verdier-Pinard et al., 2003; Berges et al., 2012a).

De plus, des analyses de bio-modélisation ont montré que le peptide NFL-TBS.40-63 lie préférentiellement la β tubuline par rapport à l' α tubuline (Laurin et al., 2015), et plus spécifiquement la β III tubuline comparé à la tubuline β I (Laurin et al., 2017). Cependant, bien que la tubuline β III soit une isoforme intéressante pour expliquer les effets du peptide, cette isoforme est aussi exprimée par les neurones sains matures (Breuss et al., 2017) où le peptide n'a pas d'effet (Berges et al., 2012a). Une modification post-traductionnelle de la β III-tubuline, ou l'expression d'une protéine anormale

dans les cellules de glioblastomes pourraient expliquer l'effet spécifique du peptide sur ces cellules de glioblastome comparé aux neurones. Une autre possibilité serait que la quantité maximale de peptide utilisée à forte dose (100 $\mu\text{mol/L}$) qui pénètre dans les neurones est seulement d'environ 10% (Berges et al., 2012a). Cette quantité serait peut-être trop faible pour avoir un effet sur le réseau de MTs des neurones.

Le peptide NFL-TBS.40-63 n'induit pas de toxicité sur les neurones et les astrocytes (Berges et al., 2012a) contrairement au peptide Tat qui induit leur apoptose *in vitro* (Eugenin et al., 2003) bien qu'il ait aussi un effet neuro-protectif *in vivo* (Meloni et al., 2014). De plus, d'autres peptides comme R9, Trans, Penetratine ou Tat sont capables de pénétrer dans les cellules du système nerveux central mais sans spécificité apparente (Bolton et al., 2000; Kizil et al., 2015) et peuvent y induire une toxicité (Bolton et al., 2000), contrairement au peptide NFL qui entre principalement dans les cellules en division (Lépinoux-Chambaud and Eyer, 2013) et qui n'a pas d'effet toxique sur le cerveau sain après injection dans le striatum (Berges et al., 2012a). Toutes ces données confèrent un avantage important au peptide NFL-TBS.40-63 pour une possible utilisation en clinique.

Effets sur les propriétés des cellules

Bien que le réseau de MTs des CSNs ne soit pas détruit par le peptide, le dynamisme des MTs est crucial pour les fonctions dans la division cellulaire, la migration et la différenciation (Nogales, 2000; Yourek et al., 2007; Vemu et al., 2016). Il y a plus de 22 variants de dimères de tubuline qui n'ont pas le même dynamisme en fonction de leur association (Vemu et al., 2016). La fonction des MTs peut être indépendante de leur composition dans certains tissus, mais ce n'est pas le cas des MTs exprimés par les neurones, où les modifications post-traductionnelles sont décisives pour la fonction des MTs (Janke, 2014). Toutes ces données indiquent que le peptide pourrait lier une ou plusieurs isoformes de tubulines en fonction du type cellulaire où il se trouve. Il est possible qu'en fonction de la conformation de la tubuline à l'intérieur de la cellule, des isoformes de tubulines impliquées, ou encore des modifications post-traductionnelles, le peptide se lie plus ou moins spécifiquement et affecte plus ou moins profondément la polymérisation des MTs. Ainsi, la liaison du peptide sur les tubulines dans les précurseurs d'oligodendrocytes n'empêche pas la polymérisation des MTs, cependant, il induit la différenciation et la maturation de ces cellules (Fressinaud and Eyer, 2014).

Nos travaux sur les CSNs ont aussi montré que le peptide modifie les propriétés des CSNs. En effet, en présence du peptide NFL-TBS.40-63, les propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération des CSNs (rats et humaines) sont réduites proportionnellement à la concentration en peptide. Cette

prolifération est caractérisée par un nombre moins important de cellules après plusieurs jours en présence du peptide (1^{er} et 2^{ème} articles scientifiques).

Cependant, les CSNs humaines incorporent une quantité plus importante de BrdU, qui est proportionnelle à la concentration en peptide. Le BrdU est utilisé pour étudier la prolifération car c'est un marqueur de la division cellulaire en s'intégrant à l'ADN lors de sa réplication. Ce résultat contredirait donc les résultats de la prolifération. En effet, il y a une diminution du nombre de cellules mais une augmentation de l'incorporation de BrdU. Nous avons émis l'hypothèse que le peptide induit la division de la cellule en cellules engagées dans la différenciation. En effet, l'action du peptide peut être réalisée en plusieurs étapes : 1- blocage de la division cellulaire durant les premiers jours et 2- division de la cellule en cellules progéniteurs ou précurseurs de cellules différenciées. Durant l'étape 1, les cellules contrôles prolifèrent lentement créant d'autres CSNs, alors qu'avec le peptide, les cellules ne prolifèrent plus (ou moins). Après 3 jours (étape 2), les cellules contrôles continuent de se diviser lentement (BrdU⁺), alors que les cellules en présence du peptide se divisent (BrdU⁺⁺⁺) en cellules engagées (progéniteurs ou précurseurs) dans les différentes voies de différenciation. Ces cellules étant des cellules adhérentes, il est possible que leur cycle cellulaire soit plus rapide, comme précédemment démontré (Assoian, 1997; Carrano and Pagano, 2001; HERNÁNDEZ-NEGRETE et al., 2011) Cependant, le nombre de cellules contrôles est plus important que le nombre de cellules traitées, à 3 jours post-traitement car les cellules traitées ne se sont pas divisées lors de la phase 1. C'est pourquoi le nombre de cellules en présence du peptide est inférieur par rapport aux cellules contrôles, mais le nombre de cellules BrdU⁺ est supérieur. Il serait intéressant de faire un double marquage avec le BrdU ou un autre marqueur de la prolifération comme le Ki67 et un marqueur de différenciation pour confirmer cette hypothèse.

Après plusieurs jours, l'adhésion de cellules est augmentée en présence du peptide. Étant donné que les cellules adhérentes pouvaient être des cellules différenciées, nous avons étudié l'expression de protéines et de gènes impliqués dans les différentes voies de différenciations des CSNs, à savoir, les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. D'une manière générale, nous observons une augmentation de la différenciation des CSNs avec une augmentation du marquage des protéines telles qu'A2B5 et CD90. Cependant, l'analyse de l'expression génique indique que les voies prises par les CSNs ne sont pas les mêmes en fonction de la nature des cellules. Bien qu'il y ait une augmentation des gènes *TUBB3* et *DCX* (gènes neuronaux) dans les deux cas, il y a une augmentation des gènes *CNP* et *MBP* (gènes d'oligodendrocytes) pour les CSNs de rats alors qu'il y a une augmentation des gènes *GFAP* et *CD44* (gènes astrocytaires) pour les CSNs humaines (1^{er} et 2^{ème} articles scientifiques). Il y a donc une augmentation de la différenciation dans les voies neuronales et oligodendrocytaires pour les CSNs de rats (1^{er} article scientifique), et une augmentation des voies neuronales et astrocytaires pour les CSNs humaines (2^{ème} article scientifique). Pour les CSNs humaines, il y a une perte de l'expression

du gène *CD133*, marqueur spécifique des CSNs, à toutes les concentrations de peptide, indiquant une perte du caractère « souche » des cellules. Toutes ces données indiquent que le peptide n'induit pas le même effet en fonction de l'origine des cellules souches neurales (Berges et al., 2012a).

