

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Science-Technologie-Santé, 258
Faculté des Sciences

Equipe Accueil n° 3842 : Homéostasie Cellulaire et Pathologies

Faculté de Médecine

N° 59-2006

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Neurosciences, cancérologie

Présentée et soutenue publiquement par

Barbara BESSETTE

Le 29 septembre 2006

Notch1, développement normal et cancers

Directeurs de Thèse : Dr Muriel Mathonnet et Pr Marie-Odile Jauberteau

Jury :

PR D. TROUDAUD (Université de Limoges)	PRESIDENT
Dr G. SICARD (Université de Dijon)	RAPPORTEUR
DR A. MEINIEL (Université de Clermont-Ferrand)	RAPPORTEUR
DR R. MEINIEL (Université de Clermont-Ferrand)	EXAMINATEUR
Dr F. LALLOUE (Université de Limoges)	INVITE
Pr associé K. KATSUBE (Université de Tokyo)	INVITE

Remerciements

Je remercie le Docteur **Muriel Mathonnet** d'avoir accepté de m'encadrer et de diriger mon travail de thèse suite au départ prématuré du Directeur Christiane Ayer-Le Lièvre.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur **Marie-Odile Jauberteau-Marchan** qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et a accepté de codiriger mon travail de thèse

Nous remercions profondément le Directeur **Annie Meiniel** qui nous fait l'honneur de juger ce travail.

Nous remercions très sincèrement le Directeur **Robert Meiniel** qui a accepté de participer à ce jury.

Nous exprimons tous nos remerciements au Docteur **Gilles Sicard** qui a accepté de juger ce travail.

Nous remercions sincèrement le Professeur **Danielle Troutaud** qui nous fait l'honneur de présider ce jury.

Tous nos remerciements sont adressés au Docteur **Fabrice Lalloué** qui a accepté d'être membre de ce jury.

Nous remercions vivement le Docteur **Ken-ichi Katsube** qui nous fait l'honneur de venir du Japon en tant que membre de ce jury.

Je remercie le Conseil Régional du Limousin, le Fond Social Européen ainsi que l'Université de Limoges pour leur soutien financier.

Je remercie l'Ecole Doctorale Science-Technologie-Santé et particulièrement Gaëlle Peyrat qui est toujours à notre écoute.

Je remercie toute l'équipe de l'EA 3842 pour leur soutien.

Je remercie enfin le Directeur **Christiane Ayer-Le Lièvre** sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Mes pensées vont vers elle.

Résumé en français

Le récepteur Notch1 est mis en cause dans de nombreux processus biologiques tel que la différenciation, le maintien du potentiel de différenciation, la mort cellulaire et même la cancérisation. Récemment le récepteur Notch1 a été co-immunoprécipité avec la protéine Nov qui appartient à la famille des gènes CCN. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de deux gènes de la famille CCN : *CCN1* et *CCN3* au cours du développement aviaire. Ce modèle présente de nombreux avantages pour l'étude du développement notamment l'accessibilité des embryons. Dans ce modèle, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'épithélium olfactif pour l'étude du récepteur Notch1. Cet organe présente la particularité de comporter des cellules nerveuses et d'être capable de se renouveler tout au long de la vie suggérant la présence de cellules souches dans cet organe. Des cultures primaires d'épithéliums olfactifs d'embryons de poulets ainsi que la caractérisation de ces cellules ont été réalisées. Les cellules souches de cet organe ont ensuite été isolées par la méthode de fractionnement par couplage flux / force (SdFFF). Le récepteur Notch1 étant impliqué dans les processus de différenciation neuronale au cours du développement, nous avons étudié le niveau d'expression de ces transcrits au cours de la mise en place de l'épithélium olfactif aviaire. Nous avons pu mettre en évidence l'implication du récepteur Notch1 au cours de l'ontogenèse de cet organe. Puis le récepteur a été étudié dans un modèle tumoral glial : U-87 MG. L'étude *in vitro* a permis de montrer la présence du récepteur et de quatre de ses ligands. Les cellules U-87 MG ont ensuite été traitées par différentes molécules (FasL, étoposide, dexaméthasone) afin d'induire l'apoptose. Les variations d'expression du récepteur Notch1 en fonction des traitements ont été observées. L'utilisation d'un inhibiteur des gamma-sécrétases inhibant le clivage S3 du récepteur Notch permet une diminution de l'apoptose induite par FasL dans les cellules U-87 MG. Dans un second temps, un modèle *in vivo* de glioblastome humain a été mis au point dans le laboratoire. Les molécules utilisées *in vitro* ont été testées sur notre modèle de xéno greffes. Les traitements par FasL / étoposide / dexaméthasone ont permis une diminution importante de la taille des tumeurs et une amélioration des symptômes cliniques. Il semblait pertinent d'étudier la mise en cause du récepteur Notch1 au cours de ce phénomène de cancérisation. Il semble qu'une diminution du niveau d'expression du récepteur Notch1 soit observée après exposition FasL / étoposide et FasL / étoposide / dexaméthasone.

Mots clefs : Notch1, épithélium olfactif, U-87 MG, étoposide, FasL, dexaméthasone, CCN, cultures primaires.

Abstract

Notch1 during development and tumorigenesis

Notch1 receptor participates in several biological processes as cellular differentiation, self renewal potential, apoptosis and carcinogenesis. This protein was shown to have physical interaction with *Nov*, a member of the CCN gene family. Avian olfactory epithelium is known to have neuronal cell renewal. At first, this potential function was studied using avian olfactory primary cell culture and stem cells were purified using SdFFF method. Notch1 receptor was then studied by *in situ* hybridization during avian olfactory development in order to know Notch1 expression during neuronal cell production. We determined that Notch1 receptor was implicated during avian olfactory ontogenesis. In a second time, Notch1 receptor was studied in a glioblastoma cell line: U-87 MG cells. In order to induce apoptosis in these cells different treatments were tested: FasL, etoposide and dexamethazone. Notch1 expression was observed after these different treatments to understand its role during U-87 MG cells apoptosis. We determine that Notch1 expression was modified after treatments and that FasL-induced apoptosis was decreased when Notch1 was inactivated by a gamma-secretase inhibitor. Apoptotic molecules were then tested after U-87 MG cell xenografts. An important decrease of tumour size was observed after treatments. At the end, Notch1 expression was observed in our model. Its expression seemed to be reduced after our treatments *in vivo*.

Table des matières

ABREVIATIONS

INTRODUCTION

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I.	SYSTEME NOTCH.....	4
A.	Introduction générale.....	4
B.	Le récepteur Notch.....	5
1.	Domaine extracellulaire.....	6
2.	Domaine intracellulaire.....	6
3.	Le récepteur Notch et ses paralogues.....	7
C.	Les ligands de Notch.....	8
1.	Domaine extracellulaire.....	8
2.	Domaine intracellulaire.....	9
3.	Les ligands chez différentes espèces.....	9
D.	Les modes d'action de Notch.....	10
1.	Signalisation au cours de la division cellulaire asymétrique.....	11
2.	Inhibition latérale.....	12
3.	Mode inductif.....	14
E.	Activation du récepteur Notch et transduction du signal.....	14
1.	Chez la drosophile.....	14
2.	Chez les mammifères.....	16
F.	Régulation de la voie de signalisation de Notch.....	17
1.	Les modulateurs de la voie de Notch chez la drosophile.....	17
a)	Modulateurs extracellulaires.....	18
b)	Modulateurs transmembranaires.....	18
c)	Modulateurs cytoplasmiques.....	19
d)	Modulateurs nucléaires.....	19
2.	Modulation chez les vertébrés.....	19
a)	Glycosylation.....	19
b)	Modulation par endocytose / protéolyse.....	20
G.	Notch et considérations évolutives.....	21
H.	Notch et développement.....	22

I.	Notch et SNC	23
J.	Notch et cancers	25
II.	LA FAMILLE DES GENES CCN.....	27
A.	Introduction générale.....	27
B.	Les différents membres et leur structure	28
C.	Fonctions biologiques des CCN.....	29
III.	LE RECEPTEUR FAS.....	30
A.	Introduction générale.....	30
B.	Structure de la protéine Fas.....	30
1.	Partie extracellulaire.....	31
2.	Partie intracellulaire	31
C.	Voies de signalisation induites par le récepteur Fas	32
1.	Initiation du signal.....	32
2.	Transduction du signal	33
a)	Voies apoptotiques	33
b)	Voie proliférative	35
3.	Régulateurs de la transduction du signal de Fas	36
a)	Les facteurs FLIP	36
b)	Le facteur FAP-1	37
c)	Fas et NF- κ B	38
d)	Fas et les protéines kinases activées par la mitose.....	38
e)	Fas et Protéine Kinase C	39
f)	Sphingomyélinases, céramides, regroupements membranaires du récepteur Fas	40
D.	Rôles physiologique et pathologiques.....	40
1.	Rôle dans le système immunitaire.....	41
2.	Système nerveux	42
a)	Fas et neurones	43
b)	Fas et cellules gliales.....	44
3.	Rôle de Fas au cours de l'angiogenèse.....	45
4.	Rôle de Fas dans les thérapeutiques anti-cancéreuses.	45
IV.	EPITHELIUM OLFACTIF.....	48
A.	Le système olfactif	48
1.	Les cellules de soutien.....	49
2.	Les cellules neuroréceptrices	49

3.	Cellules basales	50
a)	Les cellules basales horizontales (ou HBCs)	50
b)	Les cellules basales globulaires (ou GBCs)	50
B.	La neurogenèse olfactive.....	51
V.	GLIOBLASTOMES.....	52
A.	Données générales.....	52
B.	Cellules souches, différenciation gliale et normale chez l'adulte	53
C.	Fas et voies de recherche thérapeutiques	58

MATERIEL ET METHODES

I.	MODELES ANIMAUX.....	60
A.	Modèle aviaire.....	60
1.	Prélèvements d'épithéliums olfactifs de poulets.....	60
2.	Coupes tissulaires d'embryons de poulets	61
B.	Modèle développé chez le rat.....	61
1.	Prélèvements des épithéliums olfactifs	61
2.	Modèles de glioblastomes obtenus par xéno greffes de cellules tumorales gliales humaines.....	61
a)	Détermination de la zone d'implantation	62
b)	Anesthésie des rats	63
c)	Préparation des cellules	64
d)	Protocole de greffes des cellules	64
e)	Traitement de la tumeur par perfusion intra-cérébrale continue	65
f)	Suivi clinique.....	68
II.	CULTURES CELLULAIRES	69
A.	Cultures primaires d'épithéliums olfactifs	69
B.	Lignée gliale humaine U-87 MG	69
C.	Ensemencement des cellules	70
D.	Conditions de stimulation des cellules	70
III.	TRI CELLULAIRE.....	72
A.	Principe de la SdFFF	72
B.	Préparation de l'appareil avant tri cellulaire	73
IV.	PREPARATION DES PLASMIDES CONTENANT LES INSERTS D'INTERET	74
A.	Transformation des bactéries	74
B.	Mise en culture de bactéries transformées par un plasmide.....	76

C.	Purification des plasmides amplifiés.....	76
V.	SEQUENÇAGE	78
VI.	HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	79
A.	Préparation des sondes	79
1.	Principe du marquage à la digoxigénine (DIG)	79
2.	Linéarisation du plasmide	80
3.	Transcription <i>in vitro</i>	80
4.	Précipitation de produits de transcription.....	81
B.	Dot-blot	81
C.	Hybridation sur coupe tissulaire.....	82
1.	Fixation.....	82
2.	Préhybridation	82
3.	Hybridation.....	82
4.	Lavages stringents	83
D.	Révélation.....	83
VII.	DETECTIONS PROTEIQUES.....	84
A.	Cytométrie en flux.....	84
1.	Immunomarquage.....	84
2.	Cycle cellulaire.....	85
B.	Immunohistochimie.....	86
1.	Par immunofluorescence indirecte	86
2.	Par marquage immuno-péroxydase.....	87
C.	Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte.....	87
D.	Les contrôles	89
E.	Détection de protéines par la méthode de Western-Blotting.....	89
1.	Préparation des protéines	90
a)	Lysat cellulaire total	90
b)	Dosage de la concentration protéique	90
2.	Séparation des protéines par électrophorèse	90
3.	Transfert sur membrane des protéines	91
4.	Détection des protéines d'intérêt grâce à des anticorps spécifiques	91
VIII.	DETECTION DE LA MORT CELLULAIRE.....	93
A.	Mise en évidence de l'apoptose par la méthode TUNEL.....	93
B.	Détection de la libération des nucléosomes solubles par méthode ELISA	94

C.	Détection par méthode DAPI	94
IX.	ANALYSE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE.....	95
A.	Détection de la prolifération des cellules par incorporation de BrdU.....	95
1.	Par comptage sous microscope	95
2.	Par cytométrie en flux	96
X.	METHODES D'ANALYSE DE RESULTATS	97

RESULTATS

I.	DEVELOPPEMENT, CCN ET NOTCH1	99
A.	Etude de deux gènes CCN : <i>Cef10</i> et <i>Nov</i> au cours du développement aviaire.....	99
B.	Purification des cellules souches de l'épithélium olfactif.....	102
1.	Dans l'épithélium olfactif aviaire.....	102
a)	Culture primaire	102
b)	Séparation des cellules par SdFFF	103
c)	Identification des cellules après tri.....	104
d)	Caractérisation des cellules de PF2.....	105
2.	Dans l'épithélium olfactif de rat.....	107
a)	Culture primaire	107
b)	Caractérisation des cellules	108
C.	Comparaisons entre les cultures primaires d'épithéliums olfactifs	110
D.	Notch1 dans l'épithélium olfactif aviaire.....	110
II.	NOTCH1, TUMEUR GLIALE HUMAINE ET APOPTOSE.....	114
A.	Caractérisation des cellules U-87 MG	114
B.	Le récepteur Notch1 et ses ligands dans les cellules U-87 MG.....	115
1.	Le récepteur Notch1	115
2.	Les ligands du récepteur Notch1	117
C.	Le récepteur Fas dans les cellules U-87 MG avant et après exposition à FasL et étoposide.....	119
D.	Apoptose des cellules U-87 MG en présence de FasL et d'étoposide	121
E.	L'association FasL et étoposide diminue la prolifération des cellules gliales	124
F.	L'apoptose des cellules U-87 MG après les traitements par FasL, étoposide et dexaméthasone	126
G.	Variation de l'expression de Notch1 en fonction des traitements.....	127
H.	Les variations du cycle cellulaire après traitements.....	130
I.	Variation de la différenciation après traitements	132

J.	Influence de l'inactivation du récepteur Notch1 lors de l'apoptose induite par FasL	133
III.	MODELE DE XENOGREFFE, TRAITEMENTS ET EXPRESSION DE NOTCH1 ..	135
A.	Vérification des coordonnées de stéréotaxie	135
B.	Les xénogreffes de cellules U-87 MG conduisent au développement d'une tumeur.	136
C.	Les injections de LCR (contrôle) n'ont aucun effet sur des rats Nude	139
D.	FasL et étoposide ont un effet anti-tumoral	140
E.	La dexaméthasone augmente l'effet anti-tumoral de FasL associé à l'étoposide	140
F.	Notch1 dans les xénogreffes	141

DISCUSSION

PERSPECTIVES

REFERENCES

ANNEXES

Liste des tableaux

Tableau 1 : Othologues des récepteurs, ligands et effecteurs de la voie de Notch.	22
Tableau 2 : Les gènes CCN et leurs paralogues.....	27
Tableau 3 : Fonctions biologiques des CCN.....	29
Tableau 4 : ensemencement des cellules en fonction des techniques utilisées.....	70
Tableau 5 : Liste des molécules déposées sur les cellules.....	71
Tableau 6 : Correspondance des inserts, vecteurs et enzymes de restriction utilisés.....	77
Tableau 7 : Ribosondes synthétisées, leurs vecteurs et les ARN polymérase utilisées.....	81
Tableau 8 : Les différents anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.....	85
Tableau 9 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistofluorescence.....	86
Tableau 10 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence avec leurs dilutions pour l'immunocytochimie.....	88
Tableau 11 : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.....	89
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés en Western-blot.....	92

Liste des figures

Figure 1 : Phénotypes comparés de drosophiles sauvage (A) et mutante pour le gène Notch (B).....	4
Figure 2 : Schématisation des principaux domaines du récepteur Notch.	5
Figure 3 : Paralogues du récepteur Notch chez la drosophile et l'homme.....	7
Figure 4 : Schématisation des domaines des principaux ligands de Notch.....	8
Figure 5 : Paralogues des ligands de Notch chez la drosophile et l'homme.....	9
Figure 6 : Représentation d'une division asymétrique.....	12
Figure 7 : Illustration d'inhibition latérale.	13
Figure 8 : Illustration du mode inductif médié par la voie de Notch.	14
Figure 9 : Interaction Notch / Delta dans le processus d'inhibition latérale chez la drosophile.	15
Figure 10 : transduction du signal lors de la fixation du ligand sur Notch chez les mammifères.....	16
Figure 11 : Les modulateurs du récepteur Notch chez la drosophile.....	18
Figure 12 : Modèles du rôle de l'endocytose pour Delta.	21
Figure 13 : Les effets de la Neurogénine et de Notch sur des précurseurs neuronaux permettent la différenciation astrocytaire ou neuronale.....	24
Figure 14 : Représentation de la structure multimodulaire des gènes de la famille CCN et des protéines correspondantes.	28
Figure 15 : Composition du récepteur Fas.	31
Figure 16 : représentation des voies extrinsèque et intrinsèque induites par la caspase-8.....	34
Figure 17 : Les fonctions de c-FLIPL.	37
Figure 18 : Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+.....	42
Figure 18 : Représentation d'une coupe transversale de l'épithélium olfactif.....	49
Figure 19 : Hypothèse de la différenciation astrocytaire à partir d'une cellules souches neuroépithéliales.....	54
Figure 20 : Théorie de l'arrêt de la maturation cellulaire.	56
Figure 21 : Planche de l'atlas de Paxinos et Watson , 1982.....	63
Figure 22 : appareil de stéréotaxie utilisé.....	64
Figure 23 : Système d'injection des cellules lors des xénogreffes.	65
Figure 24 : Pompe osmotique Alzet.....	66
Figure 25 : Coupe schématique des pompes osmotiques Alzet.	66

Figure 26 : Ajustement de la profondeur des canules par des espaceurs.	67
Figure 27 : Principe de la SdFFF.	72
Figure 28 : Représentation du plasmide pBSK-.....	74
Figure 29 : Représentation du plasmide pGEM-T Easy.	75
Figure 30 : Représentation du plasmide pGEM 4Z.....	75
Figure 31 : Principe de l'hybridation in situ.	80
Figure 32 : Détection de Cef10 et Nov par hybridation in situ sur coupes sériées de cœur d'embryon de poulet à ED7,5.	100
Figure 33 : comparaison de l'expression des gènes Cef10 et Nov dans les membres, la moelle épinière et les ganglions rachidiens aux stades ED7 et ED8 par hybridation in situ.	101
Figure34 : Caractérisation des cellules issues des cultures primaires d'épithéliums olfactifs de poulets après 15 jours en culture.	102
Figure35 : Fractogramme issu du tri de cellules d'épithéliums olfactifs de poulets prélevés à ED14.....	103
Figure36 : Devenir de PF1 et PF2 après 10 jours de remise en culture.	104
Figure 37 : Caractérisation immunocytochimique des cellules composant les « neurosphères- like » issues de 10 jours de culture de cellules de PF2 à forte densité.....	105
Figure38 : Effet prolifératif du NGF sur les cellules flottantes issues de la culture de PF2. Etude par incorporation de BrdU.	106
Figure 39 : Structures « neurosphères-like » obtenues après 30 jours de culture.	107
Figure 40 : Ponts cytoplasmiques reliant les amas cellulaires (→).....	108
Figure 41 : Epithélium olfactif de rat après 30 jours de culture et immunomarquage par un anticorps anti-CamKII.....	109
Figure 42 : Immunocytochimie réalisée avec un anticorps anti-cytokératine14 sur une culture primaire d'épithélium olfactif de rat après 30 jours de culture.	109
Figure 43 : Placode olfactive d'un embryon de poulet à 4 jours.....	111
Figure 44 : Représentation de l'expression des transcrits de Notch1 au sein de l'épithélium olfactif d'embryons de poulet au cours du développement.....	111
Figure 45 : Epithélium olfactif d'embryon de poulet de 8 jours.....	112
Figure 45 : Analyse immunocytochimique des marqueurs exprimés par les cellules U-87 MG.	115
Figure 46 : Détection de l'expression de Notch1 dans des conditions basales sur les U-87 MG.	116
Figure 47 : Détection du récepteur Notch1 par cytométrie de flux dans la lignée U-87 MG.	117

Figure 48 : Détection de Delta 1, 4 et de Jagged 1 et 2 par Western blotting.....	117
Figure 49 : Détection de Delta 1 et 4 Jagged 1 et 2 par cytométrie de flux après perméabilisation.	118
Figure 50 : Mesure des intensités moyennes de fluorescence des ligands de Notch1.	119
Figure 51 : Détection par Western-blotting de l'expression du récepteur Fas au niveau de cellules gliales à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.....	120
Figure 52 : Etude immunocytochimique de l'expression de Fas au niveau de la lignée gliale U-87 MG à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.....	120
Figure 53 : Analyse, par le dosage des nucléosomes solubles, des taux d'apoptose des cellules U-87 MG en présence d'étoposide à des concentrations croissantes.	122
Figure 54 : Influence de FasL sur le niveau d'apoptose dû à l'étoposide.....	123
Figure 55 : L'effet supra-additif de FasL et étoposide sur l'apoptose des U-87 MG.	124
Figure 56 : Analyse de la prolifération des cellules U-87 MG, en présence de FasL et d'étoposide, par détection de l'incorporation de BrdU.	125
Figure 57 : Détection de l'apoptose par ELISA Cell Death après traitements par FasL, étoposide, dexaméthasone et différentes combinaisons.....	126
Figure 58 : Détection du récepteur Notch1 dans les cellules U-87 MG par cytométrie de flux après traitements de 24H et 48H.	128
Figure 59 : Expression des récepteurs Fas et du domaine intracellulaire de Notch1 dans les U-87 MG selon les traitements.....	129
Figure 60 : Pourcentage de cellules exprimant Notch1 déterminé par cytométrie de flux après 24H et 48H de traitement.	130
Figure 61 : Evolution du cycle cellulaire des cellules U-87 MG après traitements.....	131
Figure 62 : Détection de la vimentine et du récepteur Notch1 sur les cellules U-87 MG.	132
Figure 63 : Expression du récepteur Notch1 et de la vimentine après 24H et 48H de traitement.....	133
Figure 64 : Evaluation du niveau d'apoptose des cellules U-87 MG après traitement par FasL et l'inhibiteur de γ -sécrétase.....	134
Figure 65 : Vérification des coordonnées de stéréotaxie grâce à l'injection de bleu de méthylène.	135
Figure 66 : Représentation graphique des différents jours d'euthanasie des rats.	136
Figure 67 : Coloration à l'hématoxyline de coupes des cerveaux de rats.....	137
Figure 68 : Valeurs de la surface moyenne des tumeurs.....	137

Figure 69 : Analyse des marqueurs cellulaires exprimés au niveau des tumeurs induites par xéno greffes cellules U-87 MG.	139
Figure 70 : Détection du domaine actif du récepteur Notch1 dans les coupes de cerveaux des rats greffés et traités.	142

Liste des annexes

Annexe 1: Modulation of Fas-induced apoptosis by p75 neurotrophin receptor in a human neuroblastoma cell line.....	189
Annexe 2: Neural stem cell separation from the embryonic avian olfactory epithelium by sedimentation field-flow fractionation.	203
Annexe 3: <i>In vitro</i> induction of human glioblastoma cells by Fas plus etoposide and <i>in vivo</i> antitumour activity of combined drugs in xenografted nude rats.....	212

ABREVIATIONS

Ab :	anticorps
ADNe :	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANK :	ankyrine
ARN :	Acide ribonucléique
BrdU :	bromodeoxyuridine
BSA :	"Bovin Serum Albumin"
Caspase :	"cysteinyl aspartate-specific proteinase"
CCN :	CTGF / Cyr61 / Nov
CDK :	"cyclin-dependant kinases"
CR ou CRD :	région riche en cystéine
CSL :	CBF1, Su(H), Lag-1
CT :	domaine Cystéine Knot
CTGF :	"Connective Tissue Growth Factor"
Cyr 61 :	"Cystein rich protein"
DAPI :	4,6-diamidino-2-phénylindole
DD :	domaine de mort
DED :	domaine effecteur de mort
DIG :	digoxigénine
DISC :	complexe de signalisation de la mort induite
dNTP :	déoxynucléotide triphosphate
DSL :	Delta-Serrate-Lag 2
E(spl) :	"Enhancer of Split"
EBD :	"EGF binding domain"
ECN :	domaine extra-cellulaire de Notch
EDTA :	éthylène diamine tétra acétique acide
EGF-Like :	"Epidermal growth factor-Like"
ELISA :	"enzyme-linked immunosorbent assay"
ERK :	"extracellular signal-regulated kinases"
FADD, Daxx, RIP, FAP-1 :	protéines adaptatrices
FasL :	Fas ligand

FGF2 :	"Fibroblast Growth Factor 2"
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine
FLIP :	"FLICE inhibitory protein"
GBCs :	cellules basales globulaires
GFAP :	protéine gliale fibrillaire acide
GRP :	"Glial-restricted progenitor"
HBCs :	cellules basales horizontales
HES :	hématoxyline-éosine-safran
<i>HES-1</i> :	"Hairy-Enhancer of Split"
IC :	domaine intra-cellulaire
ICN :	domaine intra-cellulaire de Notch
IFN-γ :	interféron-gamma
Ig :	immunoglobuline
IGFBP :	domaine "Insulin-like Growth Factor Binding Protein-like"
Il :	interleukine
IMF :	intensité moyenne de fluorescence
IPTG :	isopropyl- β -D-thiogalactoside
JNK :	kinase N-terminale c-Jun
KDa :	Kilo Dalton
LBD :	"ligand binding domain"
LCR :	liquide céphalo rachidien
LNR ou LNG :	"Lin12 / Notch / GLp1 repeat"
MAPK :	"Mitogen-Activated Protein Kinase"
MVB :	corps multivésiculaires
NBT-BCIP :	nitroblue-tetrazolium, 5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate
NCR :	région de réponse aux cytokines
NLS :	séquence de localisation nucléaire
<i>Nov</i> :	"Nephroblastoma overexpressed"
NRP :	"Neuronal-restricted progenitor"
NT :	séquence N-terminale
NTM :	domaine trans-membranaire de Notch
NTPs :	nucléotides triphosphate
p75^{NTR} :	récepteur aux neurotrophines p75
PARP :	poly-ADP-ribose-polymérase
PDGF :	"Platelet Derived Growth Factor"

PBS :	tampon phosphate salin à pH 7,2
PEST :	proline-glutamine-sérine-thréonine
PFA :	paraformaldéhyde
PI3-K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC :	Protéine Kinase C
PLAD :	"pre-ligand association domain"
PS :	peptide signal
RBP-Jκ :	"recombination binding protein j-kappa"
RIP :	"receptor interacting protein"
SdFFF :	technique de fractionnement par couplage flux - force de sédimentation
SDS-PAGE :	"sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis"
SNC :	système nerveux central
SSC :	Saline Sodium Citrate
<i>Su(H)</i> :	Suppressor of Hairless
SVF :	sérum de veau foetal décomplémenté
TAD :	domaine d'activation transcriptionnel
TAE :	Tris Acétate EDTA
TCR :	récepteur des cellules T
TM :	transmembranaire
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TNF-R :	"tumor necrosis factor receptor"
TRAIL :	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R :	"TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor"
Trk :	récepteurs à activité tyrosine kinase
tRNA :	ARN de transfert
TSP1 :	domaine "Trombospondine-like"
TUNEL :	"TdT-mediated dUTP nick end labelling"
UTP :	uridine triphosphate
V/SVF :	versène / SVF
VWC :	domaine "Von Willebrand factor-like"
X-gal :	5-bromo 4-chloro 3-indolyl-β-D-galactoside

INTRODUCTION

Le récepteur Notch, gène précoce du développement, est étudié depuis le début du XX^{ième} siècle. Son étude a débuté chez la drosophile et s'est poursuivie au fil des années chez les mammifères. Ce récepteur agit classiquement en se liant à ses ligands exprimés par les cellules voisines. Son implication dans la différenciation neuronale est maintenant clairement établie au cours du développement. De plus le récepteur Notch semble impliqué dans le maintien de cellules souches au niveau du système nerveux central. De récentes études semblent impliquer le récepteur Notch dans les processus de cancérisation. Dans ce cadre, sa fonction est très discutée car certains auteurs lui prêtent des fonctions oncogéniques et d'autres des fonctions suppresseur de tumeur. Ces propriétés sont en fait liées au type cellulaire dans lequel il s'exprime. De plus, de récentes études ont montré qu'il existait une interaction physique entre le récepteur Notch et la protéine CCN3. CCN3 appartient à la famille des protéines CCN qui compte 6 membres à l'heure actuelle. Cette famille de protéines participe à de nombreux processus physiologiques comme la différenciation, la prolifération et même la cancérisation.

Dans ce contexte, nous avons souhaité étudier, dans un premier temps l'implication de deux des membres de la famille CCN : CCN1 et CCN3 au cours du développement aviaire. Le modèle aviaire offre de nombreux avantages notamment l'accessibilité des embryons. Un organe a particulièrement retenu notre attention : l'épithélium olfactif. Cette structure est composée de cellules neuronales et non neuronales et possède la capacité d'auto-renouvellement tout au long de la vie de l'individu. C'est la raison pour laquelle nous sommes intéressés à sa capacité de renouvellement en isolant ses cellules souches puis à l'implication potentielle du récepteur Notch1 au cours de la mise en place de cet organe pendant l'embryogenèse.

Dans un second temps en raison de son implication dans les processus tumorigènes, l'étude du récepteur Notch1 et de ses ligands au sein de la lignée tumorale gliale humaine U-87 MG a été entreprise. Après avoir mis en évidence la présence du récepteur Notch1 et de 4 de ses ligands nous avons étudié les conditions d'induction de l'apoptose dans ces cellules.

Pour cela, nous avons cherché la présence du récepteur de mort Fas. Différentes molécules (FasL, étoposide et dexaméthasone) ont été testées sur cette lignée cellulaire. Parallèlement à l'induction d'apoptose dans les cellules U-87 MG, l'étude du récepteur Notch1 en fonction de ces traitements a été réalisée. L'étude du récepteur révèle des modifications de son expression à la suite des traitements par ces différentes molécules. Il pourrait s'agir de variations du niveau de différenciation ainsi qu'à l'apoptose des cellules U-87 MG.

Dans la dernière partie de cette étude, des xénogreffes de cellules U-87 MG dans des cerveaux de rats nude ont été réalisées afin de déterminer si les traitements pro-apoptotiques utilisés *in vitro* étaient efficaces *in vivo*. Ces expérimentations nous ont permis d'observer une importante diminution de la taille des tumeurs consécutive aux traitements instillés et une modification de l'expression du récepteur Notch1 due aux traitements par FasL / étoposide et par FasL / étoposide / dexaméthasone.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. SYSTEME NOTCH

A. Introduction générale.

La mutation Notch a été découverte chez la drosophile. En comparant des ailes de drosophiles sauvages et de drosophiles hétérozygotes, **Morgant** en 1916, puis Otto Mohr en 1919 ont découvert que les ailes des femelles mutantes hétérozygotes étaient le siège d'encoches (« notch » en anglais) à leurs extrémités (**Figure 1**) (**Morgant et Bridges**, 1916 ; **Mohr**, 1919).

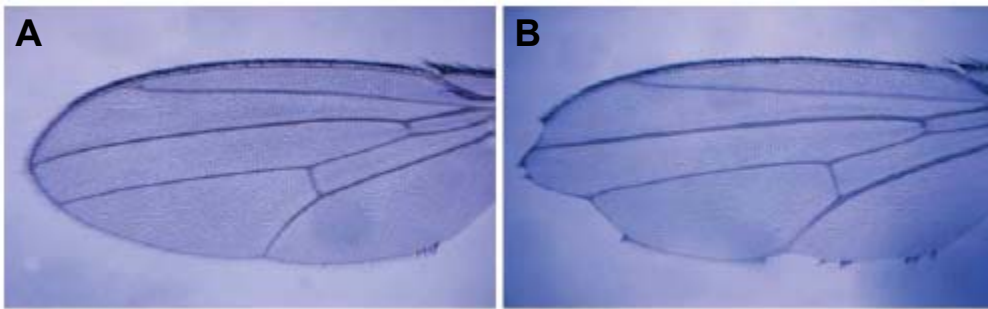


Figure 1 : Phénotypes comparés de drosophiles sauvage (A) et mutante pour le gène Notch (B).

*Le phénotype obtenu à gauche correspond à l'expression de l'allèle sauvage de Notch et le phénotype de droite correspond à l'expression du gène muté de Notch : Notch + / -. (D'après **Radtke et Raj**. 2003).*

Par contre la délétion complète de Notch, obtenue chez la drosophile, est létale dès le stade embryonnaire. Elle génère au cours de l'embryogenèse une hypertrophie du système nerveux par surproduction de neurones. Cette surproduction neuronale était, chez l'embryon, précocement létale (**Poulson**, 1919 ; **Poulson**, 1940 ; **Campos-Ortega**, 1995). Ce gène a alors été nommé « gène neurogénique ».

En 1985, le gène Notch était cloné et ses récepteurs identifiés chez la drosophile (**Wharton**, 1985). Depuis, de multiples travaux ont permis de documenter la voie de signalisation du récepteur Notch dans diverses espèces. Le récepteur et ses ligands semblent à la fois ubiquitaires et hautement conservés au cours de l'évolution (**Artavanis-Tsakonas et al.**, 1995).

B. Le récepteur Notch

Le récepteur Notch est synthétisé sous forme d'un précurseur d'environ 300 kDa (selon les espèces), qui est clivé constitutivement dans le Golgi. Ce clivage conduit à la formation de deux sous-unités, le domaine extracellulaire et le domaine intracellulaire qui restent associés de manière non covalente. L'hétérodimère est adressé à la surface cellulaire où il reste inactif, jusqu'à ce qu'il lie un des ligands présents à la surface d'une cellule contigüe (**Brou et al.**, 2000 ; **Okochi et al.**, 2002). Le récepteur Notch est alors composé de domaines aux fonctions différentes constituant ainsi sa principale forme détectée à la surface cellulaire (**Figure 2**).

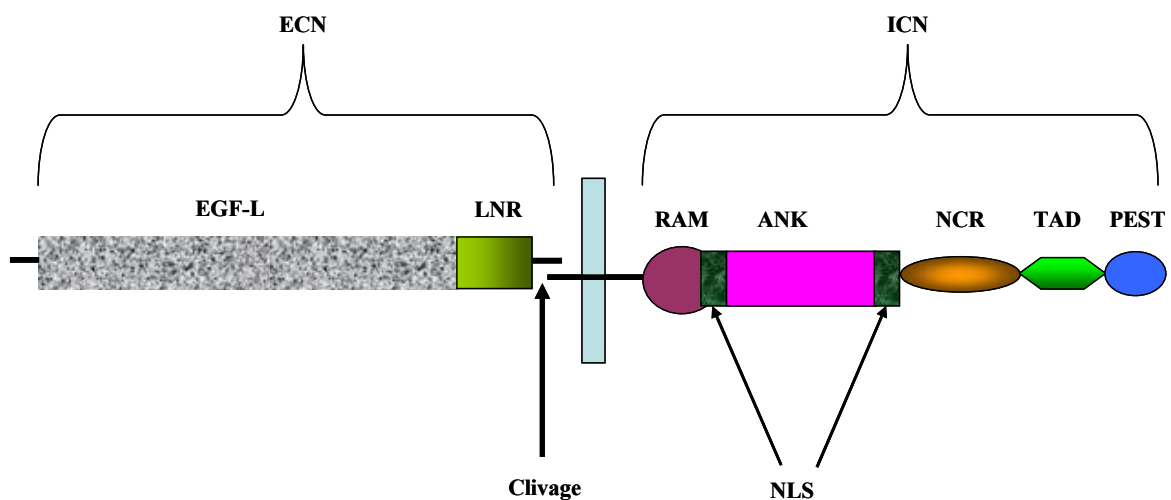


Figure 2 : Schématisation des principaux domaines du récepteur Notch.

ECN : Domaine extracellulaire de Notch ; **ICN** : Domaine intracellulaire de Notch ; **EGF-L** : séquences Epidermal Growth Facteur-Like répétées ; **LNR** : séquences LIN12 / NOTCH répétées ; **NLS** : séquences de localisation nucléaire ; **ANK** : domaine ankyrine répété ; **NCR** : Domaine de réponse aux cytokines ; **TAD** : domaine d'activation de transcription ; **PEST** : Pro-Glu-Ser-Thr.

1. Domaine extracellulaire

Il possède, en fonction des espèces, un large domaine (extracellulaire) composé de 10 à 36 séquences **EGF-L** permettant l'interaction avec le ligand. Les EGF-L permettent la formation d'homodimères de Notch qui augmentent la réponse aux ligands (**Sakamoto et al.**, 2005). Ces séquences inhibent des protéases capables d'activer Notch indépendamment de la fixation d'un de ses ligands (**Sakamoto et al.**, 2005). Ces EGF-L sont suivies par des séquences répétées **LNR** ou **LNG**. Ces dernières semblent jouer un rôle dans la stabilité et la conformation du domaine extracellulaire (**Heitzler et Simpson**, 1993), dans la dimérisation du récepteur (**Lieber et al.**, 1993) et dans la régulation négative de l'activité du récepteur en l'absence de fixation du ligand. Dans le domaine extracellulaire ainsi constitué figure la partie qui régule négativement l'activité du récepteur (**Fleming**, 1998). Ce domaine constitue le lieu de fixation du ligand. Son absence induit une activation constitutive du récepteur (**Rebay et al.**, 1993 ; **Struhl et al.**, 1993 ; **Lieber et al.**, 1993). Chez la drosophile, les 11^{ème} et 12^{ème} EGF-L sont nécessaires et suffisants pour assurer l'interaction avec les cellules portant le ligand (**Rebay et al.**, 1991). Ces séquences sont conservées chez les vertébrés suggérant que ces motifs constituent le site privilégié de fixation du ligand.

2. Domaine intracellulaire

Le domaine intracellulaire (**ICN**) constitue la partie active du récepteur. Quelle que soit l'espèce, l'ICN possède des séquences **ANK** ainsi qu'une séquence **PEST**. Lors de la fixation du ligand sur le domaine extracellulaire, le domaine intracellulaire est libéré par clivage protéolytique puis transloqué dans le noyau. La séquence PEST semble réguler la réponse de Notch en favorisant le renouvellement du domaine transloqué et donc en inhibant la transduction du signal (**Greenwald**, 1998 ; **Artavanis-Tsakonas et al.**, 1999). Le domaine intracellulaire est connu pour interagir avec de nombreuses autres molécules, les plus importantes d'entre elles appartenant au groupe des facteurs de transcription CSL [CBF1 pour les vertébrés, Su(H) pour la drosophile et Lag-1 pour *C. elegans* (**Fortini et Artavanis-Tsakonas**, 1994 ; **Tamura et al.**, 1995 ; **Fortini**, 2002)]. La fixation de ces facteurs a lieu sur le domaine appelé **RAM** flanqué de deux **NLS**. Cette fixation semble facilitée par la présence des séquences **ANK** adjacentes. L'interaction entre le domaine intracellulaire et les facteurs **CSL** contrôle la transcription d'éléments clés de la voie de signalisation de Notch comme les gènes *E(spl)* pour la drosophile et *HES-1* pour les mammifères dont les produits inhibent

l'expression de gènes de la neurogenèse. Notch1-2 et -3 des mammifères ont également une région **NCR** et un domaine **TAD**.

3. Le récepteur Notch et ses paralogues.

Le récepteur Notch et les processus cellulaires dans lesquels il intervient sont fortement conservés au cours de l'évolution. Il existe cependant des variants du récepteur en fonction des espèces (**Figure 3**).

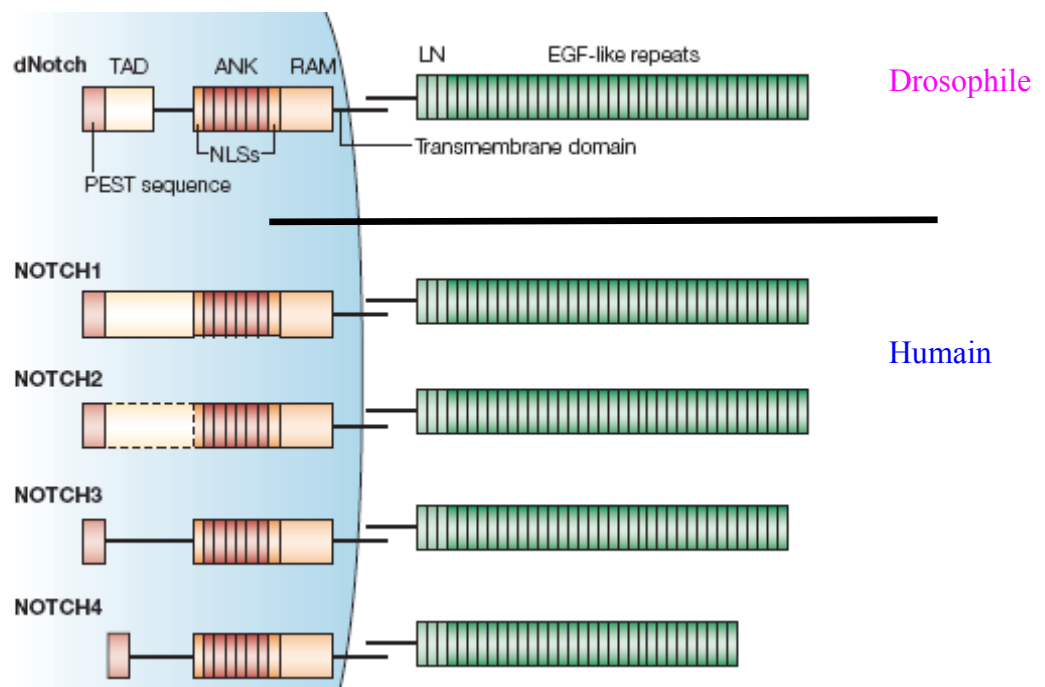


Figure 3 : Paralogues du récepteur Notch chez la drosophile et l'homme.

La drosophile ne possède qu'un seul récepteur Notch : dNotch, alors que les vertébrés possèdent 4 récepteurs Notch codés par 4 gènes différents : Notch1-4. (Radtke et Raj, 2003)

Chez la drosophile, un seul gène code le récepteur Notch alors que chez les mammifères, il existe 4 récepteurs Notch codés par 4 gènes différents. Notch1 et 2 possèdent 36 séquences EGF-L alors que Notch3 n'en possède que 24 et Notch4 seulement 29. De même, Notch1 présente un important domaine de transactivation (TAD) Notch2 un domaine plus petit alors que Notch3 et 4 n'en possèdent pas.

C. Les ligands de Notch

L'activation du récepteur Notch nécessite l'interaction de son domaine extracellulaire avec un de ses ligands. Ceux de la drosophile et de *C Elegans* appartiennent à la famille DSL (Delta, Serrate, Lag-2) (Tax et al., 1994 ; Wang et Struhl, 2005). La drosophile exprime deux ligands du récepteur Notch : Delta et Serrate. *C Elegans* en possède 4 : Lag-2, Apx-1, Arg-2 et F16B12.2. L'homme quant à lui exprime des ligands regroupés sous le nom de familles Delta et Jagged. Ces familles sont composées des ligands Delta-Like1, 3 et 4 et Jagged 1 et 2 (Baladron et al., 2005). Les différents domaines constituant ces ligands sont représentés dans la Figure 4.

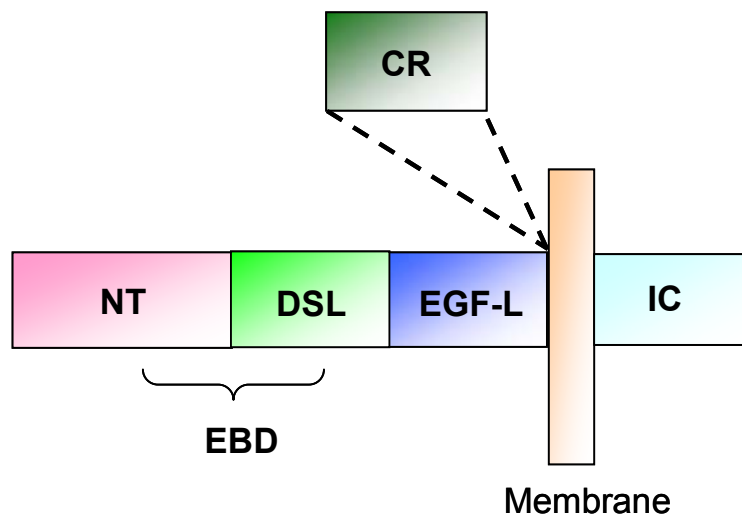


Figure 4 : Schématisation des domaines des principaux ligands de Notch.

NT, séquence N-terminale extracellulaire ; *DSL*, domaine Delta-Serrate-Lag2 ; *CR*, région riche en cystéine ; *IC*, domaine intracellulaire ; *EBD*, EGF Binding Domain.

1. Domaine extracellulaire

Les ligands de Notch qui ont été découverts jusqu'à présent sont des protéines membranaires. La séquence peptidique d'adressage est suivie par la séquence N-terminale (**NT**). Cette séquence semble assez peu conservée au cours de l'évolution. En aval de cette séquence se trouve le domaine Delta-Serrate-Lag2 (**DSL**). Ce domaine constitue la marque de tous les ligands de Notch et est nécessaire à l'interaction physique du ligand et de son récepteur *in vitro* (Muskavitch, 1994). Le domaine DSL est composé d'un **EGF-L** auquel il manque un des six résidus cystéine qui le caractérise. Le domaine NT et le motif DSL forment

le domaine de fixation au motif EGF (**Muskavitch**, 1994) nommé EGF Binding Domain (**EBD**). Adjacent à ce motif DSL se trouvent les séquences EGF-L puis le domaine transmembranaire TM (**Kopezynski et al.**, 1988 ; **Fleming et al.**, 1990). Il faut noter que certains ligands comme Serrate contiennent une région additionnelle riche en cystéines (**CR**) en aval des séquences EGF-L.

2. Domaine intracellulaire

Le domaine TM est suivi du domaine intracellulaire (**IC**) composé de 70 à 215 acides aminés selon les espèces. Ce domaine est hautement variable à la fois en taille et en séquence.

3. Les ligands chez différentes espèces.

Comme pour les récepteurs, les ligands de Notch sont des protéines bien conservées au cours de l'évolution. Il existe cependant plus de ligands pour le récepteur Notch chez les mammifères que ceux dénombrés chez la drosophile (2 ligands pour la drosophile, 5 pour les mammifères) (**Figure 5**).

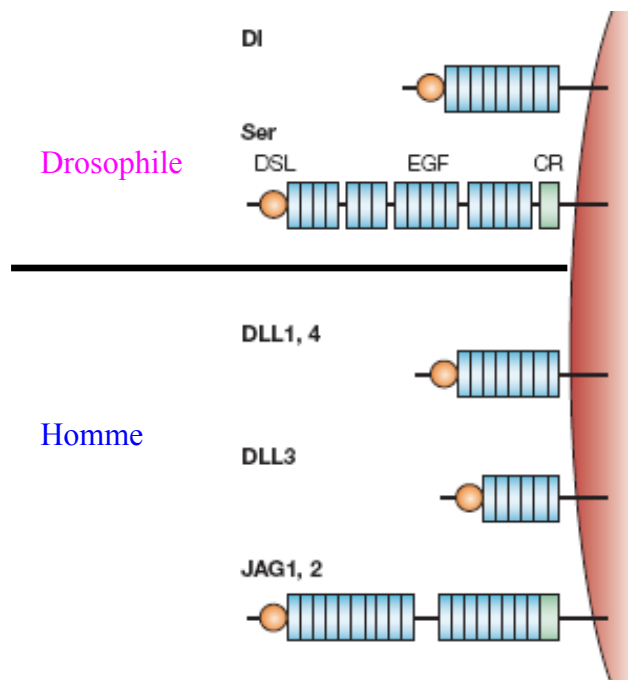


Figure 5 : Paralogues des ligands de Notch chez la drosophile et l'homme.

(Radtke et Raj, 2003) Delta : Dl ; Serrate : Ser ; Delta-Like1, 3, 4 : DLL1, 3, 4 ; Jagged , 2 : JAG1, 2

Deux familles de ligands sont distinguées. Les ligands de la famille Delta nommés Delta chez la drosophile et Delta-Like chez les mammifères et la famille Serrate ou Jagged nommés ainsi respectivement chez la drosophile et chez les mammifères.

Les deux ligands décrits chez la drosophile sont codés par les gènes *Delta* et *Serrate*. La partie extracellulaire du ligand Delta contient un motif **DSL** suivi de 9 motifs de type **EGF-L**. Le ligand appelé Serrate possède un domaine extracellulaire composé d'un domaine DSL et de 14 motifs de type EGF ainsi qu'une région **CR**. Les séquences 5' et 3' terminales des gènes de la famille *Delta* et *Serrate* sont moins conservées mais toutes deux contiennent un domaine CR dans la partie N terminale, probablement impliqué dans la spécificité des liaisons ligand / récepteur.

Chez les mammifères, 3 variants du gène Delta ont été décrits, les Delta-like 1, 3 et 4 (Dll1, Dll3 et Dll4), qui contiennent chacun un domaine **DSL** et 8, 6 et 8 domaines de type **EGF-L** respectivement. Il existe un quatrième ligand pour Notch chez les mammifères, structurellement proche des gènes de la famille Delta, appelé PEF1 ou DELTA LIKE (Dlk) (**Baladron et al.**, 2005). Les autres ligands connus chez les mammifères sont appelés Jagged1 et Jagged2 (**Fleming**, 1998 ; **Lissemore et Starmer**, 1999). Ce sont également des protéines transmembranaires. Leur fragment extracellulaire est composé d'un domaine DSL et de 16 motifs de type EGF (**Figure 5**). De nouveaux ligands de NOTCH ont été décrits, tels que la F3 / CONTACTINE et la NB3 qui activent la voie Notch et jouent un rôle dans la différenciation des oligodendrocytes (**Hu et al.**, 2003 ; **Cui et al.**, 2004). Cette multiplication des gènes a pour corollaire une augmentation de la complexité de la fonction Notch, de telle sorte qu'à l'heure actuelle, ses modes de fonctionnement restent mal connus.

Cependant des modes d'actions du récepteur et de ces ligands ont déjà été mis en évidence.

D. Les modes d'action de Notch

La nature pléiotropique de Notch et son rôle primordial au cours du développement et de la différenciation cellulaire ont été démontrés par de nombreuses études et pour de nombreux systèmes cellulaires (Système Nerveux Central (SNC), système immunitaire).

Notch peut à la fois inhiber ou retarder la différenciation cellulaire, ré-orienter une cellule différenciée, ou agir dans les processus de prolifération et d'apoptose (**Sjölund et al.**, 2005 ; **Rehman et Wang**, 2006). Notch peut de ce fait agir sur le devenir cellulaire grâce à ses ligands qui peuvent activer des voies de signalisation différentes. Trois mécanismes d'activation de la voie Notch ont été décrits : (1) signalisation par division asymétrique observée chez la drosophile (2) signalisation bidirectionnelle par inhibition latérale, appelée mode permissif ; (3) signalisation unidirectionnelle, connue sous le terme de mode inductif. Ces deux derniers mécanismes sont observés à la fois chez la drosophile et chez les mammifères.

1. Signalisation au cours de la division cellulaire asymétrique

L'implication du récepteur Notch au cours d'une division asymétrique (**Figure 6**) est retrouvée chez la drosophile. En effet, ce type de signalisation a lieu au sein d'une cellule possédant un gradient de concentration en facteur de transcription très souvent retrouvé au cours du développement chez la drosophile. L'inhibiteur de Notch, Numb, va se concentrer dans une partie du cytoplasme de la cellule mère. Lors de la division cellulaire, Numb n'est plus retrouvé que dans l'une des deux cellules filles. Ce facteur inhibera l'expression du récepteur au sein de cette cellule qui deviendra une cellule émettrice exprimant fortement le ligand (**Roegiers et Jan**, 2004).

