

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

INTRODUCTION

I. Présentation des protéines IQGAP	1
I.1. La famille « IQ-GAP »	1
I.2. Localisations chromosomique, tissulaire et cellulaire des isoformes IQGAP1 et IQGAP2	1
I.3. Les domaines structuraux et fonctionnels des protéines IQGAP1 et IQGAP2	2
I.3.1 Le domaine « CHD » (<i>Calponin-Homology-Domain</i>)	
I.3.2 Le domaine « IR » (<i>Internal Repeat</i>)	
I.3.3 Le motif « WW »	
I.3.4 Le motif « IQ »	
I.3.5 Le domaine « GRD » (<i>GAP-Related Domain</i>)	
I.3.6 Le domaine « RGCT » (<i>RasGAP C-Terminal</i>)	
I.4. Les protéines « IQGAP » au cours de l'évolution	6
II. Les fonctions cellulaires d'IQGAP1	7
II.1. La protéine IQGAP1 est un important régulateur de la dynamique du cytosquelette	8
II.1.1 Une histoire ancestrale entre IQGAP et le cytosquelette	
II.1.2 IQGAP est un effecteur des Rho GTPases Rac et Cdc42	
II.1.3 IQGAP1 et le réseau microtubulaire	
II.2. Le rôle d'IQGAP1 dans la polarité et la migration cellulaire	11
II.3. IQGAP1 dans la régulation des contacts intercellulaires	13
II.4. Rôle d'IQGAP1 dans la motilité neuronale et la croissance neuritique	16
II.5. IQGAP1 : un acteur central des voies de signalisation intracellulaire	16
II.5.1 IQGAP1 et les voies de signalisation	
II.5.1.1 <i>IQGAP1 et la voie Wnt/wingless</i>	
II.5.1.2 <i>IQGAP1 et la voie des MAP (Mitogen Activated Protein) Kinases</i>	
II.5.2 IQGAP1 et les récepteurs	
II.5.2.1 <i>Le récepteur à l'EGF (EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor)</i>	
II.5.2.2 <i>Le récepteur au VEGF de type-2</i>	
II.5.2.3 <i>Le CD44</i>	
II.5.2.4 <i>Le récepteur muscarinique à l'acétylcholine M3</i>	
II.5.2.5 <i>IQGAP1 et les récepteurs AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate)</i>	

III. Régulations fonctionnelles d'IQGAP1	22
III.1. Le rôle de la signalisation Ca²⁺/Calmoduline	22
III.2. La localisation sub-cellulaire	23
III.3. L'oligomérisation	23
III.4. Les modifications post-traductionnelles	23
IV. Les cellules souches neurales dans le système nerveux central adulte	25
IV.1 Historique et contexte scientifique contemporain	25
IV.2 La neurogenèse chez les mammifères adultes	28
IV.2.1 La zone sous-ventriculaire adulte (SVZ)	
IV.2.2 La couche sous-granulaire de l'hippocampe (SGL)	
IV.3 Les mécanismes intrinsèques et extrinsèques contrôlant la neurogenèse adulte dans la voie SVZ/RMS/Bulbe Olfactif (BO)	35
IV.3.1 Les mécanismes moléculaires de régulation intrinsèque des cellules souches de la SVZ adulte	
IV.3.1.1 <i>Persistiance des cellules souches neurales de l'embryon à l'adulte</i>	
IV.3.1.2 <i>Les mécanismes moléculaires contrôlant la SVZ adulte</i>	
IV.3.2 Les cellules souches et leur microenvironnement : les « niches » de la SVZ	
IV.3.2.1 <i>Le rôle des facteurs de croissance dans la neurogenèse</i>	
IV.3.2.1.1 <i>Les rôles des ligands de la famille des récepteurs à l'EGF : l'EGF, le bFGF, le TGFα (<i>Transforming Growth Factor</i>) et les neurégulines</i>	
IV.3.2.1.2 <i>Le rôle de l'<i>Insulin-Like Growth Factor-1</i> (IGF-1)</i>	
IV.3.2.2 <i>Les relations entre la neurogenèse et la signalisation cellulaire</i>	
IV.3.2.2.1 <i>La signalisation <i>Sonic Hedgehog</i> (Shh)</i>	
IV.3.2.2.2 <i>La signalisation Notch</i>	
IV.3.2.2.3 <i>La voie de signalisation canonique Wnt/β-caténine</i>	
IV.3.2.3 <i>Les composantes cellulaires des niches neurogéniques de la SVZ</i>	
IV.3.2.3.1 <i>Les cellules épendymaires dans la neurogenèse</i>	
IV.3.2.3.2 <i>Les cellules astrocytaires dans la neurogenèse</i>	
IV.3.2.3.3 <i>Les cellules endothéliales dans la neurogenèse</i>	
IV.3.3 Les mécanismes moléculaires régulant la migration et la différenciation neuronale le long de la RMS et dans le bulbe olfactif	
IV.3.3.1 <i>Les molécules d'adhérences et matricielles dans la régulation de la neurogenèse adulte</i>	
IV.3.3.1.1 <i>La protéine NCAM (<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>) et son résidu acide poly-sialylé (PSA)</i>	
IV.3.3.1.2 <i>Les intégrines</i>	
IV.4 Les différents acteurs modulant la neurogenèse adulte	51
IV.4.1 Le système Slit-ROBO	
IV.4.2 Le système éphrine-Eph	
IV.4.3 Les neurégulines (NRG) et le récepteur ErbB4	
IV.4.4 Les astrocytes de la RMS et le neurotransmetteur GABA	
IV.4.5 Les facteurs chimio-attractants du bulbe olfactif (BO)	
IV.4.6 Les facteurs agissant sur le détachement et la migration radiaire des neuroblastes dans le bulbe olfactif	

V. Un cas pathologique du système nerveux central: les tumeurs cérébrales	56
V.1 Généralités sur le cancer	56
V.2 Les tumeurs cérébrales	57
V.2.1 La problématique de la classification histologique et le « grading » des tumeurs neuro-épithéliales	
V.2.2 Les gliomes : une sous-classe de tumeurs neuro-épithéliales	
V.2.2.1 <i>Vers une classification moléculaire des gliomes</i>	
V.3 Implication des cellules souches et/ou progénitrices dans la cancérogenèse	62
V.3.1 Les propriétés intrinsèques des cellules souches	
V.3.2 Les phénotypes tumoraux	
V.3.3 La notion de cellules souches cancéreuses (« <i>cancer stem cells</i> »)	
V.3.3.1 <i>Les « cancer stem cells » dans la lignée hématopoïétique</i>	
V.3.3.2 <i>Les « cancer stem cells » dans les tumeurs solides du sein</i>	
V.4 Implication des cellules souches/progénitrices neurales dans l'étiologie des tumeurs cérébrales	67
V.5 Une dérégulation de la niche à l'origine des cancers	69
V.5.1 Les niches de la SVZ, un équilibre fragile	
V.6 Les implications en terme de thérapie	72
V.6.1 Les radiothérapies et chimiothérapies	
V.6.2 Les thérapies anti-angiogéniques	

RESULTATS

I. Objectifs de la thèse	76
II. Etude fonctionnelle de la protéine IQGAP1 dans la régulation de la neurogenèse adulte	79
II.1 Article n°1 : la protéine IQGAP1 intervient dans la voie de signalisation du VEGF pour réguler la migration des cellules progénitrices neurales	79
II.1.1 Introduction	79
II.1.1.1 <i>IQGAP1 dans le cerveau</i>	
II.1.2 ARTICLE n°1: “IQGAP1 regulates VEGF-triggered neural progenitors migration”	82
II.1.3 Résultats complémentaires	83
II.1.4 Discussion et perspectives	88
II.1.4.1 <i>IQGAP1 un nouveau marqueur de cellules progénitrices neurales</i>	
II.1.4.2 <i>IQGAP1 est un régulateur de la migration des cellules progénitrices</i>	
II.1.4.3 <i>Les facteurs environnementaux contrôlant la neurogenèse adulte</i>	
II.1.4.4 <i>Le VEGF dans la neurogenèse</i>	
II.1.4.5 <i>Les influences astrocytaires dans la neurogenèse</i>	
II.1.4.6 <i>Les cellules endothéliales et la neurogenèse</i>	
II.1.4.7 <i>Les mécanismes moléculaires impliqués dans la migration des précurseurs neuraux</i>	

II.1.4.8 IQGAP1 n'intervient pas dans la régulation de la migration des neuroblastes

III. Caractérisation de la protéine IQGAP1 dans un contexte pathologique de tumeurs cérébrales chez le rat et chez l'Homme 93

III.1 ARTICLE n°2 : la protéine IQGAP1 caractérise une population de cellules souches et/ou progénitrices cancéreuses dans les glioblastomes 93

III.1.1 Introduction 93

III.1.1.1 IQGAP1 et la Cancérogenèse

III.1.1.2 Présentation du modèle de rat de tumeurs chimio-induites

III.1.2 Article n°2: "IQGAP1 protein specifies amplifying cancer cells in glioblastoma multiforme" 95

III.1.3 Discussion et perspectives 96

III.1.3.1 IQGAP1 est un marqueur de cellules progénitrices neurales dans le cerveau de rongeurs adultes

III.1.3.2 IQGAP1 caractérise une population de cellules progénitrices cancéreuses dans les tumeurs malignes de rat et les glioblastomes humains