Bien que le peptide n'ait pas d'action sur le réseau de MTs des CSNs contrairement aux cellules de glioblastomes, il induit une réduction de la prolifération dans tous ces types cellulaires. Les résultats obtenus sur les CSNs sont concordants avec les précédentes données montrant que le peptide entre dans les précurseurs d'oligodendrocytes et augmente leur différenciation et leur maturation (Fressinaud and Eyer, 2014). En effet, les cellules présentes dans une neurosphère sont hétérogènes, il est donc possible que des précurseurs d'oligodendrocytes y soient aussi présents (Suslov et al., 2002).

L'expression de tubuline change durant le développement, il est donc possible qu'il y a des différences entre les CSNs de fœtus et les CSNs de la ZSV de cerveaux adultes (Tuszynski et al., 2003), ce qui expliquerait les résultats différents en fonction de la source des cellules. De plus, l'action du peptide est fortement liée à sa conformation à l'intérieur de la cellule (Berges et al., 2012b), et donc son changement de conformation à l'intérieur des CSNs par rapport aux cellules de glioblastomes pourrait modifier son effet intracellulaire.

Afin de comprendre les différents effets cellulaires obtenus avec le peptide NFL-TBS.40-63, les différentes isoformes présentes dans les différents types cellulaires où le peptide a plus ou moins un effet seront caractérisées par spectrométrie de masse en collaboration avec le laboratoire du Dr. Carsten Janke (Paris). De plus, il sera réalisé des études d'interaction entre le peptide et la tubuline isolée directement à partir de ces différentes cellules. Ces études réalisées par BIACORE nous donneront la stoechiométrie de la réaction entre le peptide et la tubuline. De plus, les partenaires d'interactions du peptide isolés à partir de ces études seront analysés par spectrométrie de masse. Toutes ces études nous permettront de comprendre plus spécifiquement les effets du peptide NFL-TBS.40-63.

Il serait intéressant de regarder si le peptide a des effets sur les cellules souches de glioblastome. En effet, ces cellules sont responsables de la résistance aux traitements (radiothérapie et chimiothérapie) des patients atteints d'un glioblastome et de la récurrence de la tumeur (Altaner, 2008; Qazi et al., 2016). Tout comme les cellules de glioblastomes, elles expriment la tubuline β III (Rennert et al., 2016) ce qui pourrait entrainer leur mort par apoptose grâce à un traitement avec le peptide NFL-TBS.40-63. Ces cellules ont aussi les mêmes propriétés que les CSNs (prolifération, autorenouveaulement et différenciation) qui peuvent être à l'origine des gliomes (Modrek et al., 2014). Ces données nous laissent penser que le peptide pourrait pénétrer de manière passive dans ces cellules. Le peptide pourrait stimuler la différenciation de ces cellules, comme nous l'avons montré sur les

CSNs, ce qui réduirait la tumorigénicité de ces cellules. Ces travaux sont actuellement en cours au sein du laboratoire, en collaboration avec le laboratoire du Pr. Samuel Weiss (Calgary – Canada).

« A notre connaissance, c'est la première fois qu'un peptide montre une action de différenciation des cellules souches neurales sans entrer dans les autres cellules de la zone sous ventriculaire. »

Conclusions générales

Les travaux menés au cours de ces trois années ont permis d'améliorer les connaissances sur les capacités du peptide NFL-TBS.40-63 à cibler et à modifier les propriétés des CSNs de rats et humaines.

A notre connaissance, seul ce peptide est capable d'entrer spécifiquement dans les CSNs par rapport aux cellules matures environnantes (neurones, astrocytes et oligodendrocytes), où il induit une réduction des propriétés de prolifération et d'auto-renouvellement de ces cellules pour les amener à se différencier.

Couplé à des nanocapsules lipidiques, le peptide augmente la disponibilité intracellulaire des molécules encapsulées et permet d'améliorer leur ciblage et de réduire leurs effets toxiques.

Bien qu'il reste à découvrir le mécanisme moléculaire permettant d'expliquer l'entrée sélective du peptide NFL-TBS.40-63 et son mode d'action différentiel, ce peptide semble être un outil prometteur pour cibler les CSNs endogènes de la zone sous ventriculaire chez des patients atteints de maladie neurodégénérative afin de stimuler la création de nouveaux neurones.

Annexes

Liste des figures

Figure 1.1: Les deux systèmes nerveux.....	16
Figure 1.2: Connexions entre le SNC et le SNP.	17
Figure 1.3: Les différents types de cellules dans le système nerveux central et périphérique : les cellules neuronales et les cellules gliales.	18
Figure 1.4: Morphologie d'un neurone.	19
Figure 1.5: Interaction d'un astrocyte avec son environnement.....	20
Figure 1.6: Schéma d'un oligodendrocyte qui forme la gaine de myéline autour d'un axone d'un neurone.....	21
Figure 1.7: Microglie en condition physiologique ou pathologique.	23
Figure 1.8: Schéma des cellules épendymaires.	24
Figure 1.9: Le cytosquelette cellulaire.....	25
Figure 1.10: Schématisation de la dynamique des MTs.....	26
Figure 1.11 : Exemples de modifications post-traductionnelles sur les tubulines.	28
Figure 1.12: Schématisation de la dynamique des MFs.....	29
Figure 1.13: Organisation et assemblage des FIs.	30
Figure 1.14: Composition et organisation des neurofilaments.....	31
Figure 1.15: Représentation morphologique et moléculaire de la maladie d'Alzheimer.....	33
Figure 1.16: Représentation de la perte en dopamine d'un cerveau atteint de la maladie de Parkinson.	34
Figure 1.17: Représentation de la perte de la myéline au cours du développement de la SEP. ...	37
Figure 1.18: Représentation de la perte des motoneurons au cours du développement de la SLA.	38
Figure 1.19: Origines possibles de la formation des gliomes.....	40
Figure 2.1 : Les différents types de cellules souches en fonction du stade de développement.....	42
Figure 2.2 : Potentiel de différenciation des cellules souches embryonnaires.....	43
Figure 2.3: Principe d'utilisation et de production des iPSCs.....	45
Figure 2.4: Schéma représentant la division symétrique et asymétrique des CSNs <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>.	49
Figure 2.5 : Développement de la ZSV et localisation des CSNs après le développement du cerveau.	50
Figure 2.6 : Représentation du microenvironnement de la ZSV.	51
Figure 2.7 : Représentation du microenvironnement de la ZSG.	52
Figure 2.8 : Les facteurs épigénétiques qui régulent les CSNs.....	53
Figure 2.9 : La niche des CSNs adultes située au niveau de la ZSV.	54
Figure 2.10 : Les différentes stratégies actuelles pour l'utilisation thérapeutique des cellules souches neurales.	57

Figure 2.11: Les CSNs seraient les cellules initiatrices des gliomes et responsables de la récurrence de la tumeur.	61
Figure 2.12 : Exemples de différentes thérapies possibles avec des CSNs grâce à leur tropisme naturel vers les gliomes.	62
Figure 3.1 : Les différents mécanismes d'entrée dans une cellule.	69
Figure 3.2: Exemples de modèles pour la translocation directe des CPPs.	70
Figure 3.3 : Schématisation des différentes voies d'endocytoses.	72
Figure 3.4 : Présentation des différentes applications de CPPs.	74
Figure 3.5 : Principe de la technique du peptide array.	80
Figure 3.6 : Exemple des effets <i>in vitro</i> des peptides issus des neurofilaments.	81
Figure 3.7 : Exemple des effets <i>in vitro</i> du peptide NFL-TBS.40-63.	83
Figure 3.8 : Exemple des effets <i>in vivo</i> du peptide NFL-TBS.40-63.	84
Figure 3.9 : Prédiction de la structure secondaire du peptide NFL-TBS.40-63.	85
Figure 3.10 : Efficacité du système NFL-LNC-(Paclitaxel).	86
Figure R1 : Hypothèse du mécanisme d'action du peptide NFL-TBS.40-63 sur les hCSNs.	125

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Les cellules neurales en clinique pour les maladies neurodégénératives	60
Tableau 2.2 : Les CSNs en clinique pour les tumeurs cérébrales	64
Tableau 3.1 : Exemple de peptides pénétrants.	67
Tableau 3.2 : Applications possibles des CPPs.	75
Tableau 3.3 : Exemples de CPPs utilisés en clinique comme vecteurs.	78
Tableau 3.4 : Nom des différents peptides issus des filaments intermédiaires.	81
Tableau R1 : Caractéristiques de certaines carbocyanines.	167



Bibliographie

Abdelhak, A., Junker, A., Brettschneider, J., Kassubek, J., Ludolph, A.C., Otto, M., and Tumani, H. (2015). Brain-Specific Cytoskeletal Damage Markers in Cerebrospinal Fluid: Is There a Common Pattern between Amyotrophic Lateral Sclerosis and Primary Progressive Multiple Sclerosis? *Int J Mol Sci* *16*, 17565–17588.