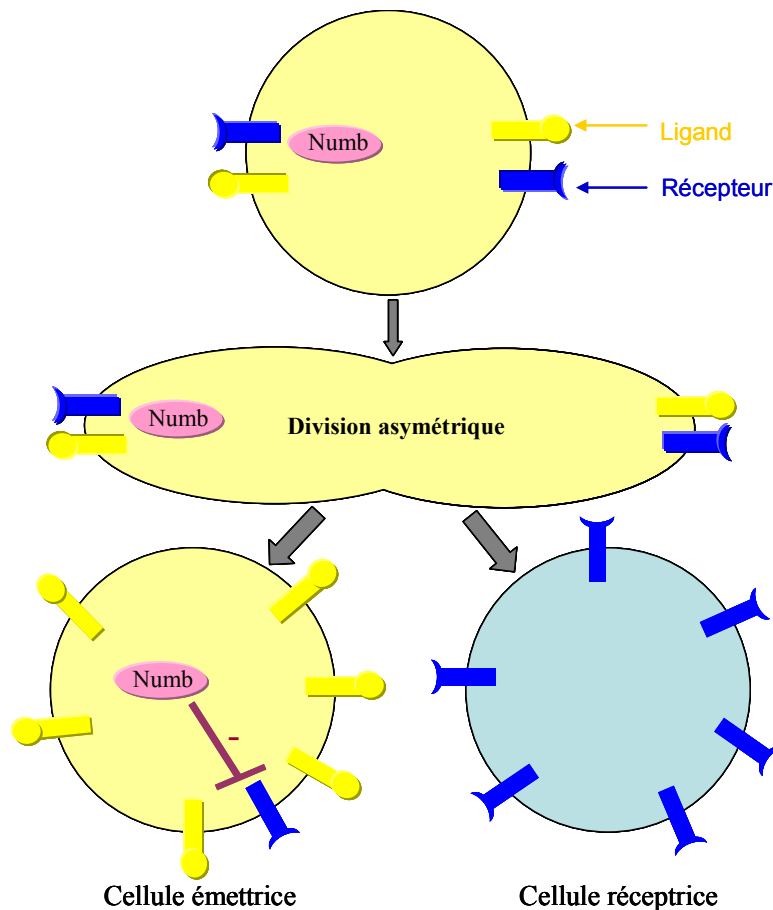


Figure 6 : Représentation d'une division asymétrique.

Une cellule unique possédant un gradient de facteur de transcription, ici Numb, entraîne une division asymétrique de la cellule donnant naissance à deux cellules distinctes (-) *inhibition de la synthèse du récepteur*. (D'après **Kimble et Simpson, 1997**)

2. Inhibition latérale

L'inhibition latérale (**Wigglesworth, 1940**) est le mécanisme d'action de la voie Notch le plus étudié. Il s'exerce au sein d'un groupe de cellules qui, au départ, ont le même potentiel de différenciation. Ce mécanisme a été initialement étudié chez la drosophile (**Heitzler et Simpson, 1991** ; **Artavanis-Tsakonas, 1995** ; **Artavanis-Tsakonas et al., 1999**).

Les cellules voisines expriment sur leur membrane plasmique le ligand et le récepteur dans les mêmes proportions. Le processus de différenciation cellulaire par inhibition latérale s'enclenche dès que s'établit le premier contact ligand / récepteur entre deux cellules. La

cellule recevant la stimulation (cellule réceptrice) par le ligand va produire de plus en plus de récepteurs et inhiber la synthèse de récepteurs sur la cellule voisine (cellule émettrice). Parallèlement, la cellule émettrice va augmenter sa synthèse de ligand et subir l'inhibition de la synthèse de récepteur. Ce déséquilibre de production ligand / récepteur génère une boucle d'amplification aboutissant à l'émergence de deux cellules différentes, une cellule exprimant fortement le récepteur, la cellule réceptrice, et l'autre exprimant fortement le ligand, la cellule émettrice. Ce mécanisme est illustré au cours de la différenciation neuronale (**Figure 7**). Au cours de ce processus, la cellule émettrice va inhiber la différenciation cellulaire de la cellule réceptrice.

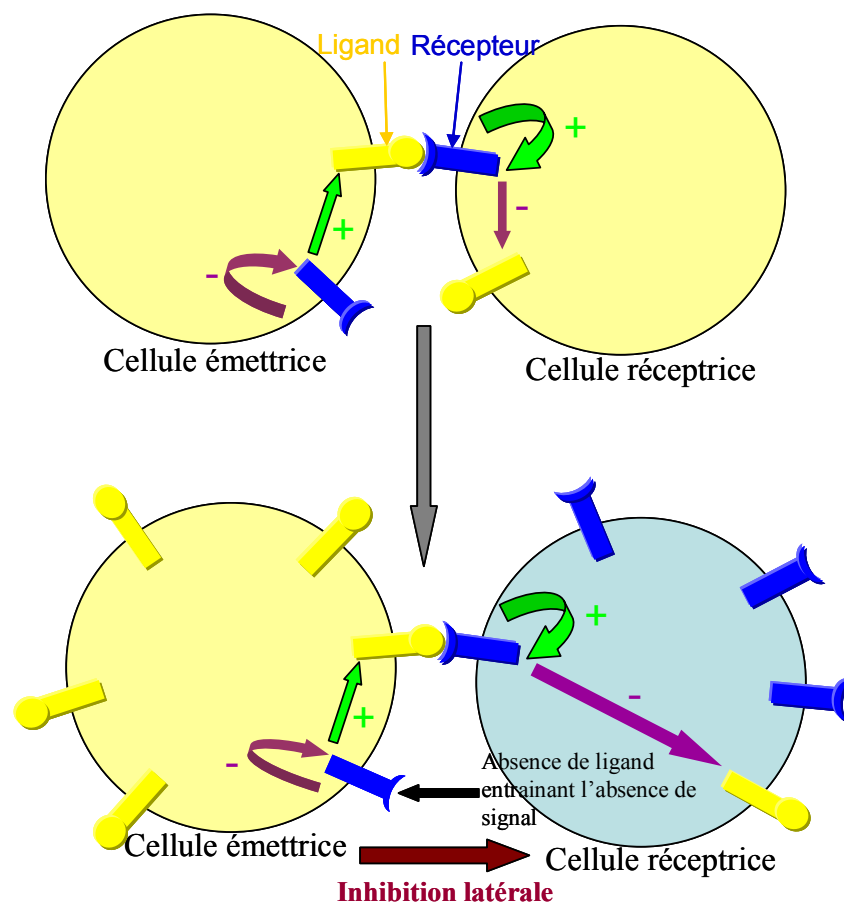


Figure 7 : Illustration d'inhibition latérale.

Des cellules issues d'un même cluster possèdent à la fois le récepteur et le ligand. Les deux cellules détiennent donc le même potentiel de différenciation. Elles subissent ensuite à la fois une boucle d'amplification et d'inhibition. + : augmentation de synthèse. - : diminution de synthèse. (D'après **Kimble et Simpson, 1997**)

3. Mode inductif

Dans la signalisation par induction (**Figure 8**), les cellules voisines ne sont pas équivalentes et n'expriment pas les mêmes molécules. L'une va exprimer fortement le récepteur et l'autre le ligand. Il existe donc deux populations cellulaires différentes. Ces deux populations ont des voies de différenciation différentes. Notch agit *via* des signaux unidirectionnels entre deux cellules.

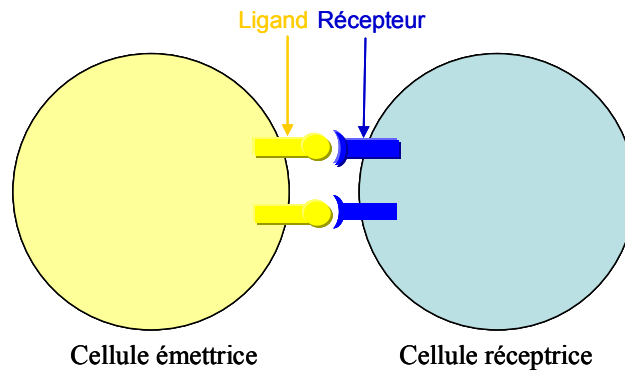


Figure 8 : Illustration du mode inductif médié par la voie de Notch.

Les deux cellules voisines ne possèdent pas le même potentiel de différenciation dès le départ. L'une possède uniquement le récepteur Notch et l'autre uniquement le ligand. (D'après Kimble et Simpson, 1997)

L'activation du récepteur Notch, au cours de ces différents modes d'action, aboutit à l'expression de différents gènes impliqués dans des processus physiologiques.

E. Activation du récepteur Notch et transduction du signal

Après fixation d'un ligand de Notch sur le récepteur, la transduction du signal qui est mise en place est différente chez la drosophile et chez les mammifères.

1. Chez la drosophile

Le mécanisme d'action le mieux connu pour Notch a été étudié chez la drosophile et il met en cause Notch et son ligand Delta. Il semblerait cependant que ce schéma d'activation soit applicable aux vertébrés (**Figure 9**).

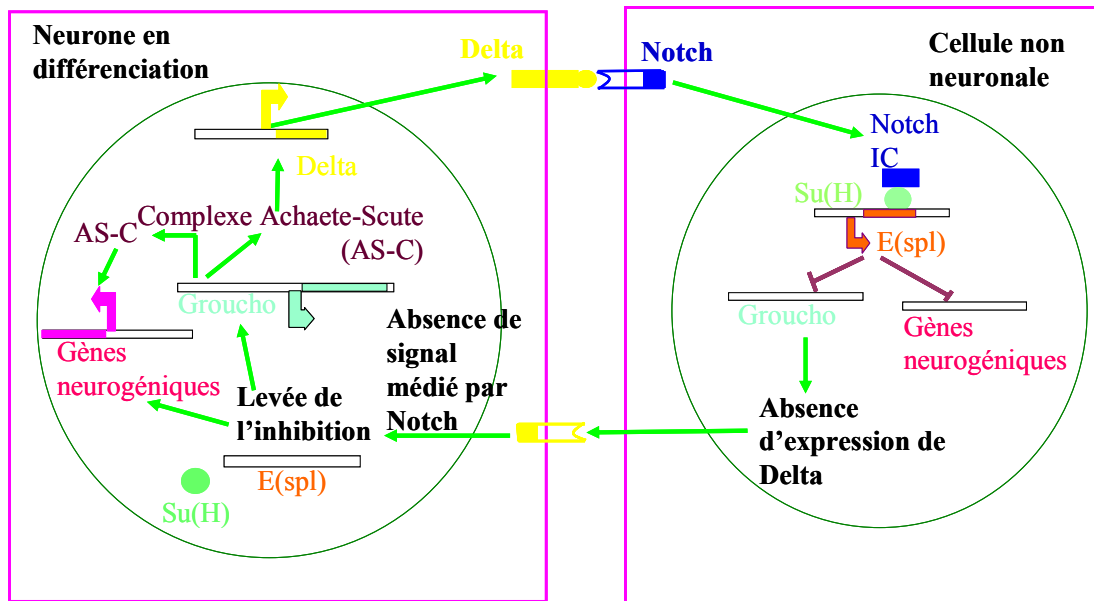


Figure 9 : Interaction Notch / Delta dans le processus d'inhibition latérale chez la drosophile.

Lors du processus d'inhibition latérale, les signaux d'inhibition sont échangés à l'intérieur d'un cluster pro-neural. Le signal médié par Notch entraîne l'inhibition de la différenciation de la cellule portant le récepteur Notch. Après fixation du ligand sur le récepteur, il y a libération du domaine intracellulaire de Notch sous l'action de métalloprotéases. Ce domaine va alors agir comme régulateur transcriptionnel (**Jarriault et al.**, 1995 ; **Kopan et al.**, 1996) en migrant dans le noyau où il se fixe sur les produits des gènes *Su(H)* chez la drosophile. Ceci va entraîner l'activation transcriptionnelle de gènes codant des antagonistes de la différenciation neuronale tel que *E(spl)* qui inhibe l'activation de gènes neurogéniques. Dans la cellule contigüe, l'absence de signal médié par Delta lève l'inhibition de la transcription de gènes neurogéniques. L'expression de *Groucho* permet l'expression de gènes pro-neuronaux comme *Achaete-Scute* entraînant ainsi la cellule vers un devenir neuronal.

La différenciation des cellules n'est pas simplement due à la liaison de Notch et Delta puisqu'une même cellule peut à la fois exprimer Notch et Delta. C'est en fait les proportions relatives de récepteur et de ligand à la surface d'une cellule et les interactions avec les cellules voisines qui déterminent l'arrêt ou la poursuite de la différenciation. Le niveau d'activation de Notch dépend de la quantité de ligands exprimés par les cellules adjacentes pouvant conduire

à un effet amplificateur du signal issu du récepteur. Cet effet amplificateur réside dans le fait que l'activation de Notch conduit à une diminution de l'expression de Delta et donc, diminue le pouvoir inhibiteur de la cellule ayant le récepteur Notch activé.

2. Chez les mammifères

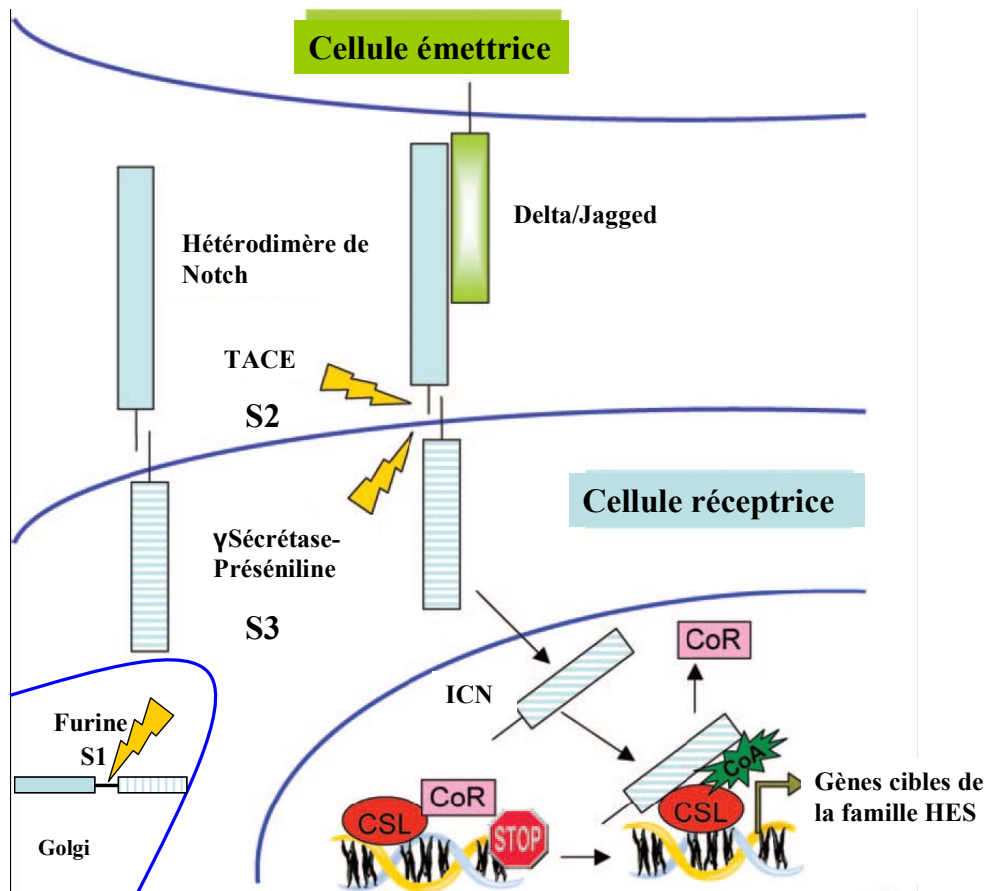


Figure 10 : transduction du signal lors de la fixation du ligand sur Notch chez les mammifères.

(D'après Lasky et Wu, 2005).

Avant son adressage à la membrane plasmique, le récepteur Notch est clivé une première fois dans l'appareil de Golgi, au niveau du domaine extracellulaire par une furine (S1) (Blaumueller et Artavanis-Tsakonas, 1997 ; Logeat et al., 1998 ; Guidos, 2002) (Figure 10). Les deux sous-unités sont alors liées sous forme d'hétérodimère de manière non

covalente et calcium dépendante (**Annaert et De Strooper**, 1999). Lorsque le récepteur atteint la surface cellulaire et qu'il entre en interaction avec son ligand, un second clivage (**S2**) est induit dans la partie extracellulaire du récepteur. Ceci a lieu grâce à une enzyme de type métalloprotéase, membre de la famille ADAM, la protéase **TACE** (**Brou et al.**, 2000 ; **Okochi et al.**, 2002). Un dernier clivage intervient cette fois-ci au niveau du domaine intracellulaire du récepteur (**S3**) par l'intervention du complexe γ -sécrétase-préséniline (**Fortini**, 2001 ; **De Strooper**, 2003). Ceci permet le relargage du domaine intracellulaire de Notch (**ICN**) dans la cellule. Grâce aux séquences NLS qu'il exprime, ce domaine va atteindre le noyau dans lequel il sera transloqué. ICN déplace le corépresseur (**CoR**) ce qui lui permet de s'associer aux facteurs de transcription comme **CSL** (C promoter binding factor-Suppressor of hairless-Lag1 transcription factor) (**Fortini**, 2002). Ce complexe régule des gènes codant des protéines HLH (helix-loop-helix proteins). Le complexe ainsi formé recrute la co-enzyme A (**CoA**) et ceci permet de réguler l'expression de gènes cibles de la famille **HES** (Hairy-Enhancer of Split) (**Figure 10**). Ce mécanisme par rétrocontrôle empêche l'expression des gènes *Ngn* (neurogénine) et *MASH* (non montré sur la figure) (**Rehman et Wang**, 2006).

F. Régulation de la voie de signalisation de Notch.

1. Les modulateurs de la voie de Notch chez la drosophile

Comme tous les signaux intracellulaires induits par un récepteur, la distribution restreinte du ligand constitue la régulation première de l'activation du récepteur. Les deux ligands connus chez la drosophile, Delta et Serrate, sont généralement considérés comme des agonistes de Notch mais peuvent cependant inhiber l'activation de ce dernier. Le mécanisme de cet antagonisme reste encore inconnu. De plus, il existe de nombreuses molécules qui peuvent influencer la voie de signalisation de Notch (**Panin et Irvine**, 1998) (**Figure 11**). Dans la plupart des cas, ces modulateurs ont été identifiés chez la drosophile mais il est important de noter qu'il existe des homologues entre la plupart de ces modulateurs et ceux trouvés chez d'autres organismes. De nombreux modulateurs ont été identifiés mais leurs mécanismes d'action ne sont pas encore complètement élucidés.

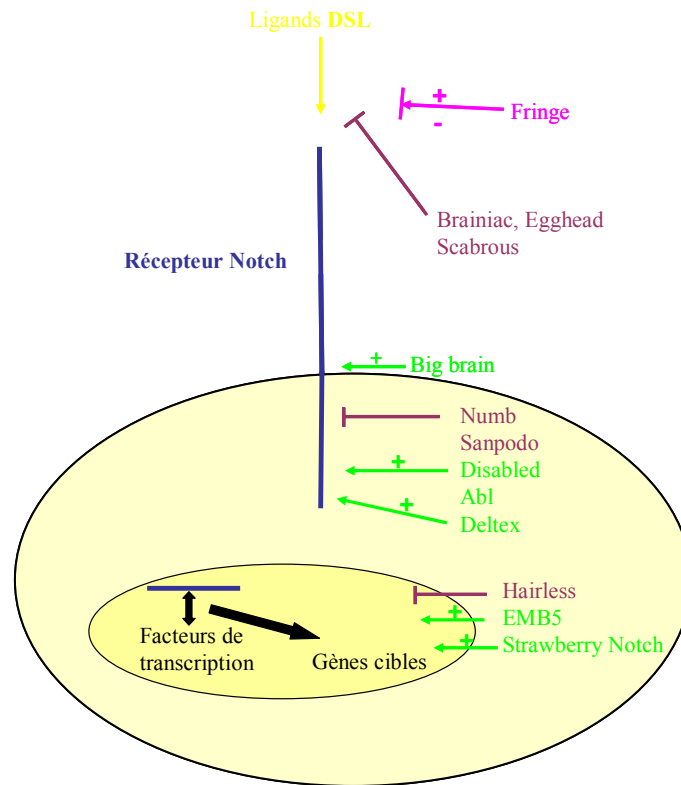


Figure 11 : Les modulateurs du récepteur Notch chez la drosophile.

a) Modulateurs extracellulaires

De nombreuses molécules ont été identifiées comme modulant l'activité de Notch de façon extracellulaire. Ces molécules influencent l'affinité de Notch pour ses ligands. Par exemple, le gène *fringe* code une glycoprotéine qui modulerait négativement l'activation de Notch par modifications enzymatiques du récepteur au niveau des séquences ELR (**Panin et al.**, 1997 ; **Haltiwanger**, 2002). D'autres protéines comme *brainiac* et *egghead* semblent influencer la production de ligands pour Notch voire même joueraient le rôle de ligand pour le récepteur mais n'activeraient pas la voie de transduction du signal. La protéine *scabrous* découverte par Baker et son équipe en 1990, agit également négativement sur l'activation de Notch (**Baker et al.**, 1990 ; **Lee EC et al.**, 2000).

b) Modulateurs transmembranaires

La protéine « *big brain* » semble colocalisée avec Notch et Delta *in vivo* (**Doherty et al.**, 1997) et pourrait agir comme régulateur positif de la voie de signalisation de Notch.

c) Modulateurs cytoplasmiques

Ces effecteurs agissent en aval de la fixation du ligand sur le récepteur Notch et en amont de la translocation du domaine intracellulaire du récepteur. Deux gènes, *numb* et *sanpodo*, ont été identifiés comme modulant de la voie d'activation de Notch lors des divisions cellulaires asymétriques dans le système nerveux (**Spana et Doe**, 1996 ; **Skeath et Doe**, 1998). A ce niveau, *numb* constitue un antagoniste de Notch. Ce gène code une protéine cytoplasmique associée à la membrane. Elle va se lier au domaine intracellulaire de Notch et va inhiber la transduction du signal par interaction protéique directe. Il semble que l'action de *sanpodo* se situe en aval de celle de *numb* mais son rôle dans la modulation de la voie de signalisation de Notch n'est pas encore connu (**Schweisguth**, 2004). Les protéines *abl* et *disabled*, quant à elles, peuvent interagir avec le domaine RAM23 de Notch et modifier la transduction du signal. La protéine *disabled* est mise en cause dans les phénomènes de guidage axonal et agirait positivement sur la voie de signalisation de Notch (**Giniger**, 1998). *Deltex* est une autre protéine qui régule positivement l'activité de Notch en se fixant aux séquences ankyrines du récepteur (**Diederich et al.**, 1994 ; **Kanwar et Fortini**, 2004).

d) Modulateurs nucléaires

La protéine *Hairless* est capable d'inhiber la transduction du signal liée à la translocation du domaine intracellulaire en se liant directement à la protéine *Su(H)*, inhibant ainsi son activité transcriptionnelle (**Brou et al.**, 1994 ; **Lai**, 2002). D'autres protéines telles que *emb5* et *strawberry Notch* sont également mises en cause dans la voie de signalisation de Notch mais semblent être des acteurs régulant positivement cette voie.

2. Modulation chez les vertébrés

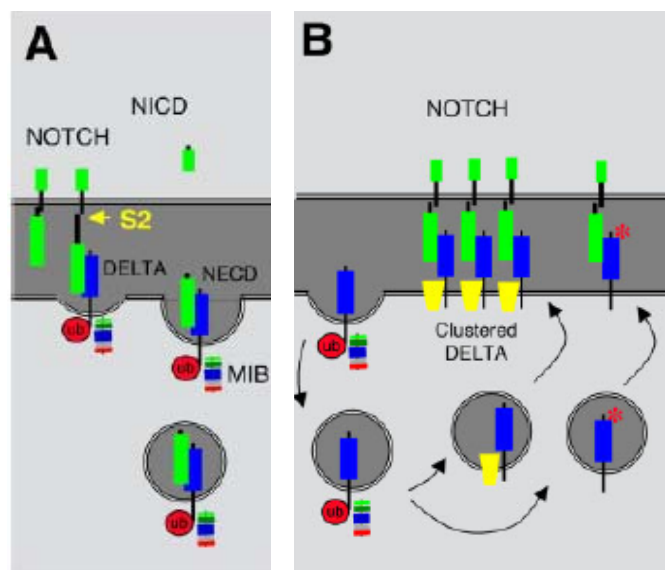
a) Glycosylation

La modulation de la signalisation médiée par le récepteur Notch suite aux modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation ou encore la fucosylation semblent assez évidentes. En effet, l'ajout de sucres quels qu'ils soient entraîne des modifications dans la structure tridimensionnelle du récepteur et donc modifie les interactions possibles avec les ligands. La fucosylation des motifs répétés EGF du récepteur Notch permet une augmentation de l'affinité de ce dernier pour les ligands de la famille DSL (**Haines et**

Irvine, 2003). De la même manière, la glycosylation des séquences répétées EGF du récepteur Notch va potentialiser l'interaction Notch / Delta-Like1 et permettre la signalisation mais également inhiber la signalisation médiée par la liaison Notch / Jagged1 (Hicks et al., 2000).

b) Modulation par endocytose / protéolyse.

La voie de signalisation induite par l'activation du récepteur Notch est affectée par le phénomène d'endocytose de différentes manières. Les phénomènes d'endocytoses augmentent l'activation du récepteur Notch sur la cellule voisine. Plusieurs hypothèses, illustrées dans la **Figure 12**, sont émises pour expliquer ces phénomènes. i) La fixation du ligand sur le récepteur Notch et le début de l'endocytose entraîneraient une traction sur ce dernier, ce qui faciliterait le clivage S2 par la métalloprotéase (**Figure 12A**). ii) L'internalisation des ligands par des endosomes et leurs interactions avec des cofacteurs ou des modificateurs permettraient de rendre ces ligands plus actifs lors de leur retour à la membrane (**Figure 12B**) ; iii) Les ligands sont internalisés dans des corps multivésiculaires (MVB) où se forment des clusters de ligands qui seront relargués à la membrane par des exosomes pour activer les récepteurs des cellules voisines (**Figure 12C**). Les ligands liés aux domaines extracellulaires des récepteurs sont internalisés puis recyclés à la membrane alors que les domaines extracellulaires des récepteurs sont quant à eux pris en charge dans un lysosome où ils seront dégradés (Le Borgne, 2006).



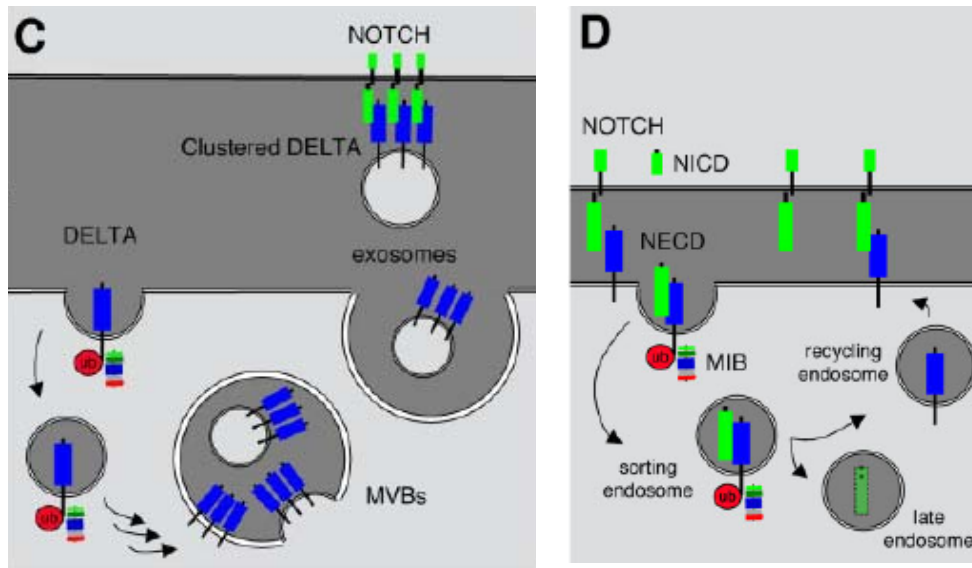


Figure 12 : Modèles du rôle de l'endocytose pour Delta.

A: L'endocytose de Delta facilite le clivage S2 par une métalloprotéase. B–D: l'endocytose de Delta ainsi que le recyclage de ce ligand rendent son interaction avec Notch plus efficace. B: Le recyclage de Delta depuis la membrane plasmique permet la formation de vésicules contenant des clusters de Delta associés à des co-facteurs (jaunes sur le dessin) ou des modificateurs (astérisques rouges sur le dessin) permettant d'augmenter l'affinité de Delta avec le récepteur. Ces vésicules peuvent être à leur tour ramenées à la membrane pour activer massivement le récepteur Notch. C: Après l'endocytose, Delta est internalisé dans des corps multivésiculaires (MVBs) où se créent des clusters de Delta qui sont par la suite relargués via des exosomes à la membrane. D: Le recyclage de Delta. Après l'endocytose, le complexe Delta-NECD se dissocie et les ligands retournent à la membrane via les endosomes pour de nouveau activer les récepteurs Notch. NECD vont alors transiter dans la cellule via des endosomes et éventuellement subir une dégradation dans les lysosomes. (D'après **Chitnis**, 2006)

G. Notch et considérations évolutives

Notch est un récepteur hautement conservé au cours de l'évolution. Le tableau ci-dessous récapitule de manière non exhaustive les différents paralogues de Notch et des composantes de sa voie de signalisation chez trois espèces chez lesquelles ce récepteur est étudié.

Types de protéines	Drosophile	Mammifères	Caenorhabditis elegans
Récepteurs	Notch	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4	Lin-12 Glp-1
Ligands	Delta Serrate	Delta-Like1 Delta-Like3 Delta-Like4 Jagged1 Jagged2	Lag-2 Apx-1 Arg-2 F16B12.2
Effecteurs de la famille CSL	Suppressor of Hairless	CBF-1/RBP-jk	Lag-1 EMB-5
Gènes cibles	E(spl)	HES 1 à 7	Lin-22
Glycosyle transférase	Fringe	Lunatic Fringe Manic Fringe Radical Fringe	

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

(D'après **Lai**, 2004 ; **Haines et Irvine**, 2003).

H. Notch et développement

La mise en cause de Notch au cours du développement est particulièrement étudiée chez la drosophile. L'interaction Notch / Delta joue un rôle essentiel lors des processus de segmentation chez la drosophile (**Mishra et al.**, 2001) et lors de l'inhibition de la neurogenèse au sein de clusters proneuronaux par inhibition latérale (**Lai**, 2004). Ce gène précoce du développement fait l'objet de nouvelles études au cours du développement dans d'autres modèles comme le modèle aviaire, largement utilisé en biologie du développement. Il semble que les gènes Notch1, 2, Delta1 et Serrate1 et 2 soient exprimés dès la formation du blastodisque, lors de la gastrulation chez les embryons de poulet. (**Caprioli et al.**, 2002). Le récepteur Notch participe également, dans cet organisme, à la mise en place de la crête neurale par un mécanisme d'induction. Les cellules épidermales adjacentes à la crête neurale en formation expriment Notch et Delta ce qui induit, au niveau de la crête neurale, l'expression du gène *Slug* (marqueur de la crête neurale), nécessaire à la formation de cette

dernière (**Cornell et Eisen**, 2005). D'autre part, Serrate a été mis en évidence chez le poulet en 1996 par Lewis et son équipe (**Lewis**, 1996 ; **Myat et al.**, 1996). Ils ont démontré que ce ligand était exprimé dans différentes structures telles que système nerveux central, le système vasculaire ou encore le mésenchyme des bourgeons des membres. Cette expression est corrélée avec l'expression du récepteur Notch ainsi que de Delta. Ces trois gènes sont également exprimés au niveau du cortex et de la moelle épinière lors de la mise en place des premiers neurones. Serrate permet également une organisation dorso-ventrale au cours de la formation du tube neural. Ce ligand, ainsi que Delta, sont exprimés pendant le développement des muscles squelettiques chez le poulet. Dans ce cadre, ils jouent un rôle au cours de la différenciation des cellules musculaires (**Vargesson et al.**, 1998). Jagged, l'homologue de Serrate chez les mammifères, permet *in vitro* le maintien de cellules souches hématopoïétiques dans un état indifférencié lorsqu'il est en présence (**Jones et al.**, 1998 ; **Varnum-Finney et al.**, 1998 ; **Li et al.**, 1998).

L'interaction de Notch et de ses ligands est régulée notamment par une glycoprotéine nommée Lunatic Fringe chez les vertébrés. Une expression ectopique de cette glycoprotéine conduit à une diminution de l'expression de Serrate au cours du développement du tube neural chez l'embryon de poulet (**Sakamoto et al.**, 1998). Les interactions entre le récepteur et les ligands ainsi que leurs implications au cours de différents processus physiologiques ont été étudiés. Les ligands peuvent, par exemple, réguler négativement l'expression du récepteur au sein d'une même cellule (**Katsube et Sakamoto**, 2005).

Ce gène précoce du développement, ainsi que ses ligands, sont donc intimement liés au développement du système nerveux et à la ségrégation entre les cellules neuronales et les cellules non neuronales.

I. Notch et SNC

Le récepteur Notch est mis en cause dans la mise en place du SNC ainsi que dans le maintien de ce dernier. En effet, des expériences ont permis de démontrer le rôle de Notch lors du processus de myélinisation. Chez des souris mutantes ayant un déficit en récepteur Notch1, une augmentation du phénomène de myélinisation au niveau des axones du SNC peut être observée. (**Givogri et al.**, 2002). Notch1 a également été détecté par hybridation *in situ* à la fois dans la zone subventriculaire, dans le gyrus denté ainsi qu'au niveau du courant rostral

chez des souris âgées de 4 jours. Ces zones sont connues pour contenir des cellules souches neuronales. La distribution du récepteur Notch1 et de ses ligands dans ces structures en post-natal suggère un rôle de Notch1 dans le maintien du pool de cellules souches et de la différenciation neuronale après la naissance (Stump et al., 2002).

L'activation de Notch ne maintient pas les cellules souches dans un état indifférencié et ne promeut pas leur autorenouvellement. Une activation même brève du récepteur est suffisante pour entraîner une perte du potentiel neurogénique accompagnée d'une accélération de la différenciation gliale. Ceci suggère que les cellules neuroblastiques qui expriment les ligands de Notch peuvent agir positivement sur la différenciation gliale de leurs cellules souches voisines. (Figure 13) (Morrison et al., 2000 ; Lundkvist et Lendahl, 2001).

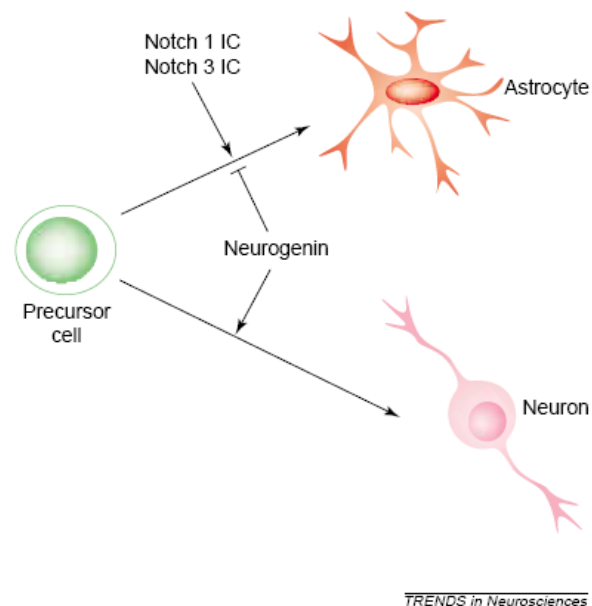


Figure 13 : Les effets de la Neurogénine et de Notch sur des précurseurs neuronaux permettent la différenciation astrocytaire ou neuronale.

L'activité des domaines intracellulaires de Notch1 et Notch3 entraîne les cellules vers un devenir glial. Au contraire la Neurogénine va à la fois promouvoir une différenciation neuronale et empêcher une différenciation gliale. (D'après Lundkvist et Lendahl, 2001)

D'autre part, Gaiano et son équipe ont introduit, grâce à un virus, le domaine intracellulaire de Notch (actif) dans le cortex de souris, avant le début de la neurogenèse. Les cellules infectées deviennent alors des cellules de la glie radiaire. En post-natal, de

nombreuses cellules infectées deviennent des astrocytes périventriculaires. Tout ceci tend à prouver que Notch promeut la différenciation de la glie radiaire lors de l'embryogenèse mais également qu'il y aurait une filiation entre ces cellules de la glie radiaire et les cellules dites souches dans le système nerveux chez l'adulte (**Gaiano et al.**, 2000 ; **Yoon et Gaiano**, 2005).

J. Notch et cancers

Le récepteur Notch participe à des processus fondamentaux de différenciation cellulaire. Ce rôle clef dans la physiologie cellulaire sous-tend l'idée qu'un dysfonctionnement dans la voie de signalisation peut avoir des conséquences dramatiques pour la cellule (**Allenspach et al.**, 2002). Ainsi, des mutations peuvent conduire à des phénomènes de cancérisation. La première mise en cause de Notch dans les phénomènes de cancérisation a eu lieu en 1991 par Ellisen et son équipe. (**Ellisen et al.**, 1991) Ils montrèrent qu'il existait une translocation chromosomique récurrente (t(7;9)) concernant le gène Notch dans une partie de la population leucémique lymphoblastique aigüe (T-ALL). Cette translocation chromosomique entraîne une augmentation de synthèse du domaine actif de Notch et donc une amplification de la voie de la signalisation qui en découle (**Aster et al.**, 1997).

Depuis cette découverte, de nombreuses aberrations dans la voie de signalisation de Notch ont été décrites comme pouvant être liées à des processus de cancérisation. C'est le cas par exemple dans le cancer du poumon (**Sriuranpong et al.**, 2002), les cancers de la peau (**Thelu et al.**, 2002 ; **Massi et al.**, 2006), les cancers du col de l'utérus (**Zagouras et al.**, 1995 ; **Talora et al.**, 2002), le cancer du sein (**Stylianou et al.**, 2006) et également dans les neuroblastomes (**Pahlman et al.**, 2004).

Cependant, le récepteur Notch est à la fois associé à certains phénomènes de cancérisation mais on lui octroie également un effet suppresseur de tumeurs. Son rôle semble intimement lié au type cellulaire observé (**Radtke et Raj**, 2003).

Le récepteur Notch, ainsi que la voie de signalisation qui découle de son activation, sont intimement liés aux phénomènes de différenciation neuronale et gliale. Dans ce contexte, une expression aberrante du récepteur peut entraîner une prolifération anarchique de cellules gliales par exemple. Il semblerait que ce soit le cas dans le phénomène du glioblastome ou du moins que cette pathologie soit liée à des modifications du niveau d'expression de Notch

(**Purow et al.**, 2005). Les modifications de l'expression de Notch ont été observées dans différentes lignées de glioblastomes mais il n'est pas clair pour le moment que ces modifications entraînent la cancérisation. En revanche, Notch1 et Delta sont surexprimés dans de nombreux glioblastomes et la diminution artificielle de l'expression de ces deux protéines entraîne une apoptose massive et une diminution de la prolifération dans des lignées glioblastiques (**Purow et al.**, 2005). Ce pendant, il existe des exceptions ; dans certaines lignées de haut grade comme la lignée U-87 MG, le récepteur Notch ainsi que ses ligands semblent très faiblement exprimés (**Purow et al.**, 2005). Ces récentes découvertes laissent des interrogations sur le rôle que peuvent jouer Notch et ses effecteurs dans les lignées cancéreuses. Notch pourrait être considéré à la fois comme suppresseur de tumeur et comme oncogène (**Leong et Karsan**, 2006).

Notch semble donc jouer un rôle complexe dans certaines pathologies cancéreuses. Récemment, chez le poulet, ce récepteur a été co-immunoprécipité avec une protéine sécrétée appelée Nov (CCN3) (**Sakamoto et al.**, 2002). Cette protéine sécrétée est associée comme le récepteur Notch à des phénomènes de cancérisation (**Joliot et al.**, 1992). CCN3 appartient à une famille de protéines appelée CCN. Le récepteur Notch se lie à CCN3 par l'intermédiaire de ses séquences EGF répétées (**Katsube et Sakamoto**, 2005). Ces deux molécules ainsi que leur voie de signalisation semblent intimement liés.

II. La famille des gènes CCN

A. Introduction générale

La découverte de la famille des gènes CCN débute par la mise en évidence de trois gènes ayant une structure commune et dont l'expression est modulée par des facteurs de croissance et est altérée dans les cellules cancéreuses (**Brigstock, 1999 ; Perbal, 2001**).

L'acronyme CCN correspond à :

Connective tissue growth factor ou CTGF

Cystein rich protein ou Cyr 61

Nephroblastoma overexpressed ou NOV

Cette famille de gènes code des protéines régulatrices comptant jusqu'à ce jour six membres distincts chez l'Homme. Des paralogues ont été trouvés dans diverses espèces (**Tableau 2**).

Abréviations des gènes et localisation chromosomique	Nom complet du gène	Orthologues
Cyr61 (CCN1) (1p22.3)	Cystein rich 61	CEF 10 (chicken embryo fibroblasts)(Ck) βIG1 (TGFβ induced gene) cyr 61 (Mu)
Ctgf (CCN2) (6q23.1)	Connective tissue growth factor	Ctgf (Ck) ctgf (Sw) ctgf (Xn) βIG2 (TGFβ induced gene) (Mu) Fisp 12 (fibroblast inducible secreted protein) (Mu)
Nov (CCN3) (8q24.1)	Nephroblastoma overexpressed	Nov (Ck) novM (Mu) nov (Sw) nov (Xn)
wisp-1 (CCN4) (8q24.1-24.3)	Wnt-1 induced secreted protein	Elm 1 (expressed in low metastatic type 1 cells) (Mu) Wisp 1 (Mu)
wisp-2 (CCN5) (20q12-13)	Wnt-1 induced secreted protein	rCop-1 (expression lost after transformation) (Mu) HICP (heparin induced CCN-like protein) Wisp-2 (Mu)
wisp-3 (CCN6) (6q23.1)	Wnt-1 induced secreted protein	

Tableau 2 : Les gènes CCN et leurs paralogues.

(D'après la revue **Perbal, 2001**).

B. Les différents membres et leur structure

Les gènes de la famille CCN ont une structure commune composée de 4 modules (**Figure 14**) codés par 5 exons. L'organisation multimodulaire des protéines CCN soulève des interrogations sur la fonction biologique de chacun des modules. Le rôle fonctionnel de chacun de ces modules est à l'heure actuelle inconnu mais deux hypothèses sont émises : soit l'activité de chaque module s'additionne, soit un module peut se substituer à un autre module. En fait une telle formation modulaire peut suggérer qu'à chaque module correspond une fonction qui peut interagir séquentiellement avec d'autres partenaires et que la fonction biologique des CCN dépend de ces effets combinés.

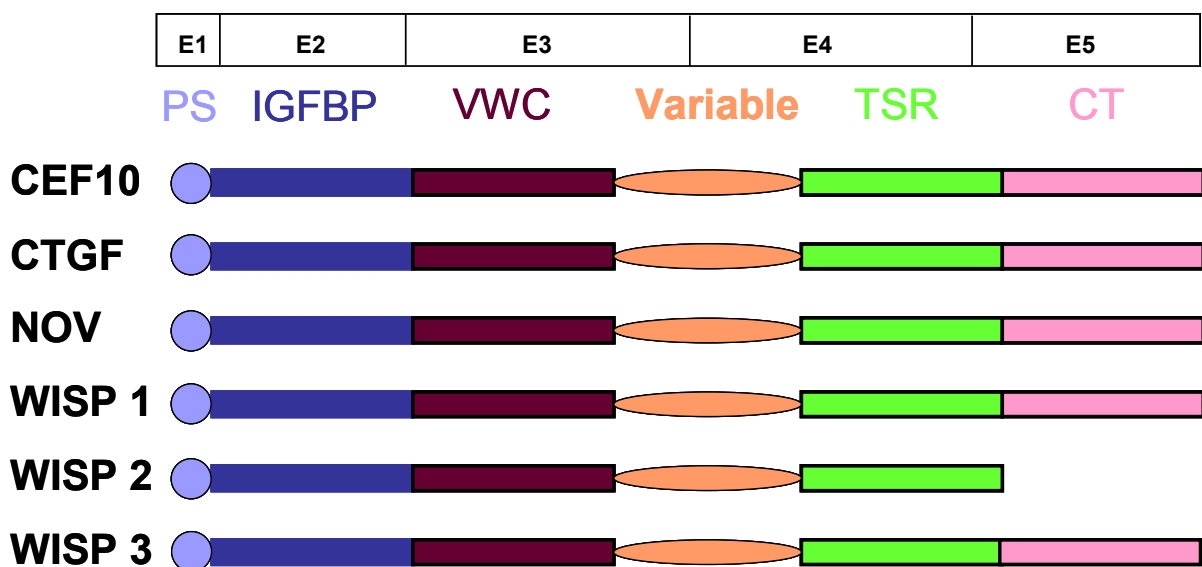


Figure 14 : Représentation de la structure multimodulaire des gènes de la famille CCN et des protéines correspondantes.

E1-5 : exons 1 à 5. PS : peptide signal, IGFBP : domaine Insulin-like Growth Factor Binding Protein-like, VWC : domaine Von Willebrand facto- like, TSR : domaine Trombospondine-like, CT : domaine Cystéine Knot. (D'après la revue **Perbal**, 2001 ; **Perbal**, 2004))

Cette représentation schématique de la structure protéique des CCN ne rend pas compte des toutes les protéines efficaces retrouvées *in vivo*. Il existe également des isoformes de ces protéines générées par des modifications post-traductionnelles ou des épissages alternatifs (**Perbal**, 2004).

C. Fonctions biologiques des CCN

Ces protéines sont sécrétées et associées aux protéines de la matrice extracellulaire. Elles régulent différentes fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la migration, la différenciation ou encore la survie cellulaire. Les profils d'expression des gènes CCN tendent à prouver qu'ils sont mis en cause dans de nombreux processus physiologiques. En effet, les transcrits des CCN sont retrouvés au sein des trois feuilletts embryonnaires. (**Perbal**, 2004). De plus, ces protéines semblent avoir un rôle au cours de l'angiogenèse, de la chondrogenèse et de certaines pathologies (**Takigawa**, 2003 ; **Lau et Lam**, 1999 ; **Brigstock**, 1999 ; **Perbal**, 2001).

Des grandes fonctions biologiques ont donc pu être mises en évidence pour chacun des membres de cette famille de gènes (**Tableau 3**) mais la liste qui suit n'est pas exhaustive. Cependant, les trois premiers membres de la famille ont particulièrement été étudiés du fait de leur découverte plus ancienne (**Rachfal et Brigstock**, 2005).

CCN	Fonctions biologiques
CCN 1	Gène précoce du développement (Lau and Nathan 1985) Adhésion cellulaire, migration cellulaire, survie cellulaire (Kireeva et al 1996, Leu et al 2002)
CCN 2	Agent mitogène, facteur chimiotaxique (Bradham et al 1991) Adhésion, migration cellulaire (Brigstock et al 1999)
CCN 3	Inhibiteur de la croissance cellulaire (Jolliot et al 1992) Oncogène si la protéine est tronquée (revue Brigstock 1999)
CCN 4	Inhibiteur de la croissance cellulaire (Hashimoto et al 1998)
CCN 5	Sénescence cellulaire (Zhang et al 1998) Suppresseur de tumeur (Pennica et al 1998)
CCN 6	Surrexprimé dans les cancer du côlon (Pennica et al 1998)

Tableau 3 : Fonctions biologiques des CCN.

*(D'après **Rachfal et Brigstock**, 2005)*

III. LE RECEPTEUR FAS

A. Introduction générale

Le récepteur Fas est une protéine classée dans la superfamille des récepteurs au « Tumor Necrosis Factor » (TNF) / « Nerve Growth Factor » (NGF) qui comportent tous dans leur partie extracellulaire plusieurs domaines riches en cystéines ou « Cystein Rich Domain » (CRD) (de 2 à 5 domaines). Parmi ces récepteurs, Fas (également appelé CD95 ou Apo1) a été largement étudié et décrit ; ce récepteur de mort présente un « Death Domain » (DD) ou domaine de mort intracellulaire, dont la présence est indispensable dans l'induction du signal pro-apoptotique. Ainsi, le récepteur Fas peut induire la mort cellulaire, notamment pour l'élimination de cellules surnuméraires ou potentiellement dangereuses (délétion des clones lymphocytaires autoréactifs lors de la lymphogenèse, éradication de cellules cancéreuses). Il a récemment été montré que le récepteur Fas possède également des propriétés non apoptotiques, lui procurant donc une dualité fonctionnelle. Celle-ci est non seulement impliquée dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la neuritogenèse mais elle pourrait également faciliter la progression des tumeurs et l'angiogenèse.

B. Structure de la protéine Fas

Fas est une protéine composée de 335 acides aminés. En fonction des études publiées, le poids moléculaire de ce récepteur varie de 45 à 52 kDa (**Oehm et al.**, 1992), cette variation étant très certainement liée à l'existence de formes différemment glycosylées du récepteur (**Keppler et al.**, 1999). D'autre part, des études ont mis en évidence qu'un épissage alternatif du transcrit de Fas entraîne l'excision des régions codant le domaine transmembranaire, ce qui permet la production de formes solubles du récepteur contribuant à la régulation de l'apoptose induite par FasL (**Cheng et al.**, 1994 ; **Papoff et al.**, 1999).

1. Partie extracellulaire

Les 156 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de Fas correspondent à la partie extracellulaire du récepteur. Ils sont organisés de sorte à former 3 CDR : acides aminés 28 à 65 pour le CRD1, 65 à 112 pour le CRD2 et 112 à 149 pour le CRD3. Des études de mutagenèse permettant de tronquer différents peptides dans la partie extracellulaire ont permis d'identifier la zone de fixation du ligand de Fas. Cette zone correspond aux domaines CDR2 et CDR3, les plus proches de la région transmembranaire du récepteur et est appelée région LBD pour "ligand binding domain". Le domaine CDR1 a quant à lui été plus récemment décrit comme une zone permettant l'oligomérisation du récepteur, indispensable à la transduction du signal apoptotique de Fas (**Papoff et al.**, 1999). Cette oligomérisation, qui s'est révélée indépendante du ligand, est réalisée grâce aux 65 acides aminés N-terminaux de la protéine qui forment un domaine d'auto-association ou PLAD ("pre-ligand association domain") (**Siegel et al.**, 2000) (**Figure 15**).

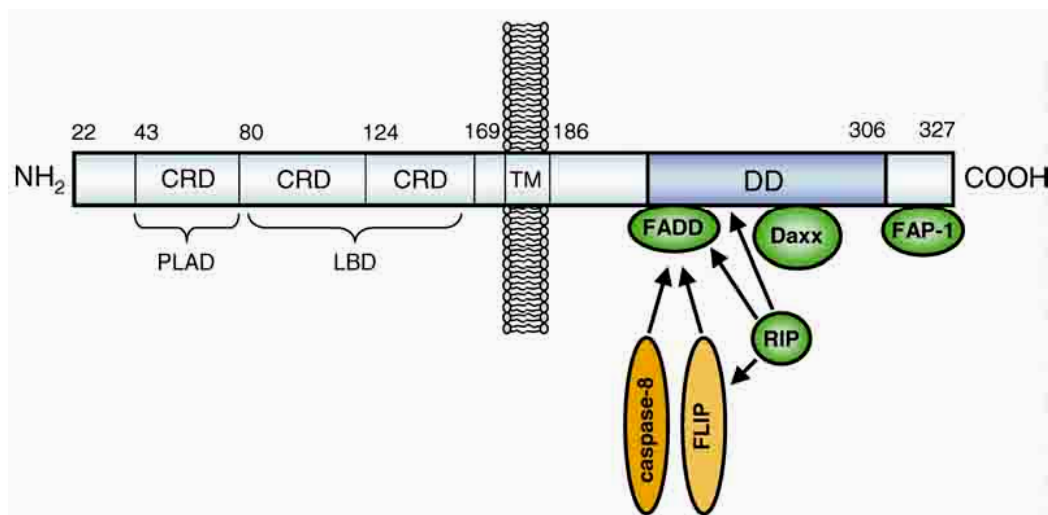


Figure 15 : Composition du récepteur Fas.