III.1.3.3 L'origine cellulaire des oligodendrogiomes et des glioblastomes

III.1.3.4 La population de « cancer stem cells » dans les tumeurs malignes

III.1.3.5 La biologie des tumeurs malignes

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 102

REFERENCES 106

Liste des abréviations

- **AMPA** : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
- **APC** : *Adenomatous Polyposis Coli*
- **bFGF** : *basic-Fibroblast Growth Factor*
- **bHLH** : *basic Helix- Loop- Helix*
- **BMP** : *Bone Morphogenetic protein*
- **BrdU** : Bromodeoxyuridine
- **CaM** : Calmoduline
- **CHD** : *Calponin-Homology-Domain*
- **CLIP-170** : *Cytoplasmic Linker Protein-170*
- **CPO** : Cellules Progénitrices Oligodendrogliales
- **DCX** : Doublecortine
- **EGF** : *Epidermal Growth Factor*
- **GAP** : *GTPase Activating Protein*
- **GDI** : *GDP Dissociation Inhibitors*
- **GEF** : *GDP/GTP Exchange Factor*
- **GFAP** : *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- **GFP** : *Green Fluorescent Protein*
- **GRD** : *GAP-Related Domain*
- **HES** : *Hairy/Enhancer of Split*
- **HUVEC** : *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*
- **IGF-1** : *Insulin-Like Growth Factor-1*
- **IR** : *Internal Repeat*
- **KO** : *Knock-out*
- **Mash1** : *Mammalian achaete schute homolog 1*
- **MAPK** : *Mitogen Activating Protein Kinase*
- **N-CAM** : *Neural-Cell Adhesion Molecule*

- **NGF** : *Nerve Growth Factor*
- **NSC** : *Neural Stem Cells*
- **PDGF** : *Platelet-Derived Growth Factor*
- **PSA-NCAM** : *Poly Sialic Acid-N-CAM*
- **RGCT** : *Ras GAP C-Terminal*
- **RMS** : *Rostral Migratory Stream*
- **ros** : *reactive oxygen species*
- **SGL** : *Subgranular layer*
- **Shh** : *Sonic Hedgehog*
- **si RNA** : *small interference Ribo Nucleic Acid*
- **SNc** : Système Nerveux central
- **SVZ** : *Subventricular Zone*
- **TGF** : *Transforming Growth Factor*
- **VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor*

Liste des figures

Figure 1 : Domaines structuraux d'IQGAP1 et ses partenaires	6
Figure 2 : Structure des protéines « IQGAP » au cours de l'évolution	7
Figure 3 : IQGAP1 dans la polarité cellulaire et la migration directionnelle	13
Figure 4 : Rôle d'IQGAP1 dans la régulation des contacts cellule-cellule	15
Figure 5 : La voie canonique Wnt/Wingless	18
Figure 6 : Organisation de la zone sous-ventriculaire (SVZ) adulte et de la voie de migration rostrale (RMS)	32
Figure 7 : Organisation de la couche sous-granulaire (SGL) dans le gyrus denté de l'hippocampe adulte	35
Figure 8 : Transformation séquentielle de la glie radiaire au cours du développement	37
Figure 9 : Marquage spécifique de la glie radiaire dans le cerveau de souris nouveaux-nés (P0)	38
Figure 10 : Mise en évidence d'une oligodendrogenèse physiologique chez l'adulte	40
Figure 11 : Niche de la SVZ adulte	48
Figure 12 : Synthèse des différentes familles de facteurs régulant la neurogenèse adulte	55
Figure 13 : La cancérisation d'une cellule	56
Tableau 1 : Classification simplifiée des tumeurs neuro-épithéliales	58
Tableau 2 : Le grade (« grading ») des tumeurs cérébrales	59
Figure 14A : Mutations génétiques et altérations chromosomiques répertoriées au cours de la progression des astrocytomes	61
Figure 14B: Voies de progression tumorale des oligodendrogiomes	62
Figure 15 : Les cellules souches/progénitrices, cibles de mutations transformantes	65
Figure 16 : Les cellules souches hématopoïétiques sont des vecteurs de leucémies	66
Figure 17 : Implication de cellules souches et/ou progénitrices dans l'émergence de tumeurs cérébrales	69
Figure 18 : La dérégulation du microenvironnement dans les cancers	70

Figure 19 : Modèles expliquant l'échec de thérapies conventionnelles	73
Figure 20 : Modèle putatif permettant d'expliquer l'échec de thérapies anti-angiogéniques	75
Figure 21 : Expression d'<i>iqgap1</i> dans le cerveau au cours du développement	80
Figure 22 : IQGAP1 est ubiquitaire dans le cerveau adulte	81
Figure 23 : IQGAP1 est présente dans les vaisseaux sanguins du parenchyme cérébral adulte	82
Figure 24 : IQGAP1 et la β-caténine co-localisent dans les neurosphères adultes	82
Figure 25 : Accumulation de cellules Ki-67+ dans la SVZ de souris mutantes	83
Figure 26 : IQGAP1 intervient dans la migration des cellules progénitrices neurales	84
Figure 27 : IQGAP1 est impliquée dans les propriétés d'adhérence des cellules progénitrices neurales	85
Figure 28 : IQGAP1 est impliquée dans la différenciation neuronale induite par le VEGF	86
Figure 29 : Le VEGF induit une différenciation neuronale	87
Figure 30 : Histologie et tomographie des tumeurs cérébrales chimio-induites par l'ENU chez le rat	95
Figure 31 : IQGAP1 ou la thérapie de demain	101

INTRODUCTION

I. Présentation des protéines « IQ-GAP »

I.1. La famille « IQ-GAP »

La protéine IQGAP1 est une protéine multi-modulaire appartenant à une famille de protéines « IQ-GAP ». Elle fut découverte par hasard en 1994, dans des tissus extraits d'ostéosarcomes métastatiques humains (Weissbach et al., 1994). Cette nouvelle protéine de 1657 résidus amino-acides présente d'une part de grandes similarités de séquence avec le domaine catalytique de protéines appartenant à la superfamille Ras et possédant une activité d'hydrolyse du GTP, Ras-GAP (Ras-*GTPase activating protein*). D'autre part, IQGAP1 possède un domaine N-terminal riche en un motif particulier « IQ », d'où son nom « IQ-GAP1 ». Deux ans plus tard, une protéine cible des petites Rho-GTPases Cdc42 et Rac1 dans le foie ayant un fort pourcentage de similarités avec la protéine précurseur IQGAP1 fut identifiée. Elle fut nommée IQGAP2 (Brill et al., 1996; McCallum et al., 1996). Un gène *iqgap3* a également été identifié dans le génome humain, il semblerait coder une protéine ayant les mêmes caractéristiques que les deux autres membres de la famille mais dépourvue de certains domaines fonctionnels. A ce jour, aucune étude concernant IQGAP3 n'a été recensée dans la bibliographie. IQGAP1 est la protéine de cette famille la plus étudiée et la mieux caractérisée car, en plus d'être la première découverte, elle semble ubiquitaire.

I.2. Localisations chromosomique, tissulaire et cellulaire des isoformes IQGAP1 et IQGAP2

IQGAP1 et IQGAP2 sont des protéines multi-modulaires de haut poids moléculaire respectivement de 180 KDa et 175 KDa qui présentent une homologie de séquence de 62% (Brill et al., 1996). Chez l'homme, *iqgap1* est localisé sur le chromosome 15 en région 15p-15q1.1 (Weissbach et al., 1994) et le gène *iqgap2* est situé sur le chromosome 5 en région 5q1.1-1.3 (Brill et al., 1996). La protéine IQGAP1 est distribuée dans de nombreux tissus alors que la protéine IQGAP2 est restreinte au foie. Si la localisation subcellulaire de la protéine IQGAP2 semble constante en région péri-nucléaire au niveau des membranes de l'appareil de Golgi dans des cellules d'ovaires d'hamsters chinois (CHO) (Brill et al., 1996), en revanche la localisation d'IQGAP1 varie en fonction du type cellulaire. En effet, dans des fibroblastes et des cellules rénales de singes verts africains (cellules Vero), IQGAP1 se positionne au niveau des lamellipodes et des renflements membranaires (« *membrane ruffles* ») (Bashour et al., 1997; Kuroda et al., 1997). Cependant, dans des cellules CHO, IQGAP1 est détectée au niveau de l'appareil de Golgi où elle co-localise avec l'actine

filamenteuse (F-actine) et Cdc42 (McCallum et al., 1996). Dans les cellules épithéliales, IQGAP1 se situe aux contacts cellule-cellule au niveau des jonctions adhérentes où elle se lie à la β -caténine ainsi que dans les renflements membranaires (Kuroda et al., 1997). Nous verrons plus tard que ces changements de localisation sont intimement liés à la fonction cellulaire d'IQGAP1 et à l'état physiologique des cellules.

I.3. Les domaines structuraux et fonctionnels des protéines IQGAP1 et IQGAP2

Dans ces deux protéines, très homologues, on trouve un grand nombre de domaines structuraux ou motifs qui vont permettre l'interaction avec un grand nombre de protéines impliquées dans diverses fonctions biologiques. Plusieurs motifs, respectivement nommés *Calponin Homology Domain* (CHD), *Internal Repeats* (IR), WW, IQ, *GTPases Activating Protein-Related Domain* (GRD), sont recensés. La plupart des interactions décrites concerne la protéine IQGAP1.