Achanta, P., Sedora Roman, N.I., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Gliomagenesis and the use of neural stem cells in brain tumor treatment. *Anticancer Agents Med Chem* *10*, 121–130.

Aguilar, A., Becker, L., Tedeschi, T., Heller, S., Iomini, C., and Nachury, M.V. (2014). α -Tubulin K40 acetylation is required for contact inhibition of proliferation and cell–substrate adhesion. *Mol Biol Cell* *25*, 1854–1866.

Ahmed, S., Gan, H., Lam, C.S., Poonepalli, A., Ramasamy, S., Tay, Y., Tham, M., and Yu, Y.H. (2009). Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adh Migr* *3*, 412–424.

Alison, M., and Islam, S. (2009). Attributes of adult stem cells. *J. Pathol.* *217*, 144–160.

de Almeida, P.E., Ransohoff, J.D., Nahid, M.A., and Wu, J.C. (2013). Immunogenicity of Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives. *Circ Res* *112*, 549–561.

Altaner, C. (2008). Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma* *55*, 369–374.

Asai, T., Tsuzuku, T., Takahashi, S., Okamoto, A., Dewa, T., Nango, M., Hyodo, K., Ishihara, H., Kikuchi, H., and Oku, N. (2014). Cell-penetrating peptide-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *444*, 599–604.

Assoian, R.K. (1997). Anchorage-dependent Cell Cycle Progression. *J Cell Biol* *136*, 1–4.

Baas, P.W. (2002). Microtubule transport in the axon. *Int. Rev. Cytol.* *212*, 41–62.

Badhiwala, J., Decker, W.K., Berens, M.E., and Bhardwaj, R.D. (2013). Clinical trials in cellular immunotherapy for brain/CNS tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics* *13*, 405–424.

Bagó, J.R., Alfonso-Pecchio, A., Okolie, O., Dumitru, R., Rinkenbaugh, A., Baldwin, A.S., Miller, C.R., Magness, S.T., and Hingtgen, S.D. (2016). Therapeutically engineered induced neural stem cells are tumour-homing and inhibit progression of glioblastoma. *Nat Commun* *7*, 10593, 1–13.

Baker, R.D., Howl, J., and Nicholl, I.D. (2007). A synchological cell penetrating peptide mimic of p21WAF1/CIP1 is pro-apoptogenic. *Peptides* *28*, 731–740.

Balzeau, J., Peterson, A., and 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., and 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.
- Barreau, K., Lépinoux-Chambaud, C., and Eyer, J. (2016). Review of clinical trials using neural stem cells. *JSM Biotechnol Bioeng* *3*, 1057: 1-5.
- Bauer, R., Kaiser, M., and Stoll, E. (2014). A computational model incorporating neural stem cell dynamics reproduces glioma incidence across the lifespan in the human population. *PLoS ONE* *9*, e111219.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* *81*, 871–927.
- Bechara, C., and Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters* *587*, 1693–1702.
- Ben-Hur, T. (2008). Immunomodulation by neural stem cells. *Journal of the Neurological Sciences* *265*, 102–104.
- Benmerah, A., and Lamaze, C. (2002). Endocytose : Chaque voie compte ! *Med Sci (Paris)* *18*, 1126–1136.
- Berges, R., Balzeau, J., Peterson, A.C., and 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., and 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.
- Bergström, T., and Forsberg-Nilsson, K. (2012). Neural stem cells: Brain building blocks and beyond. *Ups J Med Sci* *117*, 132–142.
- Bhattacharya, R., and Cabral, F. (2004). A Ubiquitous β -tubulin Disrupts Microtubule Assembly and Inhibits Cell Proliferation. *Mol Biol Cell* *15*, 3123–3131.
- Bhattacharya, R., Frankfurter, A., and Cabral, F. (2008). A minor β -tubulin essential for mammalian cell proliferation. *Cell Motil. Cytoskeleton* *65*, 708–720.
- Biehl, J.K., and Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *J Cardiovasc Nurs* *24*, 98–105.
- Bocquet, A., Berges, R., Frank, R., Robert, P., Peterson, A.C., and Eyer, J. (2009). Neurofilaments bind tubulin and modulate its polymerization. *J. Neurosci.* *29*, 11043–11054.
- Bolton, S.J., Jones, D.N.C., Darker, J.G., Eggleston, D.S., Hunter, A.J., and Walsh, F.S. (2000). Cellular uptake and spread of the cell-permeable peptide penetratin in adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* *12*, 2847–2855.
- Bouabe, H., and Okkenhaug, K. (2013). Gene Targeting in Mice: a Review. *Methods Mol Biol* *1064*, 315–336.

Breuss, M.W., Leca, I., Gstrein, T., Hansen, A.H., and Keays, D.A. (2017). Tubulins and brain development – The origins of functional specification. *Molecular and Cellular Neuroscience*.

Brouhard, G.J. (2015). Dynamic instability 30 years later: complexities in microtubule growth and catastrophe. *Mol. Biol. Cell* 26, 1207–1210.

Bruce, J.N., and Kennedy, B. (2017). *Glioblastoma Multiforme Treatment & Management: Medical Care, Surgical Care, Consultations*.

C-D-E

Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173–2181.

Campdelacreu, J. (2014). Parkinson disease and Alzheimer disease: environmental risk factors. *Neurologia* 29, 541–549.

Carradori, D., Barreau, K., and Eyer, J. (2016a). The carbocyanine dye DiD labels in vitro and in vivo neural stem cells of the subventricular zone as well as myelinated structures following in vivo injection in the lateral ventricle. *Journal of Neuroscience Research* 94, 139–148.

Carradori, D., Saulnier, P., Pr at, V., des Rieux, A., and Eyer, J. (2016b). NFL-lipid nanocapsules for brain neural stem cell targeting in vitro and in vivo. *J Control Release* 238, 253–262.

Carradori, D., Eyer, J., Saulnier, P., Pr at, V., and des Rieux, A. (2017). The therapeutic contribution of nanomedicine to treat neurodegenerative diseases via neural stem cell differentiation. *Biomaterials* 123, 77–91.

Carrano, A.C., and Pagano, M. (2001). Role of the F-Box Protein Skp2 in Adhesion-Dependent Cell Cycle Progression. *J Cell Biol* 153, 1381–1390.

Casarosa, S., Bozzi, Y., and Conti, L. (2014). Neural stem cells: ready for therapeutic applications? *Mol Cell Ther* 2, 1–17.

Castellani, R.J., Rolston, R.K., and Smith, M.A. (2010). Alzheimer Disease. *Disease-a-Month* 56, 484–546.