(d'après Lambert et al., 2003).

CRD : domaine riche en cystéine ; PLAD : domaine de pré-association ; LBD : domaine de liaison du ligand ; TM : domaine transmembranaire ; DD : domaine de mort

2. Partie intracellulaire

L'étude de la séquence en acides aminés de la partie intracellulaire du récepteur Fas ne met en évidence aucune séquence consensus correspondant à une quelconque activité

enzymatique (**Sartorius et al.**, 2001). En revanche, les 15 derniers acides aminés de la partie C-terminale de Fas déterminent une zone d'interaction avec la protéine tyrosine phosphatase FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1) dont le rôle est de réguler négativement l'apoptose médiée par le récepteur Fas (**Li et al.**, 2000). La délétion de ces 15 résidus N-terminaux entraîne une augmentation de l'apoptose transmise par Fas (**Sato et al.**, 1995). D'autre part, la partie intracellulaire de Fas comporte une zone de 68 résidus, possédant de très fortes homologies avec le récepteur TNF-R1, qui correspond au DD de Fas (**Itoh et al.**, 1991) (**Figure 15**). Des études de mutagenèse et de transgénèse (modèle de souris *lpr^{cg}*) ont permis de mettre en évidence que le résidu Valine 238 de ce domaine DD est indispensable à la transmission du signal apoptotique induit par le récepteur Fas. En effet, la mutation de cet acide aminé entraîne l'abolition du signal de mort. Le domaine DD du récepteur Fas comporte également des zones d'interaction avec deux molécules adaptatrices, « Fas associated death domaine » (FADD) et Daxx, qui permettent d'activer les voies de signalisation intracellulaires. Enfin, la séquence de la partie intracellulaire du récepteur Fas comporte un site de phosphorylation, en dehors du DD, au niveau de la zone proximale (**Kennedy et al.**, 1999).

C. Voies de signalisation induites par le récepteur Fas

1. Initiation du signal

Il a été clairement démontré que non seulement le récepteur Fas est capable de s'assembler en trimères indépendamment de l'engagement de son ligand, mais aussi que cet assemblage en trimères constitue un pré-requis à la liaison de FasL, et par conséquent à la transmission du signal de mort (**Papoff et al.**, 1999 ; **Siegel et al.**, 2000). La trimérisation de Fas ne peut être réalisée qu'en présence de la région « pre-ligand associated domain » (PLAD) du domaine extracellulaire du récepteur, région constituée du domaine CDR1, et donc parfaitement distincte du site de liaison à FasL. Ainsi, qu'il y ait absence ou présence du ligand, des monomères et des trimères du récepteur Fas co-existent dans la membrane plasmique (**Chan et al.**, 2000). La trimérisation des récepteurs entraîne très probablement des modifications de conformation de Fas, favorisant l'activation des voies de signalisation. Des molécules adaptatrices, telles que FADD, RIP, FAP-1 et Daxx, possédant toutes un DD sont alors recrutées par les trimères de Fas pour la transmission du signal.

2. Transduction du signal

a) Voies apoptotiques

- Formation du complexe de signalisation de mort induite (DISC)

Le récepteur Fas stimulé, qui ne possède aucune activité enzymatique intrinsèque, doit impérativement s'associer à diverses protéines capables de transmettre le signal de mort. Ainsi, la transmission du signal apoptotique de Fas nécessite la formation d'un complexe multiprotéique, nommé « complexe de signalisation de la mort induite » ou DISC, et composé d'agrégats de Fas, de la protéine FADD et de la caspase-8.

Après stimulation de Fas, par son ligand ou par un anticorps agoniste, la protéine FADD se fixe au récepteur (**Kischkel et al.**, 1995) *via* les DD homologues entre ces deux protéines (**Boldin et al.**, 1995 ; **Chinnaiyan et al.**, 1995). La protéine FADD va alors pouvoir recruter et activer les caspases initiatrices (caspase-8 ou -10) grâce à son domaine effecteur de mort « death effector domain » (DED) N-terminal. Des études ont de plus démontré que ce domaine est indispensable à la transmission du signal : en effet, une protéine FADD possédant son domaine DD mais tronquée dans son domaine DED est incapable d'induire l'activation de l'apoptose (**Chinnaiyan et al.**, 1996).

Dans un premier temps, le complexe de signalisation de la mort induite « Death inducing signal complex » (DISC) comporte à la fois des formes zymogènes et des formes activées de la caspase-8 (**Muzio et al.**, 1996). En effet, l'activation du récepteur Fas permet tout d'abord de recruter FADD et la pro-caspase-8, puis c'est la formation d'oligomères de pro-caspase-8 qui entraîne son auto-protéolyse et permet la libération de la sous-unité catalytique de la caspase-8 dans le cytoplasme (**Martin et al.**, 1998 ; **Salvesen et Dixit**, 1999). La caspase-8 active peut alors cliver la pro-caspase-3 pour l'activer, et cette dernière va initier une cascade de caspases effectrices qui vont à leur tour conduire la cellule à une mort inéluctable par apoptose (**Slee et al.**, 1999).

Il est important de noter le processus de mort cellulaire induite par Fas nécessite l'activation de la caspase-8 (**Varfolomeev et al.**, 1998). A ce stade, outre la voie de signalisation induite par le récepteur Fas (dite voie extrinsèque), une activation parallèle de la voie mitochondriale (dite voie intrinsèque) est détectée dans certains types cellulaires et

dépend du clivage de la protéine Bid par la caspase-8 qui permet l'activation de la voie mitochondriale, les deux voies aboutissant à l'activation commune d'une caspase effectrice, la caspase-3 (**Figure 16**).

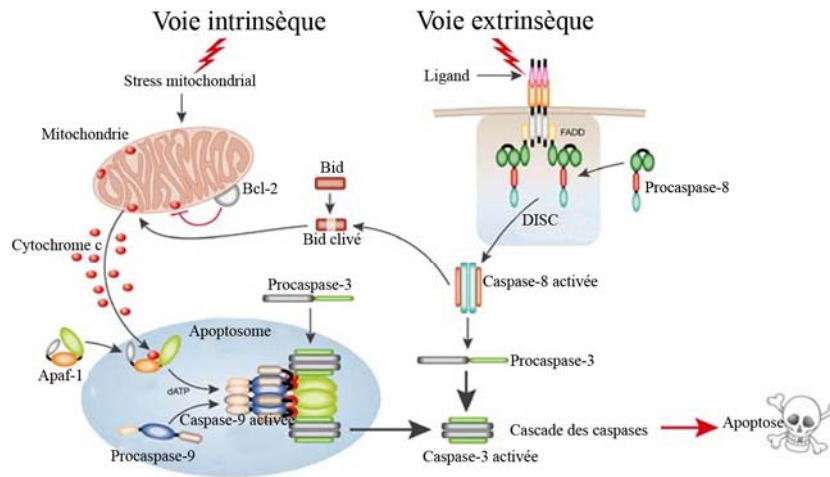


Figure 16 : représentation des voies extrinsèque et intrinsèque induites par la caspase-8.

Les deux voies pro-apoptotiques peuvent se rejoindre par l'intermédiaire du clivage de Bid. (D'après **Macfarlane et Williams, 2004**)

Ainsi, dans la voie mitochondriale intrinsèque, la caspase-8 activée clive la protéine Bid et génère ainsi un fragment (**Couzin et al., 2002**) qui se lie à la protéine Bax. Celle-ci correspond à un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, présent sous forme monomérique dans le cytosol. La liaison du fragment de Bid entraîne l'oligomérisation de Bax et son intégration dans la membrane externe mitochondriale. Ce processus déclenche l'ouverture de mégapores mitochondriaux, la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération du cytochrome c (**Eskes et al., 2000**).

Dans la voie extrinsèque, la fixation de FasL entraîne tout d'abord la formation de microagrégats du récepteur Fas puis le DISC est formé, grâce à l'intervention de filaments d'actine, et la caspase-8 est activée. Dans un premier temps, la caspase-8 activée est trop peu efficace pour la transduction d'un signal apoptotique mais elle permet en revanche, avec l'intervention de la voie des sphingomyélinases, la formation à la surface cellulaire de larges groupements membranaires de protéines Fas (**Gulbins et Grassme, 2002**). Ces regroupements membranaires ont pour rôle d'augmenter le signal transmis ainsi que

l'activation de la caspase-8 afin d'induire un signal apoptotique efficace. Enfin, le complexe Fas / FasL est internalisé, grâce à la formation de vésicules d'endocytose.

Compte tenu de la diversité des molécules impliquées dans la voie de signalisation empruntée à la suite de l'activation du récepteur Fas par FasL, différents types d'inhibiteurs vont pouvoir réguler le signal. Ainsi, les protéines FLIP (« Flice inhibitory protein ») et FAP-1 sont spécifiques à la voie extrinsèque, Bcl-2 et Bcl-xl agissent en bloquant la voie mitochondriale, et les protéines inhibitrices de l'apoptose « inhibitor of apoptosis proteins » (IAPs) interfèrent dans l'activation des caspases. Les régulations spécifiques de la voie de Fas seront développées dans la partie « régulateurs de la transduction du signal de Fas ».

b) Voie proliférative

A l'opposé de la voie conduisant à la mort cellulaire, l'activation du récepteur Fas peut également déclencher la prolifération de différents types cellulaires. Ce phénomène a notamment été décrit pour des cellules T stimulées par leur récepteur TCR (« T cell receptor »), des thymocytes humains purifiés (**Alderson et al.**, 1993) ou encore des fibroblastes humains de peau, pour lesquels la simple stimulation de Fas suffit à entraîner une prolifération significative (**Freiberg et al.**, 1997 ; **Jelaska et Korn**, 1998). De plus, un antagoniste de FasL, le Fas-Fc (qui est un compétiteur soluble du ligand de Fas) peut bloquer la prolifération des cellules T stimulées par des quantités suboptimales d'un anticorps anti-TCR.

A l'heure actuelle, même si les voies de signalisation empruntées restent à déterminer entièrement, il semble que les protéines FADD, FLIP, la caspase-8 et la voie de ERK « extracellular signal-regulated kinases » soient impliquées dans cette prolifération cellulaire en réponse à la stimulation de Fas (**Zhang et al.**, 1998 ; **Kennedy et al.**, 1999 ; **Shinohara et al.**, 2000 ; **Thome et Tschopp**, 2001). En effet, il a clairement été établi qu'une activation des caspases était induite par la stimulation du TCR (**Kennedy et al.**, 1999 ; **Alam et al.**, 1999) mais la nature de ces caspases et de leurs substrats reste controversée selon les modèles étudiés. Ainsi, une étude a mis en évidence l'activation de la caspase-8 mais sans clivage de la caspase-3 ni de son substrat, la PARP (poly-ADP-ribose-polymérase) (**Kennedy et al.**, 1999), alors que d'autres travaux ont montré l'activation des caspases-3, -6, -7 et -8 ainsi que le

clivage sélectif de quelques substrats de la caspase-3 telle que la PARP (**Alam et al.**, 1999). Néanmoins, l'ensemble de ces travaux démontre que la caspase-8, qui s'autoactive après son recrutement par FADD, est toujours impliquée dans l'initiation de la prolifération des cellules T induite par la voie de Fas (**O'Reilly et al.**, 2004).

Ainsi, le récepteur Fas présente une dualité fonctionnelle puisque son activation entraîne deux types de signalisation antagonistes : mort cellulaire ou prolifération. Parmi les différents facteurs pouvant contribuer à diriger de façon préférentielle vers la prolifération et la survie, les facteurs de croissance et les cytokines présents dans l'environnement cellulaire jouent un rôle prépondérant dans l'orientation de la réponse (**Rathmell et Goodnow**, 1998). Ainsi, des travaux récents de notre équipe ont mis en évidence que l'inhibition de la voie apoptotique de Fas pouvait être induite par l'activation d'un autre récepteur de mort, le récepteur de faible affinité pour les neurotrophines (p75^{NTR}). Cette interaction a été détectée au niveau de cellules neuroblastiques humaines (lignée SH-SY5Y), co-exprimant les deux récepteurs, et dans lesquelles la co-stimulation de Fas et p75^{NTR} aboutit à une inhibition du signal apoptotique, alors que l'activation isolée de chaque récepteur induit l'apoptose. Cette survie cellulaire est associée à l'activation de la caspase-8 et pourrait faire intervenir des protéines adaptatrices au sein d'un complexe de signalisation. (**Giraud et al.**, 2005 voir annexe 1).

3. Régulateurs de la transduction du signal de Fas

a) Les facteurs FLIP

Les protéines inhibitrices FLIP « FLICE inhibitory protein » suppriment l'activation de la caspase-8 (**Irmeler et al.**, 1997 ; **Keuz et al.**, 2004). FLIP contient deux DED qui vont lui permettre de se lier aux pro-domaines des caspases-8 ou -10 et ainsi empêcher leur recrutement par leurs récepteurs de mort (notamment Fas et TNF-RI) (**Bump et al.**, 1995). Cette famille d'inhibiteurs de caspases a été identifiée à l'origine dans le virus de l'herpès et le virus molluscipox (**Bertin et al.**, 1997 ; **Thome et al.**, 1997). Il existe une grande variété de transcrits de FLIP. Le transcrit le plus long (c-FLIP_L) possède, en plus des deux DED, l'équivalent d'un domaine caspase inactif. La forme courte (c-FLIP_S), pour sa part, ne présente que les deux DED. En dehors de son effet inhibiteur sur la caspase-8, il semble que c-FLIP_L

puisse avoir un effet activateur de la pro-caspase-8 (**Peter**, 2004) (**Figure 17**). Les protéines c-FLIP_L et la caspase-8 semblent nécessaires, par exemple, à la survie et à la prolifération des cellules T après la stimulation du TCR (**Budd et al.**, 2006).

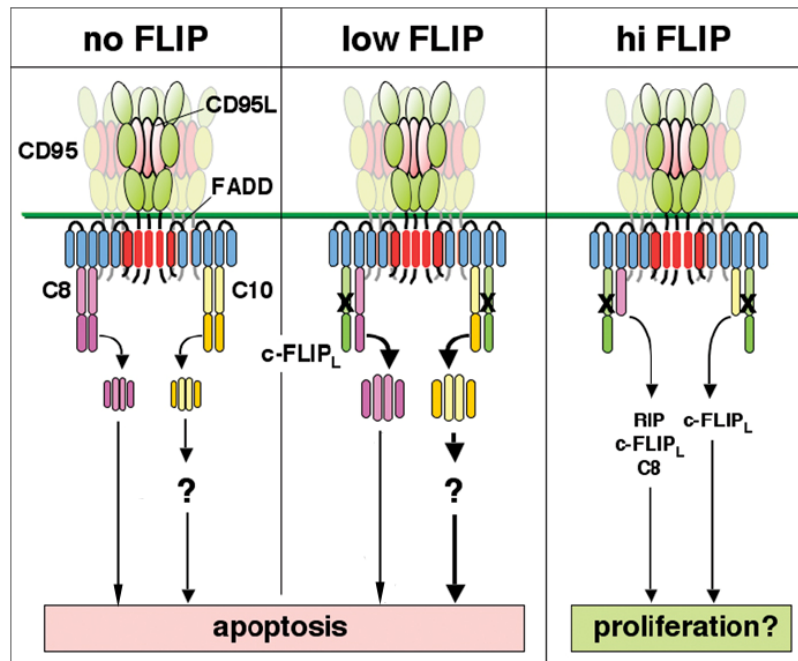


Figure 17 : Les fonctions de c-FLIP_L.

La fonction de la protéine c-FLIP_L dépend de sa concentration cytoplasmique. L'absence ou la faible concentration de cette protéine entraîne l'apoptose par l'intermédiaire notamment des caspase-8 et -10. En revanche, une forte concentration en c-FLIP_L (« hi FLIP ») permettrait la prolifération cellulaire. Ce mécanisme passerait également par l'intermédiaire des caspases-8 et -10 (D'après **Peter**, 2004).

b) Le facteur FAP-1

La protéine FAP-1 est une protéine tyrosine phosphatase identifiée comme étant associée au récepteur Fas (**Sato et al.**, 1995). Cette protéine est connue comme régulant négativement la voie de signalisation du récepteur Fas (**Li et al.**, 2000). Il semblerait que FAP-1 empêche le transport du récepteur Fas de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique (**Ivanov et al.**, 2003). Le rôle de FAP-1 apparaît cependant plus complexe. De récentes études semblent montrer que FAP-1 pourrait au contraire promouvoir l'apoptose induite par Fas. Après transfection de FAP-1 au sein d'une lignée cancéreuse de côlon SW480, il semble que

les cellules deviennent sensibles à l'apoptose par la voie de Fas, ceci étant dû à la surexpression de FAP-1 (**Miyazaki et al.**, 2006).

c) Fas et NF- κ B

L'activation de NF- κ B et l'induction de l'apoptose, en particulier par les récepteurs de mort, sont liées par des boucles de rétrocontrôle inhibitrices. Ainsi, la voie de signalisation NF- κ B régule négativement l'apoptose induite par les récepteurs de mort en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques. De plus, l'apoptose interfère avec l'activation de NF- κ B par l'intermédiaire des caspases, qui clivent plusieurs des composants de la voie de signalisation de NF- κ B (**Wajant et al.**, 2003). En outre, plusieurs études ont montré qu'une inhibition de l'apoptose dépendante de Fas permet d'augmenter fortement l'activation de NF- κ B (**Mandal et al.**, 1996 ; **Wajant et al.**, 2000). Même si les mécanismes exacts de cette activation de NF- κ B par la voie proliférative du récepteur Fas demeurent mal connus, il semble qu'ils fassent intervenir la protéine FADD et la caspase-8 (**Hu et al.**, 2000).

d) Fas et les protéines kinases activées par la mitose

Les cascades des MAPK « mitogen-activated protein kinase » sont formées par 3 voies fonctionnellement distinctes : les kinases régulées par des voies ERK la voie de la kinase p38 et la voie de la JNK « kinase N-terminale c-Jun ».

Les protéines RIP (« receptor interacting protein »), capables de s'associer avec le DD de Fas et d'interagir avec les protéines FADD et FLIP, ont une activité sérine / thréonine kinase. Ainsi, RIP2 peut phosphoryler ERK et activer la voie des ERK, indépendamment de MEK (« mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase ») (**Lambert et al.**, 2003).

La protéine Daxx (**Yang et al.**, 1997) est un répresseur de la transcription dépourvu de DD mais qui est néanmoins capable de s'associer avec le DD de Fas, dans une région distincte de celle de FADD. *In vitro*, Daxx potentialise l'apoptose induite par Fas (*via* FADD), mais, dans des lignées cellulaires déficientes en FADD, la protéine Daxx ne suffit pas à compenser cette absence. Deux mécanismes de signalisation indépendants sont activés. Ce sont les voies de JNK et SAPK ("stress-activated protein kinase"), qui participent à la régulation de la prolifération cellulaire (**Chang et al.**, 1998) et à la régulation transcriptionnelle de gènes

impliqués dans l'activation des caspases (**Torii et al.**, 1999). D'autre part, des études ont montré que la molécule Daxx intervient également lors de phénomènes de survie cellulaire et de prolifération induits par Fas (**Michaelson et al.**, 1999 ; **Michaelson**, 2000). Enfin, la délétion du gène codant la protéine Daxx est létale pour des embryons de souris et est accompagnée d'une apoptose massive, ce qui prouve que cette molécule peut correspondre à un facteur de survie, au moins durant le développement.

L'activation des JNK par la voie de Fas et l'apoptose sont régulièrement associées, probablement par l'intermédiaire des caspases (**Cardone et al.**, 1997 ; **Deak et al.**, 1998 ; **Widmann et al.**, 1997 et 1998). De plus, plusieurs études ont montré que l'inhibition des caspases entraîne un blocage conjoint de l'apoptose et de l'activation des JNK (**Lenczowski et al.**, 1997 ; **Deak et al.**, 1998 ; **Low et al.**, 1999 ; **Sabapathy et al.**, 1999 ; **Wilson et al.**, 1999 ; **Rochat-Steiner et al.**, 2000). Néanmoins, dans la plupart des cas, l'inhibition des JNK n'a aucun effet ou seulement un effet modéré sur l'apoptose induite par Fas, ce qui démontre que l'activation des JNK, bien que liée à l'apoptose, ne constitue pas une étape obligatoire dans la mort cellulaire induite par Fas.

e) Fas et Protéine Kinase C

Plusieurs études ont montré que l'activation de la PKC peut réprimer l'apoptose cellulaire, et notamment l'apoptose induite par la voie de Fas (**Gomez-Angelats et al.**, 2000 ; **Herrant et al.**, 2002 ; **Busuttil et al.**, 2002). C'est pourquoi, dans la lignée lymphocytaire T humaine Jurkat, deux mécanismes distincts vont permettre de diminuer l'activation de la PKC, et ce, dès les premiers stades de l'apoptose induite par le récepteur Fas (**Ruiz-Ruiz et al.**, 1997) : le premier utilise la voie des MAPK tandis que le second, majoritaire, est un mécanisme MAPK-indépendant (**Ruiz-Ruiz et al.**, 1999). La modulation de la voie apoptotique de Fas par la PKC et par des ecto-PKC, est réalisée en amont du recrutement de FADD et de la caspase-8 par une modification de l'efficacité de formation du DISC (**Gomez-Angelats**, 2001). En effet, comme cité précédemment, la trimérisation du récepteur Fas constitue un pré-requis à l'activation du récepteur par le ligand FasL, et il a récemment été montré que la phosphorylation extra-cellulaire du récepteur Fas par des ecto-kinases de type ecto-PKC participe à l'inhibition de l'agrégation du récepteur Fas dès ce stade (**Lautrette et al.**, 2006). Par conséquent, dès lors que Fas est phosphorylé par les ecto-PKC, la trimérisation est inhibée, le DISC ne peut plus être formé et le signal apoptotique est inhibé.

f) Sphingomyélinases, céramides, regroupements membranaires du récepteur Fas

L'activation du récepteur Fas induit l'hydrolyse en céramides (**Hetz et al.**, 2002) des sphingomyélines, par des sphingomyélinases acides (**Hannun et Luberto**, 2000) et neutres (**Arenz et al.**, 2001). Cependant, plusieurs études ont également montré que la voie de Fas n'était pas affectée en cas de déficit en sphingomyélinase acide, que ce soit chez des patients atteints du syndrome de Niemann-Pick (**Cock et al.**, 1998) ou chez des souris déficientes pour cette enzyme (**Santana et al.**, 1996). Par conséquent, les céramides ne seraient pas directement impliqués dans l'apoptose induite par Fas (**Hsu et al.**, 1998) et le rôle exact de leur production à la suite de l'activation de Fas reste à déterminer clairement.

Néanmoins, de récentes études ont mis en évidence un rôle crucial des céramides dans le regroupement membranaire et la polarisation des récepteurs Fas à la surface cellulaire. Ainsi, l'hydrolyse des sphingomyélines engendrée par l'activation de Fas permet la formation dans la membrane de larges domaines enrichis en céramides (**Gulbins et Grassme**, 2002). Ces domaines servent de support pour le regroupement membranaire et la polarisation des molécules de récepteur Fas (**Gulbins**, 2003). L'intégration du récepteur Fas dans les radeaux lipidiques a été recherchée et les résultats obtenus restent controversés selon les études réalisées (**Cremesti et al.**, 2001 ; **Algeciras-Schimmich et al.**, 2002 ; **Rotolo et al.**, 2005). Cependant, les études les plus récentes semblent confirmer la présence du récepteur Fas et des molécules composant le DISC au niveau des radeaux lipidiques (**Hueber et al.**, 2002 ; **Scheel-Toellner et al.**, 2002 ; **Eramo et al.**, 2004). De plus, dans la lignée neuroblastique SH-SY5Y, les récepteurs Fas et p75^{NTR}, lors de leur coactivation, sont colocalisés à la surface cellulaire, ce qui pourrait être lié à une augmentation de la fluidité membranaire. Fas, p75^{NTR} ainsi que les effecteurs de la voie apoptotique pourraient ainsi être localisés au sein de radeaux lipidiques (**Giraud et al.**, 2005 voir annexe 1).

D. Rôles physiologique et pathologiques

Le récepteur de mort Fas a initialement été identifié à la surface cellulaire de lymphocytes B et de fibroblastes humains (**Trauth et al.**, 1989 ; **Yonehara et al.**, 1989). Ultérieurement, des études ont montré que Fas est exprimé de façon physiologique et constitutive à la surface de nombreux types cellulaires : lymphocytes B et T activés, hépatocytes, cellules épithéliales du côlon (**Strater et Moller.**, 2000) et de l'endomètre utérin

(**Tanaka et al.**, 1999), cellules myocardiques (**Aoyama et al.**, 2002) ou encore cellules endothéliales (**Lidington et al.**, 1999). Il est également largement exprimé au niveau des cellules du système nerveux, que ce soit au niveau de neurones (corticaux, sensoriels, hippocampiques ou motoneurones) ou au niveau de cellules gliales (oligodendrocytes, astrocytes, cellules microgliales et cellules de Schwann). Malgré cette expression ubiquitaire, les seules conséquences directes de l'inactivation du récepteur Fas décrites à l'heure actuelle chez l'homme ne concernent que les cellules du système immunitaire (**Le Deist et al.**, 1996).

1. Rôle dans le système immunitaire

Les interactions Fas / FasL permettent de contrôler la survie des lymphocytes périphériques et participent ainsi fortement au maintien de la tolérance immunitaire aux autoantigènes (**Green**, 1994 ; **Ju et al.**, 1995). Deux lignées de souris transgéniques, *lpr* et *lpr^{cg}*, dont le gène codant Fas a été invalidé, ont permis de mettre en évidence l'implication du récepteur Fas dans l'élimination périphérique des lymphocytes autoréactifs (**Watanabe-Fukunaga et al.**, 1992). Ces animaux présentent différents désordres auto-immuns liés à des proliférations lymphocytaires T et B anormales. Ainsi, les lymphocytes T subissent une prolifération anarchique conduisant à leur accumulation dans la rate et les ganglions lymphatiques. De plus, les lymphocytes B autoréactifs ne sont pas éliminés chez ces animaux, ce qui conduit à des anomalies auto-immunes dues à la production d'autoanticorps similaires à ceux observés au cours du lupus érythémateux systémique humain. Chez l'homme, différentes mutations de Fas ont été décrites essentiellement dans des syndromes immunoprolifératifs auto-immuns et dans des lymphadénopathies massives (**Fisher et al.**, 1995 ; **Rieux-Laucat et al.**, 1995). Ainsi, le récepteur Fas joue un rôle physiologique crucial dans l'homéostasie des populations lymphocytaires B et T : il intervient d'une part dans l'élimination des lymphocytes périphériques autoréactifs, et d'autre part, en fin de réponse immunitaire spécifique, dans l'apoptose des lymphocytes activés, après leur prolifération et l'élimination de l'antigène (**Krammer**, 2000).

En plus de son implication dans le maintien de l'homéostasie des populations lymphocytaires, le récepteur Fas joue un rôle capital dans l'élimination des cellules tumorales, ou infectées par un virus par les cellules du système immunitaire. En effet, ces cellules tumorales ou infectées sont normalement éliminées par les cellules T cytotoxiques activées par le mécanisme suivant : ces lymphocytes T expriment FasL à leur surface, ce qui leur

permet d'induire le suicide des cellules infectées ou en voie de tumorigénération exprimant physiologiquement le récepteur Fas (**Figure 18**). Néanmoins, un grand nombre de cellules tumorales parvient à échapper à cette apoptose induite par les cellules T cytotoxiques, grâce à deux grands types de mécanismes : i) inhibition de l'expression de Fas à leur membrane (**Muschen et al.**, 2000) ou inactivation de Fas par des mutations ponctuelles, décrites tant au niveau des tumeurs solides (**Willis et al.**, 1999 ; **Mullauer et al.**, 2001) que des hémopathies (**Landowski, et al.**, 1997 ; **Gronbaek et al.**, 1998 ; **Mullauer et al.**, 2001) ; ii) expression du ligand de Fas, FasL, par les cellules tumorales (**Whiteside**, 2002), afin de déclencher l'apoptose des lymphocytes activés exprimant Fas. Ce dernier mécanisme est similaire à celui qui est observé au niveau des organes dits « privilégiés » (cellules de la cornée, cellules de Sertoli du testicule, microglie du système nerveux et placenta) et est assimilable à une barrière tissulaire physiologique contre les réponses du système immunitaire.

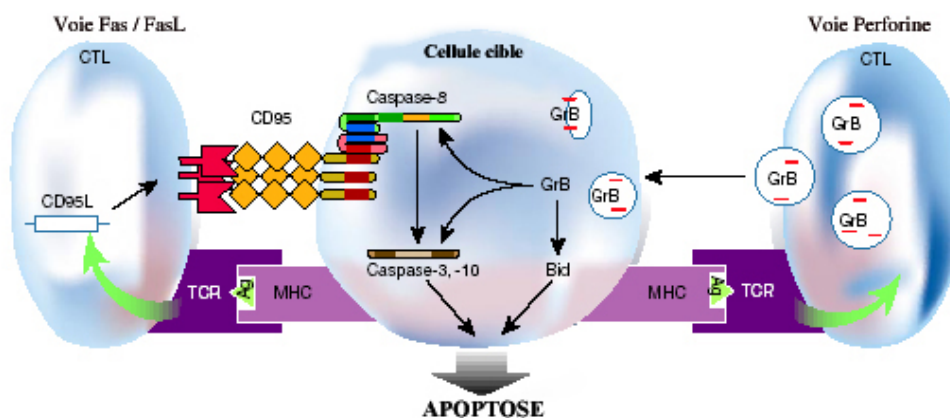


Figure 18 : Elimination des cellules pathogènes par les lymphocytes T CD8+.
(**Bobe**, 2002).

2. Système nerveux

L'apoptose constitue également un mécanisme physiologique crucial au cours de la formation du système nerveux embryonnaire, puisqu'elle permet l'élimination des neurones surnuméraires n'établissant pas de connexions synaptiques fonctionnelles (**Oppenheim**, 1991). En revanche, chez l'adulte, une augmentation de l'apoptose neuronale est impliquée dans différentes maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer ou encore lors des accidents vasculaires cérébraux ischémiques (**Honig et Rosenberg**, 2000).

a) Fas et neurones

Bien que la voie du récepteur Fas soit la principale voie d'apoptose décrite dans de nombreux systèmes, l'expression de Fas par les neurones reste très peu documentée.

L'expression du récepteur Fas par des neurones a été mise en évidence dans différentes conditions pathologiques, expérimentales ou non. Ainsi, le récepteur a été détecté dans les neurones de rats au cours de l'ischémie expérimentale (**Sakurai et al.**, 1998). D'autre part, Fas est exprimé par les neurones dans des conditions pathologiques, comme la maladie d'Alzheimer (**De la Monte et al.**, 1997), ou après exposition à l'interféron gamma (IFN- γ) (**Rensing-Ehl et al.**, 1996). De plus, *in vitro*, les motoneurones embryonnaires de rat co-expriment Fas et FasL et rentrent rapidement en apoptose par la voie de Fas lorsqu'ils sont cultivés en absence de facteur trophique (**Raoul et al.**, 1999) alors que Fas est présent sur des motoneurones de souris cultivés sans privation de sérum et par conséquent de facteurs trophiques (**Yi et al.**, 2000). Ainsi, le récepteur Fas n'est pas seulement exprimé par les neurones dans des conditions pathologiques mais également dans certaines conditions physiologiques normales. En effet, Fas est exprimé transitoirement par des neuroblastes dans le cortex de rats et de façon plus importante à des stades plus différenciés dans des cultures primaires de souris (**Cheema et al.**, 1999). Des études immunohistochimiques réalisées *ex vivo* ont permis de détecter l'expression neuronale de Fas dans le cerveau de souris juvéniles normales, mais cependant sans identification précise de la population neuronale impliquée (**Park et al.**, 1998). En revanche, le récepteur Fas n'est pas détectable dans des cultures de cellules issues de cerveaux de fœtus humains à 12-16 semaines de gestation (**Becher et al.**, 1998) alors que des travaux réalisés dans notre équipe ont montré que Fas est exprimé constitutivement uniquement par les motoneurones humains fœtaux en culture et sur coupes *ex vivo* (**Lautrette et al.**, 2003).

De plus, des études récentes semblent montrer que les fonctions non apoptotiques de Fas joueraient également un rôle important dans le système nerveux. En effet, les souris *lpr* présentent, en plus de leurs désordres immunitaires, une atrophie progressive des dendrites des neurones pyramidaux du SNC (**Sakic et al.**, 1998).

D'autre part, l'étude plus récente de la lignée neuroblastique humaine SH-SY5Y et de cultures primaires de neurones sensitifs de souris a mis en évidence que l'activation du

récepteur Fas induisait la croissance neuritique, par une voie indépendante de la caspase-8 et liée à l'activation des ERK (**Desbarats et al.**, 2003). En effet, on a observé que FasL entraînait une augmentation de la croissance dendritique, *in vivo* et *in vitro*, sur les cellules neuronales hippocampiques et corticales et en aucun cas l'apoptose de ces cellules neuronales. Cette arborisation des cellules neuronales par l'interaction Fas / FasL ne semble pas passer par la voie des caspases mais semble lié au DD et corrélé avec une augmentation de l'expression de la protéine Tau non phosphorylée. Dans ce cadre, Fas permettrait la croissance dendritique en agissant sur la phosphorylation de Tau qui par son interaction avec le cytosquelette permettrait les modifications structurelles pour la croissance dendritique (**Zuliani et al.**, 2006).

b) Fas et cellules gliales

Des études réalisées chez la souris ont montré une expression constitutive de Fas par les astrocytes cultivés et la microglie isolée du cerveau néonatal (**Lee et al.**, 2000). En revanche, chez l'homme, l'expression de Fas par les cellules gliales reste controversée. Ainsi, des travaux sur des cultures primaires de cellules gliales, de fœtus humains ou de cerveaux adultes, ont démontré une expression constitutive de Fas limitée aux astrocytes et pouvant être augmentée par différentes cytokines comme l'Interleukine (IL)-1, l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α (**Choi et al.**, 1999). Cependant une seconde étude n'a permis la mise en évidence de Fas qu'au niveau des oligodendrocytes dans le cerveau adulte (**D'Souza et al.**, 1996), son expression étant néanmoins également inductible par l'IFN- γ (**Pouly et al.**, 2000). Enfin, une troisième étude, réalisée avec des cultures primaires de système nerveux central de fœtus humains (12-16 semaines de gestation), a permis de détecter l'expression de Fas uniquement au niveau des astrocytes (**Becher et al.**, 1998). Cependant, la présence du récepteur Fas a été mise en évidence au niveau de lignées gliales et notamment au niveau de glioblastomes (**Frankel et al.**, 2002). Dans les glioblastomes, le récepteur Fas a pour rôle d'induire la prolifération et non l'apoptose des cellules des gliomes de haut grade co-exprimant Fas et FasL (**Gratas et al.**, 1997 ; **Song et al.**, 2006).

3. Rôle de Fas au cours de l'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus fondamental du développement et de la réparation des tissus. La néoangiogénèse peut cependant exercer des effets délétères, favorisant la pathogénicité de certaines maladies tels que les processus tumoraux dans lequel elle participe au caractère invasif des tumeurs. Le rôle du VEGF « vascular endothelial growth factor » a été mis en évidence lors de l'angiogénèse dans les processus tumorigènes. Dans les myélomes multiples la sécrétion de ce facteur est dépendante de la protéine p53 (**Tai et al.**, 2002). De plus, une étude sur 29 glioblastomes a montré que 86% d'entre eux expriment le VEGF et qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de cette molécule le niveau d'agressivité de ce type de tumeur (**Miyagami et Katayama**, 2005).

Dans les maladies inflammatoires, l'angiogénèse facilite le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation. En retour, les leucocytes stimulent la formation de néo-vaisseaux par la production de cytokines. L'activation des macrophages va induire la prolifération vasculaire grâce à la sécrétion de facteurs trophiques vasculaires comme le β -FGF « basic Fibroblaste Growth Factor » (**Polverini et al.**, 1977) et de TNF (**Leibovich et al.**, 1987). Le TNF est responsable de l'activité angiogénique du liquide synovial dans le cas de l'arthrite rhumatoïde (**Lupia et al.**, 1996). Dans ce cadre, le récepteur Fas peut jouer un double rôle. Dans les pathologies comme les rétinopathies, il induit l'inhibition de l'angiogénèse (**Kaplan et al.**, 1999). Cette activité anti-angiogénique va être possible par l'inhibition de l'expression de FasL due au TNF au niveau des cellules endothéliales (**Sata et Walsh**, 1998). L'activation du récepteur Fas peut également induire une néo-vascularisation. L'administration d'anticorps agonistes du récepteur Fas dans des implants de Matrigel peut induire l'angiogénèse et l'infiltration de cellules pro-inflammatoires (**Biancone et al.**, 1997). Le récepteur Fas peut donc à la fois promouvoir et inhiber l'angiogénèse, l'impliquant ainsi de manière directe dans les phénomènes de cancérisation mais également dans des voies de recherche thérapeutiques envisageables.

4. Rôle de Fas dans les thérapeutiques anti-cancéreuses.

Dans la littérature, de nombreux articles traitent de la sensibilisation des cellules au ligand FasL à la suite à l'exposition de celles-ci aux molécules utilisées en chimiothérapie (**Micheau et al.**, 1997 ; **Uslu et al.**, 1997 ; **Wu et al.**, 2000 ; **Debatin et Kramer**, 2004).

Des traitements avec des molécules anti-cancéreuses comme le méthotrexate, cisplatine, mytomicine ou doxorubicine, ou encore l'étoposide, entraîneraient une augmentation de l'expression du récepteur Fas ainsi que de son ligand FasL dans de nombreux cancers. De ce fait, les cellules seraient d'autant plus sensibles à l'apoptose induite par la voie de Fas. (**Muller et al.**, 1998 ; **Friesen et al.**, 1999 ; **Mo et Beck**, 1999).

D'autres mécanismes de sensibilisation à l'apoptose induite par Fas au cours de traitements anti-cancéreux ont été mis en évidence et notamment l'augmentation de l'expression de la caspase-8 ainsi que de FADD (**Micheau et al.**, 1999). Récemment, il a été démontré que certaines molécules comme le taxol augmentaient l'apoptose par l'activation des caspases -8 et -10 via leur activation par FADD (**Day et al.**, 2006).

La perte de fonction du récepteur Fas est souvent liée à des processus de cancérisation. Elle peut être due à une inhibition de l'expression du récepteur Fas ou à des épissages alternatifs produisant des molécules de Fas solubles ou encore des modifications d'un des acteurs de la voie de signalisation du récepteur Fas comme Bcl-2 (**Jaattela et al.**, 1995), Bcl-xL (**Srinivasan et al.**, 1998), FAP-1 (**Sato et al.**, 1995) ou FLIP (**Irlmer et al.**, 1997 ; **Kataoka et al.**, 1998). La perte d'expression de Fas a déjà été évoquée dans les cancers du côlon (**Owen-Schaub et al.**, 1994 ; **Yao et al.**, 2004), des mélanomes (**Leithauser et al.**, 1993), des cancers de l'œsophage (**Gratas et al.**, 1998), cancers du sein (**Keane et al.**, 1996), cancers hépatiques (**Strand et al.**, 1996) et le cancer bronchique (**Viard-Leveugle et al.**, 2003).

Cependant beaucoup de ces même cellules cancéreuses expriment FasL, conférant ainsi aux cellules un statut immunologique privilégié (**Griffith et al.**, 1995 ; **Griffith et al.**, 1996 ; **Bellgrau et al.**, 1995).

D'autre part, FasL peut être utilisé à des fins thérapeutiques. Pour prouver que FasL peut induire une diminution de taille d'une tumeur, *in vivo*, du surnageant de culture de neuroblastomes transfectés par le gène de FasL a été utilisé pour induire l'apoptose de cellules cibles (**Rensing-Ehl et al.**, 1995). L'efficacité de l'apoptose par l'activation de la voie de Fas, induite par l'utilisation d'anticorps anti-Fas agonistes ou des cellules exprimant FasL ou encore des protéines recombinantes (rFasL) dans les tumeurs, a été démontrée *in vivo* dans des transplantations de tumeurs solides sur la souris. Néanmoins, l'induction d'une réponse

inflammatoire par FasL pourrait faciliter l'expansion tumorale (**Philip et al.**, 2004) ou induire des hépatites fulminantes (**Ogasawara et al.**, 1993 ; **Tanaka et al.**,1997).

Des voies de recherche thérapeutique s'orientent sur des injections locales de FasL ou l'utilisation de vecteurs inductibles permettant une expression régulée de FasL (**Timmer et al.**, 2002).

IV. Épithélium olfactif

Dans la plupart des régions du système nerveux, la neurogenèse est limitée à une période définie du développement. Cependant, il existe quelques exceptions à cette règle connue depuis quelques années.

Le système olfactif a longtemps été considéré comme l'unique site d'un renouvellement neuronal physiologique chez l'adulte, les neurones étant remplacés régulièrement tout au long de la vie de l'individu (**Graziadei et Monti Graziadei**, 1980). Plus récemment, d'autres sites de renouvellement neuronal ont été trouvés dans le système nerveux central des mammifères (**Kuhn et al.**, 1996 ; **Bordey**, 2006). Toutefois, l'épithélium olfactif reste la source principale et la mieux connue du renouvellement neuronal chez l'adulte. Ce modèle a donc été privilégié lors de l'étude de la néoneurogenèse. Les premières données acquises sur ce sujet sont le fait d'études effectuées sur les mammifères, (**Carr et Farbman**, 1992 ; **Farbman**, 1997) cependant, elles ont été confirmées dans leurs grandes lignes chez les oiseaux (**Leibovici et al.**, 1996).

A. Le système olfactif

L'épithélium olfactif tapisse les parois de la partie supérieure de la cavité nasale et se présente comme un épithélium pseudo-stratifié. Il est constitué de trois types majeurs de cellules : les cellules de soutien, les cellules neurosensorielles et les cellules basales (**Figure 18**). En outre, chez l'adulte, il est traversé par les canaux excréteurs des glandes de Bowman sécrétant du mucus dans la cavité sous muqueuse.

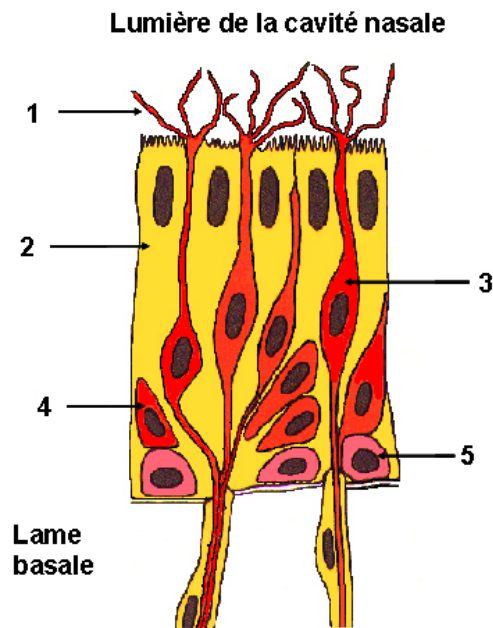


Figure 18 : Représentation d'une coupe transversale de l'épithélium olfactif.

1. cils dendritiques 2. cellules de soutien 3. cellules neurosensorielles 4. cellules basales globulaires 5. cellules basales horizontales.

1. Les cellules de soutien

Les cellules de soutien de l'épithélium olfactif traversent l'épithélium entre la lame basale et la lumière de la cavité nasale. Elles séparent et enveloppent partiellement les neurones olfactifs et remplissent plusieurs fonctions. Elles participent à la régulation de la composition ionique du mucus et interviendraient également dans la fonction de détoxification des molécules odorantes. Enfin, leur morphologie leur permettrait d'intervenir dans la cohésion de l'épithélium (Farbman, 1997).

2. Les cellules neuroréceptrices

Ce sont des neurones bipolaires. Leur corps cellulaire est localisé dans le tiers médian de l'épithélium. Ces neurones envoient un axone unique qui traverse la lame criblée de l'os éthmoïde chez les mammifères. Les projections axonales pénètrent dans le bulbe olfactif où elles forment des jonctions synaptiques avec les neurones de second ordre au niveau des glomérules olfactifs. A l'opposé, un dendrite se projette vers la lumière de la cavité nasale et

se termine par une protubérance portant 5 à 20 cils dendritiques. Ces cils, dont la membrane porte les molécules réceptrices aux molécules odorantes (OR), baignent dans l'épaisse couche de mucus qui tapisse l'épithélium et sont le siège de la réception des signaux olfactifs (**Caggiano et al.**, 1994). La dépolarisation membranaire qui suit l'excitation de la cellule nerveuse se propage jusqu'au soma puis tout le long de l'axone vers le bulbe olfactif. Il faut noter que les neurones olfactifs sont les seuls neurones qui établissent des contacts directs à la fois avec l'environnement extérieur et avec le système nerveux central. Ils sont donc soumis à de nombreux stress qui les fragilisent. Leur durée de vie est en moyenne de quelques semaines. Ainsi, pour compenser la disparition régulière des cellules différenciées, les neurones olfactifs possèdent la particularité d'être produits tout au long de la vie à partir de cellules souches (**Graziadei et Monti Graziadei**, 1980). Dans le modèle aviaire, ces cellules expriment la calmoduline kinase II calcium dépendante (**Leibovici et al.**, 1996), alors qu'elle expriment l'OMP (olfactory marker protein) chez les mammifères.

3. Cellules basales

Les cellules basales sont disposées dans le tiers basal de l'épithélium. Dans cette région des cellules en mitose peuvent être observées et sont considérées comme étant les cellules souches de l'épithélium olfactif. Deux sortes de cellules basales peuvent être distinguées.

a) Les cellules basales horizontales (ou HBCs)

Elles sont fusiformes et allongées le long de la membrane basale. Elles expriment la cytokératine 5 et 14 (**Satoh et Yoshida**, 2000) et pourraient être des cellules souches quiescentes.

b) Les cellules basales globulaires (ou GBCs)

Elles sont plus sphériques et superficielles seraient des cellules souches activées (**Farbman**, 1997). Ces cellules expriment le facteur de transcription Mash1 chez les mammifères et son homologue Cash1 chez le poulet (**Cau et al.**, 1997).

B. La neurogenèse olfactive

De nombreuses études ont permis de suggérer que parmi les cellules basales de l'épithélium olfactif se trouvent des cellules souches. Ces cellules, capables d'auto-renouvellement, se divisent de manière asymétrique donnant naissance à une nouvelle cellule souche et à un précurseur neuronal. Ce dernier va par la suite se différencier en une nouvelle cellule sensorielle. A la fois les GBCs et les HBCs incorporent de la thymidine tritiée ce qui démontre leur activité mitotique (**Graziadei et Monti Graziadei**, 1980). De plus, chez le rat, peu après un tel traitement, 90 % des cellules marquées se situent dans la partie profonde de l'épithélium, suggérant que ce sont les cellules basales qui donnent naissance aux neurones matures. Les GBCs pourraient être des précurseurs directs des neurones olfactifs du fait de leur activité mitotique augmentée après bulbectomie, condition qui aboutit à la surproduction de nouveaux neurones (**Carr et Farbman**, 1992 ; **Caggiano et al.**, 1994). Cependant il semble que les HBCs expriment un certain nombre de marqueurs caractéristiques des cellules souches (**Carter et al.**, 2004) De plus, de récentes études tendent à prouver au contraire que ce seraient les HBC qui seraient les cellules souches de cet organe (**Comte et al.**, 2006, voir annexe 2).

Il semble donc qu'en dehors de sa fonction chimiosensorielle, le système olfactif représente un modèle unique de néoneurogenèse permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régulent l'activation et l'auto-renouvellement des cellules souches ainsi que la différenciation des précurseurs neuronaux. De plus, ce potentiel de renouvellement neuronal ouvre de grandes perspectives thérapeutiques.

V. Glioblastomes

A. Données générales

Les glioblastomes sont les tumeurs astrocytaires malignes les plus indifférenciées du SNC, le plus souvent localisés au niveau des hémisphères cérébraux. Chez l'adulte, ce sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes (20 % de toutes les tumeurs intracrâniennes) avec une incidence de l'ordre de 3 nouveaux cas par an et pour 100 000 habitants, soit environ 2400 nouveaux cas par an en France. Ils surviennent à tout âge mais dans 70 % des cas entre 45 et 70 ans. Les glioblastomes forment des masses molles, riches en vaisseaux sanguins, de 3 à 10 cm de diamètre, de couleur vineuse, hétérogènes avec des zones compactes actives et des zones de nécrose étendues, parsemées de vaisseaux thrombosés et qui infiltrent le tissu cérébral. Cependant, ces tumeurs ne sont pratiquement jamais associées à l'apparition de métastases. La tumeur est entourée d'une importante réaction oedémateuse qui est habituellement traitée par des glucocorticoïdes. Ces lésions se manifestent par des signes d'hypertension intracrânienne qui s'associe souvent à des changements du comportement, à des crises comitiales, à des déficits neurologiques focaux. Cette tumeur évolue rapidement, en 2-3 mois, et même après chirurgie, radiothérapie puis chimiothérapie, son pronostic reste sombre sauf si le glioblastome provient de la transformation maligne d'un astrocytome de bas grade (glioblastome secondaire). La survie ne dépasse pas 1 à 2 ans après le diagnostic. Le traitement associe habituellement la chirurgie et la radiothérapie. La chimiothérapie est peu efficace en raison de problèmes de diffusion des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique et surtout dans la zone tumorale.

Ces gliomes se développent aux dépens des cellules gliales de type astrocytaire. Il existe différents types de tumeurs astrocytaires, classées par ordre d'agressivité par l'Organisation Mondiale de la Santé : les astrocytomes diffus (grade II), les astrocytomes anaplasiques (grade III) et enfin les glioblastomes multiformes (grade IV). Les anomalies génétiques des tumeurs semblent différentes selon qu'il s'agit d'un glioblastome primaire (de novo) ou d'un glioblastome secondaire (développé à partir d'une tumeur astrocytaire bénigne). En effet, parmi les quatre gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, p16 / CDKN2 et PTEN /

MMAC1) et les deux oncogènes (MDM2 et CDK4) fréquemment altérés dans les gliomes, la mutation du gène p53 semble plutôt associée à des tumeurs astrocytaires qui évoluent progressivement vers la malignité, alors que l'amplification de l'EGFR est plutôt associée aux glioblastomes *de novo* (**Hoang-Xuan et al.**, 1999).

L'origine des gliomes pourrait correspondre à une anomalie concernant le développement des progéniteurs gliaux issus de la cellule souche neuroépithéliale.

B. Cellules souches, différenciation gliale et normale chez l'adulte

Chez l'adulte dans le système nerveux central (SNC) il existe des zones contenant des cellules souches, les cellules souches neuroépithéliales. Ces dernières sont localisées dans le gyrus denté, l'hippocampe et la zone sous ventriculaire. Elles ont pour caractéristique de se renouveler de façon permanente et de générer des progéniteurs neuronaux et gliaux résultant de divisions asymétriques (**Ming et Song**, 2005). Outre les cellules microgliales dont l'origine provient de la migration précoce de monocytes issus de la moelle osseuse, les autres cellules gliales, astrocytaire et oligodendrocytaire, pourraient dériver d'un précurseur glial commun : le GRP (« glial-restricted progenitor »). Bien que cette origine soit encore discutée, ce progéniteur tripotent serait à l'origine des cellules astrocytaires de type I et II (identifiés par des marqueurs phénotypiques) et des oligodendrocytes (**Gregori et al.**, 2002 ; **Noble et al.**, 2004 ; **Fan et al.**, 2006) (**Figure19**). Les astrocytes de type I participeraient à la formation de la barrière hémato-méningée isolant les neurones des capillaires sanguins. Les astrocytes de type II permettraient de réguler les concentrations ioniques autour des neurones, permettent la sécrétion de neurotransmetteurs et nourrissent les neurones (**Ullian et al.**, 2001). Ces cellules jouent un rôle essentiel dans la différenciation (**Lemke**, 2001) et la survie des neurones (**Bar**, 2000). Les astrocytes ont un pouvoir migratoire et interviennent également lors de réactions inflammatoires et jouent un rôle dans la « cicatrisation gliale » (**Ridet et al.**, 1997 ; **Etienne-Manneville**, 2002).