I.3.1 Le domaine « CHD » (*Calponin-Homology-Domain*)

Ce motif est caractéristique de la famille « Calponine » qui regroupe des protéines liant l'actine et la calmoduline (Ayme-Southgate et al., 1989; Winder et al., 1993). Les protéines calponine et la calci-protéine MP-20 en sont deux représentants et présentent de fortes homologies avec un domaine situé en N-terminal d'IQGAP1 et 2 (Weissbach et al., 1994). Ce domaine « CHD » s'étend des résidus 47 à 155 pour IQGAP1 et des résidus 44 à 152 pour IQGAP2 (Brill et al., 1996; Weissbach et al., 1994). Il est également retrouvé dans des protéines capables de ponter les filaments d'actine comme la filamine (Gorlin et al., 1990), l' α -actinine (Meyer and Aebi, 1990) ou la fimbrine (Bretscher, 1981). Ces activités de pontage seraient liées à une capacité d'oligomérisation (Hartwig and Kwiatkowski, 1991; Matsudaira, 1991). Par la suite, de nombreuses études ont démontré que la protéine IQGAP1 est capable de lier directement l'actine filamentuse (F-Actine) (Bashour et al., 1997; Fukata et al., 1997; Mateer et al., 2002) et que cette liaison se fait *via* le domaine minimal « CHD » (Fukata et al., 1997). Des études complémentaires ont mis en évidence que le domaine « CHD » d'IQGAP1 lie également *in vitro* les ions Ca^{2+} qui permettent la fixation de la calmoduline (Ho et al., 1999). Ces multiples interactions sont pour certaines mutuellement exclusives, comme l'association du complexe calmoduline/ Ca^{2+} qui inhibe la liaison d'IQGAP1 à l'actine (Mateer et al., 2002). Ces propriétés mettent en exergue la régulation fonctionnelle possible d'IQGAP1 par le taux de Ca^{2+} et/ou de calmoduline intracellulaire.

I.3.2 Le domaine « IR » (*Internal Repeat*)

Ce motif, comprenant une séquence de 50 à 60 résidus amino-acides se répète six fois dans IQGAP1 et cinq dans la protéine IQGAP2 (Brill et al., 1996; Weissbach et al., 1994). Il n'est pas caractéristique d'une famille particulière de protéines mais permet la formation d'une structure de type « *coiled-coil* » (Hart et al., 1996) sans doute responsable de l'oligomérisation de la protéine (Fukata et al., 1997).

I.3.3 Le motif « WW »

Adjacent au domaine « IR », les protéines IQGAP1 et IQGAP2 contiennent un domaine « WW » de 38 résidus amino-acides que l'on retrouve dans la dystrophine et la protéine YAP (Bork and Sudol, 1994; Chen and Sudol, 1995; Sudol et al., 1995a). Ces domaines présentent toutes les fonctionnalités des domaines « SH3 » classiques (Chan et al., 1996; Sudol et al., 1995b) en recrutant des protéines comportant des régions riches en résidus proline. Cette propriété lui permet d'interagir avec certaines protéines de la signalisation cellulaire, notamment la protéine Erk-2 (*Extracellular signal-regulated kinase 2*) dont elle va moduler l'activité (Roy et al., 2004; Roy et al., 2005).

I.3.4 Le motif « IQ »

Cette séquence de 20 à 25 résidus amino-acides a été initialement identifiée dans la neuromoduline (ou GAP43), en tant que responsable de la liaison à la calmoduline en présence de calcium (Alexander et al., 1988). Des études ultérieures ont démontré que ce motif était présent dans de nombreuses protéines et correspondait à un site de liaison à la calmoduline ou à des protéines possédant des domaines de type « *EF-Hand* » similaires à ceux retrouvés dans la calmoduline (Cheney and Mooseker, 1992; Cheney et al., 1993). Dans la séquence primaire des protéines IQGAP1 et IQGAP2, quatre motifs « IQ » répétés en tandem sont retrouvés. Les deux caractéristiques de ce motif sont d'une part les deux résidus d'isoleucine et de glutamine (Cheney and Mooseker, 1992) placés en région N-terminale de la séquence consensus suivante : « IQXXXRGXX(R) » décryptée quelques années plus tard (Houdusse and Cohen, 1995) et d'autre part le résidu arginine situé en région C-terminale. Le domaine dit « complet », possédant ce résidu arginine, fixe la calmoduline indépendamment de la présence de Ca²⁺ (Houdusse and Cohen, 1995). En revanche, en son absence, le domaine ne pourra se lier à la calmoduline qu'en présence de Ca²⁺, il sera alors qualifié d'« incomplet ». Les protéines IQGAP1 et IQGAP2 possèdent trois motifs « complets » et un motif « incomplet ». Les deux isoformes d'IQGAP sont donc capables de lier directement la

calmoduline (Brill et al., 1996; Hart et al., 1996). Des études complémentaires démontrent, qu'*in vitro*, IQGAP1 lie la calmoduline *via* son domaine « IQ » et que cette interaction est potentialisée par la présence d’ions Ca²⁺ (Ho et al., 1999; Joyal et al., 1997). Le domaine « CHD » peut également lier la calmoduline mais le site préférentiel d’interaction reste le domaine « IQ » car son affinité est 20 fois supérieure à celle du domaine « CHD » (Ho et al., 1999). Plus récemment, notre laboratoire a identifié la protéine IQGAP1 comme l’une des cibles cytoplasmiques majeures de l’un des membres de la grande famille de calci-protéines S100, la S100B. Cette interaction est dépendante des ions Ca²⁺ et Zn²⁺, et se déroule au cours de réarrangements membranaires dans des lignées cellulaires dérivées de gliomes humains (Mbele et al., 2002). La famille des calci-protéines S100 lie les ions Ca²⁺ par l’intermédiaire de domaines « EF-Hand » et, par conséquent, est largement impliquée dans les voies de transduction du signal calcique (Dolmetsch et al., 1997; McConkey and Orrenius, 1996). Enfin, ces dernières années, le laboratoire de David Sacks, a mis en évidence que le motif « IQ » d’IQGAP1 permet de moduler la voie de signalisation des MAPKinasés, en fixant, *in vitro*, les protéines MEK1 et MEK2, deux kinases appartenant à cette voie (Roy et al., 2005). Ces interactions, combinées à celles décrites pour le domaine « WW » comme modulateur de l’activité des kinases Erks (Erk1, Erk2) (Roy et al., 2004) confèrent à IQGAP1 des rôles modulateurs et organisateurs de la voie des MAP Kinases. De ce fait, IQGAP1 est considérée comme une protéine d’échafaudage sous-membranaire.

I.3.5 Le domaine « GRD » (*GAP-Related Domain*)

Ce domaine, situé en partie C-terminale des protéines IQGAP1 et IQGAP2, doit son nom à une très forte homologie de séquence avec le domaine catalytique des protéines GAPs (*GTPase Activating Protein*). Ces protéines possèdent une activité intrinsèque d’hydrolyse du GTP et interviennent dans le cycle d’activation/inactivation de petites GTPases de la famille Rho. La différence est, qu’à ce jour, aucune activité « GAP » n’a été mise en évidence dans les protéines IQGAP1 et 2. Deux différences structurales peuvent expliquer ce phénomène. Les protéines IQGAP1 et IQGAP2 possèdent un résidu thréonine en position 1146 au lieu d’un résidu arginine qui semblerait essentiel à l’activité « GAP » de toutes les protéines RasGAP (Scheffzek et al., 1998). De plus, IQGAP1 présente deux résidus tyrosine en position 1192 et 1193 au lieu de résidus phénylalanine et leucine. La mutation du résidu leucine invariable en isoleucine dans la séquence primaire de la protéine p120GAP abolit son activité catalytique intrinsèque (Brownbridge et al., 1993).

Néanmoins, le domaine « GRD » permet la liaison d'IQGAP1 aux petites Rho GTPases Cdc42 et Rac, interaction qui les stabilise dans une conformation active (liée au GTP) en bloquant leur activité GTPasique intrinsèque (Brill et al., 1996; Hart et al., 1996; Ho et al., 1999; Swart-Mataraza et al., 2002; Zhang et al., 1997). De plus, si la protéine IQGAP2 se lie de façon équivalente aux formes « actives » (liées au GTP) et « inactives » (liées au GDP) (Brill et al., 1996; McCallum et al., 1996), la protéine IQGAP1, elle, interagit préférentiellement avec les formes « actives » de Cdc42 (Erickson et al., 1997; Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997) et de Rac (Kuroda et al., 1996).

Les protéines Cdc42 et Rac sont deux des membres les plus étudiés de la famille Rho et sont impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine en contrôlant respectivement la formation de filopodes et de lamellipodes lorsqu'elles sont liées au GTP. Leur interaction avec la protéine IQGAP1, qui les maintient sous une forme « active », va s'avérer importante d'un point de vue fonctionnel quant à la régulation de la dynamique de l'actine. En outre, de nombreuses études biochimiques ont démontré que ces interactions fonctionnelles entre les protéines IQGAP1 et Cdc42/Rac sont modulées par la présence de calmoduline et d'ions Ca²⁺ (Erickson et al., 1997; Ho et al., 1999; Joyal et al., 1997).