Chang, A., Tourtellotte, W.W., Rudick, R., and Trapp, B.D. (2002). Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 346, 165–173.

Chao, T.-K., Hu, J., and Pringsheim, T. (2017). Risk factors for the onset and progression of Huntington disease. *Neurotoxicology* 1–21.

- Condic, M.L. (2014). Totipotency: What It Is and What It Is Not. *Stem Cells and Development* 23, 796–812.
- Conduit, P.T. (2016). Microtubule organization: A complex solution. *J. Cell Biol.* 213, 609–612.
- Cooper, G.M. (2000a). Intermediate Filaments. In *The Cell: A Molecular Approach.*, p. 689.
- Cooper, G.M. (2000b). Structure and Organization of Actin Filaments. In *The Cell: A Molecular Approach.*, p. 689.
- Couratier, P., Corcia, P., Lautrette, G., Nicol, M., Preux, P.-M., and Marin, B. (2016). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A review of literature. *Rev. Neurol. (Paris)* 172, 37–45.
- Czyz, J., Wiese, C., Rolletschek, A., Blyszczuk, P., Cross, M., and Wobus, A.M. (2003). Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol. Chem.* 384, 1391–1409.
- Dai, X., Lercher, L.D., Clinton, P.M., Du, Y., Livingston, D.L., Vieira, C., Yang, L., Shen, M.M., and Dreyfus, C.F. (2003). The Trophic Role of Oligodendrocytes in the Basal Forebrain. *J. Neurosci.* 23, 5846–5853.
- De Jong, W.H., and Borm, P.J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 3, 133–149.
- Decimo, I., Bifari, F., Krampera, M., and Fumagalli, G. (2012). Neural stem cell niches in health and diseases. *Curr. Pharm. Des.* 18, 1755–1783.
- Del Bigio, M.R. (2010). Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 55–73.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *Cell* 97, 703–716.
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R. (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 8, 848–866.
- Dujmovic, I. (2011). Cerebrospinal Fluid and Blood Biomarkers of Neuroaxonal Damage in Multiple Sclerosis. *Mult Scler Int* 2011, 1–18.
- Egger, B., Chell, J.M., and Brand, A.H. (2008). Insights into neural stem cell biology from flies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 363, 39–56.
- Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F., and Collins, V.P. (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* 51, 2164–2172.

Eugenin, E.A., D'Aversa, T.G., Lopez, L., Calderon, T.M., and Berman, J.W. (2003). MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis: MCP-1 protection against NMDA and tat toxicity. *Journal of Neurochemistry* 85, 1299–1311.

Eyer, J., and Peterson, A. (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12, 389–405.

F-G

Falanga, A., Galdiero, M., and Galdiero, S. (2015). Membranotropic Cell Penetrating Peptides: The Outstanding Journey. *Int J Mol Sci* 16, 25323–25337.

Ferreira, R., Fonseca, M.C., Santos, T., Sargento-Freitas, J., Tjeng, R., Paiva, F., Castelo-Branco, M., Ferreira, L.S., and Bernardino, L. (2016). Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles enhance vascular regulation of neural stem cell survival and differentiation after ischaemia. *Nanoscale* 8, 8126–8137.

French-Constant (2008). The neural stem cell microenvironment. In *StemBook*, p.

Figueira, T.N., Freire, J.M., Cunha-Santos, C., Heras, M., Gonçalves, J., Moscona, A., Porotto, M., Salomé Veiga, A., and Castanho, M.A.R.B. (2017). Quantitative analysis of molecular partition towards lipid membranes using surface plasmon resonance. *Sci Rep* 7, 45647.

Fraher, J., and Dockery, P. (1998). A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. *J Anat* 193, 195–201.

Franco, R., and Fernández-Suárez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 131, 65–86.

Frank, S. (2014). Treatment of Huntington's disease. *Neurotherapeutics* 11, 153–160.

Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M., and Weber, K. (1978). Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5034–5038.

Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189–1193.

Fressinaud, C. (2016). Interactions between Axon Cytoskeleton Proteins and Oligodendrocytes during Remyelination. *BAOJ Neuro* 2, 12–13.

Fressinaud, C., and 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., and 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.
- Fressinaud, C., and Eyer, J. (2015). Neurofilaments and NFL-TBS.40-63 peptide penetrate oligodendrocytes through clathrin-dependent endocytosis to promote their growth and survival in vitro. *Neuroscience* *298*, 42–51.
- Fressinaud, C., Berges, R., and Eyer, J. (2012). Axon cytoskeleton proteins specifically modulate oligodendrocyte growth and differentiation in vitro. *Neurochem. Int.* *60*, 78–90.
- Friedmann-Morvinski, D. (2014). Glioblastoma heterogeneity and cancer cell plasticity. *Crit Rev Oncog* *19*, 327–336.
- Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Vitiello, M., Morelli, G., and Galdiero, M. (2013). Peptide-Lipid Interactions: Experiments and Applications. *Int J Mol Sci* *14*, 18758–18789.
- Galli, R., Gritti, A., Bonfanti, L., and Vescovi, A.L. (2003). Neural Stem Cells. *Circulation Research* *92*, 598–608.
- García-Alberca, J.M. (2015). Cognitive intervention therapy as treatment for behaviour disorders in Alzheimer disease: evidence on efficacy and neurobiological correlations. *Neurología (English Edition)* *30*, 8–15.
- Ginter, E., Simko, V., Weinrebova, D., and Ladecka, Z. (2015). Novel potential for the management of Alzheimer disease. *Bratislava Medical Journal* *116*, 580–581.
- Girault, J.-A., and Peles, E. (2002). Development of nodes of Ranvier. *Current Opinion in Neurobiology* *12*, 476–485.
- Goffart, N., Kroonen, J., and Rogister, B. (2013). Glioblastoma-initiating cells: relationship with neural stem cells and the micro-environment. *Cancers (Basel)* *5*, 1049–1071.
- González, F., Boué, S., and Belmonte, J.C.I. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet* *12*, 231–242.
- Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., and Daley, G.Q. (2011). Induced pluripotent stem cells — opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 915–929.
- Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D. (2017). Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in Pharmacological Sciences* *38*, 406–424.
- Guo, J., Walss-Bass, C., and Ludueña, R.F. (2010). The β isotypes of tubulin in neuronal differentiation. *Cytoskeleton* *67*, 431–441.
- Guo, Y., Wei, Q., Huang, Y., Xia, W., Zhou, Y., and Wang, S. (2013). The effects of astrocytes on differentiation of neural stem cells are influenced by knock-down of the glutamate transporter, GLT-1. *Neurochemistry International* *63*, 498–506.
- Guo, Z., Peng, H., Kang, J., and Sun, D. (2016). Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed Rep* *4*, 528–534.

Guyotat, J. (2013). Prise en charge chirurgicale des glioblastomes: les évolutions technologiques Surgical management for glioblastoma: technological evolutions. *E-Mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie* 12, 067–072.

H-I-J

Harris, D.A., Pellikka, R., Gasser, O., Blauenstein, P., Waibel, R., Schubiger, P.A., King, S.W., and Parseghian, M.H. (2009). In-Line Radiolabeling: A Novel Continuous-Flow System for Commercial-Scale Protein Labeling. *J Nucl Med* 50, 1178–1186.

Heimberger, A.B., Suki, D., Yang, D., Shi, W., and Aldape, K. (2005). The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med* 3, 38.

Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477.

Henningson, C.T., Stanislaus, M.A., and Gewirtz, A.M. (2003). 28. Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, S745–S753.

Herberts, C.A., Kwa, M.S.G., and Hermsen, H.P.H. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med* 9, 29.