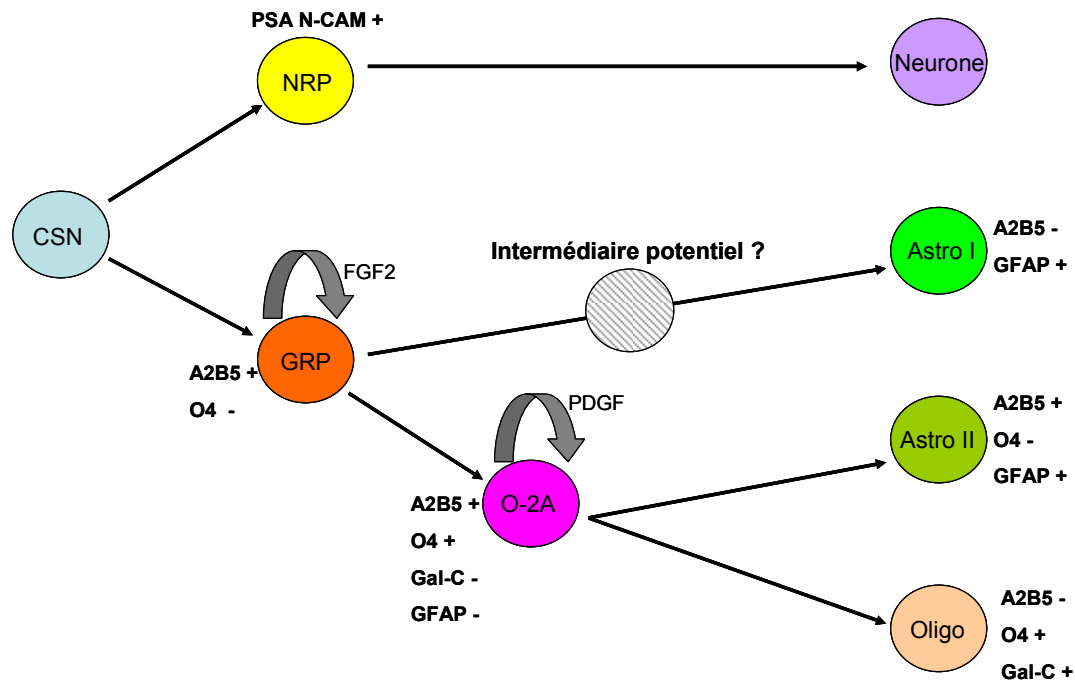


Figure 19 : Hypothèse de la différenciation astrocytaire à partir d'une cellule souche neuroépithéliales.

CNS : cellule souche neuroépithéliale ; GRP : glial-restricted progenitor ; NRP : neuronal-restricted progenitor ; FGF2 : Fibroblast growth factor 2 ; PDGF : Platelet derived growth factor ; Astro I et II : astrocytes de type I et II ; Oligo : oligodendrocyte ; Gal-C : galactocérébroside ; GFAP : protéine gliale fibrillaire acide.

A partir de la cellule souche neuroépithéliale (CNS) s'individualisent deux types de progéniteurs, ceux ne donnant que des neurones (NRP) et ceux permettant la formation des astrocytes et des oligodendrocytes (GRP). Les cellules GRP sont reconnues par les anticorps A2B5 reconnaissant des gangliosides polysialylés (Kundu et al., 1983). Ces cellules auraient un pouvoir mitotique et différenciant sous l'action du FGF2 permettant d'une part la production directe ou non d'astrocytes de type I et d'autre part la formation du précurseur O-2A (Gregori et al., 2002 ; Noble et al., 2004). Ce précurseur fut initialement découvert avant les cellules GRP par Raff et son équipe. Ils isolèrent ces cellules à partir de culture de nerfs optiques de jeunes rats et démontrèrent que ces cellules pouvaient donner des oligodendrocytes et des astrocytes de type II (Raff et al, 1983 ; Barnett et al., 1993 ; Kondo et Raff, 2000). Ce précurseur O-2A est reconnu par les anticorps A2B5 et O4 (reconnaissant

les sulfatides), il n'exprime ni de galactocérébroside (marqueur des oligodendrocytes) ni la GFAP (marqueur des astrocytes) (**Gregori et al.**, 2002). In vitro, les cellules O-2A répondent à la stimulation par le PDGF en entrant en mitose (**Hall et al.**, 1996). Les O-2A pourraient produire les oligodendrocytes (A2B5 -, O4 +, Gal-C +) et les astrocytes de type II (A2B5 +, O4 -, GFAP+). Néanmoins de nombreuses controverses subsistent sur les propriétés du précurseur de ces deux derniers types cellulaires (**Noble et al.**, 2004).

La caractérisation de ces progéniteurs fait actuellement l'objet de nombreuses recherches en raison de la découverte récente de progéniteurs multipotents dans les glioblastomes qui pourrait expliquer l'hétérogénéité cellulaire de ces tumeurs cérébrales. La diversité de ces progéniteurs pourrait être limitée par un blocage de la différenciation cellulaire comme cela a été observé pour la première fois lors de leucémies (**Buick et al.**, 1979). Ces progéniteurs transformés ne pourraient achever leur différenciation en astrocyte ou oligodendrocyte (**Figure 20**) (**Sanai et al.**, 2005). L'identité de ce progéniteur glial conduisant à la cancérisation pourrait être l'O-2A (**Noble et Mayer-Proschel**, 1997).

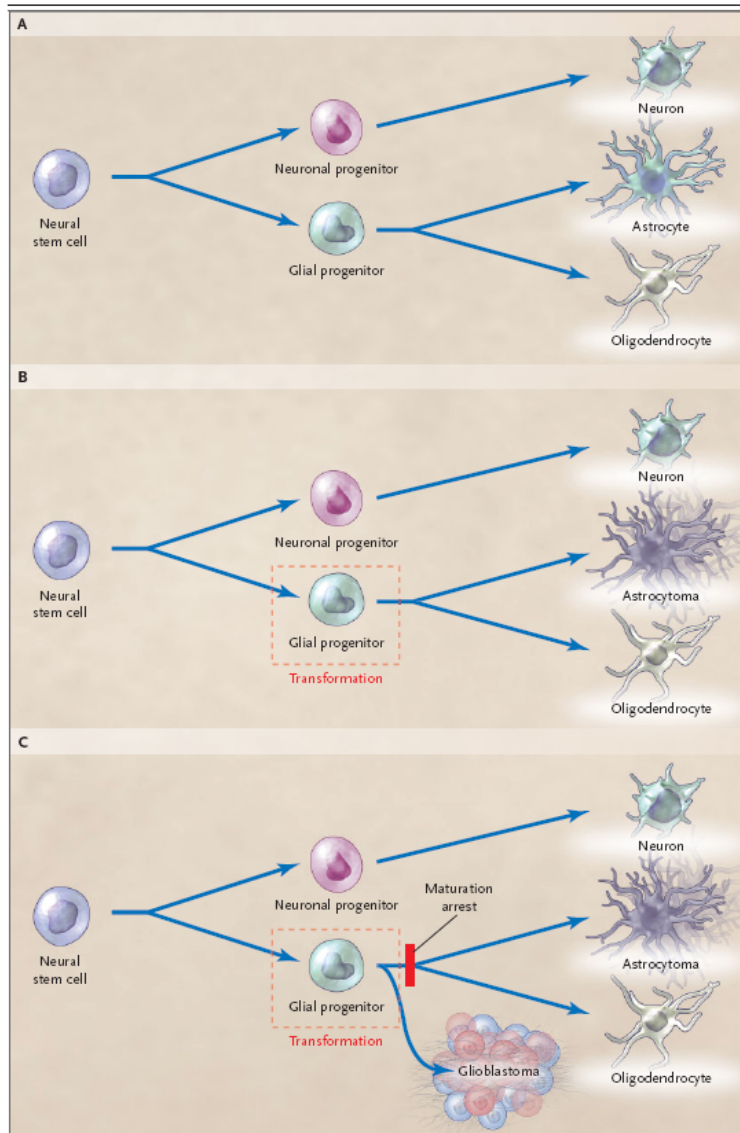


Figure 20 : Théorie de l'arrêt de la maturation cellulaire.

A : développement normal des progéniteurs neuronaux et gliaux permettant la différenciation des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes.

B : Formation des astrocytomes par transformation néoplasiques des progéniteurs gliaux. Ces astrocytomes peuvent devenir des glioblastomes.

C : Les progéniteurs gliaux accumulent des mutations conduisant à une accélération de la croissance des glioblastomes et à un arrêt complet de la maturation cellulaire. (D'après Sanai et al., 2005)

L'origine des glioblastomes est très discutée. L'une des premières hypothèses soutenue est la dédifférenciation de cellules gliales provoquant la cancérisation (**Uhrbom et al., 2002**) mais cette théorie n'explique pas tous les types de tumeurs astrocytaires comme les oligoastrocytomes (**Sanai et al., 2005**). La région sous ventriculaire, riche en cellules souches (**Sanai et al., 2004**), est proposée depuis longtemps comme étant une zone potentielle d'émergence des glioblastomes (**Globus et al., 1942 ; Globus et al., 1944**). En effet, de nombreux glioblastomes sont périventriculaires ou en continuité avec la région périventriculaire. Ils expriment fréquemment les mêmes marqueurs que les progéniteurs de cette structure (**Koos et Horaczek, 1985 ; Dahlstrand et al., 1992 ; Tohyama et al., 1992 ; Sutton et al., 1992 ; Alvarez-Buylla et Garcia-Verdugo, 2002**). De plus, ceci est conforté par le fait que cette zone puisse être plus facilement exposée à des virus oncogènes ou à des substances carcinogènes comme cela a été démontré expérimentalement chez l'animal (**Vick et al., 1977**). Les cellules immatures de la région périventriculaire ont, comme les cellules cancéreuses, des propriétés migratoires et un important potentiel infiltratif (**Shoshan et al., 1999 ; Doetsch et al., 2002 ; Palmer et al., 2000**). Récemment, des cultures de cellules tumorales gliales provenant de patients ont permis de mettre en évidence la présence de cellules exprimant le CD133, marqueur de cellules souches, et ayant la capacité de former des neurosphères comme les cellules souches neurales (**Singh et al., 2004**). Comme lors de la différenciation des cellules souches du neuroépithélium, les voies de signalisations induites par les facteurs hedgehog (**Dahmane et al., 2001**) ou l'EGF (**Wechsler-Reya et Scott, 2001**) sont souvent impliquées au cours de la formations des glioblastomes. De plus, afin de proliférer, les glioblastomes sécrètent de nombreux facteurs de croissance et surexpriment les récepteurs de ces derniers (**Wen et al., 2006**). Les astrocytomes de bas grade (WHO de grade II) surexpriment le PDGF et le récepteur au PDGF alors que les glioblastomes surexpriment le récepteur à l'EGF (**Maher et al., 2001**). Pour ces raisons, de nouvelles thérapies inhibant ces facteurs de croissances ou stimulant les voies pro-apototiques sont étudiées (**Wen et al., 2006**).

Le rôle de Notch dans les cellules souches hippocampiques ainsi que dans les cellules tumorales a été étudié. Au moyen de transfections du domaine actif de Notch1 ou de Notch3 des précurseurs hippocampiques ont pu être stabilisés et maintenu en culture (**Tanigaki et al., 2001**). De plus, les cellules exprimant fortement le domaine actif de Notch présentent la morphologie et les marqueurs des cellules astrocytaires (**Lundkvist et Lendahl, 2001**).

L'implication de Notch au cours de la différenciation de la lignée gliale (**Lundkvist et Lendahl**, 2001) suggère que des modifications de la voie de signalisation de Notch pourraient participer au processus de tumorigenèse ou que ce récepteur Notch pourrait servir de marqueur d'agressivité des cancers et notamment des glioblastomes (**Purow et al.**, 2005).

C. Fas et voies de recherche thérapeutiques

Aucune thérapeutique conventionnelle ne s'avère être curative ce qui nécessite donc la recherche de nouveaux traitements. C'est dans ce cadre que des molécules comme Fas peuvent être associées aux chimiothérapies classiques afin de diminuer la taille des glioblastomes (**Roth et al.**, 1997). Comme c'est le cas pour les cellules neuroblastiques, les gliomes peuvent également être influencés par les récepteurs de mort. En effet, le récepteur Fas peut être exprimé au niveau d'astrocytomes ou de glioblastomes et induire l'apoptose de ces cellules (**Kwon et al.**, 2001 ; **Tani et al.**, 2001 ; **Ciusani et al.**, 2002). Il peut également avoir un effet pro-inflammatoire (**Choi et al.**, 1999 et 2003) lorsque les cellules sont stimulées par FasL ou au contraire activer la prolifération selon un système d'activation autocrine des cellules co-exprimant Fas et FasL (**Shinohara et al.**, 2000). Afin de potentialiser l'effet apoptotique de Fas dans les glioblastomes, des associations à d'autres molécules s'avèrent donc nécessaire et pourraient concerner des molécules actuellement utilisées dans le cadre du glioblastome Parmi celles-ci, l'étoposide augmente légèrement la survie grâce à son effet cytotoxique (**Lavicka et al.**, 2001). De même, la dexaméthasone, glucocorticoïde habituellement employé pour ses actions anti-oedémateuse et anti-inflammatoire possède un effet anti-tumoral sur des tumeurs expérimentales induites par la lignée gliale humaine U-87 MG (**Wang et al.**, 2004).

MATERIEL ET METHODES

I. Modèles animaux

Les modèles animaux utilisés ont été de deux types. Le modèle aviaire est un modèle couramment utilisé lors des études sur le développement car il offre plusieurs avantages : une accessibilité aisée aux embryons et une discrimination du stage de développement précise. Le modèle rat nous a permis de nous rapprocher de la physiologie humaine dans le cadre d'études de xénogreffes.

A. Modèle aviaire

Afin de réaliser nos expériences, nous utilisons des embryons de poulet (*Gallus gallus* *linné*). Les œufs fécondés proviennent d'élevages commerciaux (INRA, Tours, France). La race des poulets utilisée pour notre étude est une race hétérozygote pour le gène « cou nu », sélectionnée par l'INRA.

Les œufs fécondés sont stockés au minimum 24H dans une étuve (Elvetec, France) à température constante 15°C. Pour les expériences, ils sont incubés à 38°C dans une couveuse (Maino, Italie) en atmosphère humide afin d'assurer le développement des embryons.

Les étapes du développement embryonnaire chez le poulet sont déterminées selon les tables de Hamburger et Hamilton (**Hamburger et Hamilton**, 1952). Pour les stades précoces (stade 7 à 17 selon H&H, correspondant au développement embryonnaire de 1 à 2,5 jours de développement), le développement est évalué plus précisément par le nombre de somites. A partir du 4^{ème} jour d'incubation et jusqu'à l'éclosion au 21^{ème} jour chez le poulet, le stade du développement est évalué par le nombre de jours d'incubation.

1. Prélèvements d'épithéliums olfactifs de poulets.

Les épithéliums olfactifs d'embryons de poulet sont prélevés sur des embryons de 14 jours par microchirurgie à l'aide d'une loupe binoculaire. Ils sont déposés dans des boîtes de Pétri, la sous-muqueuse est enlevée et les épithéliums sont découpés à l'aide de pince de Paschell Wolff dans du milieu Neurobasal (Invitrogen, France). Les tissus sont dissociés

chimiquement et les cellules mises en culture selon les conditions décrites ci-dessous (cf infra, « cultures cellulaires »).

2. Coupes tissulaires d'embryons de poulets

Les embryons sont prélevés à différents stades de développement, sacrifiés et conservés à -80°C. Les tissus congelés sont coupés à l'aide d'un cryostat Leica CM3050 (Allemagne). Des coupes sériées d'embryons *in toto* (ED4 à ED20) de 8 ou 12 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames super frost permettant une meilleure fixation des tissus (Menzel Glazer, Allemagne) et conservées à - 80°C.

B. Modèle développé chez le rat

1. Prélèvements des épithéliums olfactifs

Les rats (Wistar, Dépré, Chateauroux, France) âgés de 5 à 7 jours en post-natal sont sacrifiés par décapitation selon les recommandations du comité d'éthique français. Les têtes sont placées sous une loupe binoculaire afin de pratiquer les prélèvements. Après retrait de la peau au niveau du museau de l'animal et des tissus cartilagineux et conjonctifs, au niveau de la cavité nasale, les épithéliums olfactifs apparaissent de part et d'autre du septum nasal. Les deux épithéliums sont décollés de chaque côté du septum nasal et séparés de la lame criblée de l'os ethmoïde (zone de passage des axones qui établissent des connexions avec le bulbe olfactif). Les prélèvements ainsi effectués sont placés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Neurobasal (NB, Invitrogen, France) avant d'être dissociés chimiquement puis mis en culture (cf infra, « cultures cellulaires »).

2. Modèles de glioblastomes obtenus par xénogreffes de cellules tumorales gliales humaines

Toutes les manipulations réalisées sur les animaux ont été effectuées selon les recommandations du Comité National d'Éthique.

Cette étude a été réalisée afin de déterminer l'effet anti-tumoral de molécules sur des modèles de glioblastomes développés chez le rat, au moyen d'une lignée de cellules gliales

humaine, la lignée U-87 MG, implantée par stéréotaxie dans des cerveaux de rats immunodéprimés. Les rats utilisés sont des rats Nude (athymiques), femelles, âgées de deux mois (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) nourris et abreuvés à volonté et maintenus dans des cages individuelles en atmosphère stérile.

Toutes les interventions chirurgicales ont été réalisées dans des conditions optimales de stérilité.

a) Détermination de la zone d'implantation

La localisation choisie pour l'implantation des cellules dans le cerveau est le putamen caudal droit. Afin d'observer précisément la région anatomique choisie chez chaque sujet d'étude, le putamen caudal est repéré grâce à ses coordonnées stéréotaxiques par rapport au bregma (zone d'union de deux sutures), coordonnées déterminées grâce à l'atlas de Paxinos et Watson (**Figure 21**).

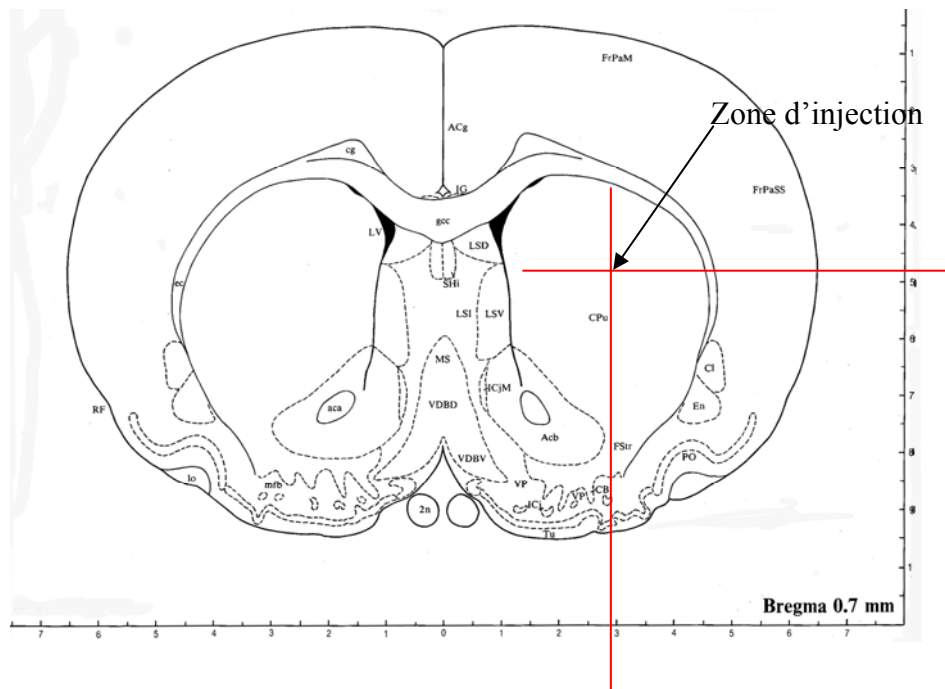


Figure 13

2n	optic nerve	FStr	fundus striati	SHi	septohippocampal nu
aca	ant commissure, ant	gcc	genu corpus callosum	Tu	olf tubercle
Acb	accumbens nu	ICj	islands of Calleja	VDBD	nu vertical limb diagonal band, dors
ACg	ant cingulate cortex	ICjM	islands of Calleja, major island	VDBV	nu vertical limb diagonal band, vent
CB	cell bridges between caudate putamen and olf tubercle	IG	induseum griseum	VP	vent pallidum
cg	cingulum	lo	lat olf tr		
Cl	claustrum	LSD	lat septal nu, dors		
CPu	caudate putamen	LSI	lat septal nu, intermediate		
ec	ext capsule	LSV	lat septal nu, vent		
En	endopiriform nu	LV	lat ventricle		
FrPaM	frontoparietal cortex, motor area	mfB	med forebrain bundle		
FrPaSS	frontoparietal cortex, somatosensory area	MS	med septal nu		
		PO	primary olf cortex		
		RF	rhinal fissure		

Figure 21 : Planche de l'atlas de Paxinos et Watson, 1982.

Selon ces informations, les coordonnées stéréotaxiques du lieu d'injection ont été déterminées par rapport au bregma :

- Antéro-postérieure : + 0,5 mm
- Latéral : - 2,7 mm
- Dorso-ventral : - 4,4 mm

La localisation exacte de l'implantation a ensuite été adaptée aux rats greffés et au matériel utilisé. Les coordonnées ont ainsi été vérifiées en administrant 1 μ L de bleu de méthylène (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) dans les cerveaux de trois rats. Après injection, les rats ont été sacrifiés et les cerveaux congelés. Des coupes coronales de 12 μ m d'épaisseur sont réalisées grâce à un cryostat et le lieu de l'injection est repéré grâce à la présence de bleu de méthylène.

b) Anesthésie des rats

Une semaine après leur arrivée dans l'animalerie, les rats sont pesés puis anesthésiés. Une première injection de midazolam (0,5 mg / 100 g, i.m., Merck, Lyon, France) a été effectuée (décontractant musculaire) et l'anesthésie est réalisée grâce à de la Kétamine 500[®] (5 mg / 100 g, i.p., Virbac Carros, France).

c) Préparation des cellules

Les cellules, U-87 MG, sont tout d'abord décollées de leur support de culture grâce à du versène (Invitrogen, France), comptées sur lame de Malassez, puis reprises dans du liquide céphalo rachidien (LCR) de synthèse stérile (147 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 0,85 mM MgCl₂, Sigma Aldrich) à une concentration de 10⁶ cellules dans 4 µL.

La viabilité des cellules a été déterminée après une heure dans le LCR grâce à du bleu de trypan (Sigma Aldrich).

d) Protocole de greffes des cellules

Les greffes ont été réalisées en utilisant un appareil d'implantation stéréotaxique (David Kopf instruments, CA, USA) :



Figure 22 : appareil de stéréotaxie utilisé.

La tête des rats est fixée dans l'appareil de stéréotaxie (**Figure 22**) grâce aux dents et par l'intermédiaire de barres d'oreilles qui entrent dans le conduit auditif de l'animal. Après nettoyage chirurgical, une incision sagittale de la peau est réalisée afin de visualiser la position exacte du bregma, le point 0 des coordonnées. La pointe d'une seringue Hamilton, fixée à l'appareil de stéréotaxie, est positionnée précisément sur le bregma, et les coordonnées antéro-postérieures (AP = 0,5 mm) et latérales (L = - 2,5 mm) sont modifiées sur l'appareil à

stéréotaxie en fonction des coordonnées déterminées grâce à l'atlas de Paxinos et Watson. La boîte crânienne est alors perforée au moyen de la pointe de la seringue Hamilton et celle-ci est enfoncée dans le cerveau des rats selon les coordonnées dorso-ventrales (DV = - 4,4 mm).



Figure 23 : Système d'injection des cellules lors des xénogreffes.

Les cellules sont alors injectées à raison de 0,5 μ L toutes les minutes, afin de ne pas léser le cerveau par une surpression du liquide, et l'aiguille est lentement retirée 2 minutes après la fin de l'injection afin d'éviter que les cellules soient entraînées avec l'aiguille lorsque celle-ci est enlevée (**Figure 23**).

L'orifice d'injection dans le crâne est ensuite rebouché grâce à de la cire à os (Horsley wax, B Braun Medical, Boulogne, France), la boîte crânienne est nettoyée au sérum physiologique stérile, la plaie est suturée et un antibiotique local est déposé.

Un groupe de 5 rats, défini comme « contrôle sain », a subi le même protocole de greffe mais le LCR injecté ne contenait aucune cellule.

e) Traitement de la tumeur par perfusion intra-cérébrale continue

Quinze jours après la greffe des cellules, des pompes osmotiques ont été implantées et ont permis d'administrer un traitement aux rats greffés de façon continue pendant 14 jours.

(1) Principe de la pompe

Une pompe osmotique Alzet (Alzet, modèle 1002, Charles River Laboratories) est utilisée pour délivrer la solution comportant les différentes molécules testées dans la zone où se développe la tumeur. Cette pompe osmotique dispose d'un réservoir de 90 μL et permet une distribution constante et continue de substances pendant 14 jours avec un débit de 0,25 μL par heure. Le réservoir de la pompe osmotique est relié à une canule par l'intermédiaire d'un cathéter flexible (**Figure 24**).

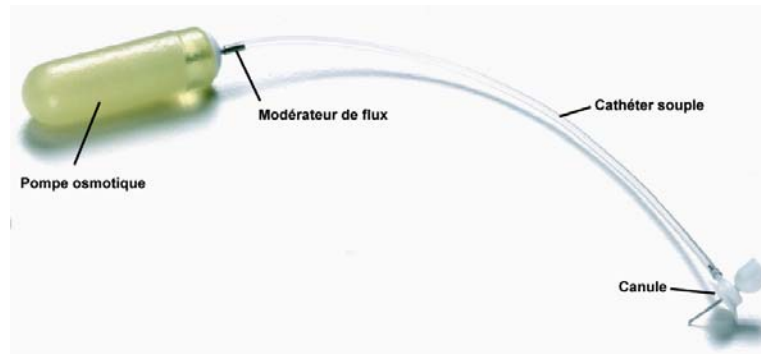


Figure 24 : Pompe osmotique Alzet.

Le fonctionnement de cette pompe est assuré par un mouvement de liquide physiologique, provenant du rat, dans la pompe au travers de la membrane semi-perméable extérieure selon un gradient osmotique (**Figure 25**), ceci comprime le réservoir flexible imperméable situé à l'intérieur de la pompe contenant la substance, et permet la diffusion de celle-ci dans le cathéter. La solution est ainsi délivrée au niveau de la canule.

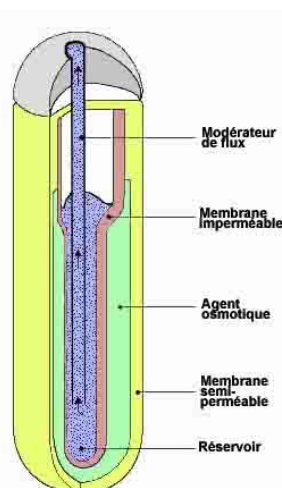


Figure 25 : Coupe schématique des pompes osmotiques Alzet.

(2) Préparation de la pompe osmotique

Les pompes osmotiques sont préparées dans un environnement entièrement stérile selon les consignes du fabricant. La profondeur de la canule de la pompe est de 5 mm. Un espaceur de 0,5 mm est donc ajouté afin d'ajuster la profondeur de la canule à 4,5 mm, profondeur à laquelle ont été injectées les cellules (**Figure 26**).



Figure 26 : Ajustement de la profondeur des canules par des espaceurs.

Le réservoir de chaque pompe a été rempli de LCR seul (contrôle sain, $n = 5$) ou de LCR contenant du FasL (0,47 ng / h) et de l'étoposide (75 ng / h) ($n = 5$) ou de LCR contenant du FasL, de l'étoposide et de la dexaméthasone (0,66 ng / h) ($n = 5$).

(3) Implantation de la pompe osmotique

Elle a été réalisée en conditions stériles sous anesthésie générale, selon les conditions décrites précédemment, au moyen du système de stéréotaxie. Après nettoyage cutané, une incision sagittale est réalisée, l'os nettoyé et la cire à os retirée. La canule est alors placée, grâce à l'appareil de stéréotaxie, dans l'orifice initialement réalisé pour l'injection des cellules, le réservoir de la pompe est inséré dans une poche sous-cutanée entre les deux omoplates. La canule est alors scellée sur l'os grâce à une vis d'ancrage et à du ciment dentaire (Pr scell glass-ionomer, Pierre Roland, Merignac, France) fixant en un seul bloc la vis et la canule. Finalement, la boîte crânienne est nettoyée au sérum physiologique stérile, les plans cutanés sont suturés et recouverts d'un antibiotique appliqué par voie locale.

Quatre groupes de 5 rats ont ainsi été étudiés :

- les contrôles sains qui ont reçus 4 μ L de LCR à la place des cellules et dont les pompes implantées contenaient du LCR.

- les rats greffés avec des cellules et non traités.

- les rats greffés avec des cellules et traités avec FasL et étoposide.

- les rats greffés avec des cellules et traités avec FasL, étoposide et dexaméthasone.

f) Suivi clinique

Un examen clinique journalier a été réalisé après chaque intervention. Une recherche systématique de symptômes cliniques a été réalisée avant et après la pose de la pompe osmotique ainsi que sur les contrôles sains. Les principaux symptômes recherchés ont été l'apathie, l'anorexie, la perte de poids, l'épistaxis, la parésie, la perte d'équilibre, des perturbations de la proprioception, la paralysie et le port de tête penché.

L'euthanasie des animaux a été réalisée 30 jours après la greffe des cellules ou l'injection des 4 μ L de LCR selon les protocoles éthiques. Dans le cas d'apparition de symptômes cliniques, les animaux ont été euthanasiés prématurément. Les pompes ont alors été vérifiées et une autopsie a systématiquement été réalisée. Les cerveaux prélevés ont été rapidement congelés et conservés à -80°C .

II. Cultures cellulaires

A. Cultures primaires d'épithéliums olfactifs

Les prélèvements subissent une dissociation chimique par ajout de de trypsine à 10 % dans du milieu Neurobasal (Invitrogen) pendant 30 minutes à 37°C en présence de 5 % de CO₂. L'action de la trypsine est arrêtée par adjonction volume à volume de milieu Neurobasal supplémenté en B27 1X (Invitrogen). La dissociation cellulaire est réalisée par passages dans une aiguille de 0,6 x 25 mm de diamètre puis filtrée sur tamis cellulaire de 100 µm (Nunc). Les cellules sont mises en culture à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide dans des chambres de culture à 8 puits (SonicSeal Slide, Nunc) en milieu Neurobasal contenant du B27 (1X), 0,1 % de fungizone (Invitrogen), 50 UI / mL de pénicilline (Invitrogen), 50 µg / mL de streptomycine (Invitrogen). Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures.

B. Lignée gliale humaine U-87 MG

Les cellules U-87 MG sont des cellules tumorales issues de glioblastomes humains (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VI). Ces cellules sont cultivées dans du milieu MEM avec sels de Earles (Gibco BRL) supplémenté avec 10 % de Sérum de veau foetal décomplémenté (SVF), 1,5 g / L de bicarbonate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 1 % d'acides aminés non-essentiels, 50 UI / mL de pénicilline, 50 µg / mL de streptomycine et 0,1 % de fungizone (Invitrogen).

La lignée cellulaire U-87 MG est composée de cellules adhérentes entretenues dans des flasques de culture de 25 cm² et maintenues à 37°C dans un incubateur sous 5 % de CO₂ et en atmosphère humide (95 %). Les cellules sont décollées des flasques par un traitement de 10 minutes à 37°C en présence de versène. Les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes, puis ensemencées à différentes densités selon les expérimentations. Les cellules remises en culture sont maintenues pendant 2 jours avant toute expérimentation.

C. Ensemencement des cellules

Les cellules de la lignée U-87 MG sont entretenues dans des flasques de culture de 25 cm² (10⁵ cellules / flasques) et ensemencées selon les conditions décrites ci dessous selon les différentes conditions expérimentales (**Tableau 4**).

	Plaque 6 puits	Plaque 96 puits	Chambre de culture 8 puits	Chambre de culture 4 puits
BrdU par cytométrie	10 ⁵ cellules/puits			
Cytométrie en flux	2.10 ⁵ cellules/puits			
Elisa Cell Death		10 ⁴ cellules/puits		
Immunofluorescence			2.10 ⁴ cellules/puits	100 cellules/puits ou 10 000 cellules/puits
TUNEL			2.10 ⁴ cellules/puits	

Tableau 4 : ensemencement des cellules en fonction des techniques utilisées.

Les plaques à 6 et 96 puits ainsi que les chambres de culture Lab-Teks à 4 et 8 puits sont fournies par Nunc.

D. Conditions de stimulation des cellules

Toutes les études de prolifération ou d'apoptose ont été réalisées à plusieurs temps d'exposition à différentes molécules (**Tableau 5**).

Noms	Nature	Concentrations finales d'utilisation	Fournisseurs	Temps d'exposition
Rh Super Fas Ligand	« Super Fas Ligand » recombinant humain	Variable	Diaclone ou Alexis Biochemicals	24/48 heures
Dexaméthasone	corticostéroïde	10^{-7} M		24/48 heures
Etoposide	Inhibiteur des topoisomérases de type II	Variable	Sigma-Aldrich	24/48 heures
NGF	Nerf Growth Factor	Variable	Proméga	4 heures
Gamma-Secretase inhibitor X	Inhibiteur de gamma-sécrétase	1 μ M	Calbiochem	12/48 heures

Tableau 5 : Liste des molécules déposées sur les cellules.

III. Tri cellulaire

A. Principe de la SdFFF

La SdFFF (Sedimentation Flux Flow Fractionation) est une technique qui permet en un temps limité, sans marquage préalable, et en respectant l'intégrité cellulaire, de séparer des cellules hétérogènes en fonction de leurs différentes propriétés physico-chimiques : taille, densité et forme. Ainsi, à densité égale, les particules de plus grande taille seront éluées avant les particules de plus faible diamètre. Il est à noter qu'à taille égale les cellules les plus denses sont retenues plus longtemps que celles de densité moindre (**Figure 27**).

Les conditions de séparation (force du champ externe appliqué et flux de phase mobile) doivent être déterminées spécifiquement dans nos conditions. Le respect de la viabilité cellulaire de cette technique a été montré au cours de l'étude de l'éluion de différents types cellulaires tel que le tri de cellules ES (**Guglielmi et al.**, 2004). Aucun accroissement spécifique de la mortalité cellulaire n'a été détecté après éluion en SdFFF.

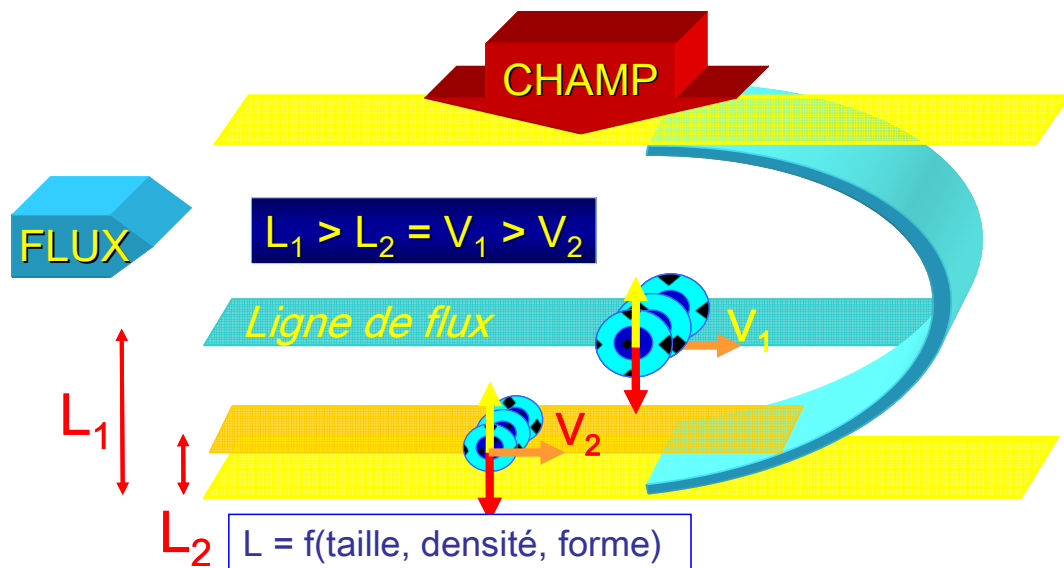


Figure 27 : Principe de la SdFFF.

Cette technique a été réalisée par le Dr S. Battu et Madame G. Bégau-Grimaud, dans le laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie du Pr P. Cardot à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

B. Préparation de l'appareil avant tri cellulaire

Le système de séparation est décontaminé par une solution de Clenz® (Beckman Coulter, Villepinte Roissy, France) puis d'eau ainsi qu'une solution à 3 % d'hypochlorite de sodium (Sigma Aldrich), suivi d'un rinçage durant une nuit par de l'eau distillée stérile et apyrogène. Quelques heures avant utilisation, cette phase mobile est remplacée par une solution de tampon salin phosphate (PBS) stérile additionné de 50 UI / mL de pénicilline, 50 µg / mL de streptomycine et 0,1 % de fungizone.

Les cellules d'épithélium olfactif de poulet, après dissociation, sont injectées dans le canal. Une fois le tri réalisé, les différentes fractions cellulaires obtenues sont mises en culture.

IV. Préparation des plasmides contenant les inserts d'intérêt

A. Transformation des bactéries

Les plasmides pBSK (**Figure 28**) ou pGEM-T Easy (**Figure 29**) ou pGEM 4Z (**Figure 30**), selon le cas, contenant les inserts sont amplifiés par transformations bactériennes à partir des bactéries JM109 (Promega) rendues compétentes par fragilisation de leur paroi à l'aide de chlorure de calcium (Promega).

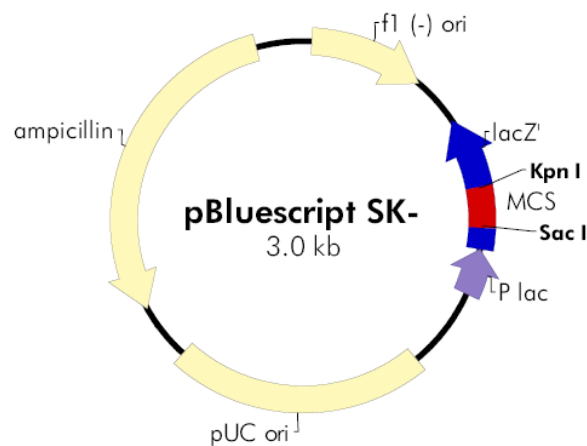


Figure 28 : Représentation du plasmide pBSK-.

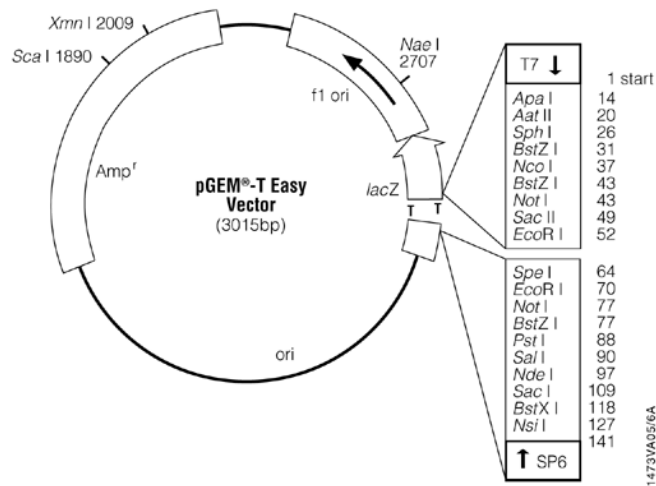


Figure 29 : Représentation du plasmide pGEM-T Easy.

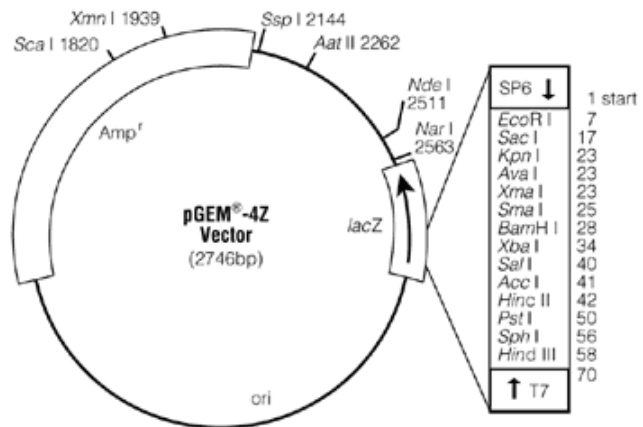


Figure 30 : Représentation du plasmide pGEM 4Z.

Le plasmide (200 ng) contenant l'insert d'intérêt est mis en contact avec 50 µL de bactéries JM109 pendant 20 minutes dans la glace. Un choc thermique à 42°C pendant 1 minute puis 2 minutes dans la glace favorisent l'entrée des vecteurs dans les bactéries. Les bactéries ainsi transformées sont alors étalées sur un milieu gélosé (15 g d'agar pour 1 litre de milieu LB : NaCl 1%, Bactotryptone 1%, Extrait autolytique de levure 0,5%, pH ajusté à 7,4 avec NaOH 10 N, Sigma Aldrich). Dans le milieu gélosé sont ajoutés de l'ampicilline (50 µg / mL, Promega) et de l'X-Gal (80 µg / mL, Promega) et de l'IPTG (0,5 mM, Promega) afin de sélectionner les bactéries transformées par les plasmides (pGEM-T Easy ou pBSK ou pGEM 4Z).

L'ampicilline contenue dans la gélose permet de sélectionner les bactéries résistantes à cet antibiotique, c'est-à-dire les bactéries contenant un plasmide. Le gène de la β -galactosidase, lacZ, permet de sélectionner les bactéries transformées par un plasmide contenant le fragment d'intérêt. L'IPTG agit alors comme inducteur du gène lacZ tandis que le X-Gal permet de mettre en évidence la présence d'une activité β -galactosidase en donnant une réaction colorée.

Ces boîtes de gélose sont alors placées dans une étuve à 37°C pendant au moins 12 heures. Les colonies bactériennes blanches sont composées de bactéries qui contiennent le plasmide et dont le gène lacZ n'est pas fonctionnel, c'est-à-dire dont le gène lacZ est coupé par le fragment d'intérêt.

B. Mise en culture de bactéries transformées par un plasmide

Cette étape permet, par l'intermédiaire de la prolifération des bactéries sélectionnées, d'augmenter la quantité des plasmides d'intérêts.

Plusieurs colonies blanches composées de bactéries résistantes à l'ampicilline, et ayant donc intégré un plasmide, sont déposées dans 2 mL de milieu Luria-Bertani (LB) contenant de l'ampicilline (1 clone bactérien / 2mL). L'amplification des clones est réalisée sous agitation, 6 à 12 heures et à 37°C.

C. Purification des plasmides amplifiés

La purification des plasmides contenus dans les bactéries a été réalisée selon le kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Après centrifugation et élimination du surnageant, les bactéries sont remises en suspension puis lysées en tampon de lyse. De la phosphatase alcaline est également ajoutée à la fin de l'étape de lyse. Elle permet l'inactivation des endonucléases qui pourraient dégrader l'ADN et la dégradation des protéines présentes dans le milieu. Une étape de neutralisation permet d'arrêter la lyse et diminue l'activité de la phosphatase alcaline. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et l'ADN plasmidique solubilisé est accroché à la membrane

d'une mini colonne lors du passage de la phase aqueuse. Après deux rinçages, l'ADN est élué de la membrane par simple ajout d'eau.

La présence ainsi que les tailles des inserts sont vérifiées par digestion enzymatique : 10 µL de plasmide sont ajoutés à 2 µL de tampon de digestion (10X) ainsi que 5 unités de chaque enzyme de restriction coupant de part et d'autre de l'insert d'intérêt (**Tableau 6**). Le volume réactionnel est ramené à 20 µL avec de l'eau ultrapure et le milieu de réaction est incubé 2 heures à 37°C (ou 30°C si on utilise *ApaI*). Le produit de digestion est analysé par électrophorèse sur gel de TBE 1X (Tris Borate EDTA) (Gibco BRL) contenant 0,7 à 2 % d'agarose (Gibco BRL) en fonction des inserts contenus dans les plasmides.

Si le plasmide contient l'insert, le reste de la suspension bactérienne est mis en culture dans 500 mL de milieu LB supplémenté en ampicilline (100 µg / mL) à 37°C, sous agitation, pendant 16 heures. Le plasmide est ensuite purifié à l'aide du Kit Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega). L'extraction et la purification des plasmides sont vérifiées de la même manière que pour les minipréparations par digestions enzymatiques et électrophorèses.

Gènes d'intérêts	Vecteurs	Enzymes de restriction
<i>CCN3 (Nov)</i>	pGEM-T-Easy	<i>Sal I</i> <i>Nco I</i>
<i>CCN1 (Cef10)</i>	pGEM-T-Easy	<i>Sal I</i> <i>Apa I</i>
<i>Notch1</i>	pBSK ⁻	<i>EcoR I</i> <i>Xho I</i>
<i>COR2</i>	pGEM 4Z	<i>EcoR I</i> <i>Sac I</i>
<i>COR3</i>	pGEM 4Z	<i>Sac I</i> <i>Hind III</i>
<i>COR4</i>	pGEM 4Z	<i>BamH I</i> <i>Nar I</i>

Tableau 6 : Correspondance des inserts, vecteurs et enzymes de restriction utilisés.

V. Séquençage

A 200 ng de plasmide (pGEM-T Easy ou pBSK ou pGEM 4Z) contenant le gène d'intérêt (**Tableau 6**) sont ajoutés 2,5 μL de solution d'amorces SP6, T3 ou T7 (10 ng / μL) (Roche Molecular, Allemagne) et le volume final est ramené à 10 μL avec de l'eau ultrapure. Le mélange obtenu contenant le plasmide est dénaturé par choc thermique : 3 minutes à 95°C immédiatement suivies de 3 minutes dans la glace. Quatre microlitres d'un mélange réactionnel contenant les 4 didéoxynucléotides marqués par des fluorochromes différents (Roche Molecular) et de la Taq polymérase (Gibco BRL) sont alors ajoutés à la solution dénaturée et une réaction de polymérisation en chaîne est réalisée selon le programme suivant : (5' à 95°C) x 1 puis (30'' à 95°C + 10'' à 51°C + 4' à 60°C) x 30 (Applied Biosystems, Lincoln Center Drive Foster, CA, USA). Le volume réactionnel après PCR est complété à 30 μL avec de l'eau ultrapure. La précipitation des produits de PCR est réalisée à l'aide de 2 volumes d'éthanol froid à 95 % et d'une incubation de 15 minutes sur la glace. Une centrifugation de 10 000 g pendant 20 minutes à 4°C permet d'obtenir un culot qui est lavé à l'aide de 200 μL d'éthanol à 70 %, centrifugé de nouveau et séché 10 minutes à température ambiante. Il est ensuite repris dans 20 μL de tampon d'échantillon (Applied Biosystems) et dénaturé par choc thermique afin d'empêcher la renaturation des brins. Le produit de la réaction de séquence est analysé par électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide à l'aide d'un séquenceur automatique (Applied Biosystems).

VI. Hybridation *in situ*

A. Préparation des sondes

Les sondes utilisées lors de l'hybridation *in situ* sont synthétisées par transcription *in vitro*. Le marquage de l'ARN synthétisé est réalisé par incorporation, lors de la transcription, d'UTP marqué à la digoxigénine. Durant ces étapes, il est nécessaire de travailler dans un environnement exempt de RNase, et à des températures ne dépassant pas 4°C afin d'éviter une dégradation rapide des ARNs.

1. Principe du marquage à la digoxigénine (DIG)

Le système DIG de marquage non radioactif utilise la digoxigénine, un haptène stéroïde qui permet de marquer l'ARN néosynthétisé. Pour produire des ARNs marqués par la DIG, l'ADNc cloné est transcrit *in vitro* par les ARN polymérases (SP6 ou T7 ou T3), en présence d'UTP marqué à la DIG. Leur détection est réalisée grâce à un anticorps anti-digoxigénine dont le fragment Fab est couplé à une enzyme ; la phosphatase alcaline. Son activité enzymatique est visualisée par son action sur un substrat spécifique : le NBT-BCIP (nitroblue-tetrazolium, 5-bromo 4-chloro 3-indolylphosphate) (Roche Molecular) provoquant une réaction colorée (**Figure 31**).

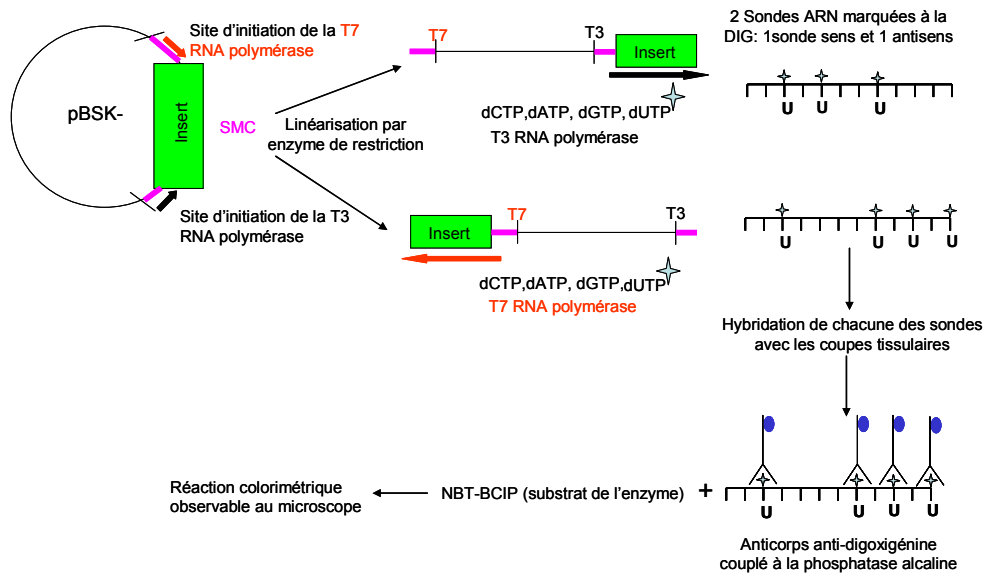


Figure 31 : Principe de l'hybridation *in situ*.

SMC, site multiple de clonage ; *DIG*, digoxigénine.

2. Linéarisation du plasmide

La linéarisation du plasmide au niveau du site multiple de clonage est nécessaire pour une bonne synthèse de la sonde. En effet, elle évite la transcription complète du vecteur. L'enzyme de restriction est choisie dans le site multiple de clonage, en position opposée au site d'initiation de l'ARN polymérase qui a été choisie en fonction de la sonde souhaitée (**Tableau 7**). Ainsi l'une des sondes correspond à l'antisens de l'ARN messager synthétisé *in vivo*, alors que l'autre est la copie conforme de l'ARN messager et ne pourra donc pas s'hybrider avec ce dernier. Ce type de sonde sert de contrôle négatif, permettant de vérifier la spécificité d'accrochage de la ribosonde.

A 10 μg de plasmide sont ajoutés 5 μL de tampon de digestion (10X), et 10 unités d'enzyme de restriction. Le mélange, pour un volume final de 50 μL , est complété avec de l'eau ultrapure. Après une digestion enzymatique de 2 heures à 37°C (ou 30°C pour *ApaI*), la linéarisation du plasmide est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %.

3. Transcription *in vitro*

Le plasmide linéarisé (0,05 μg / μL final) est mélangé aux trois nucléotides triphosphate dont les dUTP sont marqués (1X final) ainsi qu'au tampon de transcription de

l'ARN polymérase (1X final) (Roche Molecular). Les ARN polymérases SP6 ou T7 ou T3 (Roche Molecular) sont ensuite rajoutées à hauteur de 2 UI / μL . Afin de limiter la dégradation des ARN, un inhibiteur de RNase est ajouté (1 UI / μL final) (Roche Molecular) puis le volume est ajusté à 20 μL avec de l'eau ultrapure. La réaction de synthèse des ARN marqués est alors réalisée à 37°C pendant 2 h.