I.3.6 Le domaine « RGCT » (*RasGAP C-Terminal*)

La région C-terminale ne contient pas de motif d'interaction particulier mais permet la fixation de tout un ensemble de protéines impliquées dans diverses réponses biologiques. IQGAP1 est capable d'interagir directement avec la β-caténine (Briggs et al., 2002; Fukata et al., 1999a) et le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine (Kuroda et al., 1998; Li et al., 1999). Ces trois partenaires vont intervenir dans la régulation des jonctions adhérentes aux contacts intercellulaires. La β-caténine est également une des protéines appartenant à la voie de signalisation canonique Wnt, qui, par son association avec d'autres facteurs va jouer le rôle de co-facteur dans la transcription de certains gènes. L'hypothèse est donc qu'IQGAP1 pourrait intervenir dans la régulation de cette fonction transcriptionnelle.

La région C-terminale d'IQGAP1 (résidus amino-acides 1536-1657) est également responsable de l'interaction avec la protéine CLIP-170 (*Cytoplasmic Linker Protein*) (Fukata et al., 2002b), s'accumulant aux extrémités « + » des microtubules en élongation (Diamantopoulos et al., 1999; Perez et al., 1999), qui lui confère un rôle dans leur orientation (Rickard and Kreis, 1991). *In vitro*, IQGAP1 co-sédimente avec des microtubules uniquement en présence de la protéine CLIP-170 et ces deux partenaires co-localisent dans des régions membranaires particulières de fibroblastes « polarisés » (Fukata et al., 2002b). Plus

récemment, des expériences de co-immunoprécipitations ont révélé que le domaine C-terminal de la protéine APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), un stabilisateur des microtubules, est capable de lier les protéines IQGAP1 et CLIP-170 et que ce complexe ternaire se retrouve au niveau de « *leading edge* » de cellules Vero en migration (Watanabe et al., 2004). Ces résultats sont en faveur d'un rôle d'effecteur/régulateur d'IQGAP1 dans des mécanismes de polarité cellulaire et de migration directionnelle.

Dernièrement, dans des cellules endothéliales humaines de cordons ombilicaux (HUVEC), la protéine IQGAP1 a été identifiée comme l'un des partenaires du récepteur au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) de type-2 (ou Flk-1), dans lesquelles elle joue un rôle médiateur de la prolifération et de la migration de ces cellules (Yamaoka-Tojo et al., 2004). La structure globale de la protéine IQGAP1, mentionnant ses domaines d'interaction ainsi que ses différents partenaires, est représentée en figure 1.

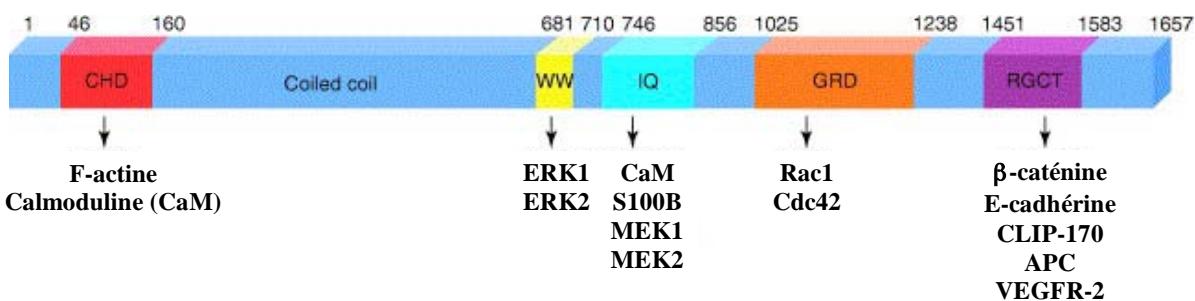


Figure 1 : Domaines structuraux d'IQGAP1 et ses partenaires (d'après (Brown and Sacks, 2006))

La protéine IQGAP1 comprend un grand nombre de motifs structuraux qui lui permettent d'interagir avec de nombreux partenaires impliqués dans diverses fonctions biologiques. Les numéros représentent la séquence primaire d'acides aminés. Les domaines « *Calponin Homology Domain (CHD)* », « *WW* », « *IQ* », « *GAP-Related Domain (GRD)* » et « *RasGAP C-Terminal (RGCT)* » sont représentés. Le domaine « *Coiled Coil* » comprend les motifs répétés internes (« *IR* »).

I.4. Les protéines « IQGAP » au cours de l'évolution

L'ensemble des domaines décrits précédemment est conservé au niveau des protéines IQGAP1 et IQGAP2 de mammifères (homme et rongeurs) (Brill et al., 1996; Weissbach et al., 1994). Cependant, des recherches d'homologies de séquences ont révélé l'existence de protéines « IQGAP » dans différents organismes (figure 2). Bien que certaines espèces soient dépourvues de quelques domaines, la structure de base de la protéine est globalement conservée au cours de l'évolution ce qui suggère qu'IQGAP est une famille de protéines ayant des fonctions cellulaires fondamentales (Briggs and Sacks, 2003). La plupart de ces

orthologues ont été identifiés et caractérisés (Adachi et al., 1997; Eng et al., 1998; Epp and Chant, 1997; Lippincott and Li, 1998; Machesky, 1998; Venturelli et al., 2000).

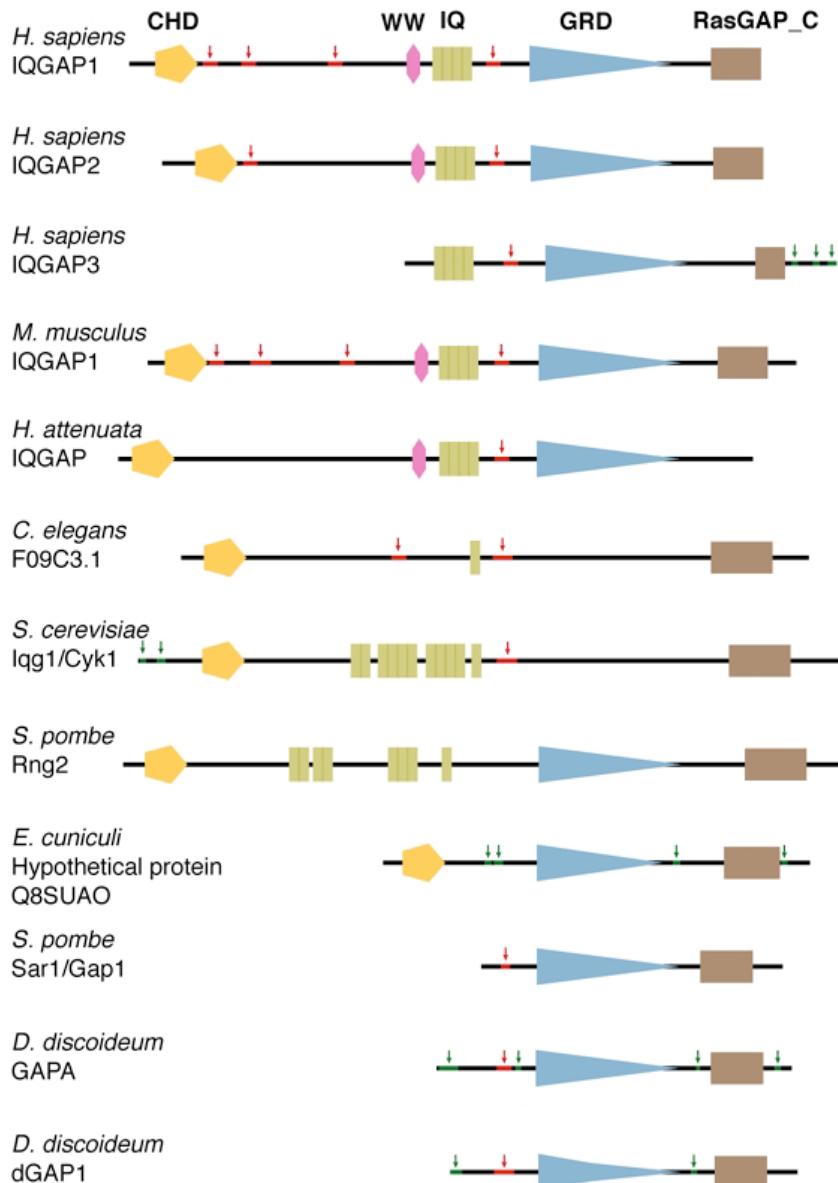


Figure 2 : Structure des protéines « IQGAP » au cours de l'évolution (d'après (Briggs and Sacks, 2003)).
Les domaines structuraux de la protéine IQGAP sont largement conservés de la levure à l'homme.

II. Les fonctions cellulaires d'IQGAP1

Les nombreux domaines d'interactions de la protéine IQGAP1 lui permettent de réguler de nombreuses fonctions cellulaires. Une de ses fonctions principales est son action modulatrice, directe ou par l'intermédiaire de ses partenaires, sur l'architecture globale de la cellule par son action sur le cytosquelette. Par ailleurs, IQGAP1 interagit avec de nombreuses

protéines et récepteurs intervenant dans la signalisation intracellulaire ce qui lui confère un rôle de protéine d'échafaudage sous-membranaire et par conséquent de modulateur de certaines voies de signalisation.

Malgré ces deux principaux rôles dans la biologie de différents types cellulaires, aucune fonction physiologique d'IQGAP1 n'est encore réellement connue chez les mammifères. En effet, la réalisation d'une lignée de souris invalidées pour le gène *iqgap1* démontre que ces animaux sont viables, fertiles et ne présentent aucun phénotype drastique si ce n'est l'apparition d'hyperplasies gastriques et la formation de polypes intestinaux chez certains animaux âgés (Li et al., 2000). L'analyse de ce phénotype indique, d'une part, que la protéine IQGAP1 n'est pas requise au cours de l'embryogenèse, et d'autre part, qu'elle joue certainement un rôle de régulateur dans certains phénomènes biologiques. Néanmoins, il reste la possibilité d'une redondance fonctionnelle avec la protéine IQGAP2, très homologue à IQGAP1, mais aucunes études n'ont encore fait état d'une localisation ectopique d'IQGAP2 autre part qu'en région hépatique.