Hernandez-Negrete, I., Sala-Newby, G.B., Perl, A., Kunkel, G.R., Newby, A.C., and Bond, M. (2011). Adhesion-dependent Skp2 transcription requires selenocysteine tRNA gene transcription-activating factor (STAF). *Biochem J* 436, 133–143.

Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J., and Price, D.L. (1987). Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3472–3476.

Honig, M.G., and Hume, R.I. (1989). Dil and diO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends Neurosci.* 12, 333–335, 340–341.

Horgusluoglu, E., Nudelman, K., Nho, K., and Saykin, A.J. (2017). Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 174, 93–112.

Hoyle, H.D., Turner, F.R., and Raff, E.C. (2000). A transient specialization of the microtubule cytoskeleton is required for differentiation of the *Drosophila* visual system. *Dev. Biol.* 221, 375–389.

Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., and Benoit, J.P. (2009). Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm* 379, 201–209.

Ishii, T., and Eto, K. (2014). Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. *World J Stem Cells* 6, 404–420.

Jacques, T.S., Swales, A., Brzozowski, M.J., Henriquez, N.V., Linehan, J.M., Mirzadeh, Z., O' Malley, C., Naumann, H., Alvarez-Buylla, A., and Brandner, S. (2010). Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *EMBO J.* 29, 222–235.

Janke, C. (2014). The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions. *The Journal of Cell Biology* 206, 461–472.

Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 79, 368–376.

Jessen, K.R. (2004). Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1861–1867.

Jiao, C.-Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I.D., Chassaing, G., and Sagan, S. (2009). Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 284, 33957–33965.

Jo, J., Song, H., Park, S.G., Lee, S.-H., Ko, J.-J., Park, J.-H., Jeong, J., Cheon, Y.-P., and 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.

Jo, J., Hong, S., Choi, W.Y., and Lee, D.R. (2014). Cell-penetrating peptide (CPP)-conjugated proteins is an efficient tool for manipulation of human mesenchymal stromal cells. *Sci Rep* 4, 1–8.

Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1864–1868.

Jones, A.T. (2007). Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 670–684.

K-L

Kalia, L.V., and Lang, A.E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet* 386, 896–912.

Kamei, N., Bech Nielsen, E.J., Nakakubo, T., Aoyama, Y., Rahbek, U.L., Pedersen, B.L., and Takeda-Morishita, M. (2016). Applicability and Limitations of Cell-Penetrating Peptides in Noncovalent Mucosal Drug or Carrier Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105, 747–753.

- Katsetos, C.D., Herman, M.M., and Mörk, S.J. (2003). Class III β -tubulin in human development and cancer. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 77–96.
- Kazanis, I., Lathia, J., Moss, L., and French-Constant, C. (2008). The neural stem cell microenvironment. In *StemBook* [Internet], (Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute), p.
- Kim, H.Y., Yum, S.Y., Jang, G., and Ahn, D.-R. (2015). Discovery of a non-cationic cell penetrating peptide derived from membrane-interacting human proteins and its potential as a protein delivery carrier. *Scientific Reports* 5, 11719.
- Kirkpatrick, L.L., and Brady, S.T. (1999). Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.*, (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), p. 1183.
- Kiss, A.L., and Botos, E. (2009). Endocytosis *via* caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 1228–1237.
- Kizil, C., Iltzsche, A., Thomas, A.K., Bhattarai, P., Zhang, Y., and Brand, M. (2015). Efficient Cargo Delivery into Adult Brain Tissue Using Short Cell-Penetrating Peptides. *PLOS ONE* 10, e0124073.
- Kornblum, H.I. (2007). Introduction to neural stem cells. *Stroke* 38, 810–816.
- Kosztowski, T., Zaidi, H.A., and Quiñones-Hinojosa, A. (2009). Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 597–612.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.
- Kristensen, M., Birch, D., and Mørck Nielsen, H. (2016). Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos. *Int J Mol Sci* 17, 185–201.
- Laurin, Y., Savarin, P., Robert, C.H., Takahashi, M., Eyer, J., Prevost, C., and Sacquin-Mora, S. (2015). Investigating the Structural Variability and Binding Modes of the Glioma Targeting NFL-TBS.40-63 Peptide on Tubulin. *Biochemistry* 54, 3660–3669.
- Laurin, Y., Eyer, J., Robert, C.H., Prevost, C., and Sacquin-Mora, S. (2017). Mobility and Core-Protein Binding Patterns of Disordered C-Terminal Tails in β -Tubulin Isoforms. *Biochemistry* 56, 1746–1756.
- Lee, J.S., and Tung, C.-H. (2012). Enhancing the Cellular Delivery of Nanoparticles Using Lipo-Oligoarginine Peptides. *Advanced Functional Materials* 22, 4924–4930.
- Lee, D.Y., Gianino, S.M., and Gutmann, D.H. (2012a). Innate neural stem cell heterogeneity determines the patterning of glioma formation in children. *Cancer Cell* 22, 131–138.
- Lee, H.-K., Lee, H.-S., and Moody, S.A. (2014). Neural Transcription Factors: from Embryos to Neural Stem Cells. *Mol Cells* 37, 705–712.

- Lee, J.-H., Zhang, A., You, S.S., and Lieber, C.M. (2016). Spontaneous Internalization of Cell Penetrating Peptide-Modified Nanowires into Primary Neurons. *Nano Lett.* *16*, 1509–1513.
- Lee, J.-S., Lee, H.J., Moon, B.-H., Song, S.-H., Lee, M.-O., Shim, S.H., Kim, H.S., Lee, M.C., Kwon, J.T., Fornace, A.J., et al. (2012b). Generation of cancerous neural stem cells forming glial tumor by oncogenic stimulation. *Stem Cell Rev* *8*, 532–545.
- Leong, C., Zhai, D., Kim, B., Yun, S.-W., and Chang, Y.-T. (2013). Neural stem cell isolation from the whole mouse brain using the novel FABP7-binding fluorescent dye, CDr3. *Stem Cell Research* *11*, 1314–1322.
- Lépinoux-Chambaud, C., and Eyer, J. (2013). The NFL-TBS.40-63 anti-glioblastoma peptide enters selectively in glioma cells by endocytosis. *Int J Pharm* *454*, 738–747.
- Lépinoux-Chambaud, C., Barreau, K., and Eyer, J. (2016). The Neurofilament-Derived Peptide NFL-TBS.40-63 Targets Neural Stem Cells and Affects Their Properties. *Stem Cells Transl Med* *5*, 901–913.
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., and Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)* *172*, 3–13.
- Lerou, P.H., and Daley, G.Q. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Reviews* *19*, 321–331.
- Li, Y., Chen, J., and Chopp, M. (2002). Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats. *Journal of the Neurological Sciences* *193*, 137–146.
- Lindgren, M., Hällbrink, M., Prochiantz, A., and Langel, U. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci.* *21*, 99–103.
- Lipe, H., and Bird, T. (2009). Late Onset Huntington Disease: Clinical and Genetic Characteristics of 34 Cases. *J Neurol Sci* *276*, 159–162.
- Lo, B., and Parham, L. (2009). Ethical Issues in Stem Cell Research. *Endocrine Reviews* *30*, 204–213.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000a). Intermediate Filaments. In *The Cell: A Molecular Approach*, p. 689.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000b). Intermediate Filaments. In *Molecular Cell Biology*, p. 1084.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000c). Neurotransmitters, Synapses, and Impulse Transmission (Section 21.4). In *Molecular Cell Biology*, p. 1084.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000d). Overview of Neuron Structure and Function (section 21.1). In *Molecular Cell Biology*, p. 1084.
- Loma, I., and Heyman, R. (2011). Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Curr Neuroparmacol* *9*, 409–416.