Gènes d'intérêts	Enzymes de restriction	ARN polymérases	Ribosondes
CCN3 (Nov)	<i>Sal I</i> <i>Nco I</i>	T7 SP6	Antisens Sens
CCN1 (Cef10)	<i>Sal I</i> <i>Apa I</i>	T7 SP6	Antisens Sens
Notch1	<i>EcoR I</i> <i>Xho I</i>	T7 T3	Antisens Sens
COR2	<i>Sac I</i> <i>EcoR I</i>	SP6 T7	Antisens Sens
COR3	<i>Hind III</i> <i>Sac I</i>	SP6 T7	Antisens Sens
COR4	<i>Nar I</i> <i>BamH I</i>	T7 SP6	Antisens Sens

Tableau 7 : Ribosondes synthétisées, leurs vecteurs et les ARN polymérases utilisées.

4. Précipitation de produits de transcription

Aux produits de transcription sont ajoutés 0,1 volume de chlorure de lithium 4M et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Le mélange est précipité 2 heures à - 80°C. La solution de ribosondes est ensuite centrifugée à 10 000 g pendant 20 minutes à une température de 4°C. Le culot ainsi obtenu est lavé à l'éthanol à 70% puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Après séchage, la ribosonde est reprise dans 20 μL d'eau ultrapure.

B. Dot-blot

Il permet de vérifier la qualité de marquage de la sonde, mais également de quantifier ce marquage. Sur une membrane chargée positivement (Hybond-N+, Amersham Pharmacia, Angleterre), 1 μL de préparation de ribosondes pure ainsi qu'1 μL de sonde diluée au 10^{ème}, au 100ème et au 1 000ème sont déposés. La même opération est effectuée pour un témoin positif de concentration connue (ARN marqué à la DIG 100 ng / μL) et pour un témoin négatif non

marqué. La membrane est ensuite séchée à l'air et l'ARN fixé par exposition aux UV. Le marquage est révélé par le NBT-BCIP (Roche Molecular) selon un protocole identique à celui utilisé lors de l'hybridation *in situ*.

Afin de vérifier l'intégrité des sondes néo-synthétisées ainsi que leur taille, 2 μ L de chacune d'elles sont soumis à une électrophorèse sur gel de TAE 1X à 1,2% d'agarose.

C. Hybridation sur coupe tissulaire

1. Fixation

Les coupes tissulaires sont préalablement fixées 8 minutes dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% (Sigma Aldrich). L'excédent de PFA est éliminé par 3 lavages de 5 minutes dans du PBS.

2. Préhybridation

La préhybridation prépare les coupes à l'hybridation en bloquant les sites non spécifiques où pourraient se fixer la ribosonde. Les coupes sont placées 10 minutes dans le tampon d'acétylation afin d'empêcher l'action des RNAses endogènes. L'excès de tampon d'acétylation est éliminé par trois lavages de 5 minutes en PBS 1X. Deux cent microlitres de milieu de préhybridation [formamide 50% (Calbiochem, Allemagne), Saline Sodium Citrate 5X (SSC)(Eppendorf, Allemagne), Denhart 5X (Roche Molecular), tRNA (1,25 ng), solution de blocage (1 %) (Roche Molecular)] contenant de l'ADN de sperme de saumon (0,5 mg / mL final) sont déposés par coupe pendant 4 à 6 h à température ambiante dans une atmosphère humide de SSC 5X.

3. Hybridation

Les ribosondes sont préalablement dénaturées à 85°C pendant 5 minutes et rapidement transférées dans la glace. Cette étape permet d'éliminer toutes les structures secondaires de l'ARN qui pourraient empêcher l'hybridation de la sonde. A 460 μ L tampon de préhybridation préalablement chauffé à 72°C sont rajoutés 90 ng de ribosonde. Cinquante microlitres de ce mélange sont déposés sur chaque lame ensuite recouverte d'une lamelle. L'hybridation est réalisée à 72°C (température d'hybridation spécifique des sondes utilisées),

pendant 14 heures dans une atmosphère humide de SSC 5X empêchant ainsi l'assèchement des coupes tissulaires.

4. Lavages stringents

Durant cette étape, permettant d'éliminer l'excès de sonde, les lames sont plongées dans du SSC 5X, préchauffé à 72°C, jusqu'à ce que les lamelles se décollent. Un bain d'une heure dans une solution de SSC 0,2X à 72°C garantit la spécificité de liaison de la ribosonde. Enfin, un dernier bain de SSC 0,2X est ensuite effectué afin de ramener les lames à température ambiante.

D. Révélation

Les lames sont plongées dans un tampon de lavage (B1) [acide maléique 0.1M, NaCl 0.15M, (pH 7,5) (Sigma Aldrich)] pendant 5 minutes à température ambiante afin d'éliminer le SSC puis, recouvertes pendant 2 heures d'une solution de blocage (B2) [B1+ solution de blocage à 1% final] (Roche Molecular) préparée extemporanément. Cette étape permet de saturer les sites non spécifiques pouvant être reconnus par l'anticorps. Un mélange de B2 et d'anticorps anti-DIG (Roche Molecular) dilué au 1 / 5000^{ème} est déposé sur chacune des lames pendant 1 heure. Deux lavages de 30 minutes dans le tampon B1 permettent d'éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés. Le pH des coupes est ensuite équilibré à 9,5 dans le tampon de révélation (B3) [Tris HCl 100 mM (Sigma Aldrich), NaCl 100 mM (Sigma Aldrich), MgCl₂ 5 mM (Sigma Aldrich) (pH 9,5)] pendant 5 minutes. La solution de révélation est préparée à partir de 10 mL de tampon B3 auxquels sont ajoutés 200 µL de nitrobleu tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT-BCIP), 200 µL de ce mélange sont déposés sur chaque lame. Après incubation de 2 heures à 30°C, la réaction enzymatique est arrêtée par rinçage des lames à l'eau distillée. Les coupes marquées peuvent être conservées dans du PBS ou bien montées dans un milieu aqueux (Immu-mount, Shandon, Waltham, MA, USA) puis stockées à 4°C. L'observation est effectuée sur microscope Leica DMRX en fond clair ou en contraste interférentiel (Nomarski). Les prises de vues effectuées par une caméra sont enregistrées par informatique. Le logiciel LIDA (Leica, France) est utilisé pour la gestion des images.

VII. Détections protéiques

A. Cytométrie en flux

1. Immunomarquage

Après retrait du milieu de culture, les cellules sont décollées par ajout de 1 mL de versène, incubées 10 minutes en incubateur à 37°C et 5% CO₂. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à 4°C pendant 5 minutes à 200 g. Le culot cellulaire est repris dans du Triton X100 (0,1 % final) durant 4 minutes à 4°C afin de perméabiliser les cellules. Après ajout de PBS, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 200 g. Après élimination du surnageant le culot cellulaire est repris dans du Versène / SVF 10 % (V / SVF) à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules / mL. La suspension cellulaire est répartie dans des tubes de cytométrie (100 µL / tube) auxquels sont ajoutés les différents anticorps primaires (**Tableau 8**) incubés pendant 30 minutes sur glace. Après ajout de 500 µL de V / SVF, chaque tube est centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 200 g et les surnageants sont éliminés avant l'addition de 100 µL de V / SVF contenant l'anticorps secondaire (**Tableau 9**), incubé pendant 30 minutes sur glace et à l'obscurité. Un nouveau lavage est réalisé comme précédemment avec 500 µL de V / SVF par tube, et une centrifugation de 5 minutes à 4 °C et à 200 g, puis les culots cellulaires sont repris dans 500 µL de V / SVF / PFA 1 %. Les suspensions cellulaires sont conservées à 4°C et à l'obscurité. L'analyse des marquages est réalisée grâce à un cytomètre en flux Epics XL-MCL Coulter (Coulter, Hialeah, FL, USA) et FacsVantage (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Spécificité de anticorps	Isotypes	Dilutions	Noms	Fournisseurs
Notch1	IgG polyclonal de lapin	1/50	Anti-Notch1 ICN (C20)	Santa Cruz Biotechnology
Delta1	IgG polyclonal de lapin	1/50	Anti-Delta1 (H265)	Santa Cruz Biotechnology
Delta4	IgG polyclonal de lapin	1/50	Anti-Delta4 (H70)	Santa Cruz Biotechnology
Jagged1	IgG polyclonal de lapin	1/50	Anti-Jagged1 (H114)	Santa Cruz Biotechnology
Jagged2	IgG polyclonal de lapin	1/50	Anti-Jagged (H143)	Santa Cruz Biotechnology
BrdU	IgG de souris	1/50	Anti-BrdU	Sigma-Aldrich
Vimentine	IgG1 de souris	1/50	Anti-vimentine, sc32322	Santa Cruz Biotechnology
Isotypique de souris	IgG1	Variable	W3/25	DakoCytomation
Isotypique de lapin	IgG	Variable	Sc-3888	Santa Cruz Biotechnology
Anti-souris-FITC	IgG de chèvre	1/100	Goat anti-mouse FITC	DakoCytomation
Anti-lapin-FITC	IgG de porc	1/100	swin anti-rabbit FITC	DakoCytomation
Alexa 633	IgG de chèvre	1/500	Anti-mouse Alexa 633	SantaCruz Biotechnology

Tableau 8 : Les différents anticorps utilisés pour la cytométrie en flux.

2. Cycle cellulaire

Les cellules U-87 MG, traitées dans différentes conditions (*II 4 conditions de stimulation des cellules*) sont décollées à l'aide de versène. Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé en PBS puis fixé par une solution de 500 µL d'éthanol à 70% en PBS à -20°C. Les échantillons sont ainsi stockés au minimum 12 heures. Après avoir retiré le surnageant, le culot cellulaire est lavé 2 fois dans 1 mL de PBS. Le culot est ensuite remis en suspension à la concentration de de 10^6 cellules dans 500µL de PBS contenant 60 ng de RNase (Sigma Aldrich). L'iodure de propidium est ajouté à chaque échantillon (0,1 µg / échantillons) puis les cellules sont analysées par cytométrie en flux au moyen d'un cytomètre FacsVantage (Becton Dickinson). L'analyse des données est ensuite réalisée avec le logiciel Modfit (Verity Software).

B. Immunohistochimie

1. Par immunofluorescence indirecte

Des coupes coronales de 12 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide du cryostat, déposées sur des lames porte-objet, séchées et conservées à -80°C .

Des colorations standard en hématoxyline (Sigma Aldrich) ou en hémateïne-éosine-safran (HES) ont été réalisées sur les coupes afin de visualiser les structures tissulaires.

Dans un second temps, des immunomarquages ont été réalisés. Les cryosections sont décongelées pendant 10 minutes à température ambiante et fixées 10 minutes à l'acétone froid à -20°C (Sigma Aldrich). Après trois lavages en PBS et une saturation d'une heure en SVF à 10 % dans du PBS à température ambiante, les coupes sont incubées avec différents anticorps primaires (**Tableau 9**) pendant 2 heures à température ambiante, dilués dans la solution de saturation.

Noms	Spécificités	Hôtes	Isotypes	Dilutions	Fournisseurs	Propriétés
Notch1	Notch1	Lapin	Polyclonal IgG	1/20	Santa Cruz Biotechnology	
CaMKII	Calmoduline Kinase II	souris	IgG1	1/20	Stressgen	Marqueur de neurones olfactifs
2F11	Neurofilaments 68 KDa	Souris	IgG1	1/20	DakoCytomation	Marqueur des cellules neuronales
GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide	Lapin	Polyclonal IgG	1/20	DakoCytomation	Marqueur des astrocytes
Ki-M7	CD-68	Souris	IgG1	1/20	Berhing	Marqueur des cellules microgliales
W6/32	HLA-ABC	Souris	IgG2A	1/20	Hybridome	Molécules du HLA de classe I
BG27	Fas humain	Souris	IgG2A	1/20	Diaclone	
BZ1		Souris	IgG2A	Variable	Diaclone	Contrôle Isotypique
BZ2		Souris	IgG1	Variable	Diaclone	Contrôle Isotypique
Normal rabbit IgG		lapin	IgG	Variable	Santa Cruz Biotechnology	Contrôle Isotypique

Tableau 9 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistofluorescence.

Après trois lavages en PBS, la révélation est réalisée en exposant les coupes pendant 1 heure avec un antiserum de chèvre couplé à un fluorochrome (**Tableau 11**). Les coupes, après marquages, sont finalement montées entre lame et lamelle en glycérol-gélatine (Sigma Aldrich) et observées grâce à un microscope confocal (Carl Zeiss S.A.S, LSM 510, Jena, Allemagne).

2. Par marquage immuno-péroxydase

Les coupes tissulaires de 12 μm stockée à -80°C sont séchées à température ambiante. Les préparations sont fixées pendant 20 minutes en PFA à 4%. Les coupes sont lavées 3 fois 5 minutes en PBS. Une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% dans du PBS est déposée pendant 30 minutes à l'obscurité sur les coupes afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Les préparations sont lavées 3 fois 5 minutes en PBS. Les sites non spécifiques des coupes tissulaires sont saturés avec de la BSA à 5% en PBS pendant 30 minutes puis l'anticorps de lapin anti-Calmoduline Kinase II (1 / 250, CaMKII, Stressgen) est déposé sur chaque coupe pendant 12 heures dans la solution de saturation à 4°C . Les préparations sont rincées 3 fois 5 minutes en PBS. L'anticorps secondaire (1 / 1000, anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase, DakoCytomation) dilué dans la solution de saturation est déposé pendant 90 minutes sur les coupes tissulaires. Les préparations sont rincées 3 fois 5 minutes avec du PBS. La réaction est révélée par une incubation de 5 à 15 minutes avec une solution composée de 0,03% de peroxyde d'hydrogène, 0,05 % de diamino-3,3'benzidine (DAB) dans du PBS.

C. Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte

L'expression de protéines, à l'état basal ou dans différentes conditions de stimulation, a été étudiée par immunofluorescence sur la lignée cellulaire U-87 MG. De même, cette méthode a permis d'étudier les caractéristiques biochimiques des cellules d'épithéliums olfactifs de poulet avant et après tri cellulaire.

Les cellules, à raison de 10^4 ou 10^5 cellules par puits, ont étéensemencées en plaques 8 puits Lab-Tek (Nunc). Après adhésion des cellules, celles-ci sont mises ou non en présence de différents effecteurs pendant 24 ou 48 heures. Le milieu de culture est alors retiré et les cellules sont fixées grâce à une solution de PFA à 4% dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont alors lavées 3 fois en PBS et, afin de permettre la

détection d'antigènes intra-cellulaires, sont perméabilisées par une solution d'alcool / acétone (V / V, Sigma Aldrich) ou de Triton X-100 à 0,1 % dans du PBS pendant 5 minutes à 4°C. Trois rinçages en PBS sont à nouveau réalisés et une étape de saturation visant à bloquer les sites de fixation non spécifiques est réalisée par incubation des cellules avec une solution de sérum d'agneau (Sigma Aldrich) dilué à 10 % dans du PBS pendant 90 minutes ou 2 heures et à température ambiante.

Les cellules sont ensuite incubées avec les mêmes anticorps primaires que ceux utilisés pour l'immunohistochimie, dilués dans la solution de saturation pendant 90 minutes à température ambiante, mais à des dilutions différentes lors de l'immunocytochimie (**Tableau 10**).

Noms	Spécificité	Fournisseurs	Dilutions
2F11	Neurofilament	DakoCytomation	1/50
Anti-GFAP	GFAP	DakoCytomation	1/50
Ki-M7	CD68	Berhing	1/50
W6/32	HLA-I	Hybridome	1/50
BG27	Fas human	Diaclone	1/50
Notch1 (C20 ou H131)	Notch1 humain	Santa Cruz Biotechnology	1/50
CaMKII	Calmoduline kinase II	Stressgen	1/200
TrkA	Tyrosine kinase récepteur A	Santa Cruz Biotechnology	1/200
Kératine (11E10)	Kératine 3, 12, 14, 18	Dr. Dhouailly	Non dilué

Tableau 10 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunofluorescence avec leurs dilutions pour l'immunocytochimie.

Après 3 lavages de 10 minutes en PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire (**Tableau 10**) dilué dans du PBS, pendant 30 minutes à température ambiante. Finalement, les cellules sont lavées en PBS, 3 fois 20 minutes, rapidement rincées à l'eau,

séchées puis montées entre lame et lamelle, en glycérol-gélatine. Les observations sont réalisées grâce à un microscope confocal (Carl Zeiss).

Spécificité	Hôte	Conjugué	Fournisseur	Dilution
Ig totales de souris	Chèvre	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (Leiden, Netherlands)	1/4000 ou 1/9000
Ig totales de souris	Chèvre	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	1/4000 ou 1/9000
Ig totales de lapin	Chèvre	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	1/4000 ou 1/9000
Ig totales de lapin	Chèvre	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	1/4000 ou 1/9000

Tableau 11 : Liste des anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

D. Les contrôles

Un contrôle systématique de chaque anticorps secondaire a été effectué afin de vérifier l'absence de fixation non spécifique. Pour cela, les cellules ou les coupes tissulaires sont incubées avec l'anticorps secondaire, sans exposition préalable à un anticorps de première couche.

De même, un contrôle isotypique est effectué pour chaque anticorps primaire, avec selon les cas, des Ig irrelevantes IgG1 ou IgG2a purifiées chez la souris ou une fraction purifiée d'IgG de lapin.

E. Détection de protéines par la méthode de Western-Blotting

Cette technique a été utilisée afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de protéines au niveau de la lignée cellulaire U-87 MG.

1. Préparation des protéines

a) Lysat cellulaire total

Après un lavage en PBS 1X, les cellules sont lysées dans du tampon de lyse [50 mM Tris HCl, 1 % NP-40, 0,25 % deoxycholate de sodium, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (Sigma Aldrich), 1mM de phényl méthyl sulfonyl fluoride, 2 µg / mL de cocktail anti-protéase (Protease inhibitor cocktail set III, Calbiochem)] pendant 5 minutes à 4°C. Le lysat cellulaire est alors homogénéisé par aspiration et refoulement puis centrifugé à 14 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines cellulaires totales est conservé à - 20°C.

b) Dosage de la concentration protéique

La concentration en protéines totales est déterminée selon un dosage colorimétrique basé sur l'utilisation du réactif de Bradford (Sigma Aldrich). La gamme étalon de la réaction est réalisée à l'aide d'une solution d'Albumine Sérique Bovine (BSA, Sigma Aldrich) de concentration connue. Les densités optiques obtenues pour chaque solution sont mesurées grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

2. Séparation des protéines par électrophorèse

Vingt à 25 µg de protéines ont été diluées au ½ dans du tampon de Laemmli modifié adapté pour les études électrophorétiques (Tris 0,25 M, pH 6,8 ; SDS 4 % ; glycérol 10 % ; bleu de bromophénol 0,006 % et β-mercaptoéthanol 2 %). Elles ont ensuite été dénaturées à 100°C pendant 5 minutes.

Dans différents puits du système de migration sont déposés les lysats totaux de protéines U-87 MG ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Sigma Aldrich).

La séparation protéique est réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide contenant du docécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE). Les gels de résolution utilisés sont composés de 1,85 M de Tris HCl pH 8,8, SDS à 10 %, Temed à 0,05 %, ammonium persulfate à 10 % (Sigma Aldrich) et d'une concentration variable en acrylamide (Sigma Aldrich). Les concentrations d'acrylamide utilisées sont de 7,5 et 12 %, selon le poids moléculaire des protéines recherchées. L'électrophorèse est réalisée à ampérage constant, 40

mA, dans du tampon de migration (Tris 190 mM, glycine 150 mM, SDS 0,1 %, pH 8,5, Sigma Aldrich).

3. Transfert sur membrane des protéines

Un transfert sur membrane de nitrocellulose (HAHY 0,45 μ M, Millipore, St Quentin-Yvelines, France) est ensuite effectué (transfert semi-sec, Biométra, Polylabo, Strasbourg, France) pendant 45 minutes pour chaque gel à 12 volts dans du tampon de transfert (Tris 250 mM, glycine 200 mM, méthanol 20 %, pH 8,2).

Après transfert, la membrane de nitrocellulose est plongée dans une solution de rouge Ponceau (Sigma Aldrich) afin de vérifier la qualité de l'électrophorèse et du transfert protéique.

4. Détection des protéines d'intérêt grâce à des anticorps spécifiques

Afin de bloquer les sites éventuels de fixation non spécifique, les membranes sont plongées dans une solution de PBS contenant 5 % de lait écrémé pendant 2 heures à température ambiante.

Les bandes de nitrocellulose sont ensuite incubées pendant 14 h, à 4°C, sous agitation lente, avec l'anticorps primaire, dilué dans du PBS contenant 3 % BSA (BSA, Jacques Boy Institute S.A., Reims, France) ou dans la solution de saturation en fonction des anticorps primaires.

Les anticorps primaires utilisés en Western-blot sont récapitulés dans le **Tableau 12**.

Noms	Antigènes	Hôtes	Dilutions	Fournisseurs	Concentrations de gel
C20	Fas humain	Lapin	1/200	Santa Cruz Biotechnology	12%
C20	Notch1 ICN humain	Lapin	1/100	Santa Cruz Biotechnology	7,5%
H131	Notch1 extracellulaire Humain	Lapin	1/100	Santa Cruz Biotechnology	7,5%
H265	Delta1 extracellulaire Humain	Lapin	1/100	Santa Cruz Biotechnology	4-12%
H70	Delta4 extracellulaire Humain	Lapin	1/100	Santa Cruz Biotechnology	4-12%
H114	Jagged1 extracellulaire Humain	Lapin	1/100	Santa Cruz Biotechnology	4-12%
H143	Jagged2 extracellulaire Humain	Lapin	1/50	Santa Cruz Biotechnology	4-12%
	IgG	Lapin	Variable	DakoCytomation	

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des anticorps primaires utilisés en Western-blot.

Après 3 lavages en PBS, la membrane est plongée pendant 1 heure dans une solution contenant des anticorps secondaires, anti-immunoglobulines (Ig) totales de lapin couplés à la peroxydase (Dako Cytomation) obtenus chez la chèvre, dilués au 1 / 1000 dans du PBS. La révélation est effectuée en utilisant un réactif chémoluminescent (Abcys, France).

VIII. Détection de la mort cellulaire

A. Mise en évidence de l'apoptose par la méthode TUNEL

Les cellules ont étéensemencées dans des puits de plaques 8 puits (LabTek, 10⁵ cellules / puits) et laissées pendant 72 heures dans leur milieu de culture avant d'être stimulées pendant 48 heures avec différentes molécules.

La présence d'apoptose est évaluée par la méthode TUNEL selon les instructions du fournisseur (Promega). Les cellules sont fixées en PFA dilué à 4 % dans du PBS et perméabilisées grâce à du Triton X100 dilué à 0,1 % dans du PBS pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées au PBS. Après 10 minutes en présence du tampon d'équilibration fourni dans le kit, les cellules sont incubées 1 heure à 37°C et à l'obscurité avec une solution de polymères nucléotidiques conjugués à la fluorescéine contenant la terminale deoxynucléotidyl transférase. Cette enzyme va catalyser la liaison de polymères nucléotidiques fluorescents à l'extrémité 3'OH libre des brins d'ADN générés au cours de l'apoptose. La réaction est arrêtée par incubation des cellules pendant 10 minutes dans une solution SSC 2X puis les cellules sont lavées en PBS. Une contre-coloration au bleu-Evans (Sigma Aldrich) pendant 5 minutes permet de détecter en fluorescence rouge l'ensemble des cellules. Après plusieurs lavages en PBS et un lavage à l'eau, les cellules sont fixées entre lame et lamelle en glycérol-gélatine.

Les cellules en apoptose sont alors comptées (au moins 3 champs par condition et 300 cellules par essai) avec un microscope à fluorescence (x 200, Carl Zeiss S.A.S). L'index apoptotique des cellules est déterminé pour chacune des conditions par rapport à l'état basal qui est arbitrairement fixé à 1.

B. Détection de la libération des nucléosomes solubles par méthode ELISA

La proportion de cellules en apoptose a également été évaluée par le dosage des nucléosomes solubles générés au cours de l'apoptose. Ce dosage a été réalisé par la technique immunoenzymatique, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) selon les instructions du fournisseur (Cell Death Detection ELISA Plus ; Roche Diagnostic, Meylan, France).

Les cellules sontensemencées dans des puits de plaques 96 puits à 10^4 cellules / puits et mises en culture au minimum 72 heures dans leur milieu de culture. Après 24 ou 48 heures d'incubation en présence des différentes molécules étudiées, les plaques contenant les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 10 minutes et le surnageant est remplacé par 200 μ L de tampon de lyse. Après 30 minutes de lyse, une nouvelle centrifugation est réalisée et 20 μ L du surnageant de chaque condition sont ajoutés dans des puits sensibilisés à la peroxydase et contenant deux anticorps, un anti-histone couplé à la biotine et un anti-DNA couplé à la POD (Horse-radish peroxidase). L'ensemble des composants est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation. Trois lavages sont réalisés puis le substrat est ajouté. Lorsque le substrat est métabolisé par l'enzyme, une coloration apparaît. La coloration, et donc le niveau d'apoptose des cellules, est mesurée grâce à un spectrophotomètre à 405 nm. Chaque expérimentation a été réalisée au moins 3 fois.

C. Détection par méthode DAPI.

Le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dihydrochloride (Sigma Aldrich) est une molécule fluorescente qui s'intercale au niveau de l'ADN. Le DAPI, à 10 μ g / mL, est mis en présence des cellules pendant 30 minutes à l'obscurité et les cellules sont ensuite fixées pendant 30 minutes grâce à du PFA dilué à 4 % dans du PBS. Après trois lavages en PBS et un lavage à l'eau, les marquages sont observés grâce à un microscope à fluorescence (Leica DMRX, Rueil-Malmaison, France) et les cellules marquées et les cellules totales sont comptées (au moins 3 champs par condition et 300 cellules par essai).

IX. Analyse de la prolifération cellulaire

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée après exposition des cellules à différentes molécules pendant 4 ou 48 heures. Le bromodeoxyuridine (BrdU) est un homologue de la thymidine. Il peut ainsi être incorporé dans l'ADN au cours de la phase de réplication (phase S) du cycle cellulaire.

A. Détection de la prolifération des cellules par incorporation de BrdU

Le bromodeoxyuridine (BrdU, 20 μ M, Sigma Aldrich) a été ajouté au milieu de culture en même temps que les molécules à tester et laissé 4 ou 48 heures.

Cette expérience a été réalisée par deux méthodes : un comptage sous microscope pour les cultures primaires d'épithéliums olfactifs de poulets et une détection par cytométrie en flux pour l'étude de la lignée U-87 MG.

1. Par comptage sous microscope

Cette étude est réalisée selon les instructions du fournisseur (5-Bromo-2'-deoxyuridine Labelling and detection Kit II, Roche Diagnostics). Les cellules sont lavées 3 fois en PBS puis fixées à l'éthanol pendant 20 minutes à - 20°C. La préparation est rincée à nouveau 3 fois en PBS et la solution d'anticorps monoclonal anti-BrdU est déposée 30 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées 3 fois en PBS puis l'anticorps secondaire anti-Ig de souris couplé à la phosphatase alcaline est déposé 30 minutes à 37°C. Les cellules sont lavées 3 fois en PBS. La révélation se fait par ajout de NBT-BCIP pendant 15 à 30 minutes. Les cellules sont lavées en PBS et la préparation est montée entre lame et lamelle en glycérol-gélatine. Les comptages sont effectués au microscope sur l'ensemble des cellules. L'index de prolifération correspond au rapport des cellules marquées sur le nombre de cellules totales.

2. Par cytométrie en flux

Les cellules sont décollées de leur support de culture par ajout de versène et sont perméabilisées par une solution de 0,1 % de Triton X100 et 1 % de citrate de sodium (Sigma Aldrich) en PBS pendant 2 minutes sur glace. Leur ADN est dénaturé par un traitement d'une heure dans une solution d'HCl à 2 M (Sigma Aldrich), neutralisée pendant 10 minutes en tampon borate à 0,1 M, pH 8,5. Après deux rinçages en PBS, les cellules sont remises en suspension dans du V / SVF, comptées, et 2×10^5 cellules par tube, correspondant à chacune des conditions expérimentales décrites ci-dessus, seront analysées par cytométrie en flux selon les conditions préalablement décrites au moyen d'un anticorps monoclonal anti-BrdU (Sigma Aldrich) et d'un anticorps secondaire anti-Ig de souris, couplé FITC, produit chez la chèvre (Dako Cytomation). Des contrôles isotypiques et des contrôles de fixation non spécifique de l'anticorps secondaire ont été réalisés lors de chaque manipulation.

L'analyse des marquages est réalisée grâce à un cytomètre en flux Epics XL-MCL Coulter (Coulter). Chaque analyse a été réalisée avec au moins 20 000 cellules et les résultats obtenus, sont représentatifs de 3 manipulations indépendantes.

X. Méthodes d'analyse de résultats

Afin d'analyser nos données différents test statistiques ont été réalisés.

L'analyse des moyennes obtenues après les expérimentations *in vitro* ont été évaluées à partir des données de 3 tests indépendants réalisés en triplicate. Les barres d'erreur correspondent à la valeur de l'écart moyen (ou erreur standard). Les analyses statistiques (Test de corrélation, Test T et ANOVA) ont été effectuées au moyen des logiciels Systat 7.0 (SPSS inc., Evanston, IL). Des analyses sont considérées comme significatives pour des valeurs de probabilité $< 0,05$.

L'anaylse des résultats *in vivo* a été réalisée sur un échantillon de 5 individus pour chaque condition expérimentale. Les modifications des tailles des tumeurs ont été analysées par le test de Tukey HSD (Honest significant difference) et l'influence de chaque produit sur la taille des tumeurs par la méthode GLM (Global linear model), toutes ces données ont été analysées avec le logiciel Systat 7.0.

RESULTATS

I. Développement, CCN et Notch1

Le modèle aviaire nous a permis d'avoir accès facilement aux embryons à différents stades de développement et de pouvoir ainsi observer l'implication des gènes *Cef10* (*CCN1*), *Nov* (*CCN3*) et *Notch1* au sein de ce modèle. Le gène *Cef10* est connu notamment pour être un agent mitogène alors que *Nov*, au contraire, est connu pour inhiber la croissance cellulaire. De plus des expérimentations de co-immunoprécipitation ont permis de montrer qu'il existait une liaison physique entre la protéine Nov et le récepteur Notch1 (**Sakamoto et al.**, 2002 ; **Katsubé et Sakamoto**, 2005). Dans ce cadre, la présence du module CT (quatrième module) de CCN3 est nécessaire pour permettre cette interaction physique (**Perbal**, 2004).

A. Etude de deux gènes CCN : *Cef10* et *Nov* au cours du développement aviaire

Le but de cette étude, réalisée en collaboration avec le Professeur Katsubé et différents laboratoires français et étrangers, était de déterminer si l'activation des gènes de la famille CCN était ou non séquentielle au cours du développement. Différents stades embryonnaires (ED) ainsi que différentes structures ont été analysés. Les deux gènes recherchés au départ furent *Nov* et *Cef10*.

La technique d'étude de l'expression de ces gènes a été l'hybridation *in situ*. Dans un premier temps, celle-ci a été mise au point à partir d'un tissu connu comme exprimant les gènes *Nov* et *Cef10* : le cœur (**Figure 32**).

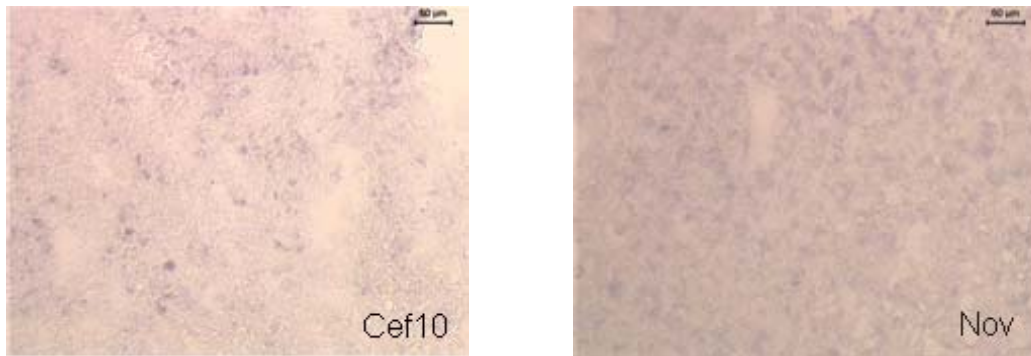


Figure 32 : Détection de *Cef10* et *Nov* par hybridation *in situ* sur coupes sériées de cœur d'embryon de poulet à ED7,5.

Une fois cette mise au point effectuée, des séries d'hybridation *in situ* ont été réalisées et les résultats d'expression entre les deux gènes ont été comparés. Les stades étudiés ont été les stades embryonnaires ED7 et ED8. Pour chaque expérimentation, la spécificité de la ribosonde antisens utilisée est recherchée. Pour cela nous réalisons la même manipulation d'hybridation *in situ* avec une ribosonde sens et constatons l'absence de marquage.

Certaines structures comme la rétine et l'épithélium aortique restent positives pour les deux gènes durant la période embryonnaire étudiée (non montré).

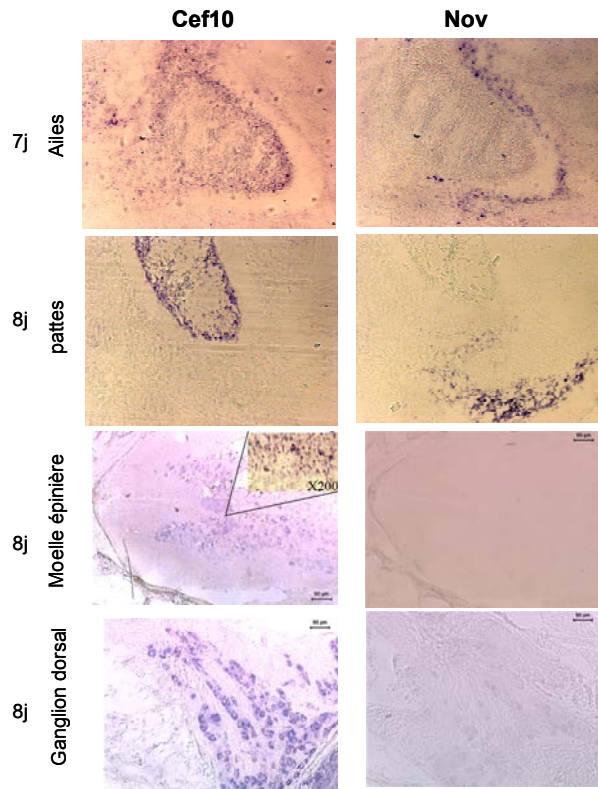


Figure 33 : comparaison de l'expression des gènes *Cef10* et *Nov* dans les membres, la moelle épinière et les ganglions rachidiens aux stades ED7 et ED8 par hybridation in situ.

L'expression des transcrits de *Cef10* et *Nov* semble différente au niveau des structures articulaires entre ED7 et ED8. Les transcrits de *Cef10* pourraient être exprimés au niveau de la zone articulaire en développement, à la fois au niveau des membres supérieurs et inférieurs (**Figure 33**). Les ARNm de *Nov*, quant à eux, semblent être détectés dans les zones chondrocytaires au niveau des jonctions os-chondrocytes.

La deuxième grande différence d'expression de ces transcrits s'observe au niveau du tube neural et des ganglions rachidiens dorsaux. En effet, *Cef10* paraît fortement exprimé au niveau du tube neural en formation ainsi que dans les ganglions rachidiens (**Figure 33**) alors que l'expression des transcrits de *Nov* s'avère presque inexistante au sein de ces structures.

Ces résultats préliminaires font actuellement l'objet d'un travail en collaboration avec l'équipe du Professeur Katsubé à Tokyo.

L'embryon de poulet a ensuite été utilisé afin d'étudier une composante majeure du développement : les cellules souches. L'épithélium olfactif est, dans ce cadre, un organe

approprié pour cette étude de par sa composante neuronale et sont potentiel de régénération. Nous avons essayé d'isoler par la technique de sédimentation par couplage flux force (SdFFF) les cellules souches dans cet organe (Comte et al., 2006 voir annexe 2).

B. Purification des cellules souches de l'épithélium olfactif

1. Dans l'épithélium olfactif aviaire

a) Culture primaire

Dans un premier temps les cultures primaires d'épithéliums olfactifs aviaires ont été mises au point dans le laboratoire. Les épithéliums d'embryons de poulet sont prélevés à ED 14, mis en culture, et les différentes cellules composant cet organe sont ensuite caractérisées.

Dès 15 jours de culture cellulaire, des structures « neurosphère-like » sont observées (**Figure 34A**). Les cellules cultivées sont identifiées par marquages immunocytochimiques (**Figure 34BCD**).

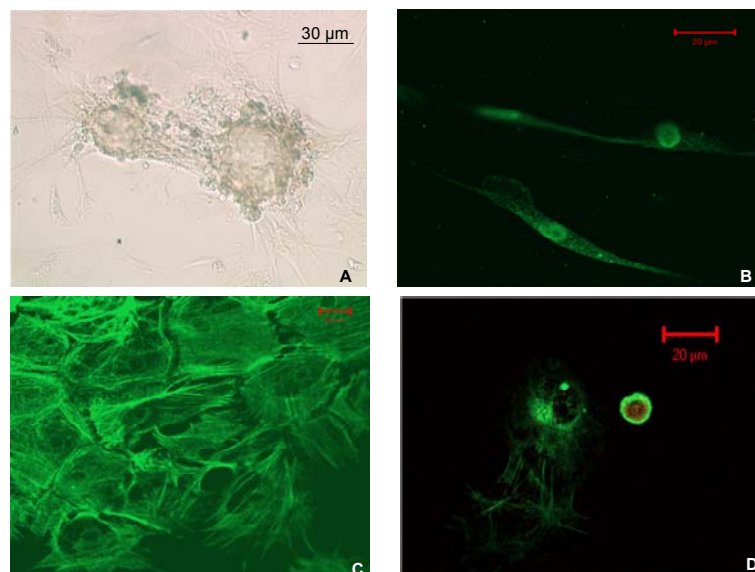


Figure 34 : Caractérisation des cellules issues des cultures primaires d'épithéliums olfactifs de poulets après 15 jours en culture.

A : « neurosphère-like » ; B : cellules exprimant la Calmoduline Kinase calcium dépendante II ; C : cellules exprimant les kératines ; D : cellule exprimant à la fois les kératines (vert) et le récepteur TrkA (rouge).

Les cultures sont composées principalement de 3 types cellulaires : des cellules exprimant la calmoduline kinase calcium dépendante II qui est un marqueur des cellules neuronales ; des cellules d'apparence fibroblastique marquées par un anticorps reconnaissant les kératines 3, 12, 14 et 18 (marqueur des cellules de soutien) et enfin des cellules exprimant à la fois une ou des kératines et le récepteur de haute affinité pour les neurotrophines TrkA (tyrosine kinase récepteur A) (marqueurs des HBC). Il existe également un quatrième type cellulaire présent au sein des neurosphères n'exprimant ni les kératines ni TrkA (non montré).

b) Séparation des cellules par SdFFF

Afin d'isoler ou d'enrichir les cultures en cellules souches d'épithélium olfactif, les cellules ont été triées par SdFFF (**Figure 35**). Au sortir de la machine deux fractions cellulaires ont été prélevées : PF1 et PF2.

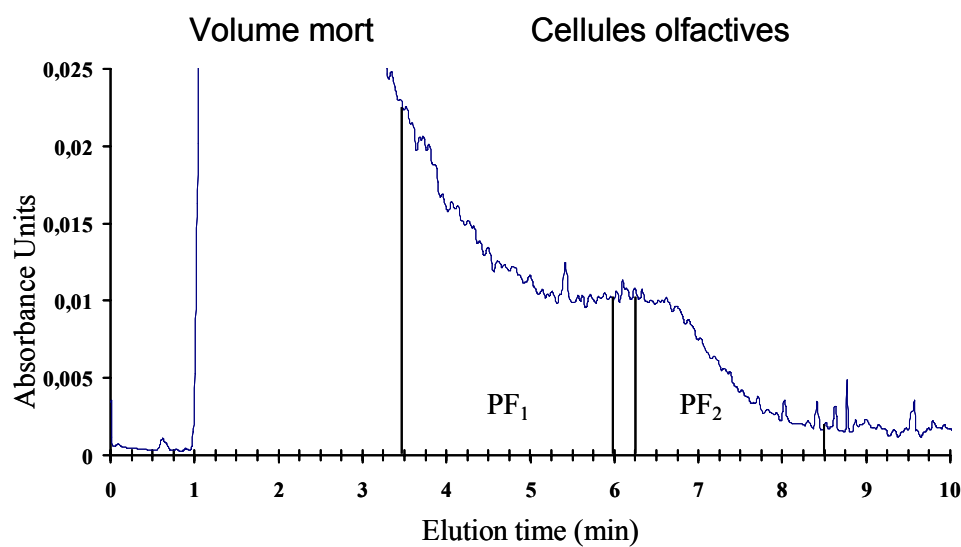


Figure35 : Fractogramme issu du tri de cellules d'épithéliums olfactifs de poulets prélevés à ED14.

PF1 et PF2 correspondent aux deux fractions cellulaires récoltées.

c) Identification des cellules après tri

Après le tri par SdFFF, les fractions collectées sont remises en culture. Dix jours après, les cellules issues des deux fractions ne présentent pas la même morphologie. La fraction PF1 se compose uniquement de cellules de type fibroblastique (**Figure 36A**) alors que la fraction PF2 se compose de 96% de petites cellules rondes exprimant le récepteur TrkA (**Figure 36B**). Lors de la remise en culture de cellules de la fraction PF2, celles-ci s'organisent en épithélium pseudoplacodal et les cellules semblent indifférenciées puisqu'elles n'expriment ni TrkA, ni les kératines ni la CamKII et ne correspondent à aucun type cellulaire observé dans les cultures primaires (**Figure 36C**). Si ces cellules sont maintenues en culture 10 jours de plus, certaines d'entre elles perdent leur adhérence et expriment à la fois le TrkA et les kératines, caractéristiques des HBC (non montré).

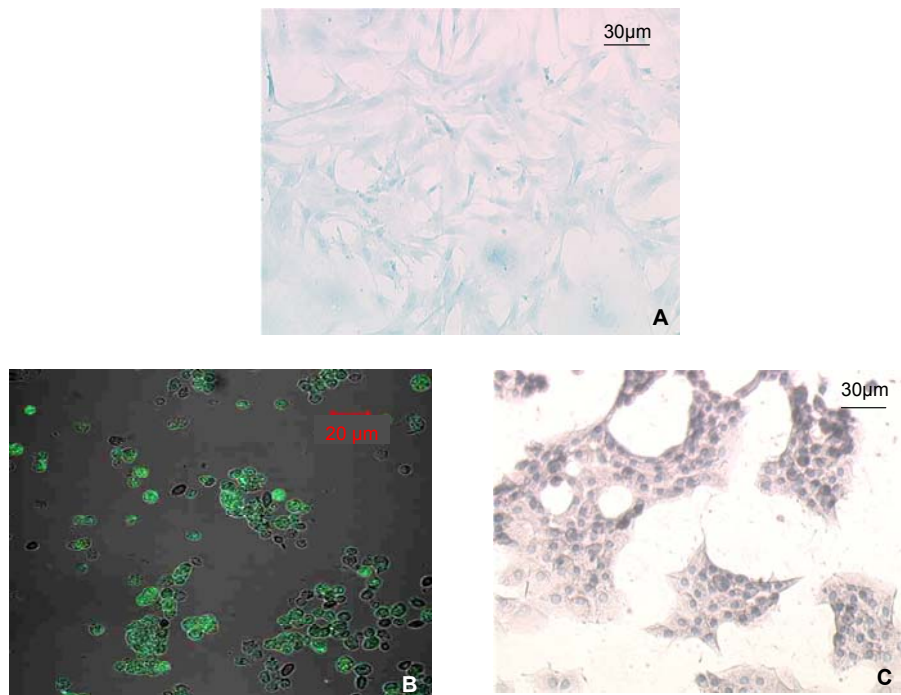


Figure 36 : Devenir de PF1 et PF2 après 10 jours de remise en culture.

A : la fraction PF1 est composée exclusivement de cellules de type fibroblastique. B : la fraction PF2 se caractérise par la présence de cellules exprimant le récepteur TrkA après le tri. C : PF2 après 10 jours de culture, les cellules forment un épithélium pseudoplacodal.

d) Caractérisation des cellules de PF2

Nous avons ensuite tenté de connaître les caractéristiques des cellules flottantes issues de PF2. Pour cela nous avons testé le caractère multipotent de ces cellules. Les cellules de la fraction PF2 ont étéensemencées à deux densités différentes : 50 cellules / mL et 5 000 cellules / mL. Après 10 jours de culture, les cellulesensemencées à faible densité forment un épithélium pseudoplacodal alors que les cellulesensemencées à forte densité recréent des structures « neurosphères like ». Les cellules composant ces amas cellulaires ressemblant aux neurosphères ont été caractérisées par immunocytochimie et hybridation *in situ* (**Figure 37**).

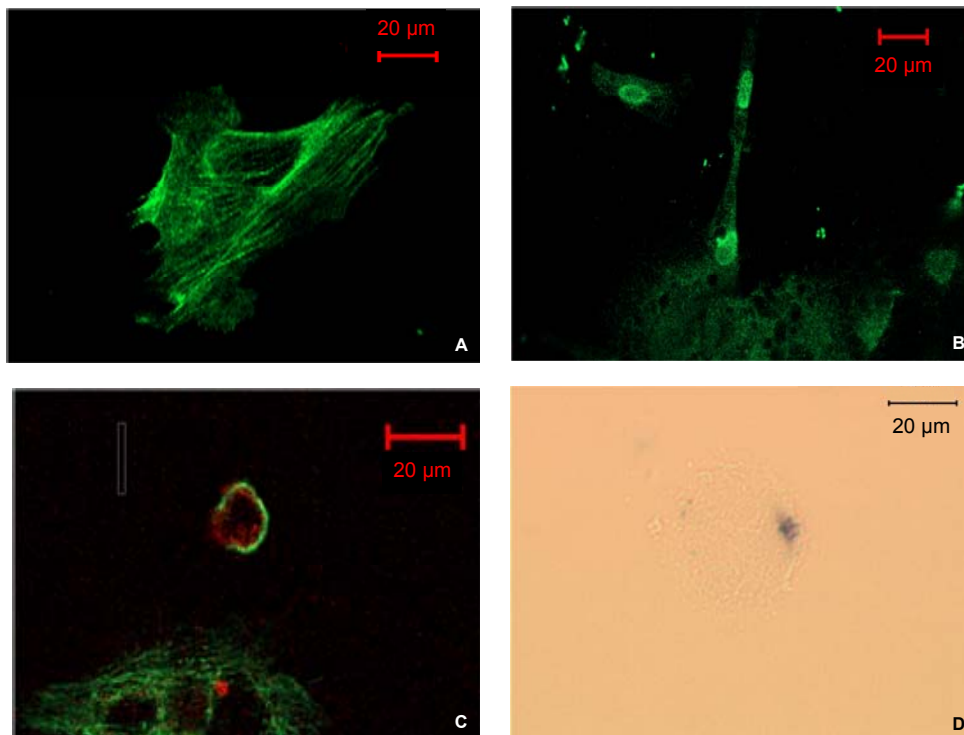


Figure 37 : Caractérisation immunocytochimique des cellules composant les « neurosphères-like » issues de 10 jours de culture de cellules de PF2 à forte densité.

A : Cellules exprimant les kératines ; B : cellules exprimant la CamKII ; C : cellules exprimant à la fois TrkA (rouge) et les kératines (vert) ; D : cellules exprimant les transcrits des récepteurs aux molécules odorantes par hybridation in situ.

Différents types cellulaires sont retrouvés après 10 jours de culture des cellules constituant PF2 : des cellules exprimant les kératines (**Figure 37A**), des cellules exprimant les kératines et le récepteur TrkA (**Figure 37C**), des cellules exprimant la CamKII (**Figure 37B**) des cellules exprimant les transcrits des récepteurs aux molécules odorantes, caractéristiques

des neurones olfactifs matures (**Figure 37D**) et enfin des cellules n'exprimant ni TrkA ni les kératines (non montré).

Après avoir démontré la multipotentialité des cellules composant la fraction PF2 (lorsque les cellules sontensemencées à forte densité), la capacité d'autorenouvellement de ces cellules a été testée. Après 4H de remise en culture en présence de BrdU, 20% des cellules de la fraction PF2 l'ont incorporé, mettant en évidence la capacité d'autorenouvellement des cellules composant la fraction PF2.

Certaines cellules flottantes exprimant le récepteur de forte affinité aux neurotrophines (TrkA), les cellules de PF2 ont été mises en présence de NGF à différentes concentrations et la prolifération cellulaire a été déterminée (**Figure 38**). Il s'avère que les cellules composant la fraction PF2 répondent positivement à des concentrations croissantes de NGF, en augmentant leur prolifération.

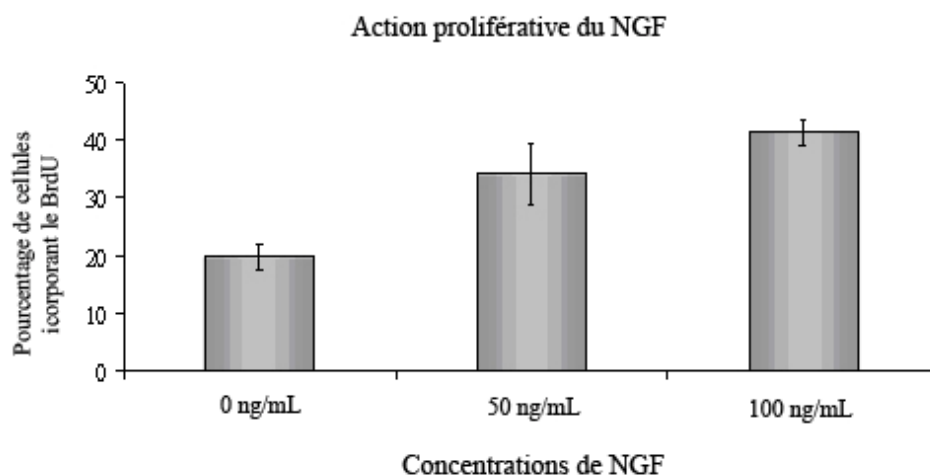


Figure38 : Effet prolifératif du NGF sur les cellules flottantes issues de la culture de PF2. Etude par incorporation de BrdU.

Au regard des résultats obtenus sur l'épithélium olfactif aviaire, il semble que nous soyons arrivés à enrichir la fraction PF2 du tri en un type cellulaire. Cette fraction cellulaire a la capacité de redonner naissance à tous les types cellulaire obtenus en culture primaire sans tri. De plus les cellules composant cette fraction cellulaire réagissent positivement au facteur de croissance NGF en proliférant.

A l'issue de ces résultats, nous avons souhaité mettre au point des cultures primaires sur un modèle plus proche de l'homme. La mise en place de cultures primaires de cellules d'épithéliums olfactifs de rats âgés de 5 jours ainsi que la caractérisation de ces cellules *in vitro* a donc été initiée. De plus, des essais ont pu être réalisés sur le modèle humain grâce à des résidus chirurgicaux de la lame criblée à visée d'incinération chez l'adulte.

2. Dans l'épithélium olfactif de rat

a) Culture primaire

Les épithéliums olfactifs de rats ont été prélevés sur des animaux âgés de 5 jours puis les cellules ont été mises en culture. Après 30 jours de culture, des amas cellulaires « neurosphères-like » apparaissent (**Figure 39**).