II.1. La protéine IQGAP1 est un important régulateur de la dynamique du cytosquelette

II.1.1 Une histoire ancestrale entre IQGAP et le cytosquelette

De nombreux travaux ont mis en lumière que la fonction primaire d'IQGAP est son action sur le cytosquelette et que cette propriété est conservée au cours de l'évolution. C'est ainsi que chez la levure, les homologues de la protéine IQGAP présentent un rôle de régulateur de la cytokinèse (Eng et al., 1998; Epp and Chant, 1997; Lippincott and Li, 1998; Machesky, 1998), étape finale de la division cellulaire qui permet une séparation et un partage équitable du cytoplasme entre les deux cellules filles. Ce phénomène nécessite la formation d'un anneau contractile, composé majoritairement d'actine et de myosine entre les deux cellules en formation. Ces travaux ont prouvé que les protéines « IQGAP » chez les levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*) sont des composants du « *spindle pole body* » (équivalent du centrosome), qu'elles jouent un rôle dans le recrutement des filaments d'actine et qu'elles sont requises dans l'assemblage de l'anneau d'actomyosine (Eng et al., 1998; Epp and Chant, 1997; Lippincott and Li, 1998; Machesky, 1998; Osman and Cerione, 1998; Shannon and Li, 1999). Chez *Dictyostelium discoideum*, l'invalidation du gène codant DdGAPA (orthologue d'IQGAP1) mène à une cytokinèse incomplète (Adachi et al., 1997). Ce phénotype s'accompagne de multiples altérations du cytosquelette et se traduit par une augmentation de la motilité cellulaire (Faix et al., 1998; Faix and Dittrich, 1996). De la

même façon, chez l’Hydre (*Hydra attenuata*), l’homologue d’IQGAP, est important pour le développement des tentacules (Venturelli et al., 2000). Des injections d’ARN messagers codant une forme humaine d’IQGAP dans des embryons de Xénopes provoquent des altérations du cytosquelette matérialisées par des lésions ectodermiques (Sokol et al., 2001). Chez les mammifères, IQGAP favorise la polymérisation de l’actine *in vitro* (Bashour et al., 1997; Erickson et al., 1997; Fukata et al., 1997) et co-localise avec l’actine au niveau des lamellipodes (Hart et al., 1996). En plus de son interaction directe avec l’actine, *via* son domaine « CHD », IQGAP peut également agir indirectement sur le cytosquelette par l’intermédiaire des RhoGTPases Rac et Cdc42 qu’elle est capable de lier *via* son domaine « GRD ».

II.1.2 IQGAP1 est un effecteur des Rho GTPases Rac et Cdc42

Le groupe de petites GTPases de type « Rho », dont les protéines Rho, Rac et Cdc42 font partie, est une sous-famille de la super famille des protéines « Ras ». Ces protéines de faible poids moléculaire (20 à 30 KDa) sont conservées de la levure à l’homme et ont la particularité de lier le GTP. Elles oscillent entre deux états interchangeables : un état « inactif » où elles sont liées au GDP et un état « actif » où elles se lient au GTP (Takai et al., 1995). Ces états sont cycliques et régulés par trois classes de protéines : 1- les « GEF » pour « *GDP/GTP Exchange Factor* », 2- les « GDI » pour « *GDP Dissociation Inhibitors* » et 3- les « GAP » pour « *GTPase Activating Protein* » (Cerione and Zheng, 1996; Takai et al., 1995).

Ces GTPases sont des acteurs importants de nombreux processus cellulaires tels que la transcription de gènes, la prolifération cellulaire, le guidage axonal, le trafic membranaire et l’apoptose (Bazenet et al., 1998; Chuang et al., 1997; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Hill et al., 1995; Johnson, 1999; Olson et al., 1995; Qiu et al., 1995a; Qiu et al., 1995b). Cependant, elles sont plus communément étudiées pour leur implication dans la régulation du cytosquelette. En effet, les protéines Rac et Cdc42 contrôlent respectivement la formation de filopodes et lamellipodes lorsqu’elles sont liées au GTP (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995a; Nobes and Hall, 1995b). Leur cycle d’activation/inactivation ainsi que les propriétés dynamiques intrinsèques du cytosquelette d’actine permettra aux protéines Rac et Cdc42 de participer et de moduler de nombreuses fonctions biologiques, comme l’adhérence cellule-cellule (Braga et al., 1997; Kodama et al., 1999; Kuroda et al., 1997; Takaishi et al., 1997), la polarité (Kroschewski et al., 1999; Stowers et al., 1995) et la migration cellulaire (Ridley, 1995) qui mettent en œuvre des remaniements du cytosquelette.

IQGAP1 interagit avec les protéines Rac et Cdc42 *via* son domaine « GRD » et les stabilise dans leurs formes actives en inhibant leur activité GTPasique intrinsèque (Brill et al., 1996; Hart et al., 1996; Ho et al., 1999; Swart-Mataraza et al., 2002; Zhang et al., 1997). De plus, IQGAP1 interagit préférentiellement avec les formes actives de Rac et Cdc42 (Erickson et al., 1997; Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997; Kuroda et al., 1996), les maintient sous cette forme et favorise ainsi la migration et l'invasion cellulaire (Mataraza et al., 2003). En outre, IQGAP1 favorise la polymérisation et le pontage de l'actine *in vitro* (Bashour et al., 1997; Erickson et al., 1997) et ces effets sont potentialisés par l'augmentation du taux de Cdc42-GTP (Fukata et al., 1997). Malgré le fait que la communication entre IQGAP1 et les Rho GTPases Rac et Cdc42 semble bi-directionnelle, il apparaît qu'IQGAP1, fonctionnellement, joue le rôle d'effecteur des protéines Rac et Cdc42 sur le cytosquelette. En effet, la migration cellulaire induite par une forme constitutivement active de la protéine Cdc42 est abolit lorsque la quantité d'IQGAP1 est réduite par ARN interférence (Mataraza et al., 2003; Swart-Mataraza et al., 2002). De plus, IQGAP1 co-localise avec l'actine au niveau des lamellipodes (Hart et al., 1996) de cellules en migration et sert de « plate forme » d'interaction multi-protéique dans les phénomènes de polarisation et de migration cellulaire.

II.1.3 IQGAP1 et le réseau microtubulaire

Les microtubules sont un des constituants majeurs du cytosquelette. Ces structures fibreuses présentes dans le cytoplasme de cellules eucaryotes sont essentielles dans la division, la polarité et la migration ainsi que dans le transport vésiculaire (Gundersen, 2002). En se liant à la protéine CLIP-170, associée aux extrémités « + » des microtubules, IQGAP1 recrute les microtubules en croissance au niveau des « *leading edges* » de fibroblastes en migration (Fukata et al., 2002b). Des expériences plus récentes ont montré que la protéine APC est également capable d'interagir directement avec IQGAP1 et qu'elles forment un complexe ternaire avec la protéine CLIP-170 au niveau de « *leading edges* » de cellules Vero en migration (Watanabe et al., 2004). Ces deux études complémentaires montrent que l'activation des protéines Rac et Cdc42 potentialise ces interactions, en particulier celle entre IQGAP1 et la protéine CLIP-170, et provoque le recrutement de la protéine CLIP-170 au niveau des « *leading edges* » et des filopodes (Fukata et al., 2002b). Suite à l'activation des Rho GTPases par des signaux extracellulaires induisant la dispersion et/ou la migration cellulaire, IQGAP1 recrute la protéine CLIP-170, les microtubules et la protéine APC qui stabilise l'ensemble, au niveau des « *leading edges* » (Watanabe et al., 2004). Par conséquent, la protéine IQGAP1 apparaît comme un régulateur du cytosquelette par l'intermédiaire de ses

partenaires protéiques (Rac1/Cdc42, CLIP-170, APC) et joue un rôle central de liaison entre le cytosquelette d'actine et les microtubules. Ces propriétés confèrent à IQGAP1 des fonctions cellulaires plus intégrées qui nécessitent une réorganisation et/ou une coordination du cytosquelette, notamment dans la polarité et la migration cellulaire, la régulation des contacts cellule-cellule et la croissance neuritique.