Lou, E., Peters, K.B., Sumrall, A.L., Desjardins, A., Reardon, D.A., Lipp, E.S., Herndon, J.E., Coan, A., Bailey, L., Turner, S., et al. (2013). Phase II trial of upfront bevacizumab and temozolomide for unresectable or multifocal glioblastoma. *Cancer Med* 2, 185–195.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820.

Ludueña, R.F. (1993). Are tubulin isotypes functionally significant. *Mol Biol Cell* 4, 445–457.

Lull, M.E., and Block, M.L. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7, 354–365.

M

Ma, D.K., Bonaguidi, M.A., Ming, G., and Song, H. (2009). Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Research* 19, 672–682.

Ma, D.K., Marchetto, M.C., Guo, J.U., Ming, G., Gage, F.H., and Song, H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* 13, 1338–1344.

Maki, T., Liang, A.C., Miyamoto, N., Lo, E.H., and Arai, K. (2013). Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases. *Front Cell Neurosci* 7, 275.

Margolis, R.L., and Ross, C.A. (2003). Diagnosis of Huntington Disease. *Clinical Chemistry* 49, 1726–1732.

Mariano, E.D., Teixeira, M.J., Marie, S.K.N., and Lepski, G. (2015). Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World J Stem Cells* 7, 477–482.

Mark J. Tullman, M.D. (2013). A Review of Current and Emerging Therapeutic Strategies in Multiple Sclerosis. *American Journal of Managed Care* 19, S21-7.

Marsh, S.E., and Blurton-Jones, M. (2017). Neural stem cell therapy for neurodegenerative disorders: The role of neurotrophic support. *Neurochem. Int.* 106, 94–100.

Mayeux, R., and Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006239–a006239.

Mayor, S., Parton, R.G., and Donaldson, J.G. (2014). Clathrin-Independent Pathways of Endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a016758–a016758.

- McLaren, A. (2000). Important differences between sources of embryonic stem cells. *Nature* 408, 513.
- Medvedev, S.P., Shevchenko, A.I., and Zakian, S.M. (2010). Induced Pluripotent Stem Cells: Problems and Advantages when Applying them in Regenerative Medicine. *Acta Naturae* 2, 18–28.
- Meloni, B.P., Craig, A.J., Milech, N., Hopkins, R.M., Watt, P.M., and Knuckey, N.W. (2014). The neuroprotective efficacy of cell-penetrating peptides TAT, penetratin, Arg-9, and Pep-1 in glutamic acid, kainic acid, and in vitro ischemia injury models using primary cortical neuronal cultures. *Cell. Mol. Neurobiol.* 34, 173–181.
- Meloni, B.P., Milani, D., Edwards, A.B., Anderton, R.S., O’Hare Doig, R.L., Fitzgerald, M., Palmer, T.N., and Knuckey, N.W. (2015). Neuroprotective peptides fused to arginine-rich cell penetrating peptides: Neuroprotective mechanism likely mediated by peptide endocytic properties. *Pharmacology & Therapeutics* 153, 36–54.
- Michailidou, I., de Vries, H.E., Hol, E.M., and van Strien, M.E. (2015). Activation of endogenous neural stem cells for multiple sclerosis therapy. *Front Neurosci* 8:454, 1–8.
- Michalski, J.-P., and Kothary, R. (2015). Oligodendrocytes in a Nutshell. *Front Cell Neurosci* 9:340, 1–11.
- Modrek, A.S., Bayin, N.S., and Placantonakis, D.G. (2014). Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells* 6, 43–52.
- Morell, P., and Quarles, R.H. (1999). The Myelin Sheath. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), p. 1183.
- Moro, E., Volkman, J., König, I.R., Winkler, S., Hiller, A., Hassin-Baer, S., Herzog, J., Schnitzler, A., Lohmann, K., Pinsker, M.O., et al. (2008). Bilateral subthalamic stimulation in Parkin and PINK1 parkinsonism. *Neurology* 70, 1186–1191.
- Morrens, J., Van Den Broeck, W., and Kempermann, G. (2012). Glial cells in adult neurogenesis. *Glia* 60, 159–174.
- Mountford, J.C. (2008). Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine* 18, 1–12.
- Mousavi, S.A., Malerød, L., Berg, T., and Kjekken, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochemical Journal* 377, 1–16.
- Müller, F.-J., Snyder, E.Y., and Loring, J.F. (2006). Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 75–84.

Nabi, I.R., and Le, P.U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology* 161, 673–677.

Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., Decker, L., Seilhean, D., Höglinger, G.U., Hirsch, E.C., Reynolds, R., and 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., and Okano, H. (2003). Expression of Tubulin Beta II in Neural Stem/Progenitor Cells and Radial Fibers During Human Fetal Brain Development. *Laboratory Investigation* 83, 479–489.

Nam, H., Lee, K.-H., Nam, D.-H., and Joo, K.M. (2015). Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect. *World J Stem Cells* 7, 126–136.

Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277–302.

O'Connor, T.P., and Crystal, R.G. (2006). Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nature Reviews Genetics* 7, 261–276.

O'Donoghue, K., and Fisk, N.M. (2004). Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18, 853–875.

Oh, M.C., and Lim, D.A. (2009). Novel treatment strategies for malignant gliomas using neural stem cells. *Neurotherapeutics* 6, 458–464.

Okita, K., and Yamanaka, S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 2198–2207.

Olson, E.S., Aguilera, T.A., Jiang, T., Ellies, L.G., Nguyen, Q.T., Wong, E.H., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (2009). In vivo characterization of activatable cell penetrating peptides for targeting protease activity in cancer. *Integr. Biol.* 1, 382–393.

Passier, R., and Mummery, C. (2003). Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research* 58, 324–335.

Pedraza, C.E., Taylor, C., Pereira, A., Seng, M., Tham, C.-S., Izrael, M., and Webb, M. (2014). Induction of Oligodendrocyte Differentiation and In Vitro Myelination by Inhibition of Rho-Associated Kinase. *ASN Neuro* 6, 1–17.

Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50, 427–434.

Pessina, A., and Gribaldo, L. (2006). The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives. *Current Medical Research and Opinion* 22, 2287–2300.

Piau, A., Nourhashemi, F., and Vellas, B. (2009). Iatrogénie et maladie d'Alzheimer. *La Revue de Médecine Interne* 30, S302–S306.

Poillot, C., and Waard, M.D. (2011). Administration de molécules actives dans les cellules - Le potentiel des peptides de pénétration cellulaire. *Med Sci (Paris)* 27, 527–534.

Polivka, J., Polivka, J., Holubec, L., Kubikova, T., Priban, V., Hes, O., Pivovarcikova, K., and Treskova, I. (2017). Advances in Experimental Targeted Therapy and Immunotherapy for Patients with Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Res* 37, 21–33.

Popova, N.V., Deyev, I.E., and Petrenko, A.G. (2013). Clathrin-Mediated Endocytosis and Adaptor Proteins. *Acta Naturae* 5, 62–73.

Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., and Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 27, 1083–1091.

Purdon, S.E., Mohr, E., Ilivitsky, V., and Jones, B.D. (1994). Huntington's disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J Psychiatry Neurosci* 19, 359–367.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001a). Generation of Neurons in the Adult Brain. In *Neuroscience*, (Sinauer Associates), p.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2001b). Neuroglial Cells. In *Neurosciences*, (Sinauer Associates), p.

Qazi, M.A., Vora, P., Venugopal, C., McFarlane, N., Subapanditha, M.K., Murty, N.K., Hassell, J.A., Hallett, R.M., and Singh, S.K. (2016). A novel stem cell culture model of recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 126, 57–67.