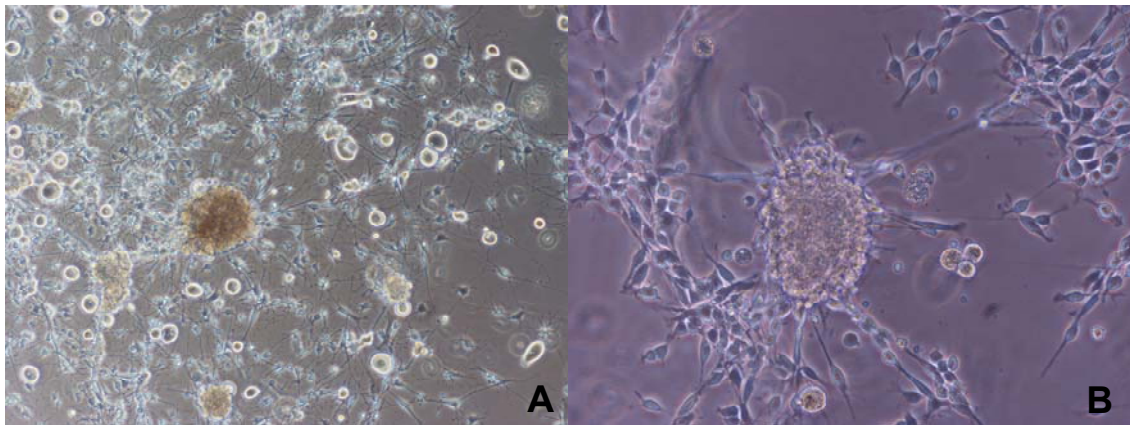


Figure 39 : Structures « neurosphères-like » obtenues après 30 jours de culture.

Grossissement : A : 100, B : X200.

En observant ces groupements cellulaires, des connexions cytoplasmiques entre différents amas cellulaires ont pu être mis en évidence (**Figure 40**).

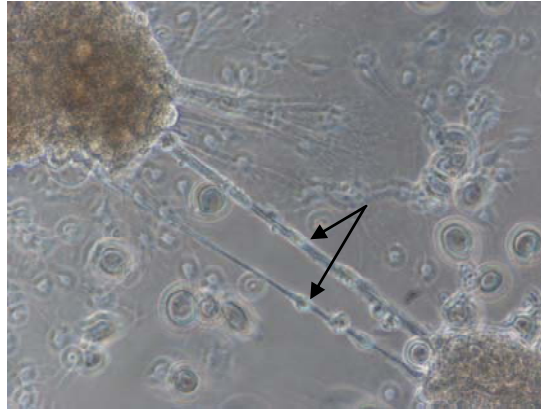


Figure 40 : Ponts cytoplasmiques reliant les amas cellulaires (→).

Grossissement X200.

Les amas cellulaires observés semblent plus ou moins flottants et uniquement rattachés au support de culture par une assise cellulaire assez mince, formée de cellules dont la morphologie est proche de celle des fibroblastes.

b) Caractérisation des cellules

Suite à l'obtention de ces cultures primaires, différents marquages ont été réalisés puis analysés par immunofluorescence afin de caractériser les types cellulaires présents dans ces cultures primaires.

Les marquages anti Calmoduline kinase calcium dépendante II ont été réalisés afin de montrer la présence de neurones au sein des cultures primaires d'épithéliums olfactifs de rats (**Figure 41**).

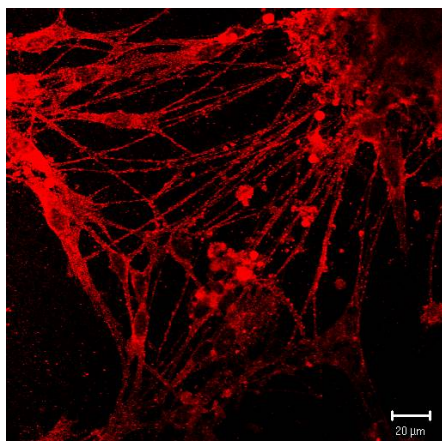


Figure 41 : Epithélium olfactif de rat après 30 jours de culture et immunomarquage par un anticorps anti-CamKII.

Certaines cellules composant les amas « neurosphère-like » présentent un marquage CamKII caractéristique des neurones.

Un deuxième type de marquage a été réalisé à l'aide d'un anticorps anti-cytokératine 14, la cytokératine étant connue pour être exprimée à la fois dans les cellules de soutien ainsi qu'au niveau des HBC (**Figure 42**).

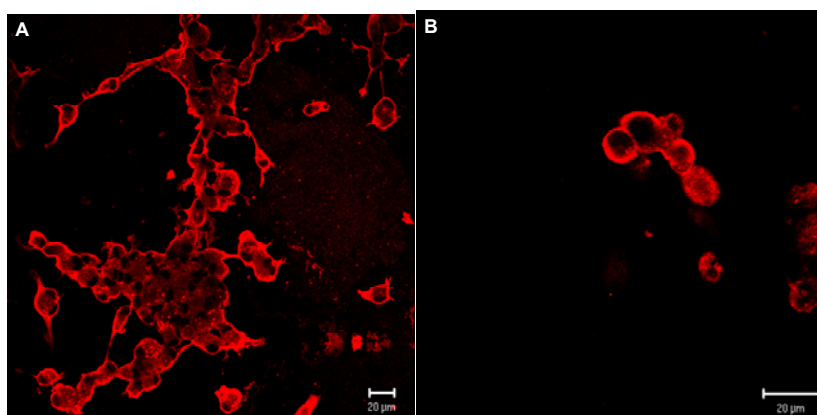


Figure 42 : Immunocytochimie réalisée avec un anticorps anti-cytokératine 14 sur une culture primaire d'épithélium olfactif de rat après 30 jours de culture.

L'anticorps utilisé est un anticorps anti-cytokératine 14. A : Les cellules marquées par cet anticorps ont une apparence fibroblastique et sont solidement attachées au plastique de la boîte de culture. B : Ce marquage est également observé sur des cellules beaucoup plus petites, beaucoup moins nombreuses et dont la morphologie ne ressemble pas à celles des cellules fibroblastiques.

Il existe au sein des cultures primaires d'épithéliums olfactifs de rats des cellules exprimant la cytokératine 14. De plus, il semble que deux populations différentes morphologiquement et numériquement expriment ce marqueur. Cependant, il est impossible d'affirmer que nous sommes en présence à la fois de HBC et de cellules de soutien sans une discrimination cytochimique plus précise de ces cellules.

C. Comparaisons entre les cultures primaires d'épithéliums olfactifs

Il s'avère que la mise en place ainsi que la caractérisation des cellules composant les cultures primaires d'épithéliums olfactifs de rats de 5 jours demandent plus de temps que pour les cultures obtenues à partir d'épithéliums d'embryons aviaires. Les prélèvements sur des nouveaux nés de 5 jours et non au stade embryonnaire rendent plus difficile l'obtention de structures ressemblant à des neurosphères en comparaison avec les résultats obtenus avec des épithéliums olfactifs issus d'embryons de poulets. De plus, à partir de cultures d'épithéliums olfactifs humains (sujets âgés) nous n'obtenons que très rarement des structures « neurosphères-like ».

D. Notch1 dans l'épithélium olfactif aviaire

Parallèlement à l'étude des cellules composant l'épithélium olfactif et en raison du potentiel de régénération de cet organe, nous avons également étudié l'expression du gène *Notch1* au cours de la mise en place de cet organe dans le modèle aviaire.

Des coupes sériées d'épithéliums olfactifs d'embryons de poulets à différents stades ont été réalisées. La principale technique utilisée a été l'hybridation *in situ* et nous a permis de visualiser l'évolution de l'expression des transcrits du gène *Notch1* au cours du développement dans l'épithélium olfactif d'embryons de poulets.

Au cours de la mise en place de la placode olfactive (ED4), un marquage homogène est détecté après hybridation *in situ* avec une sonde spécifique des transcrits de *Notch1* (**Figure 43**).

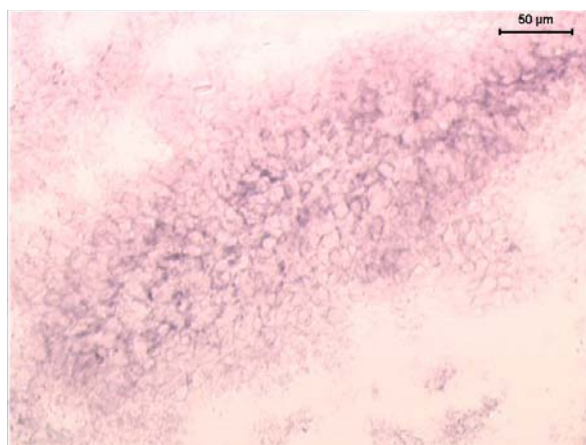


Figure 43 : Placode olfactive d'un embryon de poulet à 4 jours.

Marquage par hybridation *in situ* des transcrits de *Notch1*.

Cette expression diminue fortement entre ED4 et ED5 (**Figure 44**) puis reste relativement stable et homogène jusqu'au stade embryonnaire de ED7 à ED8. Dès lors, le profil d'expression des transcrits du récepteur *Notch1* se modifie.

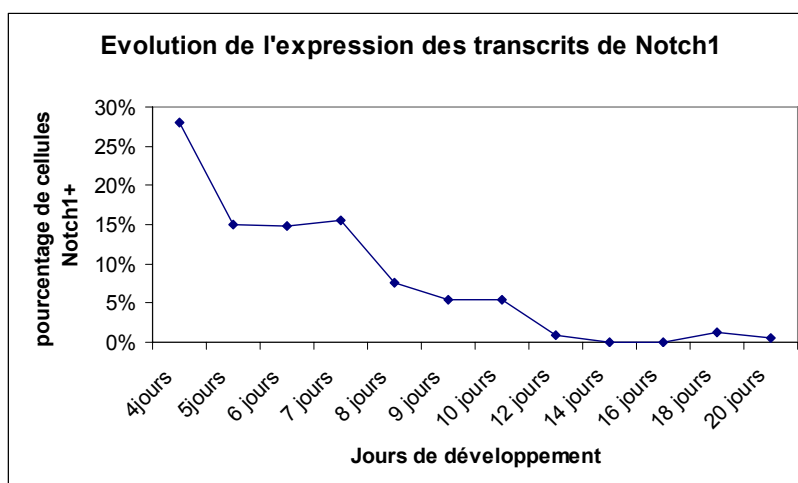


Figure 44 : Représentation de l'expression des transcrits de *Notch1* au sein de l'épithélium olfactif d'embryons de poulet au cours du développement.

Ainsi, dès le stade ED7, le marquage obtenu avec la ribosonde *Notch1* change, il n'est plus homogène au sein de la structure et se restreint à la partie médiane de l'épithélium (**Figure 45**). Les cellules marquées apparaissent comme des cellules fusiformes.

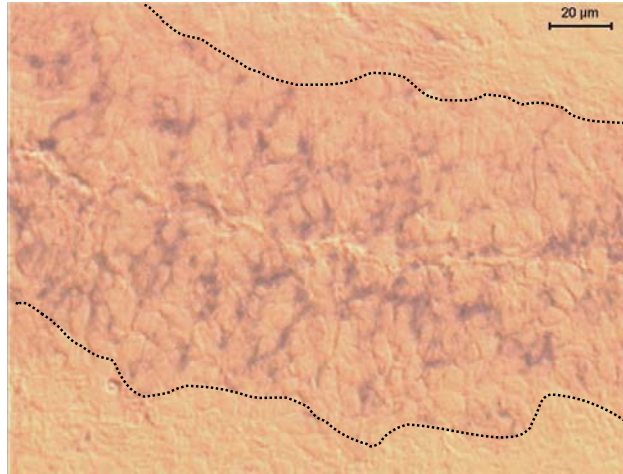


Figure 45 : Epithélium olfactif d'embryon de poulet de 8 jours.

Marquage des transcrits de Notch1 par hybridation in situ.

Par la suite, le nombre de cellules marquées diminue de manière drastique entre ED8 et ED16 (15% et 0,02% de cellules marquées, respectivement) (**Figure 44**).

A la fin du développement de l'embryon (ED18), avant l'éclosion, une ré-ascension modérée de l'expression des transcrits de *Notch1* est observée.

L'expression des transcrits de *Notch1* au sein de l'épithélium olfactif d'embryons de poulets révèle que ce récepteur apparaît au cours de la mise en place du système olfactif. De plus, cette expression décroît tout au long de l'embryogenèse du poulet et ceci par paliers avec trois périodes de diminution. La première s'observe entre ED4 et ED5, puis entre ED7 et ED8 et enfin entre ED10 et ED12. L'expression des transcrits de *Notch1* est presque inexistante au stade ED16. Avant l'éclosion de l'œuf, au stade ED18, une légère augmentation du niveau des transcrits apparaît pour enfin disparaître au stade ED20.

Le récepteur Notch1 est donc clairement impliqué au cours de la mise en place de l'épithélium olfactif. Dans ce cadre, son rôle pourrait consister en l'aiguillage de la différenciation cellulaire vers un devenir neuronal ou non neuronal. C'est pourquoi, suite à cette étude du récepteur Notch1 au cours du développement, nous avons souhaité rechercher son éventuelle implication dans une lignée de cellules gliales humaines tumorales : les cellules U-87 MG.

II. Notch1, tumeur gliale humaine et apoptose

De récentes études ont montré l'implication du récepteur Notch au cours de la régulation de la différenciation cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose dans différents types cellulaires et notamment dans des cellules néoplasiques (**Jang et al.**, 2000). Dans ce cadre, nous avons choisi la lignée U-87 MG, un glioblastome de haut grade. Différentes molécules ont été testées afin de provoquer l'apoptose de ces cellules et notamment FasL et étoposide. FasL est connu pour induire l'apoptose dans de nombreux type cellulaire et est de ce fait un outil utile dans les thérapeutiques (**Linkermann et al.**, 2005) ainsi que l'étoposide (inhibiteur des topoisomérases de type II) capable, elle aussi, d'induire l'apoptose (**Shimada et al.**, 2002).

A. Caractérisation des cellules U-87 MG

La lignée gliale humaine U-87 MG a tout d'abord été caractérisée (**Figure 45**), grâce à des anticorps spécifiques des différents types cellulaires présents dans le cerveau. Ainsi la lignée U-87 MG exprime la GFAP (Anti-GFAP Ab), un marqueur des astrocytes, ainsi que CD68 (Anti-CD68 mAb), un marqueur exprimé par la microglie et certains astrocytes tumoraux (**Zarate et Sampaolesi**, 1999), alors que les neurofilaments (Anti-NF mAb), spécifiques des neurones, ne sont pas exprimés par ces cellules tumorales.

Un dernier immunomarquage a montré l'expression, à la surface des cellules, du HLA de classe I (Anti-HLA mAb), un marqueur spécifique des cellules humaines.

Des contrôles isotypiques ont systématiquement été réalisés mais aucun marquage n'a été détecté (non montré).

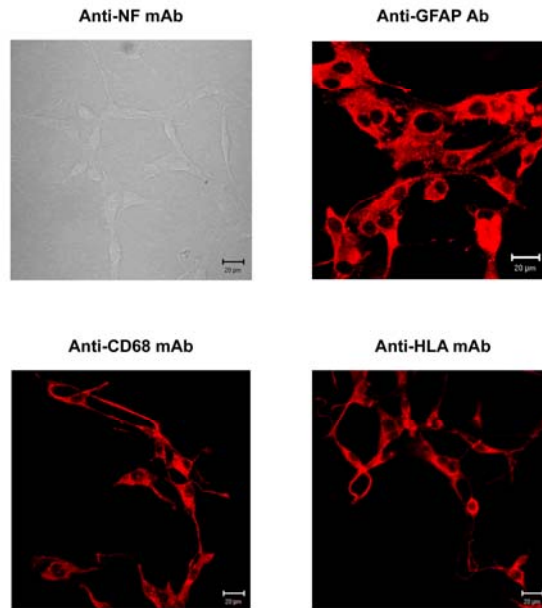


Figure 45 : Analyse immunocytochimique des marqueurs exprimés par les cellules U-87 MG.

B. Le récepteur Notch1 et ses ligands dans les cellules U-87 MG

1. Le récepteur Notch1

Dans un premier temps, la présence du récepteur Notch1 a été étudiée dans les cellules U-87 MG en conditions basales de culture, par deux méthodes : le Western-blotting, l'immunocytochimie. Les techniques ont permis de détecter la présence d'une protéine reconnue par 1 anticorps reconnaissant la partie extracellulaire du récepteur Notch1 (C20) (**Figure 46A et B**). Le contrôle isotypique pour l'immunocytochimie a été réalisé (non montré).

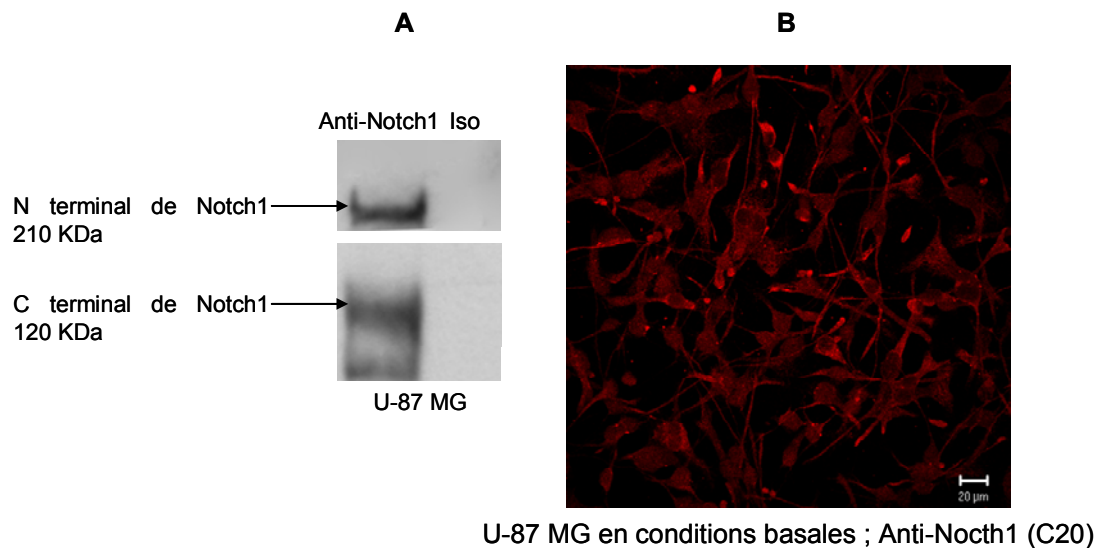


Figure 46 : Détection de l'expression de Notch1 dans des conditions basales sur les U-87 MG.

A : par Western blotting ; B par immunocytochimie par l'anticorps anti-Notch1 reconnaissant le domaine intracellulaire de Notch1 (C20) ; Iso : contrôle isotypique.

La technique de cytométrie de flux nous ont également permis de montrer que lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées, aucun marquage n'est détecté à la surface cellulaire par l'anticorps H131 et C20 reconnaissant respectivement le domaine extracellulaire et intracellulaire du récepteur Notch1. En revanche, le récepteur est détecté lorsque les cellules sont perméabilisées, et ceci aussi bien avec l'anticorps H131 et C20 (**Figure 47**).

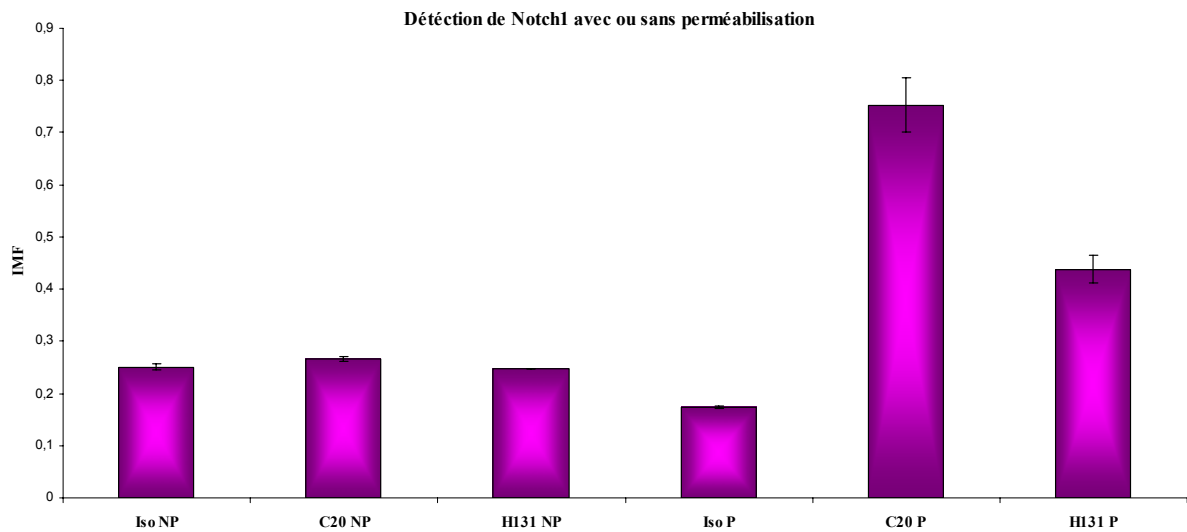


Figure 47 : Détection du récepteur Notch1 par cytométrie de flux dans la lignée U-87 MG.

Iso : contrôle isotypique ; C20 : anticorps reconnaissant la partie intracellulaire du récepteur Notch1 ; H131 : anticorps reconnaissant le domaine extracellulaire du récepteur Notch1 ; P : cellules perméabilisées ; NP : cellules non perméabilisées.

2. Les ligands du récepteur Notch1

Nous avons ensuite recherché, par Western blotting sur des lysats de cellules U-87 MG, la présence des ligands Delta 1 et 4, Jagged 1 et 2 dans la lignée U-87 MG (**Figure 48**).

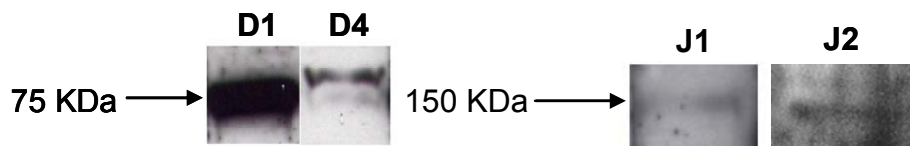


Figure 48 : Détection de Delta 1, 4 et de Jagged 1 et 2 par Western blotting.

D1 : Delta 1 ; D4 : Delta 4 ; J1 : Jagged 1 ; J2 : Jagged 2. La détection des protéines a été effectuée à partir de 20 µg de protéines totales pour la détection des ligands excepté pour la détection de J2 où 30 µg de lysat protéique a été nécessaire.

La détection de protéines grâce aux anticorps anti-Delta 1, Delta 4, Jagged 1, Jagged 2 a permis de mettre en évidence la présence de Delta 1, 4 (D1, D4) et de Jagged 1 et 2 (J1, J2) dans les cellules U-87 MG en conditions basales. Le contrôle isotypique a été systématiquement réalisé et ne montre aucun marquage (non montré).

Les ligands du récepteur Notch1 ont ensuite été recherchés par cytométrie de flux. Dans un premier temps les cellules n'ont pas été perméabilisées. En effet, les anticorps anti-ligands utilisés reconnaissent la partie extracellulaire des ligands. Dans ces conditions, aucun marquage n'a été détecté. Les cellules ont donc été perméabilisées afin de détecter ces protéines (**Figure 49**).

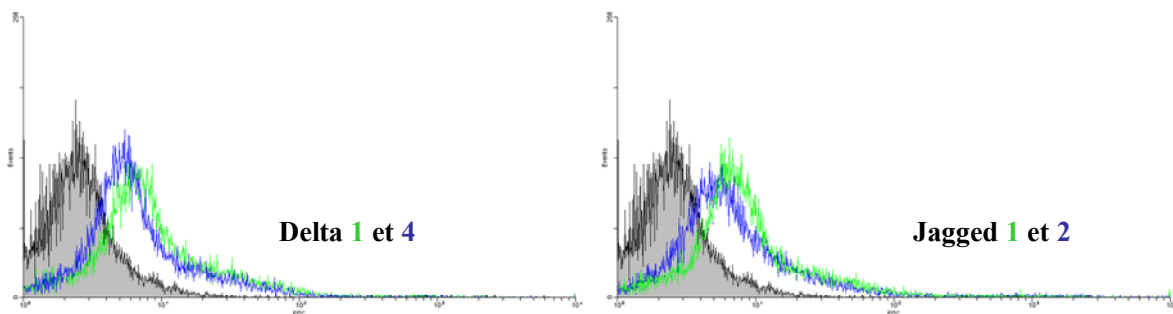


Figure 49 : Détection de Delta 1 et 4 Jagged 1 et 2 par cytométrie de flux après perméabilisation.

Les pics en gris correspondent au marquage obtenu avec le contrôle isotypique et les pics colorés aux marquages obtenus avec les différents anticorps correspondant aux ligands de Notch1.

Il semble qu'en conditions basales et par cytométrie de flux nous arrivions à détecter Delta 1 et 4 ainsi que Jagged 1 et 2 comme par Western blotting. Les intensités moyennes de fluorescence ont ensuite été comparées afin d'observer les variations d'expression des ligands au sein de la lignée U-87 MG (**Figure 50**).

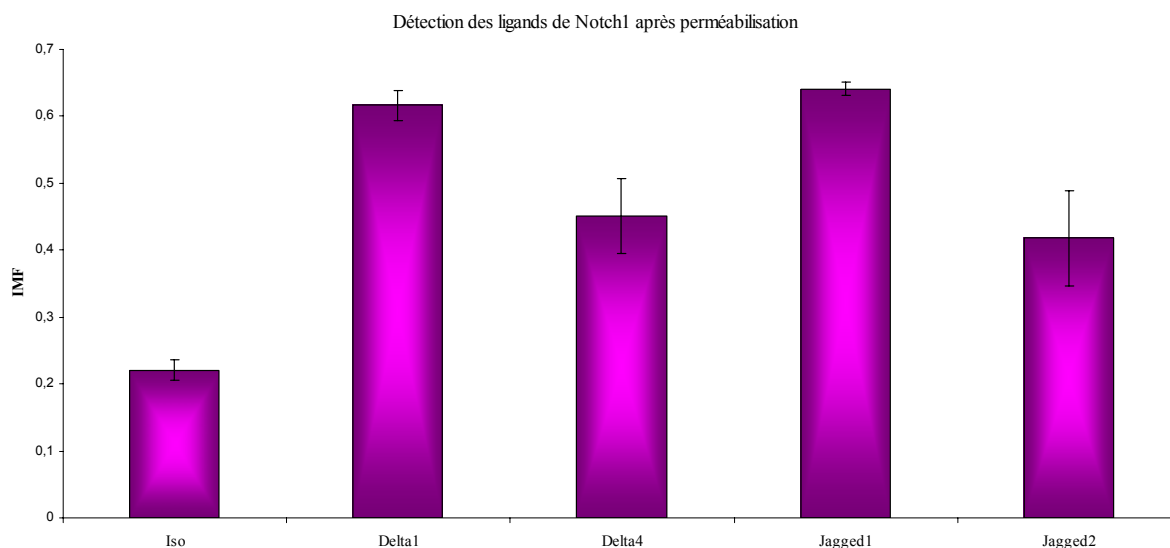


Figure 50 : Mesure des intensités moyennes de fluorescence des ligands de Notch1.

Les intensités moyennes de fluorescence des ligands Delta 1 et Jagged 1 sont comparables, et celles de Delta 4 et de Jagged 2 sont également comparables deux à deux. Il semble que le niveau d'expression de Delta 1 ainsi que de Jagged 1 soit nettement supérieur à celui observé pour les ligands Delta 4 et Jagged 2.

Après avoir détecté la existence du récepteur Notch1 et de 4 de ces 5 ligands, nous avons recherché la présence du récepteur de mort Fas ainsi que l'efficacité de son ligand (FasL) et de l'étoposide (inhibiteur des topoisomérase de type II) pour induire l'apoptose des cellules U-87 MG.

C. Le récepteur Fas dans les cellules U-87 MG avant et après exposition à FasL et étoposide

L'étude de l'expression du récepteur Fas dans la lignée U-87 MG a tout d'abord été réalisée par Western-blotting (**Figure 51**). Les protéines des lysats cellulaires utilisés sont obtenues, obtenues à partir de cellules Jurkat (contrôle positif), de cellules U-87 MG à l'état

basal ou après exposition à FasL et étoposide. Quelles que soient les conditions d'activation, une protéine de 45 kDa a été détectée grâce à un anticorps polyclonal anti-Fas (C-20), montrant que le récepteur Fas est exprimé dans la lignée cellulaire aussi bien à l'état basal qu'après traitement des cellules avec FasL et étoposide.

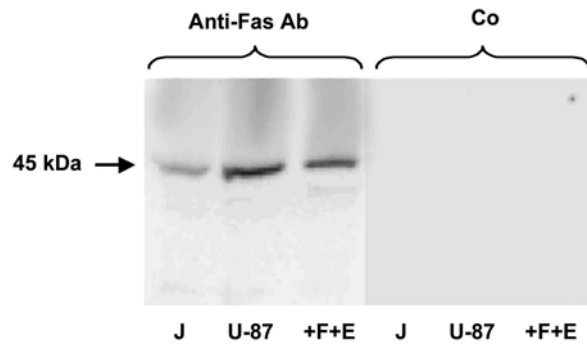


Figure 51 : Détection par Western-blotting de l'expression du récepteur Fas au niveau de cellules gliales à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.

J : Jurkat ; U-87 : état basal ; +F+E : U-87+FasL+ étoposide ; Co : Contrôle isotypique

L'immunofluorescence sur les cellules U-87 MG traités ou non avec du FasL et de l'étoposide a ensuite été réalisé avec un anticorps monoclonal anti-Fas (B-G27) (Figure 52). Le marquage obtenu a confirmé la présence du récepteur Fas à la surface des cellules, même après exposition à du FasL associé à l'étoposide

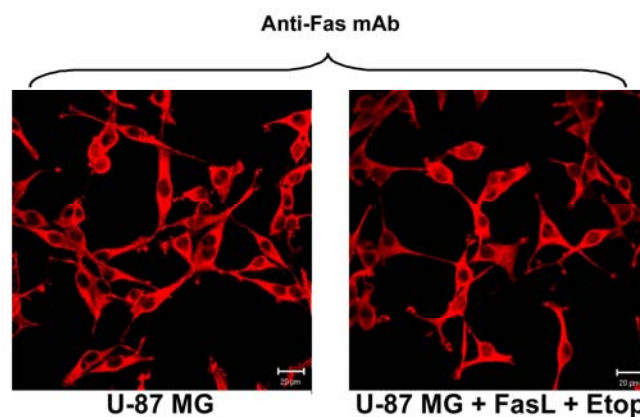


Figure 52 : Etude immunocytochimique de l'expression de Fas au niveau de la lignée gliale U-87 MG à l'état basal ou après exposition à FasL et étoposide.

Lors des deux expérimentations, un contrôle utilisant des anticorps isotypiques, a également été réalisé et s'est révélé négatif.

D. Apoptose des cellules U-87 MG en présence de FasL et d'étoposide

Le taux d'apoptose des cellules U-87 MG après exposition aux molécules FasL et étoposide, à différentes concentrations, a été déterminé grâce aux techniques de dosage des nucléosomes solubles (Cell Death Detection ELISA Plus) et TUNEL en immunofluorescence. Les index apoptotiques ont été calculés à partir du taux basal d'apoptose arbitrairement fixé à 1.

Le taux d'apoptose des cellules U-87 MG a tout d'abord été déterminé par ELISA après exposition à des doses croissantes d'étoposide de 5 à 80 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (**Figure 53**). Ainsi, quelle que soit la concentration d'étoposide, le niveau apoptotique des cellules est significativement augmenté par rapport à celui obtenu pour des cellules non stimulées (*Test T : $p < 0,013$ quelle que soit la concentration en étoposide testée*). Le taux d'apoptose des cellules ne varie pas en fonction de la concentration d'étoposide utilisée (*ANOVA : $p > 0,5$*) et n'est pas corrélé avec l'augmentation de la concentration d'étoposide (*Test de Pearson : $p > 0,15$*). Ainsi, la concentration de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ d'étoposide a été choisie pour continuer l'étude. En effet, cette concentration induit un taux d'apoptose élevé par rapport au niveau basal sur les cellules U-87 MG ($17,1 \pm 1,3$), et correspond à la concentration la plus couramment employée *in vitro* (**Boesen-de Cock et al., 1998 ; Takahashi et al., 1998**).

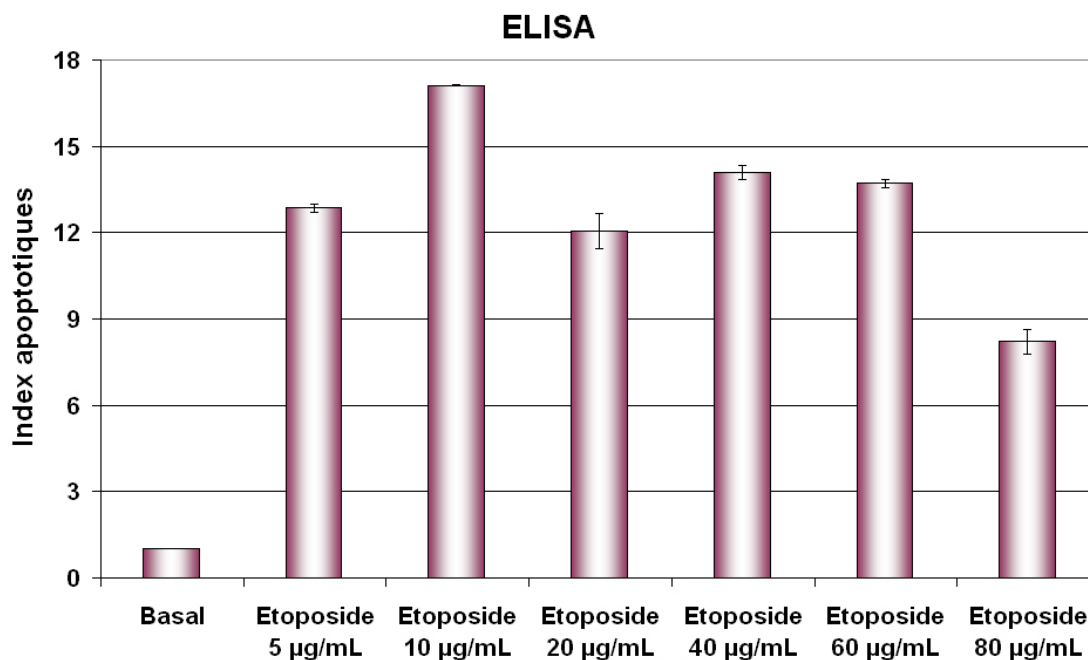


Figure 53 : Analyse, par le dosage des nucléosomes solubles, des taux d'apoptose des cellules U-87 MG en présence d'étoposide à des concentrations croissantes.

Les variations des taux d'apoptose, par dosage des nucléosomes solubles, ont ensuite été déterminées en présence de doses croissantes de FasL (5 à 80 ng / mL). Le niveau d'apoptose induit par FasL est significativement différent de celui du niveau basal (*ANOVA* : $p < 0,0001$). Contrairement aux résultats obtenus précédemment pour l'étoposide, l'apoptose augmente avec la concentration de FasL et s'accroît de façon dose-dépendante (*Test de Pearson* : $p = 0,016$) (**Figure 54**). De plus, l'association de FasL (5 à 80 ng / mL) et de l'étoposide (10 µg / mL) augmente l'apoptose des cellules en comparaison avec l'apoptose obtenue pour des concentrations équivalentes de FasL seul (*Test de Pearson* : $p = 0,03$) (**Figure 54**).

Pour connaître l'effet de l'association de FasL et de l'étoposide, nous avons comparé la différence de taux d'apoptose [(FasL (5-80 ng / mL) + étoposide)-(FasL_(5-80 ng / mL))] à l'effet de l'étoposide seul (**Figure 54**). Les différences de niveau d'apoptose obtenue ($27,1 \pm 5,5$) sont significativement plus importantes que l'apoptose détectée avec l'utilisation de l'étoposide seul ($13,5 \pm 2,0$) (*ANOVA* : $p = 0,00846$). Ceci démontre l'effet supra-additif de l'association de l'étoposide et de FasL sur le niveau d'apoptose quelle que soit la concentration de FasL.

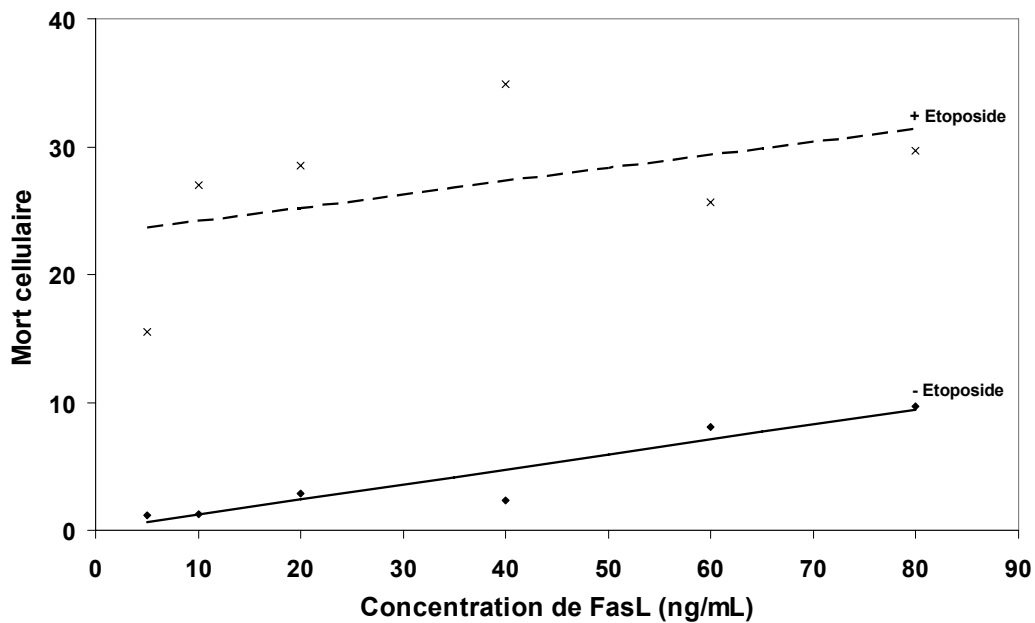


Figure 54 : Influence de FasL sur le niveau d'apoptose dû à l'étoposide.

Les deux molécules ont un effet supra-additif sur le niveau d'apoptose (dosage des nucléosomes solubles) comparé à l'effet de FasL seul, quelle que soit la concentration de FasL.

Le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé grâce à la méthode TUNEL (**Figure 55**). Les résultats confirment ceux obtenus par ELISA. L'association de FasL (40 ng / mL) et de l'étoposide (10 µg / mL) augmente de façon supra-additive l'apoptose des cellules gliales, comparé au taux de mort cellulaire obtenu pour les cellules stimulées avec FasL seul ou l'étoposide seul (*ANOVA multivarié FasL : $p < 0,0001$; étoposide: $p < 0,0001$ et FasL+étoposide: $p = 0,0006$*) par comparaison au pourcentage d'apoptose à l'état basal.

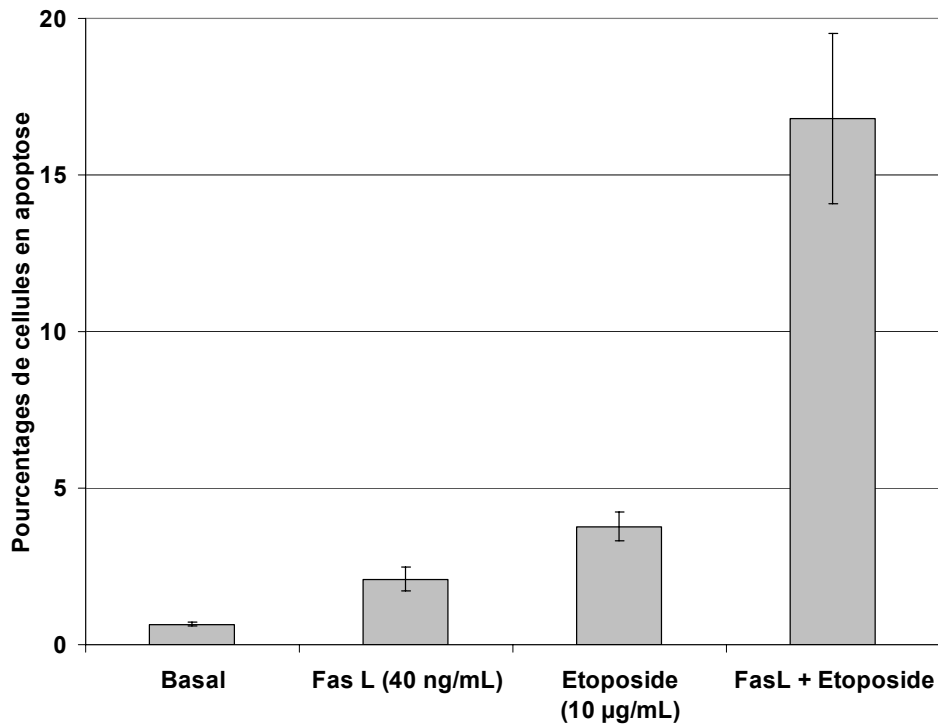


Figure 55 : L'effet supra-additif de FasL et étoposide sur l'apoptose des U-87 MG.

L'effet apoptotique de FasL et de l'étoposide a été étudié en utilisant la méthode TUNEL. FasL + Etoposide : correspond à l'association de FasL à 40 ng / mL et de l'étoposide à 10 µg / mL.

Ces résultats ont permis de déterminer les doses de FasL (40 ng / mL) et d'étoposide (10 µg / mL) suffisantes pour induire l'apoptose des cellules. Ces concentrations ont ainsi été utilisées pour la suite de cette étude.

E. L'association FasL et étoposide diminue la prolifération des cellules gliales

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée par l'incorporation du BrdU au niveau de l'ADN des cellules en division.

Les analyses d'incorporation de BrdU (**Figure 56**) ont montré que FasL ne modifie pas la division des cellules (*ANOVA multivarié* : $p = 0,082$) alors que l'étoposide la diminue fortement (*ANOVA multivarié* : $p < 0,0001$). Enfin, l'association FasL / étoposide ne montre pas un effet anti-prolifératif significativement supérieur à celui obtenu avec l'étoposide seul ($p > 0,5$) (**Figure 56**).

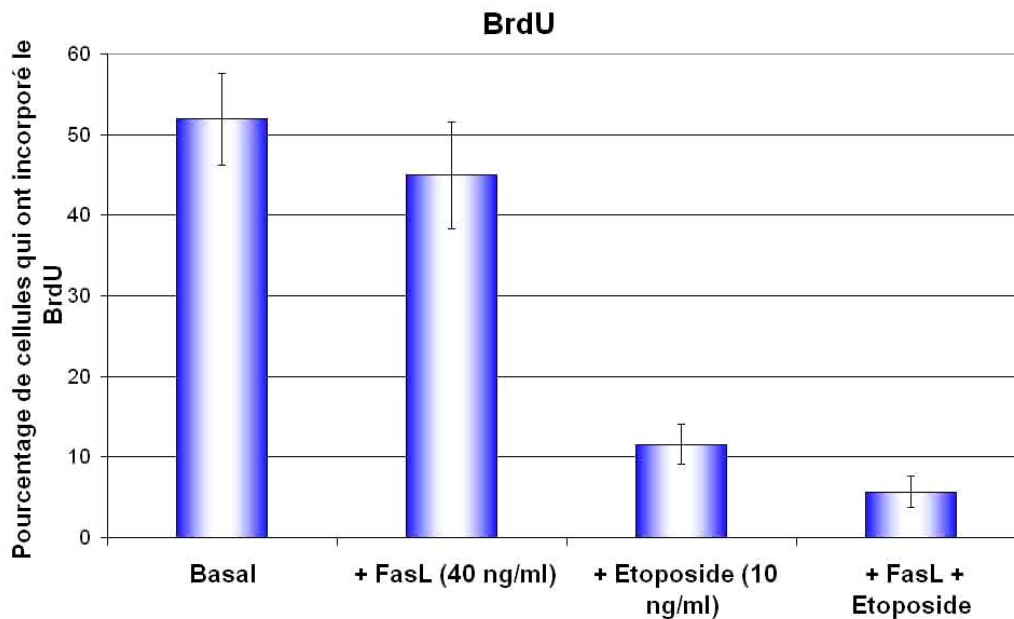


Figure 56 : Analyse de la prolifération des cellules U-87 MG, en présence de FasL et d'étoposide, par détection de l'incorporation de BrdU.

Après avoir déterminé l'effet des molécules pro-apoptotiques sur la lignée U-87 MG, les interactions possibles entre le récepteur Notch1, lié à l'agressivité des glioblastomes, et l'apoptose, induite par Fas et l'étoposide, ont été recherchées.

Le récepteur Notch1 a été étudié au niveau de la lignée humaine U-87 MG dans les différentes conditions d'exposition à FasL, étoposide et à la dexaméthasone. FasL étant connu pour induire des œdèmes lors de son utilisation thérapeutique, l'effet de la dexaméthasone a donc été testé *in vitro*. En effet, son action anti-œdémateuse a été étudiée en vue d'expérimentations *in vivo*. Cette étude a permis d'observer l'évolution de l'expression de la protéine Notch1 en fonction des effets fonctionnels obtenus au niveau cellulaire après les différents traitements. Ce travail a permis d'étudier le rôle potentiel de ces différentes molécules sur le cycle cellulaire, l'apoptose ainsi que la différenciation.

F. L'apoptose des cellules U-87 MG après les traitements par FasL, étoposide et dexaméthasone

Les expérimentations réalisées pour l'étude du récepteur Notch1 dans la lignée U-87 MG sont faites sur des cellules ayant subi moins de passages que celles précédemment utilisées et cultivé avec un sérum de veau fœtal différent. Les cellules U-87 MG ont été exposées pendant 24H et 48H à différentes molécules : FasL (40 ng / mL), étoposide (10 µg / mL), dexaméthasone (10^{-7} M) ainsi que toutes les combinaisons de ces drogues à ces mêmes concentrations. L'apoptose a été détectée par deux méthodes : l'ELISA Cell death (**Figures 57**) et le DAPI (non montré).

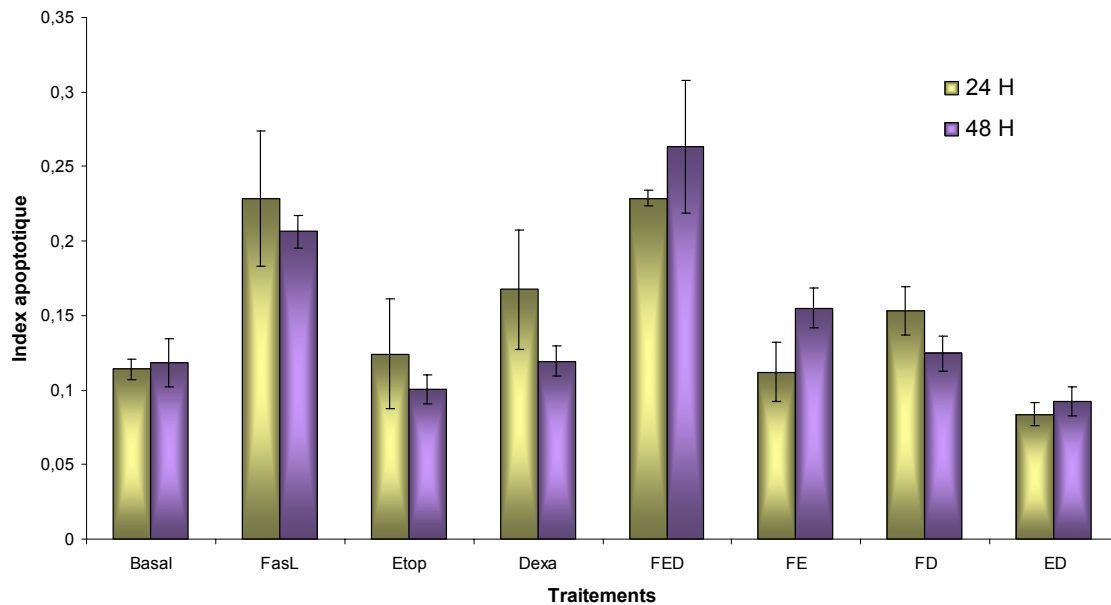


Figure 57 : Détection de l'apoptose par ELISA Cell Death après traitements par FasL, étoposide, dexaméthasone et différentes combinaisons.

Les molécules et la combinaison de ces molécules induisent l'apoptose des cellules U-87 MG après 24H et 48H de traitement. FasL : FasL à 40 ng / mL ; Etop : étoposide à 10 µg / mL ; Dexa : dexaméthasone à 10^{-7} M ; FED : FasL (40 ng / mL)+etop (10 µg / mL)+Dexa (10^{-7} M). FE, FD, ED correspondent aux molécules associées deux à deux aux mêmes concentrations que celles citées ci-dessus.

Les deux méthodes de détection utilisées pour l'évaluation de la mort cellulaire par apoptose ont permis de montrer les mêmes profils en réponse aux différents traitements.

Après 24H de traitement par FasL (40 ng / mL), une augmentation significative de l'apoptose par comparaison au niveau basal est détectée (**Figure 57**) (*ANOVA* : $p = 0,0018$). L'exposition des cellules à l'étoposide seul, ou à la dexaméthasone seule, n'induit pas d'augmentation significative des réponses apoptotiques. En revanche, l'association des 3 molécules induit une augmentation significative de l'apoptose (*ANOVA* : $p = 0,0017$) par comparaison au niveau basal ainsi que par comparaison aux associations FasL / étoposide (*ANOVA* : $p = 0,0015$), étoposide / dexaméthasone (*ANOVA* : $p = 0,0002$) ou FasL / dexaméthasone (*ANOVA* : $p = 0,0254$), qui ne sont pas significatives par rapport aux conditions basales.

Après 48H d'exposition, le même type d'observation est possible pour les traitements FasL et FED par comparaison aux conditions basales (*ANOVA* : $p = 0,0006$; $p < 0,0001$ respectivement).

En outre, et uniquement après 48H d'exposition, l'association des trois molécules (FED) provoque une augmentation significative du niveau d'apoptose par rapport à l'apoptose induite par FasL seul (*ANOVA* : $p = 0,0146$).

Enfin, il n'existe pas de variations significatives entre les résultats obtenus entre 24H et 48H de traitement sur le niveau d'apoptose induite, quelles que soient les conditions de traitement (*ANOVA* : $p > 0,05$).

G. Variation de l'expression de Notch1 en fonction des traitements

Après avoir analysé l'effet des traitements sur l'apoptose des cellules U-87 MG, le niveau d'expression du récepteur Notch1 a été détecté par cytométrie de flux dans les mêmes conditions de traitements (**Figure 58**).

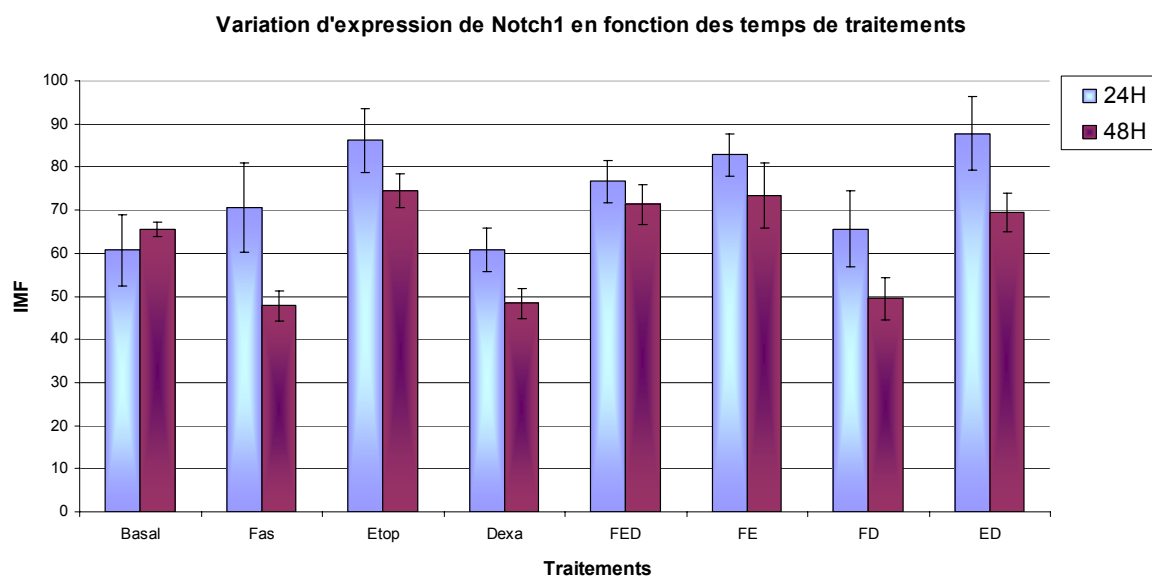


Figure 58 : Détection du récepteur Notch1 dans les cellules U-87 MG par cytométrie de flux après traitements de 24H et 48H.