II.2. Le rôle d'IQGAP1 dans la polarité et la migration cellulaire

La polarité cellulaire et la migration directionnelle sont deux phénomènes cellulaires successifs qui nécessitent une distribution asymétrique du cytosquelette et de molécules d'adhérence cellulaire et de signalisation. Par exemple, des fibroblastes en migration développent une morphologie polarisée, matérialisée par la mise en place de renflements membranaires, filopodes et lamellipodes, et par le recrutement d'extrémités « + » de microtubules en croissance au niveau du « *leading edge* » des cellules. Il s'en suit une réorganisation du centre organisateur des microtubules et de l'appareil de Golgi dans le sens de la migration. Pour chaque processus, la dynamique des réseaux actiniques et microtubulaires doit être régulée et coordonnée (Goode et al., 2000). Cependant, à ce jour, les mécanismes moléculaires et leur chronologie ne sont pas clairement établis. Les petites GTPases de la famille Rho jouent un rôle important dans la polarisation et la migration de nombreux types cellulaires, allant des fibroblastes (Nobes and Hall, 1999) aux cellules nerveuses comme les astrocytes (Etienne-Manneville, 2003; Etienne-Manneville and Hall, 2001; Etienne-Manneville and Hall, 2003) ou les neurones (Kholmanskikh et al., 2006; Luo, 2000; Schwamborn and Puschel, 2004). L'identification et la caractérisation d'effecteurs des protéines Rac et Cdc42, notamment IQGAP1 (Kuroda et al., 1996), ont permis de clarifier certains mécanismes moléculaires qui contrôlent la dynamique du cytosquelette. Ces Rho-GTPases agissent également sur l'organisation et la dynamique des microtubules (Fukata et al., 2003; Gundersen et al., 2004). La polarité cellulaire requiert le recrutement des extrémités « + » des microtubules en croissance au niveau de régions membranaires corticales particulières. Les observations de protéines fusionnées à la GFP ont révélé que les protéines se liant aux extrémités « + » des microtubules (+Tips : *plus-end-tracking proteins*) (Schuyler and Pellman, 2001), incluant les protéines CLIP-170 (Perez et al., 1999) et EB1 (Mimori-Kiyosue et al., 2000b), sont nécessaires pour lier les microtubules à des sites corticaux bien déterminés (Gundersen, 2002). Il s'avère qu'IQGAP1 est la protéine qui fait le lien entre les filaments d'actine et les microtubules. En effet, il se forme un complexe multi-protéique au niveau du « *leading edge* » de cellules en migration incluant les Rho GTPases Rac et Cdc42

actives, IQGAP1, et les protéines liées aux microtubules, la CLIP-170, EB1 et la protéine APC (Fukata et al., 2002b; Noritake et al., 2005; Watanabe et al., 2004), voir figure 3). Cette dernière, surtout connue comme un important suppresseur de tumeur dans les cancers du colon humain, se retrouve accumulée dans certaines régions corticales de cellules en croissance (Nathke, 2004) ainsi qu'aux extrémités « + » des microtubules où elle stabilise l'ensemble au pôle de la cellule en migration (Barth et al., 2002; Mimori-Kiyosue et al., 2000a). Tous ces mécanismes se déroulent selon une certaine chronologie pour promouvoir une polarisation et une migration optimales. L'expression d'une forme d'IQGAP1, amputée de son domaine d'interaction avec les protéines Rac1/Cdc42, induit la perte de ce mécanisme de polarisation cellulaire et conduit à la formation de plusieurs « *leading edges* » (Fukata et al., 2002b). Des expériences d'ARN interférence ciblant la protéine IQGAP1, ainsi que des transfections de dominants négatifs de cette protéine, affichent une nette diminution de la quantité de CLIP-170 aux « *leading edges* » de cellules en migration et une réduction drastique de la motilité (Mataraza et al., 2003; Watanabe et al., 2004). Les diminutions respectives de la quantité d'IQGAP1 et d'APC par ARN interférence inhibent la formation d'un réseau d'actine et le recrutement de microtubules au « *leading edge* » de la cellule ce qui a pour conséquence l'absence de polarisation et de migration cellulaire (Watanabe et al., 2004).

Dans les cellules HUVEC, une interaction entre IQGAP1 et le récepteur de type 2 au VEGF a été décelée (Yamaoka-Tojo et al., 2004). Par l'intermédiaire de ce récepteur, le VEGF stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Cross et al., 2003). Après stimulation par le VEGF, le complexe IQGAP1/VEGFR-2 recrute la protéine Rac1 aux « *leading edge* » des cellules endothéliales en migration. Des expériences de blessure couplées à l'invalidation de la protéine IQGAP1 par ARN interférence, révèlent une altération de la migration des cellules endothéliales (Yamaoka-Tojo et al., 2004).

L'ensemble de ces résultats met en exergue le rôle primordial des protéines Rac1/Cdc42, activées par des signaux extracellulaires, dans le recrutement d'IQGAP1 au « *leading edge* » d'une cellule en migration qui joue, en aval, le rôle de chef d'orchestre dans la coordination de la dynamique du cytosquelette afin de promouvoir la polarité et la migration cellulaire qui en résulte (voir figure 3).

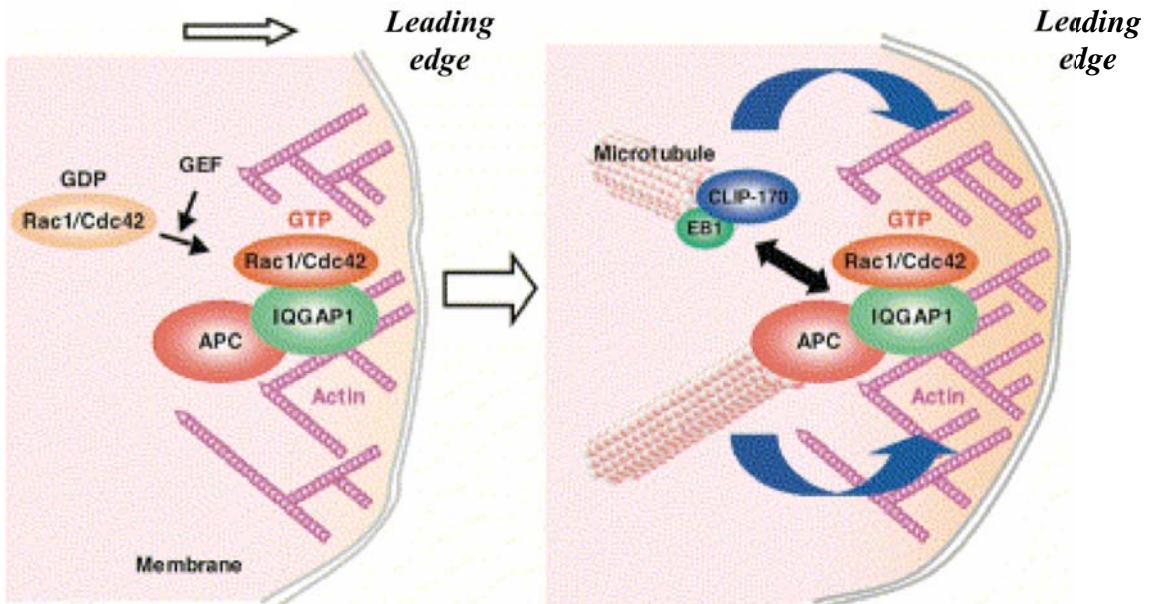


Figure 3 : IQGAP1 dans la polarité cellulaire et la migration directionnelle (d'après (Watanabe et al., 2004)).

Les formes actives des protéines Rac et Cdc42 se positionnent au « *leading edge* » des cellules qui se préparent à migrer, recrutent la protéine IQGAP1, qui sert de plate-forme pour l'organisation du réseau d'actine et permet le recrutement des protéines APC, EB-1 et CLIP-170, chargées d'amener les microtubules au niveau de ces protusions membranaires. Ainsi, IQGAP1 est la protéine clé permettant la régulation coordonnée des réseaux d'actine et de microtubules dans la polarisation et la migration cellulaire.

II.3. IQGAP1 dans la régulation des contacts intercellulaires

Il existe deux types d'adhérence cellulaire, les adhésions cellule-substrat mettant en jeu des molécules telles que les intégrines et les adhésions cellule-cellule qui sont sous le contrôle de protéines comme les cadhérines. Cette classe de protéines comprend plus de 80 membres répertoriés chez l'homme et se localisent au niveau des jonctions adhérentes de différents types cellulaires (Tepass et al., 2000; Yagi and Takeichi, 2000). Elles présentent un seul domaine transmembranaire et développent une activité adhérente, dépendante d'ions Ca^{2+} (Adams and Nelson, 1998; Gumbiner, 1996), par l'intermédiaire de leur partie extracellulaire en interagissant de façon homotypique avec les autres domaines extracellulaires des cellules voisines. Ces molécules sont capables de recruter, grâce à leur partie cytoplasmique, un certain nombre de protéines qui seront impliquées dans la régulation de la jonction et des contacts cellule-cellule. Certains membres de ces complexes multi-protéiques sont bien connus pour interagir avec les cadhérines comme le β -caténine et la plakoglobin (ou γ -caténine) (Ozawa et al., 1989; Tsukita et al., 1992) lesquelles s'associent à l' α -caténine. Cette dernière est réputée pour être un lien direct ou indirect avec le réseau d'actine, essentiel à une adhérence rigide et stable (Tsukita et al., 1992). La protéine IQGAP1 interagit avec la β -caténine et la E-cadhérite via son domaine C-terminal (Briggs et al., 2002; Fukata et al.,

1999a; Kuroda et al., 1998; Li et al., 1999) au niveau des contacts cellule-cellule (Kuroda et al., 1998; Li et al., 1999; Noritake et al., 2004). IQGAP1 se lie à la partie N-terminale de la β -caténine (résidus 1-183) (Fukata et al., 1999a) qui recouvre le domaine de liaison de l' α -caténine (Aberle et al., 1994) ce qui rend leur interaction mutuellement exclusive. De ce fait, la surexpression d'IQGAP1 induit la dissociation de l' α -caténine du complexe β -caténine-E-cadhéchine (Fukata et al., 1999a) qui se traduit dans la cellule par une fragilisation de l'activité adhérente des cadhérines (Kuroda et al., 1998).