Quarrell, O.W.J., Nance, M.A., Nopoulos, P., Paulsen, J.S., Smith, J.A., and Squitieri, F. (2013). Managing juvenile Huntington's disease. *Neurodegener Dis Manag* 3, 1–16.

R-S

Ramalho-Santos, M., and Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell* 1, 35–38.

Rappoport, J.Z., and Simon, S.M. (2003). Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration. *Journal of Cell Science* 116, 847–855.

Rawlins, M.D., Wexler, N.S., Wexler, A.R., Tabrizi, S.J., Douglas, I., Evans, S.J.W., and Smeeth, L. (2016). The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology* 46, 144–153.

- Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology* 88, 640–651.
- Rennert, R.C., Achrol, A.S., Januszyk, M., Kahn, S.A., Liu, T.T., Liu, Y., Sahoo, D., Rodrigues, M., Maan, Z.N., Wong, V.W., et al. (2016). Multiple Subsets of Brain Tumor Initiating Cells Coexist in Glioblastoma. *Stem Cells* 34, 1702–1707.
- Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L., and Siciliano, G. (2009). Astrocyte–neuron interactions in neurological disorders. *J Biol Phys* 35, 317–336.
- Rivalin, R., Lepinoux-Chambaud, C., Eyer, J., and 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, e98473.
- Roder, C., Bisdas, S., Ebner, F.H., Honegger, J., Naegele, T., Ernemann, U., and Tatagiba, M. (2014). Maximizing the extent of resection and survival benefit of patients in glioblastoma surgery: High-field iMRI versus conventional and 5-ALA-assisted surgery. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 40, 297–304.
- Ross, C.A., Aylward, E.H., Wild, E.J., Langbehn, D.R., Long, J.D., Warner, J.H., Scahill, R.I., Leavitt, B.R., Stout, J.C., Paulsen, J.S., et al. (2014). Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nat Rev Neurol* 10, 204–216.
- Ruczynski, J., Wierzbicki, P.M., Kogut-Wierzbicka, M., Mucha, P., Siedlecka-Kroplewska, K., and Rekowski, P. (2014). Cell-penetrating peptides as a promising tool for delivery of various molecules into the cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 52, 257–269.
- Rumman, M., Dhawan, J., and Kassem, M. (2015). Concise Review: Quiescence in Adult Stem Cells: Biological Significance and Relevance to Tissue Regeneration. *Stem Cells* 33, 2903–2912.
- Saillour, Y., Broix, L., Bruel-Jungerman, E., Lebrun, N., Muraca, G., Rucci, J., Poirier, K., Belvindrah, R., Francis, F., and Chelly, J. (2014). Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown. *Hum Mol Genet* 23, 1516–1526.
- Saini (2013). Insights on the structural characteristics of Vim-TBS (58-81) peptide for future applications as a cell penetrating peptide. *BioScience Trends* 7, 209–220.
- Sandmann, T., Bourgon, R., Garcia, J., Li, C., Cloughesy, T., Chinot, O.L., Wick, W., Nishikawa, R., Mason, W., Henriksson, R., et al. (2015). Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. *J. Clin. Oncol.* 33, 2735–2744.
- Sarkar, S., Raymick, J., and Imam, S. (2016). Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson’s Disease: Recent Perspectives. *Int J Mol Sci* 17, 904.
- Schuster, J., Lai, R.K., Recht, L.D., Reardon, D.A., Paleologos, N.A., Groves, M.D., Mrugala, M.M., Jensen, R., Baehring, J.M., Sloan, A., et al. (2015). A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro-Oncology* 17, 854–861.

- Schwer, H.D., Lecine, P., Tiwari, S., Italiano, J.E., Hartwig, J.H., and Shivdasani, R.A. (2001). A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology* 11, 579–586.
- Semb, H. (2005). Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. *APMIS* 113, 743–750.
- Shahriyari, L., and Komarova, N.L. (2013). Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PLoS ONE* 8, e76195.
- Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6, 683–690.
- Shufaro, Y., and Reubinoff, B.E. (2004). Therapeutic applications of embryonic stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 18, 909–927.
- Simon, M.J., Gao, S., Kang, W.H., Banta, S., and Morrison, B. (2009). TAT-mediated intracellular protein delivery to primary brain cells is dependent on glycosaminoglycan expression. *Biotechnol. Bioeng.* 104, 10–19.
- Singh, R.D., Puri, V., Valiyaveetil, J.T., Marks, D.L., Bittman, R., and Pagano, R.E. (2003). Selective Caveolin-1-dependent Endocytosis of Glycosphingolipids. *Mol Biol Cell* 14, 3254–3265.
- Song, L., and Goldman, E. (2015). Induced pluripotent stem cells are induced pluripotent stem cell-like cells. *J Biomed Res* 29, 1–2.
- Song, Y., and Brady, S.T. (2015). Posttranslational Modifications of Tubulin: Pathways to Functional Diversity of Microtubules. *Trends Cell Biol* 25, 125–136.
- Srinageshwar, B., Maiti, P., Dunbar, G.L., and Rossignol, J. (2016). Role of Epigenetics in Stem Cell Proliferation and Differentiation: Implications for Treating Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* 17, 199–213.
- Stalmans, S., Bracke, N., Wynendaele, E., Gevaert, B., Peremans, K., Burvenich, C., Polis, I., and De Spiegeleer, B. (2015). Cell-Penetrating Peptides Selectively Cross the Blood-Brain Barrier In Vivo. *PLoS ONE* 10, e0139652.
- Stengel, C., Newman, S.P., Leese, M.P., Potter, B.V.L., Reed, M.J., and Purohit, A. (2010). Class III β -tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. *Br J Cancer* 102, 316–324.
- Stobart, J.L., and Anderson, C.M. (2013). Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci* 7, 1–21.
- Stupp, R., Wong, E.T., Kanner, A.A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., Kirson, E.D., Taillibert, S., Liebermann, F., Dbalý, V., et al. (2012). NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. *European Journal of Cancer* 48, 2192–2202.

Suslov, O.N., Kukekov, V.G., Ignatova, T.N., and Steindler, D.A. (2002). Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 14506–14511.

Svendsen, C.N., Caldwell, M.A., and Ostenfeld, T. (1999). Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol.* 9, 499–513.

Szaro, B.G., and Strong, M.J. (2010). Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences* 33, 27–37.

T-V

Taylor, C.J., Bolton, E.M., Pocock, S., Sharples, L.D., Pedersen, R.A., and Bradley, J.A. (2005). Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 366, 2019–2025.

Teunissen, C.E., Dijkstra, C., and Polman, C. (2005). Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 4, 32–41.

Theeler, B.J., and Gilbert, M.R. (2015). Advances in the treatment of newly diagnosed glioblastoma. *BMC Medicine* 13, 293–303.

Torkildsen, Ø., Myhr, K.-M., and Bø, L. (2016). Disease-modifying treatments for multiple sclerosis – a review of approved medications. *Eur J Neurol* 23, 18–27.

Trabulo, S., Cardoso, A.L., Mano, M., and de Lima, M.C.P. (2010). Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 961–993.

Tsukamoto, A., Uchida, N., Capela, A., Gorba, T., and Huhn, S. (2013). Clinical translation of human neural stem cells. *Stem Cell Res Ther* 4, 102–114.

Turner, S.G., Gergel, T., Wu, H., Lacroix, M., and Toms, S.A. (2014). The effect of field strength on glioblastoma multiforme response in patients treated with the NovoTTFTM-100A system. *World J Surg Oncol* 12, 162–166.

Tuszynski, J.A., Carpenter, E.J., Huzil, J.T., Malinski, W., Luchko, T., and Luduena, R.F. (2003). The evolution of the structure of tubulin and its potential consequences for the role and function of microtubules in cells and embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 341–358.