Représentation des intensités moyennes de fluorescence (IMF) en fonction des traitements.

L'intensité d'expression du récepteur Notch1 au niveau des cellules U-87 MG est significativement différente entre 24H et 48H (*ANOVA* : $p = 0,0039$) (**Figure 58**).

Après 24H de traitement, l'expression de Notch1 par rapport au niveau basal augmente lorsque les cellules sont en contact avec l'étoposide (*ANOVA* : $p = 0,0075$). Un accroissement significatif de l'intensité moyenne de fluorescence est également observé lorsque les cellules sont traitées avec l'association FasL / étoposide (*ANOVA* : $p = 0,0173$). Cet accroissement est encore plus significatif lorsque les cellules sont traitées avec l'association dexaméthasone / étoposide (*ANOVA* : $p = 0,0051$). En revanche, le niveau d'expression de Notch1 ne varie pas significativement en présence des trois molécules.

Après 48H de traitement, les variations d'expression du récepteur Notch1 observées sont beaucoup plus importantes que celles observées après 24H. La plus importante est due au traitement par FasL qui entraîne une grande diminution d'expression du récepteur Notch1, comparé au niveau basal (*ANOVA* : $p = 0,0033$).

Compte tenu des variations d'expression du récepteur Notch1 dans les cellules U-87 MG, notamment lors des traitements par FasL et étoposide, la répartition du récepteur Fas et du domaine actif de Notch1 dans les cellules a été analysé par immunofluorescence (**Figure 59**).

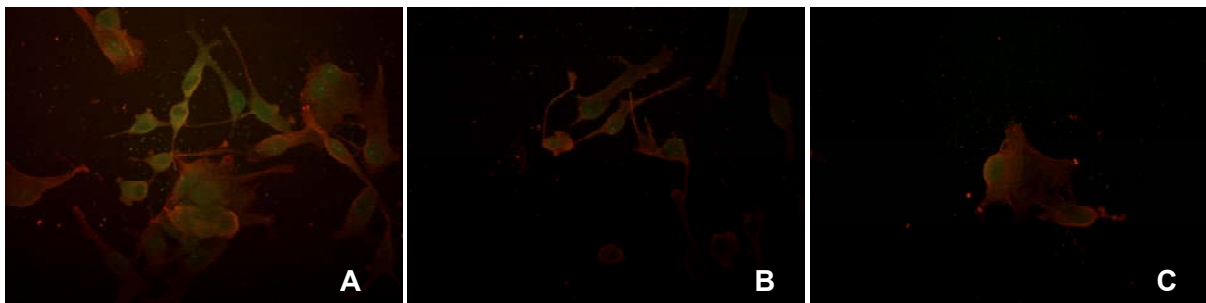


Figure 59 : Expression des récepteurs Fas et du domaine intracellulaire de Notch1 dans les U-87 MG selon les traitements.

A : expression différentes des récepteurs Fas (rouge) et Notch1 (vert) en conditions basales ; B : après 48H de traitements avec du FasL (40 ng / mL) ; C : après 48H de traitement avec de l'étoposide (10 ng / mL). A et B : grossissement X200 et C : grossissement X400.

L'observation microscopique des cellules ne révèle pas de variation de la répartition du récepteur du Fas et du domaine intracellulaire du récepteur Notch1 dans les différentes conditions de stimulation. En revanche, il semble que le domaine actif de Notch1 soit plus particulièrement localisé au niveau du cytoplasme et du noyau des cellules et reste peu voir pas exprimé au niveau de la membrane plasmique. Un contrôle isotypique pour chaque expérience a été réalisé et n'a montré aucun marquage (non montré).

En complément de l'étude des variations d'expression du récepteur Notch1, le pourcentage de cellules exprimant le récepteur Notch1 a été déterminé (**Figure 60**).

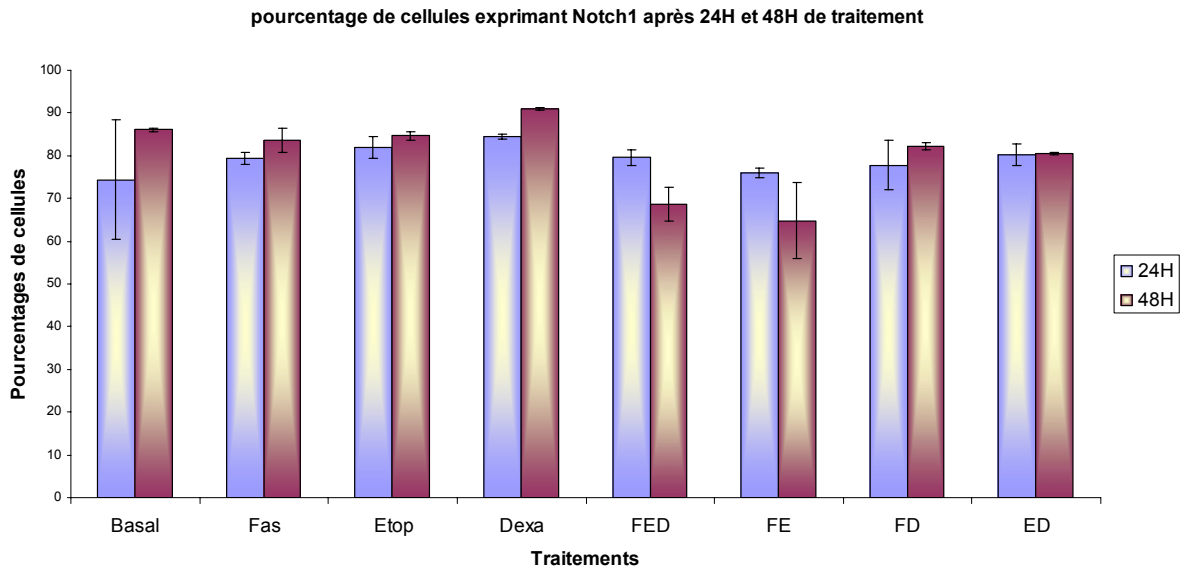


Figure 60 : Pourcentage de cellules exprimant Notch1 déterminé par cytométrie de flux après 24H et 48H de traitement.

Quelles que soient les conditions de stimulation, le nombre de cellules exprimant le récepteur Notch1 ne varie pas après 24H (**Figure 60**). Au contraire, après 48H de traitements, le pourcentage de cellules exprimant le récepteur Notch1 diminue lorsque les cellules sont mises en présence des trois molécules ou de l'association FasL / étoposide.

Afin de connaître le mode d'action de chacune des molécules testées, le cycle cellulaire et la différenciation des cellules U-87 MG ont été étudiés après traitements par ces différentes molécules. De plus, l'étoposide étant une molécule cytostatique ces expérimentations nous permettraient de connaître exactement l'impact de cette molécule sur le cycle cellulaire des cellules de la lignée U-87 MG.

H. Les variations du cycle cellulaire après traitements

Les variations du cycle cellulaire ont pu être observées par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium. Une analyse informatique nous a permise de distinguer les phases S, G2-M et G0-G1 du cycle cellulaire. Les mêmes profils de cycle cellulaire ont pu être observés entre les conditions basales ou après traitement par FasL, dexaméthasone ou encore l'association de deux molécules (**Figure 61**) et ceci après 24H ou 48H de traitement.

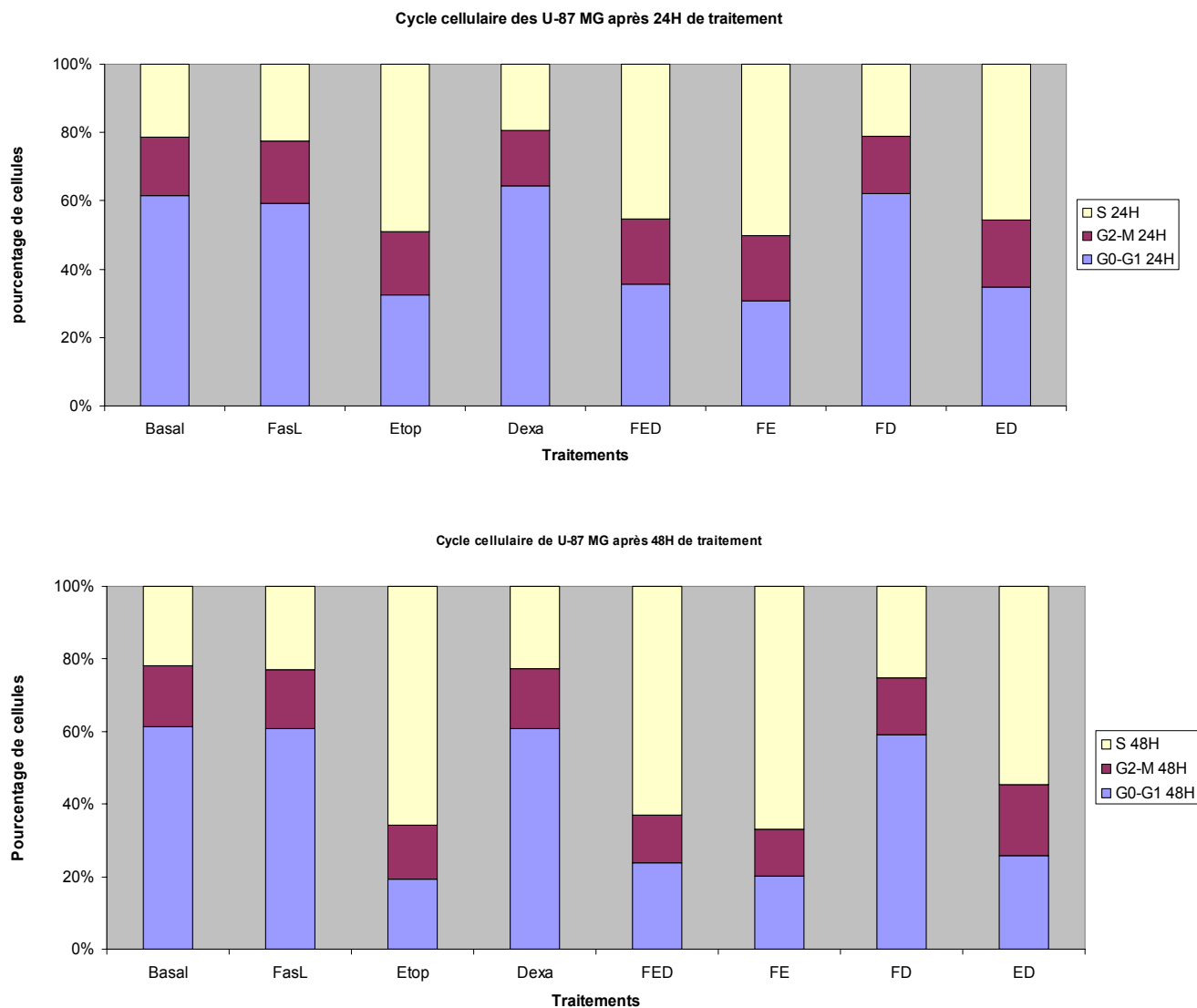


Figure 61 : Evolution du cycle cellulaire des cellules U-87 MG après traitements.

Cependant, lorsque les cellules U-87 MG sont mises en contact avec de l'étoposide, associé ou non à d'autres molécules, le profil du cycle cellulaire est modifié de manière drastique. En effet, après 24H de traitement, 47% des cellules mises en contact avec l'étoposide sont bloquées en phase S et le pourcentage de cellules bloquées passe à 62% après 48H de traitement alors qu'il est à 21,7% à l'état basal.

I. Variation de la différenciation après traitements

L'impact des traitements sur la différenciation de cellules U-87 MG a ensuite été étudié. Les variations d'expression de la vimentine, un marqueur d'indifférenciation de la lignée U-87 MG, ont donc été analysées après exposition des cellules aux différents traitements. Après 24H et 48H de traitement, l'expression du récepteur Notch1 ainsi que celle de la vimentine ont été recherchées par cytométrie de flux (**Figure 62**). Toutes les cellules exprimant la vimentine expriment également le récepteur Notch1.

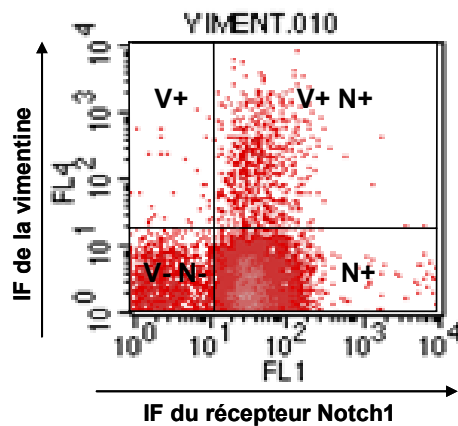


Figure 62 : Détection de la vimentine et du récepteur Notch1 sur les cellules U-87 MG.

IF : intensité de fluorescence

Le niveau d'expression des deux molécules a ensuite été recherché (**Figure 63**). Il s'avère que le niveau d'expression de la vimentine reste très faible (6%) au sein de la population cellulaire U-87 MG à l'état basal. En effet, alors que seulement 6% des cellules en moyenne expriment les deux marqueurs, 80% des cellules expriment Notch1 (**Figure 63**).

Lors des différents traitements, alors qu'aucune différence significative n'a pu être observée après 24H de stimulation une diminution importante du pourcentage de cellules exprimant à la fois le récepteur Notch1 et la vimentine a été détectée après 48H de stimulation à l'exception de l'exposition à FasL (**Figure 63**).

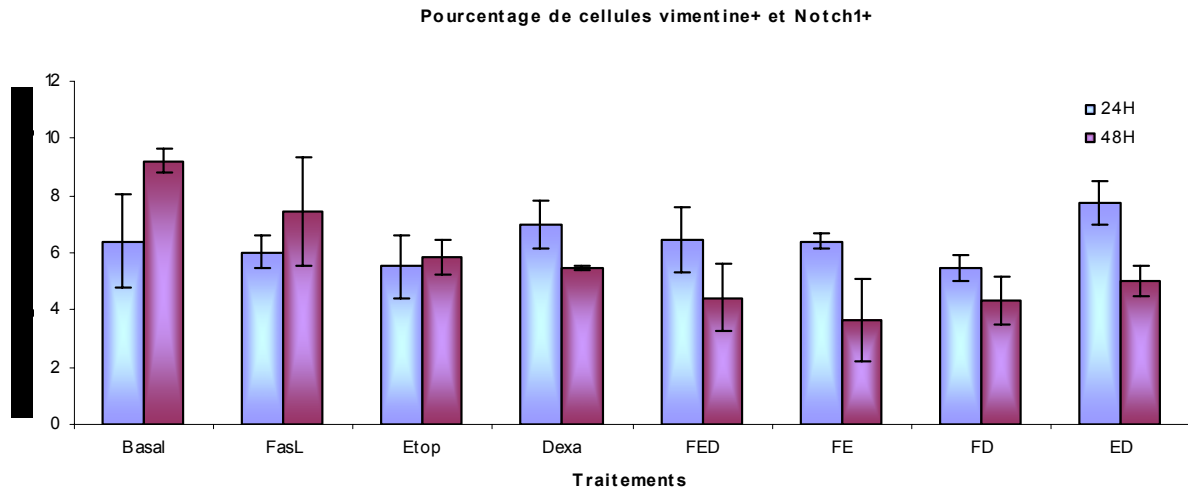


Figure 63 : Expression du récepteur Notch1 et de la vimentine après 24H et 48H de traitement.

J. Influence de l'inactivation du récepteur Notch1 lors de l'apoptose induite par FasL

Afin de connaître l'implication de l'activation du récepteur Notch1 au cours de l'apoptose des cellules U-87 MG induite par le ligand FasL, un inhibiteur de γ -sécrétase a été utilisé. En effet, cette molécule est connue pour inhiber le clivage du domaine actif du récepteur Notch et donc empêcher la transduction du signal (**Weidemann et al., 2002**).

Les cellules ont donc été traitées à la fois avec du FasL (40 ng / mL) et avec de l'inhibiteur de γ -sécrétase (1 μ M). L'apoptose des cellules a alors été évaluée par la méthode d'ELISA Cell Death (**Figure 64**).

Effet de FasL et de l'inhibiteur de gamma sécrétase sur l'apoptose des U-87 MG

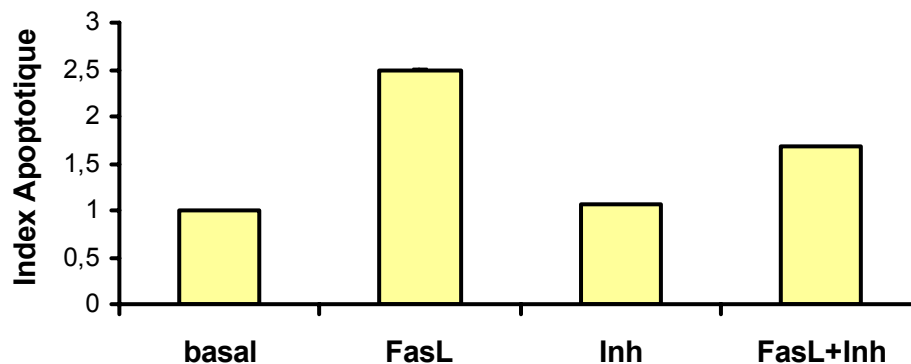


Figure 64 : Evaluation du niveau d'apoptose des cellules U-87 MG après traitement par FasL et l'inhibiteur de γ -sécrétase.

Le niveau d'apoptose des cellules U-87 MG ne semble pas modifié lorsque les cellules sont mises en présence de l'inhibiteur γ -sécrétase comparé à l'apoptose des cellules en conditions basales. En revanche, lorsque les cellules sont traitées par l'inhibiteur de γ -sécrétase et FasL, l'apoptose initiée au départ par FasL est diminuée. Ces résultats restent cependant à confirmer par des expérimentations supplémentaires car les résultats sont obtenus à l'issue d'une seule expérimentation.

III. Modèle de xéno greffe, traitements et expression de Notch1

L'efficacité des molécules proapoptiques utilisées *in vitro* a ensuite été testée *in vivo* par une méthode de xéno greffes de cellules U-87 MG dans le putamen caudal de rats nude. A l'issue de ces greffes et des traitements, des coupes de cerveaux ont fait l'objet d'études immunohistochimiques permettant notamment d'observer l'expression du récepteur Notch1 (Giraud et al., 2006, voir annexe 3).

A. Vérification des coordonnées de stéréotaxie

Du bleu de méthylène a été utilisé afin d'adapter les coordonnées de stéréotaxie au matériel et aux rats greffés (**Figure 65**). Après avoir recherché les coordonnées stéréotaxiques du putamen caudal droit (**Paxinos et Watson, 1982**), 1 μ L de bleu de méthylène a été injecté selon les coordonnées déterminées. Les rats ont alors été euthanasiés, leur cerveau congelé et coupé pour des observations microscopique. Le bleu de méthylène a été détecté au centre du putamen caudal droit et les coordonnées AP = 0,5 mm, L = - 2,7 mm et DV = 4,4, par rapport au bregma, ont, de ce fait, été respectées lors de chaque opération.



Figure 65 : Vérification des coordonnées de stéréotaxie grâce à l'injection de bleu de méthylène.

B. Les xénogreffes de cellules U-87 MG conduisent au développement d'une tumeur

L'analyse de la viabilité cellulaire, grâce au bleu Trypan, des cellules incubées 1 heure dans du LCR (temps maximum entre le moment où les cellules ont été collectées et le moment où elles sont greffées), n'a pas montré d'augmentation significative de la mortalité des cellules.

Les cellules U-87 MG ont été greffées à raison de 10^6 cellules par greffe dans des cerveaux de rats Nude ($n = 5$) et les animaux ont été observés quotidiennement après l'intervention. Des symptômes neurologiques sont apparus pour tous les rats entre le vingtième et le trentième jour après la greffe. Les examens cliniques ont montré une altération physique générale des animaux avec de signes récurrents comme la perte de poids, l'épistaxis, la perte d'équilibre, la diminution de la proprioception, la parésie et l'inclinaison de la tête.

L'euthanasie des animaux a été rapidement réalisée dès l'apparition des symptômes afin de respecter les recommandations éthiques. En absence de signes cliniques, tous les animaux ont été euthanasiés au 30^{ème} jour (**Figure 66**).

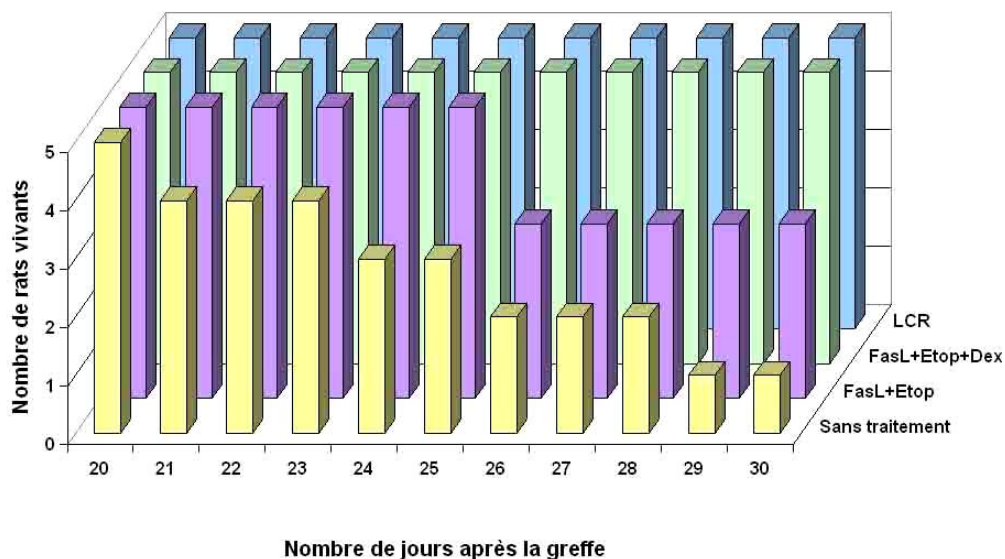


Figure 66 : Représentation graphique des différents jours d'euthanasie des rats.

Après euthanasies des rats, des coupes de cerveaux ont été réalisées et colorées grâce à de l'hématoxyline (**Figure 67**).

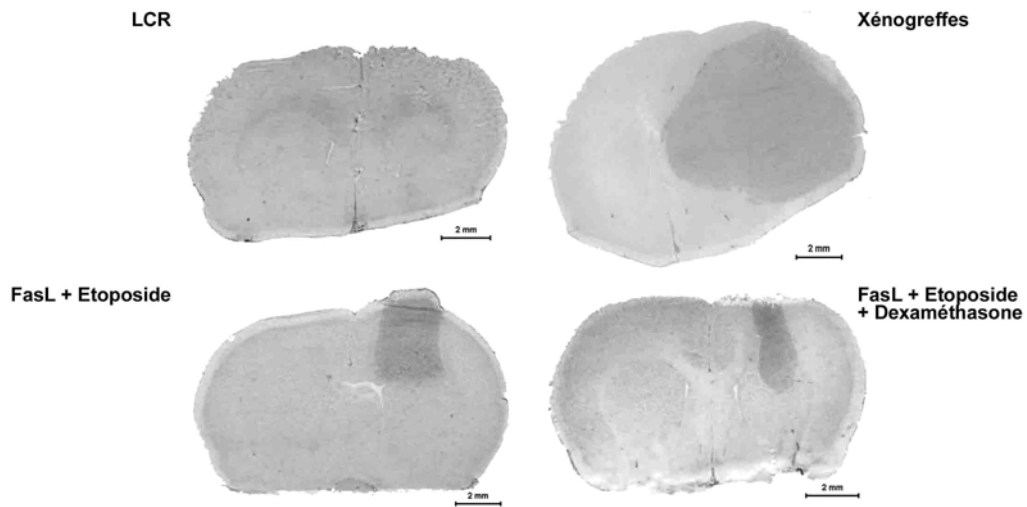


Figure 67 : Coloration à l'hématoxyline de coupes des cerveaux de rats.

Une large masse tumorale dont la surface moyenne est de $40,64 \pm 6,41 \text{ mm}^2$, a ainsi été détectée au niveau du putamen caudal droit (Xénogreffes), zone où les cellules ont été implantées (**Figure 68**).

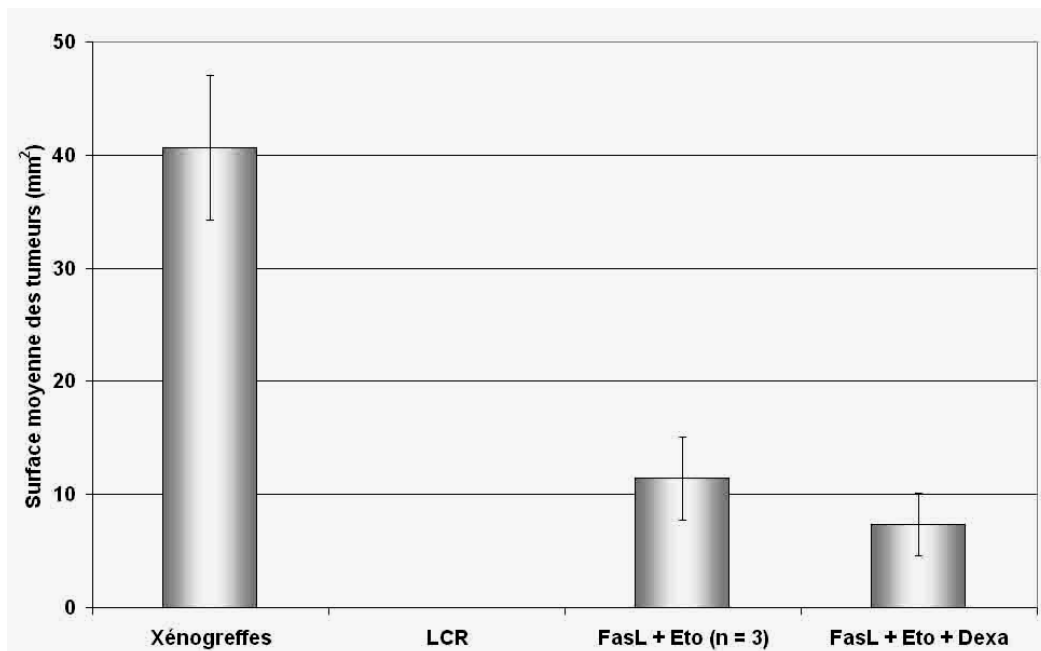


Figure 68 : Valeurs de la surface moyenne des tumeurs.

Cette masse tumorale est composée de cellules présentant des morphologies anatomo pathologiques différentes de celles des cellules des cerveaux des rats. De plus, aucune masse cellulaire analogue n'a été détectée au niveau du putamen caudal gauche (contrôle) ou au niveau des autres zones cérébrales examinées après coupes sériées.

Afin de démontrer que la tumeur provenait bien de la prolifération des cellules U-87 MG, des marquages hématoxyline-éosine-safran (HES) et immunohistochimiques ont été réalisés. Les observations des marquages HES au microscope ont confirmé que la morphologie des cellules était différente de celle des autres régions cérébrales (**Figure 69**). Les coupes des cerveaux ont ensuite été exposées aux anticorps utilisés en immunocytochimie pour caractériser les cellules U-87 MG. Les anticorps anti-CD68, anti-GFAP, anti-HLA et anti-Fas marquaient les cellules de la tumeur (T) alors que l'anticorps anti-NF ne marquait que les cellules situées en dehors de la zone tumorale, au niveau des tissus sains des cerveaux des rats (C). La masse tumorale est donc bien due à la prolifération des cellules U-87 MG, qui expriment le marqueur humain spécifique HLA, et non à la prolifération de cellules issues des tissus nerveux de rats. Enfin, l'expression de la protéine Fas a été détectée au niveau de la tumeur. Ce résultat est essentiel pour la suite des travaux puisque l'expression du récepteur Fas permet d'envisager l'analyse *in vivo* de l'effet de FasL sur les tumeurs gliales (**Figure 69**).

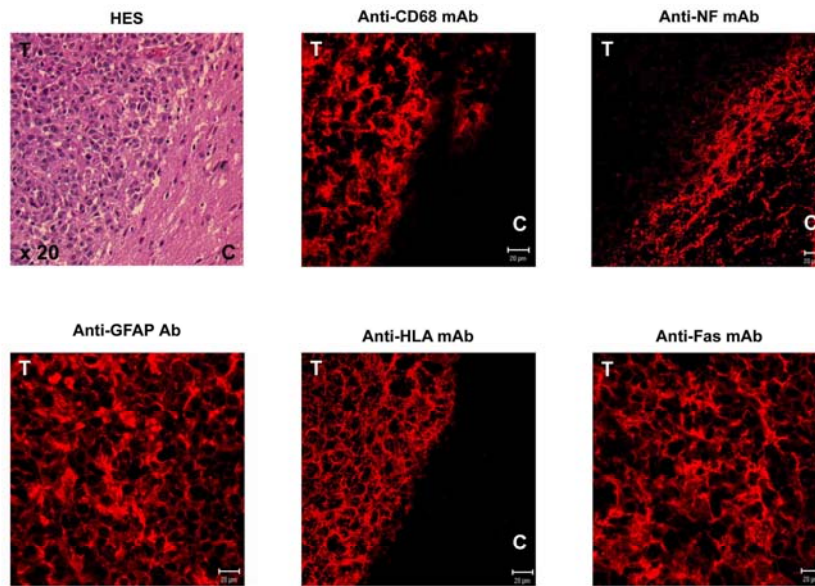


Figure 69 : Analyse des marqueurs cellulaires exprimés au niveau des tumeurs induites par xénogreffes cellules U-87 MG.

T : tumeur ; C : contrôle

C. Les injections de LCR (contrôle) n'ont aucun effet sur des rats Nude

Afin de déterminer un éventuel effet du LCR sur les cellules des cerveaux de rat, 4 μ L de LCR sans cellules ont été injectés par stéréotaxie ; les pompes osmotiques contrôles étaient uniquement remplies de LCR (contrôles sains, n = 5). Trente jours après l'injection de LCR, aucun des 5 rats ne présentait de symptômes neurologiques (**Figure 66**) et les animaux avaient gagné en moyenne 12,7 % de leur poids initial. Les rats ont alors été euthanasiés, leurs cerveaux congelés et coupés. Les colorations des coupes en hématoxyline n'ont jamais montré la présence d'une tumeur (**Figures 67 et 68**) ni de lésion inflammatoire réactionnelle en coloration HES, et aucun marquage en immunohistochimie pour les anticorps anti-CD68 et anti-HLA à titre de contrôle n'ont pu être observés. Aucune réaction tissulaire ne s'est donc développée après injection de LCR, ceci permettant de vérifier que les lésions observées après xénogreffes sont bien dues à l'injection des cellules et non à une réaction gliale due à l'injection de LCR.

D. FasL et étoposide ont un effet anti-tumoral

Des pompes osmotiques contenant les molécules FasL et étoposide ont été implantées à des rats ($n = 5$), 15 jours après la greffe des cellules U-87 MG. Les molécules testées ont été administrées pendant 15 jours. Parmi les 5 rats greffés et traités, 2 ont développé des signes neurologiques, 26 jours après la greffe (**Figure 66**). Les signes cliniques observés étaient semblables à ceux des rats greffés mais non traités. L'analyse systématique des pompes osmotiques, après euthanasie des rats, a montré qu'une quantité importante de solution contenant les molécules testées était encore présente dans les pompes osmotiques des deux rats malades. L'apparition des symptômes cliniques était donc vraisemblablement due à un défaut d'administration du traitement plutôt qu'à l'inefficacité des molécules. Ceci était concordant avec la détection d'une masse tumorale ($30,72 \pm 2,45 \text{ mm}^2$) de taille comparable à celle des tumeurs de rats greffés mais non traités.

Les 3 autres rats du lot n'ont jamais développé de signes cliniques pendant les 30 jours qui ont suivi la greffe et ont gagné 15,9 % de leur poids initial. Des colorations des coupes de cerveaux à l'hématoxyline (**Figure 67**) ont mis en évidence la présence d'une tumeur ($11,43 \pm 3,66 \text{ mm}^2$) de volume significativement plus réduit que celui observé chez les rats greffés non traités (*Test de Tukey* : $p = 0,0222$ si les volumes des tumeurs qui correspondent aux deux rats dont la pompe osmotique était défailante ne sont pas pris en compte et $p = 0,014$ si les 5 rats sont pris en compte) (**Figure 68**). Les études immunohistochimiques ont montré que les protéines CD68, GFAP, HLA de classe I et Fas étaient encore exprimées au niveau des cellules de la tumeur. Finalement, les études anatomo-pathologiques macroscopiques des coupes des cerveaux ont mis en évidence un aspect inflammatoire des cerveaux des rats au niveau de la tumeur, caractérisé par la présence d'œdèmes et de dépôts fibrineux.

E. La dexaméthasone augmente l'effet anti-tumoral de FasL associé à l'étoposide

Afin de limiter le processus inflammatoire observé chez les animaux traités par FasL et étoposide, la dexaméthasone, un immunosuppresseur systémique prescrit dans les cas de pathologies inflammatoires (incluant celles du système nerveux central), a été ajouté à FasL et étoposide lors de la préparation des pompes osmotiques ($n = 5$).

Trente jours après la greffe, aucun des 5 rats greffés et traités avec FasL, étoposide et dexaméthasone n'a présenté de symptômes cliniques (**Figure 66**). Cependant, une perte de 7,6 % de leur poids initial a pu être constatée. Les colorations à l'hématoxyline des coupes de cerveaux de rats ont montré une diminution significative de la taille des tumeurs ($7,35 \pm 2,76 \text{ mm}^2$) (**Figures 67 et 68**), que ce soit par comparaison à la taille des tumeurs des rats non traités ($n = 5$; *Test de Tukey* : $p = 0,0008$) ou à celles des rats traités avec FasL et étoposide ($n = 5$; *Test GLM* : $p = 0,005$). Les cellules de ces tumeurs conservent l'expression de CD68, GFAP, HLA classe I et Fas. Il est à noter que dans ce groupe de rats traités, la disparition complète de la tumeur a été observée pour l'un d'entre eux. Dans ce cas, les marquages par immunohistofluorescence ont en effet révélé l'absence de cellules tumorales HLA⁺ ou CD68⁺ dans les autres régions du cerveau examinées au niveau de coupes sériées.

A l'issue de ces résultats spectaculaires obtenus *in vivo* et après avoir mis en évidence l'implication du récepteur Notch1 au sein de la lignée U-87 MG et durant l'apoptose de ces cellules induites par FasL, nous avons souhaité étudier l'expression du récepteur Notch1 dans ce modèle de greffe tumorale avant et après traitement.

F. Notch1 dans les xénogreffes

Selon les premiers résultats le récepteur Notch1 serait également exprimé *in vivo* même après traitements par FasL et étoposide ou par FasL, étoposide et dexaméthasone. Cependant, l'expression du récepteur Notch1 semble diminuer dans les tumeurs ayant été traité. De plus, et contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, le récepteur se trouve exclusivement dans le cytoplasme et à la membrane des cellules et non dans le noyau. Cependant ces résultats restent à confirmer avec de nouvelles expérimentations (**Figure 70**).

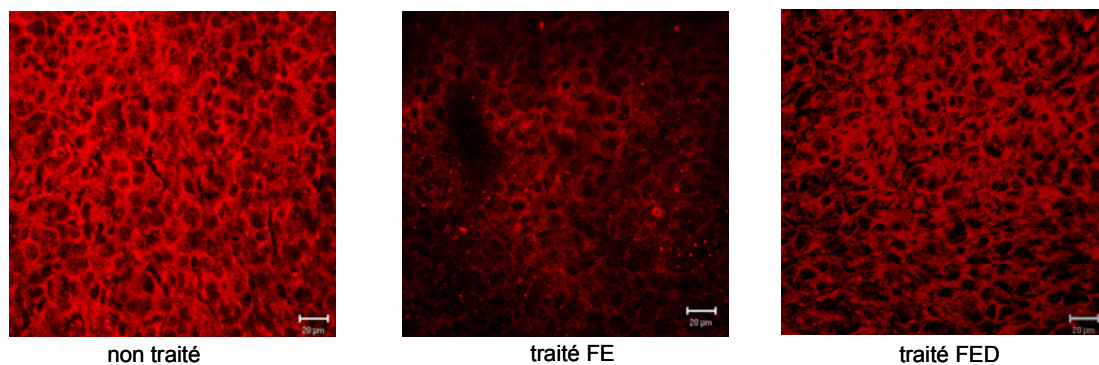


Figure 70 : Détection du domaine actif du récepteur Notch1 dans les coupes de cerveaux des rats greffés et traités.

Non traité : tumeur obtenue après xéno greffe ; traité FE : tumeur obtenue après xéno greffe et traitement par FasL et étoposide ; traité FED : tumeur obtenue après xéno greffe et traitement par FasL + étoposide + dexaméthasone.

DISCUSSION

La famille des gènes CCN compte à ce jour 6 membres distincts : CCN1 à 6 (**Bork**, 1993 ; **Perbal**, 2001). Ces gènes codent des protéines sécrétées ayant une structure modulaire commune mais des fonctions biologiques multiples : prolifération cellulaire, différenciation, migration, angiogenèse. Les deux gènes que nous avons étudiés, *Cef10* et *Nov*, sont deux gènes précoces du développement dont les rôles semblent opposés. En effet, *Cef10* permet la prolifération cellulaire (**Planque et Perbal.**, 2003) alors que *Nov*, au contraire, inhibe cette prolifération (**Planque et Perbal.**, 2003). Afin d'étudier l'implication de ces deux gènes au cours du développement, le modèle aviaire a naturellement été choisi. Les variations d'expression des transcrits de *Cef10* et *Nov* ont été comparées chez l'embryon de poulet entre ED7 et ED8. Au cours de ces stades de développement, les phalanges apparaissent au niveau des ailes et des extrémités et la partie antérieure de la mandibule devient le bec. Cette étude a montré que les transcrits de *Cef10* et de *Nov* sont exprimés au niveau du squelette et au niveau du tube neural au cours du développement.

Les éléments squelettiques exprimant des transcrits des CCN sont formés par les cellules endochondrales de l'os en formation incluant les membres antérieurs et inférieurs. Cependant, ni *Cef10* ni *Nov* ne sont exprimés au niveau des os de la face chez l'embryon de poulet. De ED7 à ED9, les ARNm de *Cef10* sont exprimés au niveau de l'articulation en développement ainsi qu'au niveau du périoste alors que les transcrits de *Nov* sont retrouvés au niveau des zones hypertrophiques chondrocytaires proches de la jonction os-chondrocytes. L'expression des transcrits de *Cef10* semble cependant plus faible que celle des transcrits de *Nov* au niveau de ces structures. Les profils d'expression des ARNm de *Cef10* et *Nov* au niveau des membres sont similaires à ceux observés pour les gènes *cOsr* (chicken orthologue Odd-skipped related genes). L'expression des gènes *cOsr* a déjà été observée au niveau du foie, des intestins, des yeux, des arcs branchiaux ou encore les membres en formation durant l'embryogenèse chez le poulet. Les gènes *cOsr* sont continuellement exprimés au niveau du liquide synovial pendant le développement tardif des membres (**Stricker et al.**, 2006). Au contraire, *Nov* est exprimé au niveau des formations endochondrales des os. Chez la souris, les progéniteurs ostéochondraux expriment *Sox9*, un facteur de transcription spécifique des gènes

de la chondrogenèse. Les cellules mésenchymateuses des bourgeons des membres expriment *Sox9* et sont capables d'engendrer à la fois les cellules de la lignée chondrogénique et celles de la lignée ostéogénique (**Akiyama et al.**, 2005). *Nov* est, quant à lui, exprimé dans les stades plus tardifs, au cours de la différenciation du cartilage, il est impliqué plus tardivement que *Sox9* au cours de la formation des os.

Au cours de l'embryogenèse précoce, Katsubé et son équipe n'ont pu détecter l'expression de *Nov* quelle que soit la structure nerveuse observée chez l'embryon de poulet (**Katsubé et al.**, 2001). Les résultats obtenus entre ED7 et ED8 pour l'expression de *Nov* coïncident donc avec ceux attendus puisque nous n'avons pas observé d'expression notable de ce gène au niveau des structures neurales. En revanche, *Cefl0* est fortement exprimé au sein du tube neural en développement ainsi qu'au niveau des ganglions dorsaux mais en aucun cas dans les vertèbres. L'expression de *Cefl0* se localise au sein de la zone entourant le canal central du tube neural. Cette zone se trouve très proche des noyaux des motoneurones. Cette expression de *Cefl0* coïncide avec la maturation neuronale et le développement tardif des membres.

Les gènes *Cefl0* et *Nov* sont donc mis en cause au court du développement des membres, du tube neural et des ganglions rachidiens postérieurs chez l'embryon de poulet entre ED7 et ED9. Ces gènes sont impliqués à la fois dans le développement des membres, l'ostéo-chondrogenèse, le développement synovial et également dans la mise en place du système nerveux.

De récentes études ont montré qu'il existait une interaction physique entre la protéine *Nov* et le récepteur Notch (**Sakamoto et al.**, 2002) : le récepteur Notch se lie à *Nov* par ses séquences EGF répétées (**Katsube et Sakamoto**, 2005). Ces deux molécules, ainsi que leur voie de signalisation, semblent intimement liées. Le récepteur Notch appartient à la famille des gènes pro-neuronaux et il est mis en cause dans de nombreux processus de différenciation cellulaire dont la neurogenèse (**Lewis**, 1996). Afin d'étudier l'expression du récepteur Notch au cours du développement, le modèle d'épithélium olfactif aviaire a été choisi. En effet, cet organe est constitué de cellules neurosensorielles et présente la caractéristique très rare d'être capable d'autorenouvellement (**Kato et al.**, 2001).

Dans un premier temps, cette particularité d'autorenouvellement de l'épithélium olfactif a été étudiée. Deux hypothèses sur l'origine de cellules souches de l'épithélium

olfactif s'oppose l'une soutient l'idée que ce sont les GBC qui sont les cellules souches et l'autre que ce sont les HBC qui jouent ce rôle (**Chen et al.**, 2004 ; **Murrell et al.**, 2005)

Afin de connaître l'identité de ces cellules souches, la mise en place de cultures primaires d'épithéliums olfactifs d'embryons de poulets et l'isolement de cellules souches de cet organe par la méthode de SdFFF ont été réalisés (**Comte et al.**, 2006 voir annexe 2). Les tris cellulaires réalisés ont permis un enrichissement de la fraction PF2 en cellules exprimant les kératines et le TrkA correspondant aux cellules HBC. Les résultats obtenus tendent à prouver que les HBC seraient les cellules souches de l'épithélium olfactif. En effet, ces cellules sont capables de se multiplier et de redonner tous les types cellulaires composant l'épithélium olfactif d'embryons de poulets. Cette étude nourrit de grands espoirs dans l'obtention de cellules souches neuronales sur des modèles plus proche de l'homme, ce qui constituerait un grand espoir thérapeutique pour les maladies neurodégénératives (**Murrell et al.**, 2005).

Sur ce modèle nous avons entrepris l'étude du récepteur Notch1 afin de savoir si la mise en place de l'épithélium olfactif pouvait être liée à l'expression de ce gène précoce du développement et s'il était particulièrement lié, dans ce cadre, au processus de neurogenèse.

L'étude spatio-temporelle de l'expression des transcrits du récepteur Notch1 suggère que ce récepteur est impliqué dans l'ontogenèse de la placode olfactive chez le poulet. La méthode d'hybridation *in situ* a permis de mettre en évidence la présence des transcrits du récepteur Notch1 au cours du développement au sein de l'épithélium olfactif d'embryons de poulets.

L'expression des transcrits de Notch1 diminue tout au long de l'embryogenèse au sein de l'organe comme cela a été montré chez la souris (**Doi et al.**, 2004). A ED4, l'expression des transcrits de *Notch1* est homogène de toutes les cellules constituant la placode olfactive. A ce stade, environ 30% des cellules expriment les transcrits du récepteur Notch1. Ce stade correspond au début de la croissance et à la migration des axones issus des cellules neurosensorielles de l'épithélium olfactif à destination du bulbe olfactif (**Van Campenhout**, 1937).

La diminution significative du niveau d'expression des transcrits de *Notch1* entre ED4 et ED5 pourrait être l'un des facteurs initiateurs de la phase de croissance axonale étant donné que le récepteur Notch1 est responsable du phénomène d'inhibition latérale (**Berezovska et al.**, 1999 ; **Henrique et al.**,1995). Le niveau d'expression des transcrits de Notch1 reste ensuite stable comme le suggère le palier d'expression entre ED5 et ED7,5. Cette étape de l'ontogenèse du système olfactif correspond à la phase durant laquelle les cellules à LH-RH migrent vers leur territoire présomptif au niveau du système nerveux central (**Murakami et al.**, 1991).

A partir d'ED8, l'apparition des premières synapses au niveau bulbaire pourrait être corrélée à une nouvelle diminution du niveau d'expression des transcrits de *Notch1*. Cette expression du récepteur semble restreinte à la partie médiane de l'épithélium olfactif, au niveau de cellules fusiformes possédant des prolongements cytoplasmiques traversant de part en part cet épithélium. La morphologie, ainsi que la localisation de ces cellules au sein de l'organe, tendent à prouver que les cellules exprimant les transcrit de *Notch1* à ED8 pourraient être des cellules neuronales mais ceci reste à confirmer par l'utilisation de marqueurs immunohistochimiques. Le récepteur Notch1 pourrait être dans ce cadre un facteur déclenchant de la croissance axonale et de la synaptogenèse (**Salama-Cohen et al.**, 2006).

L'expression des transcrits du récepteur Notch1 reste constante entre ED8 et ED10,5. Cependant à la fin de la synaptogenèse épithélio-bulbaire (**Leibovici et al.**, 1996) l'expression des ANRm du récepteur diminue et aboutit à ED14 à une disparition des transcrits au sein de l'épithélium olfactif.

De manière intéressante, il n'y a pas d'expression de *Notch1* par hybridation *in situ* détectée après ED12 à l'exception de ED18 où une très légère augmentation du niveau d'expression est observée. Cette augmentation pourrait être corrélée avec les premiers contacts entre l'épithélium olfactif et l'air. En effet, dès ED18, le poussin commence à percer la coquille de l'œuf et entre en contact avec l'environnement extérieur. Ce premier contact des neurones olfactifs avec l'air pourrait induire une mort neuronale significative en raison de l'agressivité du milieu. La restauration d'un épithélium olfactif fonctionnel implique une réactivation de la neurogenèse et des mécanismes de différenciation mettant en jeu l'expression du récepteur Notch1. Ainsi, celui-ci assurerait par un processus d'inhibition latérale (**Henrique et al.**, 1995), la réorganisation cellulaire de la muqueuse olfactive. Pour

confirmer le rôle du récepteur Notch1 à ce stade, il serait nécessaire d'étudier l'expression concomitante des protéines Notch1 et Cash 1 (Chicken acaete scute homologue 1), marqueur des précurseurs neuronaux exprimé lors de mécanismes de régénération de l'épithélium olfactif.

Les variations de l'expression de Notch1 semblent corrélées aux différentes transitions qui ont lieu au cours de l'ontogenèse du système olfactif comme la croissance axonale ou encore la synaptogenèse bulbaire.

Le profil d'expression des transcrits du récepteur Notch1 au cours de la mise en place du système olfactif aviaire suit les grandes étapes embryologiques de la mise en place de l'organe. En effet, les brutales diminutions du niveau d'expression du récepteur au sein de l'épithélium coïncident avec le début de la croissance axonale ou encore le début de la synaptogenèse entre le bulbe olfactif et l'épithélium.

Le récepteur Notch1 pourrait être l'un des facteurs participant au déclenchement d'étapes clés de la mise en place du système olfactif. Son expression serait étroitement liée à des mécanismes impliquant particulièrement les cellules neuronales au cours du développement de l'épithélium olfactif de poulet comme cela est le cas dans le modèle de souris où le récepteur est impliqué dans la ségrégation entre neurones et cellules gliales (**Carson et al.**, 2006).

L'activation de la voie de signalisation du récepteur Notch1 permet la régulation de la neurogenèse et de la gliogenèse au niveau du système nerveux central (**Yoon et Gaiano**, 2005). Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'expression du récepteur Notch1 dans un modèle pathologique de cellules gliales tumorales humaines : la lignée U-87 MG. La lignée U-87 MG est issue d'une lignée de glioblastomes de haut grade, constituée d'un type cellulaire, de type astrocytaire mais hétérogène dans son degré de différenciation (**Chu et al.**, 2001).

Nous avons mis en évidence la présence de Notch1 et de 4 de ses ligands (Delta 1, 4, Jagged 1 et 2) au sein de la lignée U-87 MG comme cela fut montré en Western blotting, par Purow et son équipe (**Purow et al.**, 2005). De plus, nous avons montré que le récepteur ainsi que les ligands ont une localisation intracellulaire dans les cellules U-87 MG puisqu'il est nécessaire de perméabiliser les cellules pour les détecter en cytométrie en flux. Des études ont

montré que le domaine intracellulaire de Notch1 pouvait être séquestré et donc empêcher la transduction du signal induite par le récepteur Notch1 (**Campos et al.**, 2006). De plus, l'expression du récepteur Notch1 semble très hétérogène dans les gliomes de haut grade, certains exprimant le récepteur Notch1 et d'autres ne l'exprimant pas (**Cheung et al.**, 2006). Il est à noter d'une part que dans les glioblastomes, le récepteur Notch1, lorsqu'il est détecté il se trouve principalement dans le cytoplasme et le noyau (**Purow et al.**, 2005 ; **Cheung et al.**, 2006) et d'autre part que son niveau d'expression est inversement proportionnel au degré d'agressivité observée dans les gliomes ainsi que dans d'autres types tumoraux (**Chu et al.**, 2002 ; **LaVoie et Selkoe**, 2003 ; **Purrow et al.**, 2005).

De plus, les ligands Delta 1 et Jagged 1 semblent avoir des effets opposés dans les glioblastomes : l'expression de Delta est corrélée avec celle du récepteur Notch1 alors que celle de Jagged 1 est inversement proportionnelle à celle de son récepteur (**Purrow et al.**, 2005). Cette différence d'expression entre Jagged 1 et le récepteur Notch1 dans ces cellules tumorales pourrait s'expliquer par le rôle que jouent ces protéines au cours du développement du système nerveux central. En effet, les progéniteurs neuronaux expriment soit le récepteur Notch1 soit les ligands, selon leur différenciation en cellules gliales ou en neurones (**Talora et al.**, 2002). Néanmoins, le profil d'expression du récepteur Notch, observé dans les gliomes de bas grade, est diminué (à l'inverse d'une expression hétérogène détectée dans les gliomes de haut grade) et comparable à celui observé dans les précurseurs neuronaux où l'on observe une diminution d'expression du récepteur Notch1 et une augmentation de l'expression des ligands (**Purow et al.**, 2005). Les différents profils d'expression du récepteur Notch1 observés dans les glioblastomes de haut grade rendent l'interprétation plus complexe. Cependant de nouvelles études ont montré l'existence de cellules souches cancéreuses, ce qui pourrait nous renseigner sur le rôle que peut jouer le récepteur Notch1 dans les gliomes de haut grade (**Sanai et al.**, 2005). En effet, le récepteur Notch permettrait le renouvellement des cellules souches neurales adultes (**Hitoshi et al.**, 2002 ; **Shen et al.**, 2004). De ce fait, lors du processus de tumorigenèse de ces cellules souches, la voie de signalisation du récepteur Notch pourrait être modifiée et même contribuer au mécanisme tumorigène.