En outre, il existe un autre niveau de régulation contrôlé par les Rho GTPases. Dans les cellules épithéliales, les protéines Rac et Cdc42 sont requises dans l'adhérence cellule-cellule (Fukata et al., 1999b; Fukata et al., 2002a; Kodama et al., 1999; Kuroda et al., 1997; Kuroda et al., 1999). Ces protéines sont capables de s'accumuler aux jonctions intercellulaires (Hart et al., 1996; Kuroda et al., 1998; Kuroda et al., 1999) où, sous leur forme « active » (liée au GTP), elles mobilisent la protéine IQGAP1 (Fukata et al., 1999b; Fukata et al., 2002a). De ce fait, IQGAP1 ne se fixe pas à la β -caténine et rend possible la fixation de l' α -caténine et de l'actine (figure 4). En conséquence, les protéines Cdc42 et Rac1 semblent être des régulateurs positifs de l'adhérence intercellulaire alors qu'IQGAP1 semble avoir une action antagoniste. Cependant, IQGAP1 inhibe l'activité intrinsèque GTPasique de ces petites RhoGTPases (Hart et al., 1996) et maintient, de ce fait, la jonction sous une forme stable et rigide (Noritake et al., 2004). La micro-injection d'une forme dominante négative de Rac (Rac^{N17}) dans des kératinocytes inhibe l'accumulation de cadhérines aux contacts cellule-cellule même en présence d'ions Ca^{2+} (Braga et al., 1997). De la même façon, la surexpression de cette forme Rac^{N17} dans des cellules épithéliales MDCK provoque la diminution des protéines E-cadhéchine et β -caténine ainsi que des filaments d'actine aux contacts cellule-cellule ; en revanche, l'introduction d'une forme constitutivement active de la protéine Rac (Rac^{V12}) induit le phénomène inverse (Takaishi et al., 1997). La transfection de formes dominantes négatives dans des cellules EL (Rac^{N17} et $Cdc42^{N17}$) induit une adhérence plus lâche (Fukata and Kaibuchi, 2001; Fukata et al., 1999a). Des expériences plus récentes de la même équipe, utilisant des facteurs de dispersion sur des cellules épithéliales (HGF : *Hepatocyte Growth Factor* ou TPA : 12-O- tetradecanoylphorbol-13-acétate), montrent une délocalisation de l' α -caténine des contacts, une diminution de l'association entre IQGAP1 et Rac et une augmentation concomittante du complexe IQGAP1/ β -caténine avant la dispersion induite des cellules. En revanche, des formes constitutivement « actives » de Rac et Cdc42 (Rac^{V12} et $Cdc42^{V12}$) mobilisent la protéine IQGAP1, la délocalisent des contacts et évitent la perte de l' α -caténine (Fukata and Kaibuchi, 2001). Par la suite, des expériences d'ARN interférence,

inhibant respectivement IQGAP1 ou Rac, révèlent une désorganisation globale des contacts intercellulaires, se traduisant par une diminution de leurs partenaires directs ou indirects, l'E-cadhéchine, la β -caténine et les filaments d'actine ainsi qu'une capacité de ces cellules à s'étaler plus rapidement (Noritake et al., 2004). Dans cette même étude, la transfection d'une forme mutante d'IQGAP1, ne pouvant se lier aux protéines Rac/Cdc42, provoque les mêmes effets que la diminution d'expression de Rac par ARN interférence. Ces résultats sont en faveur d'une régulation concertée des protéines IQGAP1 et des RhoGTPases sur la dynamique des adhérances cellule-cellule par une action coordonnée sur le cytosquelette. Dans les HUVEC, une étude a révélé une co-localisation et la formation d'un complexe entre IQGAP1 et la VE-cadhérine (*Vascular Endothelial-cadhérine*) aux contacts intercellulaires (Yamaoka-Tojo et al., 2006). Le VEGF qui agit sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales, provoque la délocalisation des protéines IQGAP1 et VE-cadhérine de ces contacts (Yamaoka-Tojo et al., 2006). Par une approche de siRNA ciblant la protéine IQGAP1, les auteurs démontrent qu'elle est importante dans l'établissement des jonctions intercellulaires à base de VE-cadhérine. Ces résultats semblent contradictoires par rapport au rôle proposé pour IQGAP1 dans les cellules épithéliales mais il est envisageable que sa fonction diverge en fonction des types cellulaires considérés car les complexes protéiques utilisés sont différents.

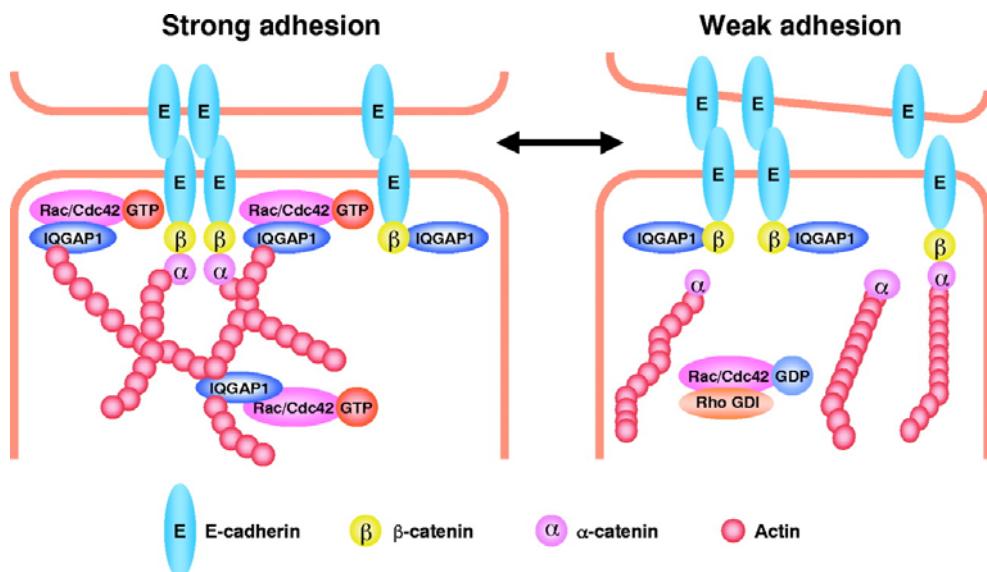


Figure 4 : Rôle d'IQGAP1 dans la régulation des contacts cellule-cellule (d'après (Noritake et al., 2005))
 Au niveau des jonctions adhérentes, responsables des contacts cellule-cellule, un équilibre dynamique a été proposé au centre duquel la protéine IQGAP1 va jouer un rôle régulateur primordial. Lorsque la quantité de Rac/Cdc42 activées est suffisante, la protéine IQGAP1 vient se fixer et organiser le réseau d'actine de manière à générer une adhérence rigide et stable. Quand la quantité de Rac/Cdc42-GTP n'est plus suffisante, IQGAP1 est relarguée et va se fixer sur la β -caténine qui perd sa liaison avec l' α -caténine et l'actine. Il en résulte une adhérence cellule-cellule plus lâche.

II.4. Rôle d'IQGAP1 dans la motilité neuronale et la croissance neuritique

Des travaux récents sont venus compléter la palette de fonctions attribuée à la protéine IQGAP1 dans les cellules nerveuses. En effet, le laboratoire de David Sacks a tout d'abord identifié les sites de phosphorylation de la protéine IQGAP1 par la protéine kinase C dans des cellules épithéliales pulmonaires (MCF7). Dans un second temps, ils ont mis en évidence qu'IQGAP1 est présente dans les projections neuritiques de neurones de l'hippocampe en différenciation et que cette croissance neuritique, dans une lignée cellulaire dérivée de neuroblastomes (N1E-115), dépend de la phosphorylation d'IQGAP1 (Li et al., 2005). La modification post-traductionnelle d'IQGAP1 peut donc avoir des effets notoires sur la régulation du cytosquelette. Plus récemment, des travaux ont identifié, le récepteur à activité Tyrosine Phosphatase PTP μ comme un nouveau partenaire d'IQGAP1. Cette interaction est potentialisée par la transfection d'une forme constitutivement active de Cdc42 et participe à la croissance neuritique en aval de ce récepteur (Phillips-Mason et al., 2006). Par ailleurs, dans des neurones en migration IQGAP1 augmente le taux de Cdc42 active et l'association d'autres protéines liées à l'actine et aux microtubules comme les protéines Lis1 et CLIP170 et que ces phénomènes s'accompagnent d'une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire (Kholmanskikh et al., 2006). Lis1 (*Lissencephaly 1*) est une protéine associée aux microtubules qui régule la fonction de dynéines et la migration neuronale (Wynshaw-Boris and Gambello, 2001). La quantité de Lis1 influence la distribution de la protéine IQGAP1 et CLIP-170. En effet, dans les neurones du cervelet et de l'hippocampe issus d'animaux hétérozygotes (Lis1 +/-) une délocalisation des deux protéines des neurites est observée. Ainsi IQGAP1 interagit avec les protéines Cdc42, Lis1 et CLIP-170 et participe à la motilité neuronale (Kholmanskikh et al., 2006). Des expériences d'ARN interférence ciblant les protéines IQGAP1 ou CLIP-170 entraînent la délocalisation des autres protéines du complexe et provoquent un ralentissement de la motilité.

Ces résultats suggèrent que les cellules mettent en place, au cours de la croissance axonale et de la migration cellulaire, au niveau des cônes de croissance et des « *leading edges* », des mécanismes moléculaires communs de régulation du cytosquelette impliquant la protéine IQGAP1.