Valadas, J.S., Vos, M., and Verstreken, P. (2015). Therapeutic strategies in Parkinson's disease: what we have learned from animal models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1338, 16–37.

Vargas, J.R., Stanzl, E.G., Teng, N.N.H., and Wender, P.A. (2014). Cell-Penetrating, Guanidinium-Rich Molecular Transporters for Overcoming Efflux-Mediated Multidrug Resistance. *Mol. Pharmaceutics* *11*, 2553–2565.

Vemu, A., Atherton, J., Spector, J.O., Szyk, A., Moores, C.A., and Roll-Mecak, A. (2016). Structure and Dynamics of Single-isoform Recombinant Neuronal Human Tubulin. *J Biol Chem* *291*, 12907–12915.

Vercelli, A., Repici, M., Garbossa, D., and Grimaldi, A. (2000). Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Research Bulletin* *51*, 11–28.

Verdier-Pinard, P., Wang, F., Burd, B., Angeletti, R.H., Horwitz, S.B., and Orr, G.A. (2003). Direct Analysis of Tubulin Expression in Cancer Cell Lines by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Biochemistry* *42*, 12019–12027.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* *17*, 98–110.

Volkman, R., and Offen, D. (2017). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells* *35*, 1867–1880.

W-Y-Z

Wake, H., and Fields, R.D. (2011). Physiological Function of Microglia. *Neuron Glia Biol* *7*, 1–3.

Wallbrecher, R., Ackels, T., Olea, R.A., Klein, M.J., Caillon, L., Schiller, J., Bovée-Geurts, P.H., van Kuppevelt, T.H., Ulrich, A.S., Spehr, M., et al. (2017). Membrane permeation of arginine-rich cell-penetrating peptides independent of transmembrane potential as a function of lipid composition and membrane fluidity. *J Control Release* *256*, 68–78.

Wang, T.-Y., and Pellois, J.-P. (2016). Peptide translocation through the plasma membrane of human cells: Can oxidative stress be exploited to gain better intracellular access? *Commun Integr Biol* *9*, e1205771.

Wang, J.T.H., Teasdale, R.D., and Liebl, D. (2014). Macropinosome quantitation assay. *MethodsX* *1*, 36–41.

Warbrick, E., Lane, D.P., Glover, D.M., and 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. *Current Biology* *5*, 275–282.

- Westphal, M., and Lamszus, K. (2015). Circulating biomarkers for gliomas. *Nature Reviews Neurology* *11*, 556–566.
- Wijesekera, L.C., and Leigh, P.N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis* *4*, 3.
- Wijeyekoon, R., and Barker, R.A. (2011). The Current Status of Neural Grafting in the Treatment of Huntington's Disease. A Review. *Front Integr Neurosci* *5*.
- Yacila, G., and Sari, Y. (2014). Potential therapeutic drugs and methods for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Med. Chem.* *21*, 3583–3593.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., and Huang, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* *81*, 1475–1485.
- Yeh, P., and Westerman, D.A. (2015). Ependymal cells in cerebrospinal fluid: a traumatic occurrence. *Blood* *125*, 2005–2005.
- Youn, P., Chen, Y., and Furgeson, D.Y. (2014). A myristoylated cell-penetrating peptide bearing a transferrin receptor-targeting sequence for neuro-targeted siRNA delivery. *Mol. Pharm.* *11*, 486–495.
- Young, R.M., Jamshidi, A., Davis, G., and Sherman, J.H. (2015). Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of Translational Medicine* *3*, 1–15.
- Yourek, G., Hussain, M.A., and Mao, J.J. (2007). Cytoskeletal Changes of Mesenchymal Stem Cells During Differentiation. *ASAIO J* *53*, 219–228.
- Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna, and Nixon, R.A. (2012). Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* *125*, 3257–3263.
- Zhao, D., Najbauer, J., Garcia, E., Metz, M.Z., Gutova, M., Glackin, C.A., Kim, S.U., and Aboody, K.S. (2008). Neural stem cell tropism to glioma: critical role of tumor hypoxia. *Mol. Cancer Res.* *6*, 1819–1829.
- Zink, S., Grosse, L., Freikamp, A., Bänfer, S., Müksch, F., and Jacob, R. (2012). Tubulin deetyrosination promotes monolayer formation and apical trafficking in epithelial cells. *J. Cell. Sci.* *125*, 5998–6008.
- Zou, L.-L., Ma, J.-L., Wang, T., Yang, T.-B., and Liu, C.-B. (2013). Cell-Penetrating Peptide-Mediated Therapeutic Molecule Delivery into the Central Nervous System. *Curr Neuropharmacol* *11*, 197–208.

Thèse de Doctorat

Kristell BARREAU

Le peptide NFL-TBS.40-63 dérivé des neurofilaments : Agent thérapeutique prometteur pour cibler et manipuler les cellules souches neurales et les cellules de glioblastomes.

The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63: A promising therapeutic agent to target and manipulate neural stem cells and glioblastoma cells

Résumé

Les travaux menés au laboratoire ont mis en évidence des sites de liaison de la tubuline (TBS pour *Tubulin Binding Site*) sur les filaments intermédiaires, tels que les neurofilaments (NFs), qui sont spécifiquement exprimés par les neurones. Le peptide NFL-TBS.40-63 qui correspond à la séquence en acide aminés du TBS situé sur la sous unité légère des NFs, a montré des propriétés anti-glioblastomes *in vitro* et *in vivo*, sans effet sur les cellules saines environnantes (neurones et astrocytes). De plus, Il est aussi capable d'induire la différenciation et la maturation des précurseurs d'oligodendrocytes sans affecter la viabilité de ces cellules.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de valoriser le peptide NFL-TBS.40-63 comme agent thérapeutique possible pour la médecine régénérative. En effet, nous avons montré que le peptide est capable de pénétrer dans les cellules souches neurales (CSNs) *in vitro* de manière passive et *in vivo*, et n'est pas toxique pour les cellules. Après plusieurs jours en présence du peptide, les propriétés dites « souches » de cellules, telle que la capacité à proliférer et à s'auto-renouveler diminuent, et les cellules se différencient en cellules plus matures.

Ces résultats indiquent que le peptide pourrait être un agent thérapeutique intéressant pour cibler les CSNs endogènes du cerveau dans le cas de maladies neurodégénératives afin de stimuler la différenciation de ces cellules.

Mots clés

Peptide pénétrant, cellules souches neurales, ciblage, différenciation

Abstract

The laboratory discovered the presence of tubulin binding sites (TBS) on intermediate filaments, like on the neurofilaments (NF) that are specifically expressed by neurons. The NFL-TBS.40-63 peptide, which corresponds to the sequence of TBS on the light subunit of NF, has showed an anti-glioblastoma property *in vitro* and *in vivo*, without effect on surrounding healthy cells (neurons and astrocytes). Moreover, it induces the differentiation and maturation of oligodendrocyte precursors without impacting the viability of these cells.

Our studies, during the PhD, allowed us to exploit the NFL-TBS.40-63 peptide as a possible therapeutic agent for regenerative medicine. Indeed, we showed that the peptide penetrates passively in neural stem cells (NSCs) *in vitro* and *in vivo*, and it is not toxic for cells. After several days with the peptide, the "stem" cell properties of cells, including the capacity to proliferate and self-renew, diminish and the cells differentiate into more mature cells.

These data indicate that the NFL-TBS40-63 peptide could be a promising therapeutic agent to target endogenous brain NSCs in neurodegenerative disorders to stimulate the differentiation of these cells.

Key Words

Cell penetrating peptide, neural stem cells, targeting, differentiation