Dans la lignée U-87 MG, certaines cellules expriment la vimentine, classiquement utilisé comme marqueur d'immaturation (**Chu et al.**, 2001). Cette présence de cellules immatures pourrait expliquer l'agressivité de ce glioblastome de haut grade ainsi que sa

résistance à l'apoptose. Dans ce cadre, nous avons recherché le moyen d'induire la mort de ces cellules. Pour cela, nous avons recherché la présence du récepteur de mort Fas dans les cellules U-87 MG. Après la mise en évidence de la présence de ce récepteur dans la lignée, nous avons testé les molécules FasL et l'étoposide à différentes concentrations afin d'induire le taux le plus élevé d'apoptose. Des études sur FasL (**Frankel et al.**, 2002 ; **Robe et al.**, 2005) et l'étoposide (**Lavicka et al.**, 2001) ont permis de montrer l'effet cytotoxique de chaque molécule séparément sur les glioblastomes. Nous avons pu déterminer que les concentrations induisant les taux les plus élevés d'apoptose *in vitro* dans la lignée U-87 MG sont de 40 ng / mL pour FasL et de 10 ng / mL pour l'étoposide. L'utilisation et l'efficacité de l'étoposide à une telle concentration ont d'ailleurs déjà été démontrés *in vitro* (**Boesen-de Cock et al.**, 1998 ; **Takahashi et al.**, 1998). Cette combinaison a été également associée à de la dexaméthasone, dont les propriétés anti-inflammatoires pourrait s'opposer à l'action pro-inflammatoire de FasL dépendant de facteurs tels que les chémokines et l'IL-1 (**Wajant et al.**, 2003, **Imamura et al.**, 2004, **Regardsoe et al.**, 2004). Après avoir montré les combinaisons de molécules (FasL / étoposide / dexaméthasone) sensibilisant les cellules U-87 MG à l'apoptose, l'expression du récepteur Notch1 dans ces différentes conditions a été étudiée. L'expression du récepteur Notch1 varie selon les différents traitements des cellules. L'action de FasL induit une diminution de l'expression du récepteur Notch1 alors que l'étoposide au contraire, induit une augmentation de son expression. Les effets opposés de FasL et de l'étoposide sur le niveau d'expression du récepteur Notch1 ont soulevé des questions sur les mécanismes potentiels sous-jacents à ces résultats. L'étude du cycle cellulaire des cellules U-87 MG après traitement a montré l'influence indiscutable de l'étoposide sur ce dernier. Cette molécule entraîne un blocage du cycle en phase S (**Lawrence et al.**, 1989) qui pourrait conduire à une accumulation du récepteur Notch1 dans ces cellules. D'autre part, les cellules U-87 MG constituent une lignée cellulaire très hétérogène dans leur degré de maturation. La vimentine a été utilisée comme marqueur d'immaturité au sein de la lignée U-87 MG (**Chu et al.**, 2001). Il apparaît que 80 % des cellules de la lignée U-87 MG expriment le récepteur Notch1 et que moins de 10 % de ces cellules expriment la vimentine. En revanche, toutes les cellules exprimant la vimentine expriment le récepteur Notch1. Seul l'ajout de FasL ne modifie pas le profil d'expression des cellules exprimant à la fois la vimentine et Notch1. A l'inverse, la dexaméthasone ainsi que l'étoposide semblent diminuer le niveau d'expression de la vimentine, ce qui tendrait à prouver que ces deux molécules induisent une différenciation cellulaire dans la lignée U-87 MG, certaines cellules perdant leur marqueur

d'immaturation. Des études ont montré le pouvoir différenciant de la dexaméthasone (**Murata et al.**, 2004 ; **Kirton et al.**, 2006).

De plus, afin de déterminer s'il existe une interaction du récepteur Notch1 avec l'apoptose induite par FasL, l'activation du récepteur Notch1 a été inhibée en utilisant un inhibiteur de γ -sécrétase. Cet inhibiteur permet d'éviter le clivage S3 du récepteur Notch1 et de ce fait d'empêcher la translocation du domaine actif de Notch1 dans le noyau et donc la transduction du signal dû au récepteur (**Doerfler et al.**, 2001). L'apoptose des cellules U-87 MG due à FasL est diminuée lorsque Notch1 est inactivé par l'inhibiteur de γ -sécrétase. Dans ce cadre, il a d'ailleurs déjà été montré que l'activation du récepteur Notch1 protège les cellules T de l'apoptose induite par la dexaméthasone, l'étoposide et l'activation du récepteur Fas, par le biais d'une augmentation des IAP, des protéines de la famille Bcl2 et des protéines FLIP (**Defos et al.**, 1998 ; **Sade et al.**, 2004).

L'effet apoptotique de l'étoposide et de FasL *in vitro* sur la lignée U-87 MG nous a conduit à envisager de mettre en place un modèle *in vivo* de ce type de tumeur gliale par xénogreffes (**Ozawa et al.**, 2002). Ces xénogreffes ont été réalisées dans des cerveaux de rats athymiques ; nous avons utilisé le FasL, l'étoposide et la dexaméthasone comme traitement expérimental afin d'essayer d'éliminer les cellules tumorales (**Giraud et al.**, 2006, voir annexe 3). L'instillation du traitement a été réalisée à l'aide de pompes osmotiques permettant une diffusion lente et continue des molécules. Ces pompes furent implantées 15 jours après les xénogreffes permettant ainsi un développement important des tumeurs. Nous avons pu constater que la combinaison de ces molécules permet une importante diminution de la taille des tumeurs même chez les rats n'ayant pas reçu l'intégralité du traitement (pompes défectueuses). Cependant des signes sévères d'inflammation pouvaient être détectés autour de la zone tumorale chez les animaux traités par le FasL et l'étoposide alors que ces signes d'inflammation n'existaient pas chez les animaux greffés non traités. Afin de diminuer ce phénomène inflammatoire, la dexaméthasone (stéroïde anti-inflammatoire) fut ajoutée au traitement. L'association des trois molécules (FasL, étoposide et dexaméthasone) entraîna une remarquable régression de la taille des tumeurs. L'effet anti-prolifératif de la dexaméthasone a déjà été démontré. Elle inhiberait l'angiogenèse dans des tumeurs solides (**Wolff et al.**, 1997) et aurait un effet anti-prolifératif (**Reil et al.**, 1999). Cependant, l'effet anti-tumoral de la dexaméthasone utilisée seule est encore débattu. Certains montrent un effet anti-apoptotique

de la molécule (Nzang Nguema et al., 2005), un effet pro-prolifératif (Zibera et al., 1992) ou encore anti-prolifératif (Kaup et al., 2001) sur les cellules tumorales, dépendant des types cellulaires. Il s'avère que l'effet anti-tumoral de la dexaméthasone reste non élucidé. Néanmoins, l'effet anti-tumoral de l'association FasL, étoposide et dexaméthasone a déjà été démontré *in vitro* sur des cellules de la lignée B (Roue et al., 2001). En effet, dans les lymphomes B, l'activation du récepteur Fas n'entraîne pas l'apoptose des cellules B qui sont également résistantes à l'étoposide, mais l'ajout de dexaméthasone permet aux cellules d'entrer en apoptose (Roue et al., 2001).

Les coupes tissulaires des cerveaux de rats greffés et traités ont été analysées et ont montré une expression du récepteur Notch1. Les traitements (FasL / étoposide ou FasL / étoposide / dexaméthasone) entraîneraient une diminution de l'expression du récepteur Notch1 *in vivo*.

L'implication *in vitro* et *in vivo* de Notch1 dans cette lignée tumorale gliale et l'évolution de son expression en réponse aux traitements pro-apoptotiques soulèvent des interrogations sur l'orientation que peut avoir ce récepteur dans un modèle pathologique comme celui de la lignée U-87 MG. Cette lignée cellulaire est très hétérogène et l'expression très limitée de la vimentine semble prouver qu'il existe au sein de cette lignée différents stades de différenciation cellulaire. De plus, toutes les cellules de la lignée exprimant la vimentine expriment également le récepteur Notch1, ce qui laisse à penser que le récepteur Notch1 pourrait être lié aux phénomènes de différenciation au sein de la lignée. Les nouvelles hypothèses sur les processus de tumorigenèse impliquant des cellules souches cancéreuses pourraient nous éclairer sur le rôle que pourrait jouer le récepteur Notch1 dans la formation des cancers et l'apoptose de ces cellules.

PERSPECTIVES

Le rôle du récepteur Notch reste ambigu dans les processus de cancérisation tantôt considéré comme suppresseur de tumeur tantôt comme oncogène (**Lelong et Karsan**, 2006 ; **Sjölund et al.**, 2005). Au regard des dernières recherches effectuées sur les cellules souches cancéreuses, Notch1 pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire au sein de lignée comme les U-87 MG. De plus ces cellules étant résistantes à l'apoptose, induire leur différenciation par l'intermédiaire du récepteur Notch1 pourrait nous permettre d'induire une sensibilisation massive de toutes les cellules de la lignée à l'apoptose par de récepteur Fas. Il est important de préciser que des études ont prouvé l'effet non apoptotique du récepteur Fas après stimulation dans certaines cellules souches (**Ceccatelli et al.**, 2004).

En outre, des études fonctionnelles complémentaires des récepteur Notch1 et 2 (souvent opposés dans les cancers) pourraient orienter les recherches afin d'induire la mort cellulaire dans la lignée U-87 MG. La découverte récente d'un marqueur d'immatunité dans les cellules tumorales : CD133, pourrait nous permettre d'isoler les cellules les plus immatures dans la lignée U-87 MG d'étudier précisément le rôle du récepteur Notch dans cette population cellulaire restreinte ainsi que l'effet FasL sur ces cellules (**Clarke**, 2004).

Au-delà de l'effet potentiel direct du récepteur Notch sur l'apoptose des glioblastomes, son effet anti angiogénique dans certains cancers pourrait également être une voie de recherche prometteuse dans le cadre des glioblastomes (**Rehman et Wang**, 2006). De plus, la protéine Nov (déjà co-immunoprécipité avec le récepteur Notch) posséderait une activité anti-tumorale dans les lignée C6 (gliome de rat) ouvrant ainsi de nouvelles perspectives d'études pour inhiber l'expansion cellulaire des U-87 MG (**Gupta et al.**, 2001). Dans le cadre, une étude des gènes de de la famille CCN durant le développement est en cours en collaboration avec le Profeseur Katsubé, permettant à terme d'approfondir nos connaissances sur cette famille de gènes et son implication dans la prolifération et la différenciation cellulaire, phénomène impliqué à la fois dans le développement et la carcinogénèse.

REFERENCES



Akiyama Ddagger H, Kim Ddagger JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrughe B. Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102:14665-14670.

Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med.* 1999; 190: 1879-1890.

Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1993; 178: 2231-2235.

Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 207-220.

Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in cancer. *Cancer Biol Ther.* 2002; 1: 466-476.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002; 22: 629-634.

Annaert W, De Strooper B. Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 439-443.

Aoyama T, Takemura G, Maruyama R, Kosai K, Takahashi T, Koda M, Hayakawa K, Kawase Y, Minatoguchi S, Fujiwara H. Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2002; 55: 787-798.

Arenz C, Thutewohl M, Block O, Waldmann H, Altenbach HJ, Giannis A. Manumycin A and its analogues are irreversible inhibitors of neutral sphingomyelinase. *Chembiochem* 2001; 2: 141–143.

Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science*. 1995; 268: 225-232.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999; 284: 770-776.

Aster JC, Robertson ES, Hasserjian RP, Turner JR, Kieff E, Sklar J. Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J Biol Chem*. 1997; 72: 11336-11343.

B

Baker NE, Mlodzik M, Rubin GM. Spacing differentiation in the developing Drosophila eye: a fibrinogen-related lateral inhibitor encoded by scabrous. *Science*. 1990; 250: 1370-1377.

Baladron V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Diaz-Guerra MJ, Garcia-Ramirez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J. dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res*. 2005; 3: 343-359.

Bar PR. Motor neuron disease in vitro: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2000; 405: 285-295.

Barnett SC, Hutchins AM, Noble M. Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb. *Dev Biol*. 1993; 155: 337-350.

Becher B, D'Souza SD, Troutt AB, Antel JP. Fas expression on human fetal astrocytes without susceptibility to fas-mediated cytotoxicity. *Neuroscience*. 1998; 84: 627-634.

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*. 1995; 377: 630–632.

Berezovska O, McLean P, Knowles R, Frosh M, Lu FM, Lux SE, Hyman BT. Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience*. 1999; 93: 433-439.

Bertin J, Armstrong RC, Otilie S, Martin DA, Wang Y, Banks S, Wang GH, Senkevich TG, Alnemri ES, Moss B, Lenardo MJ, Tomaselli KJ, Cohen JJ. Death

effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:1172-1176.

Biancone L, Martino AD, Orlandi V, Conaldi PG, Toniolo A, Camussi G. Development of inflammatory angiogenesis by local stimulation of Fas in vivo. *J Exp Med*. 1997; 186: 147–152.

Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S. Comparative aspects of Notch signaling in lower and higher eukaryotes. *Perspect Dev Neurobiol*. 1997; 4: 325-343.

Bobe P. The Fas-Fas Ligand apoptotic pathway. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Hemmatol*. 2002.

Boesen-de Cock JG, de Vries E, Williams GT, Borst J. The anti-cancer drug etoposide can induce caspase-8 processing and apoptosis in the absence of CD95 receptor-ligand interaction. *Apoptosis*. 1998; 3: 17-25.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*. 1995; 270: 7795-7798.

Bordey A. Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. *Cell Cycle*. 2006; 5: 722-728.

Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*. 1993; 327: 125–130.

Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev*. 1999; 20: 189-206.

Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 2000; 5: 207-216.

Brou C, Logeat F, Lecourtois M, Vandekerckhove J, Kourilsky P, Schweisguth F, Israel A. Inhibition of the DNA-binding activity of Drosophila suppressor of hairless and of its human homolog, KBF2/RBP-J kappa, by direct protein-protein interaction with Drosophila hairless. *Genes Dev*. 1994; 8: 2491-2503.

Budd RC, Yeh WC, Tschopp J. cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:196-204.

Buick RN, Minden MD, McCulloch EA. Self-renewal in culture of proliferative blast progenitor cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 1979; 54: 95-104.

Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P, Licari P, Mankovich J, Shi L, Greenberg, AH, Miller LK, Wong WW. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*. 1995; 269: 1885-1888.

Busuttil V, Bottero V, Frelin C, Imbert V, Ricci JE, Auberger P, Peyron JF. Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector. *Oncogene*. 2002; 21: 3213-3224.



Caggiano M, Kauer JS, Hunter DD. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron*. 1994; 13: 339-352.

Campos LS, Decker L, Taylor V, Skarnes W. Notch, epidermal growth factor receptor, and beta1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells. *J Biol Chem*. 2006; 281: 5300-5309.

Campos-Ortega JA. Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol*. 1995; 10: 75-89.

Caprioli A, Goitsuka R, Pouget C, Dunon D, Jaffredo T. Expression of Notch genes and their ligands during gastrulation in the chicken embryo. *Mech Dev*. 2002; 116: 161-164.

Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell*. 1997; 90: 315-323.

Carr VM, Farbman AI. Ablation of the olfactory bulb up-regulate the rate of neurogenesis and induces precocious cell death in olfactory epithelium. *Exp Neurol*. 1992;115: 55-59.

Carson C, Murdoch B, Roskams AJ. Notch 2 and Notch1/2 segregate to neuronal and glial lineages of the developing olfactory epithelium. *Developmental Dynamics*. 2006; 235: 1678-1688.

Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ. Olfactory horizontal basal cells demonstrates a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci*. 2004; 24: 5670-5683.

Cau E, Gradwohl G, Fode C, Guillemot F. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development*. 1997; 124: 1611-1621.

Ceccatelli S, Tamm C, Sleeper E, Orrenius S. Neural stem cells and cell death. *Toxicol Lett.* 2004; 149: 59-66.

Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science.* 2000; 288: 2351-2354.

Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science.* 1998; 281: 1860-1863.

Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC. Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci.* 1999; 19: 1754-7170.

Chen X, Fang H, Schwob JE. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* 2004; 469: 457-474.

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994, 263: 1759-1762.

Cheung HC, Corley LJ, Fuller GN, McCutcheon IE, Cote GJ. Polypyrimidine tract binding protein and Notch1 are independently re-expressed in glioma. *Mod Pathol.* 2006; 19: 1034-1041.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995; 81: 505-512.

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1996; 271: 4961-4965.

Chitnis A. Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev Dyn.* 2006; 235: 886-894.

Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim CH, Kim SJ, Kim JD, Choi IS, Choi IH. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J Immunol.* 1999; 162: 1889-1895.

Choi K, Benveniste EN, Choi C. Induction of intercellular adhesion molecule-1 by Fas ligation: proinflammatory roles of Fas in human astrogloma cells. *Neurosci Lett.* 2003; 352: 21-24.

Chu J, Jeffries S, Norton JE, Capobianco AJ, Bresnick EH. Repression of activator protein-1-mediated transcriptional activation by the Notch-1 intracellular domain. *J Biol Chem.* 2002; 277: 7587-7597.

Chu Y, Hughes S, Chan-Ling T. Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J.* 2001; 15: 2013-2015.

Ciusani E, Perego P, Carenini N, Corna E, Facchinetti F, Boiardi A, Salmaggi A, Zunino F. Fas/CD95-mediated apoptosis in human glioblastoma cells: a target for sensitisation to topoisomerase I inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63: 881-887.

Clarke MF. Neurobiology: at the root of brain cancer. *Nature.* 2004; 432: 281-282.

Cock JG, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. CD95 (Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 1998; 273: 7560-7565.

Comte I, Battu S, Mathonnet M, Bessette B, Lalloue F, Cardot P, Ayer-Le Lievre C. Neural stem cell separation from the embryonic avian olfactory epithelium by sedimentation field-flow fractionation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 [Epub ahead of print].

Cornell RA, Eisen JS. Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16: 663-672.

Couzinet A, Hérincs Z, Hueber AO. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Médecine/Sciences.* 2002; 18: 841-852.

Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R. Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem.* 2001; 276: 23954-23961.

Cui XY, Hu QD, Tekaya M, Shimoda Y, Ang BT, Nie DY, Sun L, Hu WP, Karsak M, Duka T, Takeda Y, Ou LY, Dawe GS, Yu FG, Ahmed S, Jin LH, Schachner M, Watanabe K, Arsenijevic Y, Xiao ZC. NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J Biol Chem.* 2004; 279: 25858-25865.

D

Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 1992; 52: 5334-5341.

Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, Weiner H, Ruiz i Altaba A. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development.* 2001; 128: 5201-5212.

Day TW, Najafi F, Wu CH, Safa AR. Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): a novel target for Taxol-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71: 1551-1561.

De la Monte SM, Sohn YK, Wands JR. Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1997; 152: 73-83.

De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron.* 2003; 38: 9-12.

Deak JC, Cross JV, Lewis M, Qian Y, Parrott LA, Distelhorst CW, Templeton DJ. Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 5595-5600.

Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* 2004; 23: 2950–2966.

Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ. Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity.* 1998; 9: 777-786.

Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol.* 2003; 5: 118-125.

Diederich RJ, Matsuno K, Hing H, Artavanis-Tsakonas S. Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway. *Development.* 1994; 120: 473-481.

Doerfler P, Shearman MS, Perlmutter RM. Presenilin-dependent gamma-secretase activity modulates thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 9312-9317.

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia- Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron.* 2002; 36: 1021-1034.

Doherty D, Jan LY, Jan YN. The Drosophila neurogenic gene big brain, which encodes a membrane-associated protein, acts cell autonomously and can act synergistically with Notch and Delta. *Development.* 1997; 124: 3881-3893.

Doi K, Ishida H, Nibu K. Notch expression in developing olfactory neuroepithelium. *Neuroreport*. 2004; 15: 945-947.

D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med*. 1996; 184: 2361-2370.

F

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell*. 1991; 66: 649-661.

Eramo A, Sargiacomo M, Ricci-Vitiani L, Todaro M, Stassi G, Messina CG, Parolini I, Lotti F, Sette G, Peschle C, De Maria R. CD95 death-inducing signaling complex formation and internalization occur in lipid rafts of type I and type II cells. *Eur J Immunol*. 2004; 34: 1930-1940.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*. 2000; 20: 929-935.

Etienne-Manneville S. Les molécules qui dirigent la migration des astrocytes. *Med Sci*. 2002; 18: 142-144.

F

Fan X, Salford LG, Widegren B. Glioma stem cells: Evidence and limitation. *Semin Cancer Biol*. 2006 [Epub ahead of print].

Farbman AI. Injury-stimulated neurogenesis in sensory systems. *Adv Neurol*. 1997; 72: 157-161.

Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995; 81: 935-946.

Fleming RJ, Scottgale TN, Diederich RJ, Artavanis-Tsakonas S. The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. 1990; 4: 2188-21201.

Fleming RJ. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol*. 1998; 9: 599-607.

Fortini ME, Artavanis-Tsakonas S. The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell*. 1994; 79: 273-282.

Fortini ME. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3: 673-684.

Fortini ME. Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol*. 2001; 13: 785.

Frankel B, Longo SL, Leach C, Canute GW, Ryken TC. Apoptosis and survival in high-grade astrocytomas as related to tumor Fas (APO-1/CD95) expression. *J Neurooncol*. 2002; 59: 27-34.

Freiberg RA, Spencer DM, Choate KA, Duh HJ, Schreiber SL, Crabtree GR, Khavari PA. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1997; 108: 215-219.

Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia*. 1999; 13: 1854-1858.



Gaiano N, Nye JS, Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*. 2000; 26: 395-404.

Giniger E. A role for Abl in Notch signaling. *Neuron*. 1998; 20: 667-681.

Giraud S, Lautrette C, Bessette B, Decourt C, Mathonnet M, Jauberteau MO. Modulation of Fas-induced apoptosis by p75 neurotrophin receptor in a human neuroblastoma cell line. *Apoptosis*. 2005; 10:1271-1283.

Givogri MI, Costa RM, Schonmann V, Silva AJ, Campagnoni AT, Bongarzone ER. Central nervous system myelination in mice with deficient expression of Notch1 receptor. *J Neurosci Res*. 2002; 67: 309-320.

Globus J, Kuhlenbeck H. Tumors of the striatohalamic and related regions: their probable source of origin and more common forms. *Arch Pathol*. 1942; 24: 674-734.

Globus J, Kuhlenbeck H. The subependymal cell plate (matrix) and its relationship to brain tumors of the ependymal type. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1944; 3: 1-35.

Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J Biol Chem*. 2000; 275: 19609-19619.

Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276: 44944-44952.

Gratas C, Tohma Y, Barnas C, Taniere P, Hainaut P, Ohgaki H. Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas in human esophageal cancer. *CancerRes.* 1998; 58: 2057–2062.

Gratas C, Tohma Y, Van Meir EG, Klein M, Tenan M, Ishii N, Tachibana O, Kleihues P, Ohgaki H. Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain Pathol.* 1997; 7: 863-869.

Graziadei PP, Monti Graziadei GA. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation of the olfactory bulb following section of the fila olfactoria in rat. *J Neurocytol.* 1980; 9: 145-162.

Green DR, Scott DW. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6: 476-487.

Greenwald I. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 1998; 12: 1751-1762.

Gregori N, Proschel C, Noble M, Mayer-Proschel M. The tripotential glial-restricted precursor (GRP) cell and glial development in the spinal cord: generation of bipotential oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells and dorsal-ventral differences in GRP cell function. *J Neurosci.* 2002; 22: 248-256.

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 1995; 270: 1189–1192.

Griffith TS, Yu X, Herndon JM, Green DR, Ferguson TA. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity.* 1996; 5: 7–16.

Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood.* 1998; 92: 3018-3024.

Guglielmi L, Battu S, Le Bert M, Faucher JL, Cardot PJ, Denizot Y. Mouse embryonic stem cell sorting for the generation of transgenic mice by sedimentation field-flow fractionation. *Anal Chem.* 2004; 76: 1580-1585.

Guidos CJ. Notch signaling in lymphocyte development. *Semin Immunol.* 2002; 14: 395-404.

Gulbins E, Grassme H. Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1585: 139-145.

Gulbins E. Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide. *Pharmacol Res.* 2003; 47: 393-399.

Gupta N, Wang H, McLeod TL, Naus CC, Kyurkchiev S, Advani S, Yu J, Perbal B, Weichselbaum RR. Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). *Mol Pathol.* 2001; 54: 293-299.



Haines N, Irvine KD. Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 786-797.

Hall A, Giese NA, Richardson WD. Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development.* 1996; 122: 4085-4094.

Haltiwanger RS. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* 2002; 12: 593-598.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 1951; 88: 49-92.

Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 2000; 10: 73-80.

Heitzler P, Simpson P. Altered epidermal growth factor-like sequences provide evidence for a role of Notch as a receptor in cell fate decisions. *Development.* 1993; 117: 1113-1123.

Heitzler P, Simpson P. The choice of cell fate in the epidermidis of Drosophila. *Cell.* 1991; 64: 1083-1092.

Henrique D, Adam J, Myat A, Chitnis A, Lewis J, Ish-Horowicz D. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature.* 1995; 375: 787-790.

Herrant M, Luciano F, Loubat A, Auburger P. The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation. *Oncogene.* 2002; 21: 4957-4968.

Hetz CA, Hunn M, Rojas P, Torres V, Leyton L, Quest AF. Caspase-dependent initiation of apoptosis and necrosis by the Fas receptor in lymphoid cells: onset of necrosis is associated with delayed ceramide increase. *J Cell Sci.* 2002; 115: 4671-4683.

Hicks C, Johnston SH, DiSibio G, Collazo A, Vogt TF, Weinmaster G. Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2. *Nat Cell Biol.* 2000; 2: 515-520.

Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 2002; 16: 846-858.

Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY. Biologie des gliomes : acquis et perspectives cliniques. *Med Sci.* 1999; 15: 1075-1077.

Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med.* 2000; 108: 317-330.

Hsu SC, Wu CC, Luh TY, Chou CK, Han SH, Lai MZ. Apoptotic signal of Fas is not mediated by ceramide. *Blood.* 1998; 91: 2658-2663.

Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell.* 2003; 115: 163-175.

Hu WH, Johnson H, Shu HB. Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem.* 2000; 275: 10838-10844.

Hueber AO, Bernard AM, Herincs Z, Couzinet A, He HT. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* 2002; 3: 190-196.

2

Imamura R, Konaka K, Matsumoto N, Hasegawa M, Fukui M, Mukaida N, Kinoshita T, Suda T. Fas ligand induces cell-autonomous NF-kappaB activation and interleukin-8 production by a mechanism distinct from that of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 2004; 279: 46415-46423.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190–195.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 1991; 66: 233-243.

Ivanov VN, Lopez Bergami P, Maulit G, Sato TA, Sassoone D, Ronai Z. FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 3623-3635.

J

Jaattela M, Benedict M, Tewari M, Shayman JA, Dixit VM. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene*. 1995; 10: 2297–2305.

Jang MS, Zlobin A, Kast WM, Miele L. Notch signaling as a target in multimodality cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther*. 2000; 2: 55-65.

Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*. 1995; 377: 355-358.

Jelaska A, Korn JH. Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1998; 175: 19-29.

Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, Plassiart G, Brisac M, Crochet J, Perbal B. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1992; 12:10-21.

Jones P, May G, Healy L, Brown J, Hoyne G, Delassus S, Enver T. Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1998; 92: 1505-1511.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995; 373: 444-448.

K

Kanwar R, Fortini ME. Notch signaling: a different sort makes the cut. *Curr Biol.* 2004; 14: 1043-1045.

Kaplan HJ, Leibole MA, Tezel T, Ferguson TA. Fas ligand CD95 ligand controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med.* 1999; 5: 292–297.

Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol.* 1998; 161: 3936–3942.

Kato T, Yokouchi K, Fukushima N, Kawagishi K, Li Z, Moriizumi T. Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats. *Neurosci Lett.* 2001; 307: 17-20.

Katsube K, Chuai ML, Liu YC, Kabasawa Y, Takagi M, Perbal B, Sakamoto K. The expression of chicken NOV, a member of the CCN gene family, in early stage development. *Brain Res. Gene Expr. Patterns.* 2001; 1: 61-65.

Katsube K, Sakamoto K. Notch in vertebrates--molecular aspects of the signal. *Int J Dev Biol.* 2005; 49: 369-374.

Kaup B, Schindler I, Knupfer H, Schlenzka A, Preiss R, Knupfer MM. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J Neurooncol.* 2001; 51: 105-110.

Keane MM, Ettenberg SA, Lowrey GA, Russell EK, Lipkowitz S. Fas expression and function in normal and malignant breast cell lines. *Cancer Res.* 1996; 56: 4791–4798.

Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med.* 1999; 190: 1891-1896.

Keppler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmitz I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology.* 1999; 9: 557-569.

Kimble J, Simpson P. The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13: 333-361.

Kirton JP, Wilkinson FL, Canfield AE, Alexander MY. Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes: implications for vascular calcification. *Circ Res.* 2006; 98: 1264-1272.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995; 14: 5579-5588.

Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science.* 2000; 289: 1754-1757.

Koos WT, Horaczek A. Statistics of intracranial midline tumors in children. *Acta Neurochir Suppl.* 1985; 35: 1-5.

Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS. Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 1683-1688.

Kopczynski CC, Alton AK, Fachtel K, Kooh PJ, Muskavitch MA. Delta, a Drosophila neurogenic gene, is transcriptionally complex and encodes a protein related to blood coagulation factors and epidermal growth factor of vertebrates. *Genes Dev.* 1988; 2: 1723-1735.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000; 407: 789-795.

Kreuz S, Siegmund D, Rumpf JJ, Samel D, Leverkus M, Janssen O, Hacker G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Scheurich P, Wajant H, NF κ B activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol.* 2004; 166: 369-380.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 1996; 16: 2027-2033.

Kundu SK, Pleatman MA, Redwine WA, Boyd AE, Marcus DM. Binding of monoclonal antibody A2B5 to gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983; 116: 836-842.

Kwon D, Choi C, Lee J, Kim KO, Kim JD, KIM SJ, Choi IH. Hydrogen peroxide triggers the expression of Fas/FasL in astrocytoma cell lines and augments apoptosis. *J Neuroimmunol.* 2001; 113: 1-9.



Lai EC. Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Rep.* 2002; 3: 840-845.

Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 2004; 131: 965-973.

Lambert C, Landau AM, Desbarats J. Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis*. 2003; 8: 551-562.

Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma, *Blood*. 1997; 90: 4266-4270.

Lasky JL, Wu H. Notch signaling, brain development, and human disease. *Pediatr Res*. 2005; 57:104-109.

Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res*. 1999; 248: 44-57.

Lautrette C, Giraud S, Vermot-Desroches C, Preud'homme JL, Jauberteau MO. Expression of a functional Fas death receptor by human foetal motoneurons. *Neuroscience*. 2003; 119: 377-385.

Lautrette C, Loum-Ribot E, Petit D, Vermot-Desroches C, Wijdenes J, Jauberteau MO. Increase of Fas-induced apoptosis by inhibition of extracellular phosphorylation of Fas receptor in Jurkat cell line. *Apoptosis*. 2006; 11: 1195-1204.

Lavicka J, Sarissky M, Mirossay A, Sulla I, Mojzis J, Mirossay L. Diazepam enhances etoposide-induced cytotoxicity in U-87 MG human glioma cell line. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001; 15: 201-207.

LaVoie MJ, Selkoe DJ. The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem*. 2003; 278: 34427-34437.

Lawrence TS, Canman CE, Maybaum J, Davis MA. Dependence of etoposide-induced cytotoxicity and topoisomerase II-mediated DNA strand breakage on the intracellular ionic environment. *Cancer Res*. 1989; 49: 4775-4779.

Le Borgne R. Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18: 213-222.

Le Deist F, Emile JF, Rieux-Laucat F, Benkerrou M, Roberts I, Brousse N, Fischer A. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet*. 1996; 348: 719-723.

Lee EC, Yu SY, Baker NE. The scabrous protein can act as an extracellular antagonist of notch signaling in the Drosophila wing. *Curr Biol.* 2000; 10: 931-934.

Lee SJ, Zhou T, Choi C, Wang Z, Benveniste EN. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J Immunol.* 2000; 164: 1277-1285.

Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Usher N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 1987; 329: 630-632.

Leibovici M, Lapointe F, Aletta P, Ayer-Le Lievre C. Avian olfactory receptors: differentiation of olfactory neurons under normal and experimental conditions. *Dev Biol.* 1996; 175: 118-131.

Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Moller P. Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest.* 1993; 69: 415-429.

Lemke G. Glial control of neuronal development. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 87-105.

Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 170-181.

Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood.* 2006; 107: 2223-2233.

Lewis J. Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6: 3-10.

Li LH, Milner LA, Deng Y, Iwata M, Banta A, Graf L, Marcovina S, Friedman C, Trask BJ, Hood L, Torokstorb B. The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32d cells through interaction with Notch1. *Immunity.* 1998; 8: 43-55.

Li Y, Kanki H, Hachiya T, Ohyama T, Irie S, Tang G, Mukai J, Sato T. Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int J Cancer.* 2000; 87:473-479.

Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol.* 1999; 7: 239-246.

Lieber T, Kidd S, Alcamo E, Corbin V, Young MW. Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* 1993; 7: 1949-1965.

Linkermann A Qian J, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2005; 9: 119-134.

Lissemore JL, Starmer WT. Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Mol Phylogenet Evol.* 1999; 11: 308-319.

Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 8108-8112.

Low W, Smith A, Ashworth A, Collins M. JNK activation is not required for Fas-mediated apoptosis. *Oncogene.* 1999; 18: 3737-3741.

Lundkvist J, Lendahl U. Notch and the birth of glial cells. *Trends Neurosci.* 2001; 24: 492-494.

Lupia E, Montrucchio G, Battaglia E, Modena V, Camussi G. Role of tumor necrosis factor-alpha and platelet-activating factor in neoangiogenesis induced by synovial fluids of patients with heumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 1690-1694.



MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004; 5: 674-678.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 2001; 15: 1311-1333.

Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun SC, Kumar R. Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem.* 1996; 27:30354-30359.

Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem.* 1998; 273: 4345-4349.

Massi D, Tarantini F, Franchi A, Paglierani M, Di Serio C, Pellerito S, Leoncini G, Cirino G, Geppetti P, Santucci M. Evidence for differential expression of Notch

receptors and their ligands in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2006; 19: 246-254.

Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P. Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev.* 1999; 13: 1918-1923.

Michaelson JS. The Daxx enigma. *Apoptosis.* 2000; 5: 217-220.

Micheau O, Hammann A, Solary E, Dimanche-Boitrel MT. STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256: 603-607.

Micheau O, Solary E, Hammann A, Martin F, Dimanche-Boitrel MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89: 783-789.

Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005; 28: 223-250.

Mishra A, Agrawal N, Banerjee S, Sardesai D, Dalal JS, Bhojwani J, Sinha P. Spatial regulation of DELTA expression mediates NOTCH signalling for segmentation of *Drosophila* legs. *Mech Dev.* 2001; 105: 115-127.

Miyagami M, Katayama Y. Angiogenesis of glioma: evaluation of ultrastructural characteristics of microvessels and tubular bodies (Weibel-Palade) in endothelial cells and immunohistochemical findings with VEGF and p53 protein. *Med Mol Morphol.* 2005; 38: 36-42.

Miyazaki T, Atarashi Y, Yasumura S, Minatoya I, Ogawa K, Iwamoto M, Minemura M, Shimizu Y, Sato TA, Watanabe A, Sugiyama T. Fas-associated phosphatase-1 promotes Fas-mediated apoptosis in human colon cancer cells: novel function of FAP-1. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21:84-91.

Mo YY, Beck WT. DNA damage signals induction of fas ligand in tumor cells. *Mol Pharmacol.* 1999; 55: 216-222.

Mohr OL. Character changes caused by mutation of an entire region of chromosome in *Drosophila*. *Genetics.* 1919; 4: 274-282.

Morgant H, Bridges CB. Sex-linked inheritance in *Drosophila*. *Carnegie Inst. Washington Publ.* 1916; 237: 87.

Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell*. 2000; 101: 499-510.

Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res*. 2001; 488: 211-231.

Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*. 1998; 188: 2033-2045.

Murakami S, Seki T, Wakabayashi K, Arai Y. The ontogeny of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) producing neurons in the chick embryo: possible evidence for migrating LHRH neurons from the olfactory epithelium expressing a highly polysialylated neural cell adhesion molecule. *Neurosci Res*. 1991; 3: 421-431.

Murata H, Tanaka H, Taguchi T, Shiigi E, Mizokami H, Sugiyama T, Kawai S. Dexamethasone induces human spinal ligament derived cells toward osteogenic differentiation. *J Cell Biochem*. 2004; 92: 715-722.

Murrell W, Feron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, Bianco J, Perry C, Lee G, Mackay-Sim A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn*. 2005; 233: 496-515.

Muschen M, Warskulat U, Beckmann MW. Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J Mol Med*. 2000; 78: 312-325.

Muskavitch MA. Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice. *Dev Biol*. 1994; 166: 415-430.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 85: 817-827.

Myat A, Henrique D, Ish-Horowicz D, Lewis J. A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. *Dev Biol*. 1996; 174: 233-247.

N

Noble M, Mayer-Proschel M. Growth factors, glia and gliomas. *J Neurooncol*. 1997; 35: 193-209.

Noble M, Proschel C, Mayer-Proschel M. Getting a GR(i)P on oligodendrocyte development. *Dev Biol.* 2004; 265: 33-52.

Nzang Nguema G, Boghossian S, Dardevet D, Grizard J, Alliot J. Effect of treatment with dexamethasone on protein intake in adult and old Lou/c/jall rats. *Mech Ageing Dev.* 2005; 126: 655-663.

O

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, Ponstigl H, Krammer PH. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.* 1992; 267: 10709-10715.

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 1993; 364: 806-9.

Oishi K, Kamakura S, Isazawa Y, Yoshimatsu T, Kuida K, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y. Notch promotes survival of neural precursor cells via mechanisms distinct from those regulating neurogenesis. *Dev Biol.* 2004; 276: 172-184.

Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J.* 2002; 21: 5408-5416.

Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991; 14: 453-501.

O'Reilly LA, Divisekera U, Newton K, Scalzo K, Kataoka T, Puthalakath H, Ito M, Huang DC, Strasser A. Modifications and intracellular trafficking of FADD/MORT1 and caspase-8 after stimulation of T lymphocytes. *Cell Death Differ.* 2004; 11:724-736.

Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berry K, Yonehara S. Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/ APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res.* 1994; 54: 1580-1586.

Ozawa T, Wang J, Hu LJ, Bollen AW, Lamborn KR, Deen DF. Growth of human glioblastomas as xenografts in the brains of athymic rats. *In vivo.* 2002; 16: 55-60.

P

Pahlman S, Stockhausen MT, Fredlund E, Axelson H. Notch signaling in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14: 365-373.

Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000; 425: 479-494.

Panin VM, Irvine KD. Modulators of Notch signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 1998; 9: 609-617.

Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature.* 1997; 387: 908-912.

Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem.* 1999; 274: 38241-38250.

Park C, Sakamaki K, Tachibana O, Yamashita T, Yamashita J, Yonehara S. Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 252: 623-628.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinate. *Academic Press. INC (London) LTD. London,* 1982.

Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet.* 2004; 363: 62-64.

Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 2001; 54: 57-79.

Peter ME. The flip side of FLIP. *Biochem J.* 2004; 382: 1-3.

Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14: 433-439.

Planque N, Perbal B. A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumorigenesis. *Cancer Cell International.* 2003, 3: 15.

Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone Jr MA, Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature.* 1977; 269:804-846.

Poulson DF. Chromosomal deficiencies and embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1919; 23: 133-137.

Poulson DF. The effects of certain X-chromosome deficiencies in the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool.* 1940; 83: 271-325.

Pouly S, Becher B, Blain M, Antel JP. Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59: 280-286.

Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, Sundaresan T, Pastorino S, Park JK, Mikolaenko I, Maric D, Eberhart CG, Fine HA. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.* 2005; 65: 2353-2363.

R

Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm.* 2005; 70: 69-103.

Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 756-767.

Raff MC, Abney ER, Cohen J, Lindsay R, Noble M. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J Neurosci.* 1983; 3: 1289-1300.

Raoul C, Henderson CE, Pettmann B. Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *J Cell Biol.* 1999; 147: 1049-1062.

Rathmell JC, Goodnow CC. The in vivo balance between B cell clonal expansion and elimination is regulated by CD95 both on B cells and in their micro-environment. *Immunol Cell Biol.* 1998; 76: 387-394.

Rebay I, Fehon RG, Artavanis-Tsakonas S. Specific truncations of Drosophila Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell.* 1993; 74: 319-329.

Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell.* 1991; 67: 687-699.

Regardsoe EL, McMenamin MM, Charlton HM, Wood MJ. Local adenoviral expression of Fas ligand upregulates pro-inflammatory immune responses in the CNS. *Gene Ther.* 2004; 11: 1462-1474.

Rehman AO, Wang CY. Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 293-300.

Reil TD, Sarkar R, Kashyap VS, Sarkar M, Gelabert HA. Dexamethasone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res.* 1999; 85: 109-114.

Rensing-Ehl A, Frei K, Flury R, Matiba B, Mariani SM, Weller M, Aebischer P, Krammer PH, Fontana A. Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 2253-2258.

Rensing-Ehl A, Malipiero U, Irmeler M, Tschopp J, Constam D, Fontana A. Neurons induced to express major histocompatibility complex class I antigen are killed via the perforin and not the Fas (APO-1/CD95) pathway. *Eur J Immunol.* 1996; 26: 2271-2274.

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Cage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997; 20: 570-577.

Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, de Villartay JP. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science.* 1995; 268: 1347-1349.

Robe PA, Nguyen-Khac M, Jolois O, Rogister B, Merville MP, Bours V. Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells. *BMC Cancer.* 2005; 5: 32.

Rochat-Steiner V, Becker K, Micheau O, Schneider P, Burns K, Tschopp J. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Exp Med.* 2000; 192: 1165-1174.

Roegiers F, Jan YN. Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16: 195-205.

Roth W, Fontana A, Trepel M, Reed JC, Dichgans J, Weller M. Immunochemotherapy of malignant glioma: synergistic activity of CD95 ligand and chemotherapeutics. *Cancer Immunol Immunother.* 1997; 44: 55-63.

Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280: 26425-26434.

Roue G, Lancry L, Duquesne F, Salaun V, Troussard X, Sola B. Upstream mediators of the Fas apoptotic transduction pathway are defective in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk res.* 2001; 25: 967-980.

Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Font J, Izquierdo M, Lopez-Rivas A. Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in Jurkat T cells. *J Immunol.* 1999; 163: 4737-4746

Ruiz-Ruiz MC, Izquierdo M, de Murcia G, Lopez-Rivas A. Activation of protein kinase C attenuates early signals in Fas-mediated apoptosis. *Eur J Immunol.* 1997; 27: 1442-1450.



Sabapathy K, Hu Y, Kallunki T, Schreiber M, David JP, Jochum W, Wagner EF, Karin M. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol.* 1999; 9: 116-125.

Sade H, Krishna S, Sarin A. The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 2937-2944.

Sakamoto K, Chao WS, Katsube K, Yamaguchi A. Distinct roles of EGF repeats for the Notch signaling system. *Exp Cell Res.* 2005; 302: 281-291.

Sakamoto K, Nakamura H, Takagi M, Takeda S, Katsube K. Ectopic expression of lunatic Fringe leads to downregulation of Serrate-1 in the developing chick neural tube; analysis using in ovo electroporation transfection technique. *FEBS Lett.* 1998; 426: 337-341.

Sakamoto K, Yamaguchi S, Ando R, Miyawaki A, Kabasawa Y, Takagi M, Li CL, Perbal B, Katsube K. The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277: 29399-29405.

Sakic B, Szechtman H, Denburg JA, Gorny G, Kolb B, Whishaw IQ. Progressive atrophy of pyramidal neuron dendrites in autoimmune MRL-lpr mice. *J Neuroimmunol.* 1998; 87: 162-170.

Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K. Delayed selective motor neuron death and fas antigen induction after spinal cord ischemia in rabbits. *Brain Res.* 1998; 797: 23-28.

Salama-Cohen P, Arevalo MA, Grantyn R, Rodriguez-Tebar A. Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurones through Neurogenin 3. *J Neurochem.* 2006; 97:1269-1278.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 10964-10967.

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 2005; 353: 811-822.

Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-Garcia Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* 2004; 427: 740-744.

Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell.* 1996; 86: 189-199.

Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2001; 2: 20-29.

Sata M, Walsh K. TNF-alpha regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat med.* 1998; 4: 415-420.

Sato T, Irie S, Kitada S, Reed JC. FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science.* 1995; 268: 411-415.

Satoh M, Yoshida T. Expression of neural properties in olfactory cytokeratin-positive basal cell line. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000; 121: 219-222.

Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, Salmon M, Lord JM. The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297: 876-879.

Schweisguth F. Notch signaling activity. *Curr Biol.* 2004; 14: 129-138.

Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004; 304: 1338-1340.

Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M, Yonehara S, Konishi N. Phosphorylation of Fas-associated death domain contributes to enhancement of etoposide-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Jpn J Cancer Res.* 2002; 93: 1164-1174.

Shinohara H, Yagita H, Ikawa Y, Oyaizu N. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* 2000; 60: 1766-1772.

Shoshan Y, Nishiyama A, Chang A, Mork S, Barnett GH, Cowell JK, Trapp BD, Staugaitis SM. Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas:

implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 10361-10366.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000; 288: 2354-2357.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432:396-401.

Sjölund J, Manetopoulos C, Stockhausen MT, Axelson H. The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. *Eur J Cancer*. 2005; 41: 2620-2629.

Skeath JB, Doe CQ. Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the Drosophila CNS. *Development*. 1998; 125: 1857-1865.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 1067-1074.

Song H, Moon A. Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes low-grade Hs683 glioma cell migration through JNK, ERK-1/2 and p38 MAPK signaling pathways. *Neurosci Res*. 2006. [Epub ahead of print]

Spana EP, Doe CQ. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron*. 1996; 17: 21-26.

Srinivasan A, Li F, Wong A, Kodandapani L, Smidt Jr R, Krebs JF, Fritz LC, Wu JC, Tomaselli KJ. Bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1998; 273: 4523–4529.

Sriuranpong V, Borges MW, Strock CL, Nakakura EK, Watkins DN, Blaumueller CM, Nelkin BD, Ball DW. Notch signaling induces rapid degradation of achaete-scute homolog 1. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 3129-3139.

Strand S, HofmannWJ, HugH, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nat Med*. 1996; 2: 1361–1366.

Strater J, Moller P. Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 915: 162-170.

Stricker S, Brieske N, Haupt J, Mundlos S. Comparative expression pattern of Odd-skipped related genes *Osr1* and *Osr2* in chick embryonic development. *Gene Expr Patterns*. 2006 Mar 20; [Epub ahead of print]

Struhl G, Fitzgerald K, Greenwald I. Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. *Cell*. 1993; 74: 331-345.

Stump G, Durrer A, Klein AL, Lutolf S, Suter U, Taylor V. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mech Dev*. 2002; 114: 153-159.

Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res*. 2006; 66: 1517-1525.

Sutton LN, Phillips P, Lange B. Midline supratentorial tumors. *Neurosurg Clin N Am*. 1992; 3: 821-837.



Tai YT, Podar K, Gupta D, Lin B, Young G, Akiyama M, Anderson KC. CD40 activation induces p53-dependent vascular endothelial growth factor secretion in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2002; 99: 1419-1427.

Takahashi M, Mukai H, Toshimori M, Miyamoto M, Ono Y. Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 11566-11571.

Takigawa M. CTGF/Hcs24 as a multifunctional growth factor for fibroblasts, chondrocytes and vascular endothelial cells. *Drug News Perspect*. 2003; 1: 11-21.

Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev*. 2002; 16: 2252-2263.

Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol*. 1995; 5: 1416-1423.

Tanaka M, Suda T, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S. Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *J Immunol*. 1997; 158: 2303-2309.

Tanaka T, Mizuno K, Miyama M, Chang L, Chen H, Ohtaki S, Umesaki N, Ogita S. Enhanced Fas/CD95-mediated apoptosis by epidermal growth factor in human endometrial epithelial cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999; 86: 189-194.

Tani E, Kitagawa H, Ikemoto H, Matsumoto T. Proteasome inhibitors induce Fas-mediated apoptosis by c-Myc accumulation and subsequent induction of FasL message in human glioma cells. *FEBS Lett.* 2001; 504: 53-58.

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

Tax FE, Yeargers JJ, Thomas JH. Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature.* 1994; 368: 150-154.

Thelu J, Rossio P, Favier B. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. *BMC Dermatol.* 2002; 2: 7.

Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 1997; 386: 517-521.

Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol.* 2001; 1: 50-58.

Timmer T, de Vries EG, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol.* 2002; 196: 125-134.

Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Marvin M, McKay RD, Trojanowski JQ. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest.* 1992; 66: 303-313.

Torii S, Egan DA, Evans RA, Reed JC. Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J.* 1999; 18: 6037-6049.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 1989; 245: 301-305.



Uhrbom L, Dai C, Celestino JC, Rosenblum MK, Fuller GN, Holland EC. Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Res.* 2002; 62: 5551-5558.

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science.* 2001; 291: 657-661.

Uslu R, Borsellino N, Frost P, Garban H, Ng CP, Mizutani Y, Beldegrun A, Bonavida B. Chemosensitization of human prostate carcinoma cell lines to anti-fas-mediated cytotoxicity and apoptosis. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 963-972.



Van Campenhout, E. Le développement du système nerveux crânien chez le poulet. *Arch. Biol.* 1937; 48: 611-666.

Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* 1998; 9: 267-276.

Vargesson N, Patel K, Lewis J, Tickle C. Expression patterns of Notch1, Serrate1, Serrate2 and Delta1 in tissues of the developing chick limb. *Mech Dev.* 1998; 77: 197-199.

Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, Brashem-Stein C, Flowers D, Staats S, Moore KA, Le Roux I, Mann R, Gray G, Artavanis-Tsakonas S, Bernstein ID. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood.* 1998; 91: 4084-4091.

Viard-Leveugle I, Veyrenc S, French LE, Brambilla C, Brambilla E. Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma. *J Pathol.* 2003; 201: 268-277.

Vick NA, Lin MJ, Bigner DD. The role of the subependymal plate in glial tumorigenesis. *Acta Neuropathol (Berl).* 1977; 40: 63-71.



Wajant H, Haas E, Schwenzler R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a

cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem.* 2000; 275:24357-24366.

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14: 53-66

Wang H, Li M, Rinehart JJ, Zhang R. Pretreatment with dexamethasone increases antitumor activity of carboplatin and gemcitabine in mice bearing human cancer xenografts: in vivo activity, pharmacokinetics, and clinical implications for cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1633-1644.

Wang W, Struhl G. Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila. *Development.* 2005; 132: 2883-2894.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 1992; 356: 314-317.

Wechsler-Reya R, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 385-428.

Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G. A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry.* 2002; 41: 2825-2835.

Wen PY, Kesari S, Drappatz J. Malignant gliomas: strategies to increase the effectiveness of targeted molecular treatment. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006; 6: 733-754.

Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavarijus-Tsakonas S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-repeats. *Cell.* 1985; 43: 567-581.

Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12: 43-50.

Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 2416-2429.

Widmann C, Johnson NL, Gardner AM, Smith RJ, Johnson GL. Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1. *Oncogene.* 1997; 15: 2439-2447.

Wigglesworth VB. Local and general factors in the development of 'pattern' in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 1940; 17: 180–200.

Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul-Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJ. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell.* 1999; 96: 35-45.

Wilson DJ, Alessandrini A, Budd RC. MEK1 activation rescues Jurkat T cells from Fas-induced apoptosis. *Cell Immunol.* 1999; 194: 67-77.

Wolff JE, Molenkamp G, Hotfilder M, Laterra J. Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo. *Klin Padiatr.* 1997; 209: 275-277.

Wu XX, Mizutani Y, Kakehi Y, Yoshida O, Ogawa O. Enhancement of Fas-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells by adriamycin. *Cancer Res.* 2000; 60: 2912-2918.



Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell.* 1997; 89: 1067-1076.

Yao H, Song E, Chen J, Hamar P. Expression of FAP-1 by human colon adenocarcinoma: implication for resistance against Fas-mediated apoptosis in cancer. *Br J Cancer.* 2004; 91: 1718-1725.

Yi FH, Lautrette C, Vermot-Desroches C, Bordessoule D, Couratier P, Wijdenes J, Preud'homme JL, Jauberteau MO. In vitro induction of neuronal apoptosis by anti-Fas antibody-containing sera from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2000; 109: 211-220.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-down regulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1989; 169: 1747-1756.

Yoon K, Gaiano N. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci.* 2005; 8: 709-715.



Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 6414-6418.

Zarate JO, Sampaolesi R. Pleomorphic xanthoastrocytoma of the retina. *Am J Surg Pathol.* 1999; 23: 79-81.

Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature.* 1998; 392: 296-300.

Zibera C, Gibelli N, Butti G, Pedrazzoli P, Carbone M, Magrassi L, Robustelli della Cuna G. Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. *Anticancer Res.* 1992; 12: 1571-1574.

Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, Martinez A, del Rio JA, Soriano E, Vodrazka P, Kuner R, Groene HJ, Herr I, Krammer PH, Martin-Villalba A. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ.* 2006; 13:31-40.