II.5. IQGAP1 : un acteur central des voies de signalisation intracellulaire

En plus de ses fonctions régulatrices de la dynamique du cytosquelette, IQGAP1 est capable d'interagir avec un grand nombre de molécules de signalisation et de récepteurs. De ce fait, IQGAP1 est considérée comme une protéine d'échafaudage sous-membranaire dans le

sens où elle organise et régule certaines voies de signalisation et les fonctions biologiques qui en découlent.

II.5.1 IQGAP1 et les voies de signalisation

II.5.1.1 IQGAP1 et la voie Wnt/wingless

La β -caténine joue un rôle dans l'adhérence cellule-cellule au niveau des jonctions adhérentes, mais est un médiateur important de la voie de signalisation Wnt/wingless. Cette voie de signalisation joue un rôle clé au cours du développement normal (Loureiro and Peifer, 1998; Willert and Nusse, 1998) et de la progression tumorale (Peifer and Polakis, 2000; Polakis, 2000).

En conditions normales, la β -caténine se retrouve majoritairement aux jonctions adhérentes alors que les quantités de β -caténine cytoplasmique et nucléaire sont maintenues à de très faibles niveaux. En effet, lorsque la voie Wnt est inactive, la β -caténine fait partie intégrante d'un complexe multi-protéique composé de l'axine, de la *glycogene synthase kinase 3 β* (GSK-3 β) et de la protéine APC. Au sein de ce complexe, l'interaction entre l'axine et la GSK-3 β favorise la phosphorylation de la β -caténine, qui induit l'ubiquitination de la protéine et sa dégradation par la voie du protéasome (Aberle et al., 1997; Bullions and Levine, 1998). La stimulation de cette voie passe par la fixation du ligand Wnt sur son récepteur Frizzled qui conduit, en aval, à la phosphorylation de la protéine Dishevelled (Dsh). Cette dernière, par son association avec l'axine, empêche la GSK-3 β de phosphoryler la β -caténine. De ce fait, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis est transloquée dans le noyau (Hsu et al., 1998; Young et al., 1998) où elle s'associe à des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF pour activer la transcription de nombreux gènes (Behrens et al., 1996; Huelsken and Behrens, 2002). Dans des conditions pathologiques, des mutations dans les gènes codant la β -caténine et la protéine APC promeuvent l'accumulation nucléaire de la β -caténine qui joue le rôle d'une protéine oncogénique en favorisant l'expression d'oncogènes et de régulateurs du cycle cellulaire, tels que *c-myc* (He et al., 1998) et la *cycline D1* (Tetsu and McCormick, 1999) qui activent la prolifération cellulaire (figure 5). Dans des cellules de carcinomes du colon (SW480), des mutations dans le gène *apc* favorisent une translocation nucléaire constitutive de la β -caténine. La surexpression d'IQGAP1 dans ces cellules potentialise l'activité transcriptionnelle de la β -caténine mais cet effet est aboli en présence de calmoduline (Briggs et al., 2002). En effet, la calmoduline possède une meilleure affinité pour IQGAP1 ce qui entraîne la dissociation d'IQGAP1 et de la β -caténine et la perte de

l'activation transcriptionnelle d'IQGAP1. La β -caténine et la calmoduline sont surexprimés dans plusieurs types de tumeurs malignes (Polakis, 1999; Polakis et al., 1999) et stimulent la prolifération cellulaire. *Iqgap1* est également surexprimé dans des carcinomes colo-rectaux humains mais la protéine est ségrégée au niveau du « leading edge » des cellules invasives (Nabeshima et al., 2002) où elle promeut l'invasion cellulaire. Ainsi, la calmoduline, la β -caténine et IQGAP1 forment un complexe permissif pour la carcinogenèse dans lequel IQGAP1 régule positivement l'activité transcriptionnelle oncogénique de la β -caténine et favorise l'invasion cellulaire.

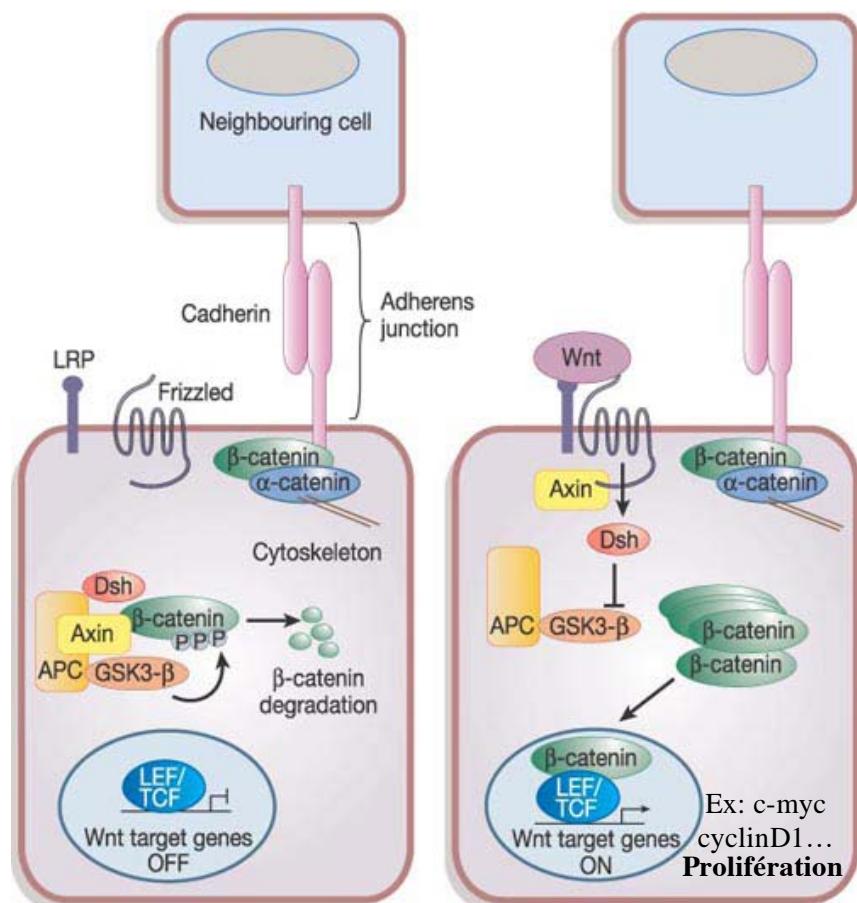


Figure 5 : La voie canonique Wnt/Wingless

En l'absence du ligand, un complexe multi-protéique se forme entre les protéines APC, Dishevelled (Dsh), l'axine et la glycogène synthase 3- β (GSK3- β). Cette dernière phosphoryle la β -caténine qui sera ubiquitinée puis dégradée par le système du protéasome.

En présence du ligand, le récepteur Frizzled est activé, recrute l'axine et entraîne la phosphorylation de Dsh en aval. Cette modification post-traductionnelle inhibe son interaction avec la GSK 3- β qui ne peut plus phosphoryler la β -caténine. La β -caténine est transloquée dans le noyau où elle s'associe avec des facteurs de transcription de la famille LEF/TCF pour activer la transcription de gènes cibles comme *c-myc* et *cyclin-D1* et induire la prolifération cellulaire.

II.5.1.2 IQGAP1 et la voie des MAP (*Mitogen Activated Protein*) Kinases

La voie MAP Kinase (MAPK) est une série d'activations en chaîne qui met en jeu des cascades de phosphorylation. Les MAP Kinases Kinases Kinases (MAPKKK ou MEKK) phosphorylent en aval les MAP Kinases Kinases (MAPKK ou MEK) qui à leur tour phosphorylent les MAP Kinases (MAPK ou Erk) (Schaeffer and Weber, 1999). Ces MAP Kinases induisent la phosphorylation de protéines cibles notamment des facteurs de transcription, des protéines adaptatrices ou bien d'autres protéines kinases qui agiront notamment sur la prolifération, la différenciation cellulaire, la survie et l'apoptose (Kolch, 2000). Des travaux récents ont mis en évidence qu'IQGAP1 est capable d'interagir avec différentes protéines appartenant à cette voie des MAPK comme les protéines MEK1, MEK2 et plus en aval avec la protéine Erk2. Dans des cellules épithéliales pulmonaires humaines (MCF7), des variations d'expression d'*Iqgap1*, induites par des stratégies de surexpression et d'invalidation par ARN interférence, influencent les phosphorylations et l'activité respective des protéines MEK et Erk en réponse à des facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et l'IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor*) (Roy et al., 2004; Roy et al., 2005). La surexpression d'une forme mutante d'IQGAP1, amputée de son domaine d'interaction à Erk2, n'altère plus l'activation des protéines Erks, après stimulation par l'EGF (Roy et al., 2004). Un siRNA dirigé contre IQGAP1, inhibe l'activation des protéines MEKs et Erks en réponse à l'EGF (Roy et al., 2005). Ces résultats suggèrent qu'IQGAP1 fonctionne comme une protéine d'échafaudage membranaire dans la voie des MAPK en modulant l'activité de ses diverses composantes.

Par ailleurs, le NGF (*Nerve Growth Factor*) est également capable d'activer en aval la voie des MAPK (Downward, 2001) afin de promouvoir la survie neuronale et la croissance neuritique (Davies, 2000). IQGAP1, sous sa forme phosphorylée, est impliquée dans la croissance neuritique de cellules issues de neuroblastomes (N1E-115) (Li et al., 2005). Ces données permettent d'évoquer l'implication potentielle d'IQGAP1 dans la voie des MAPK afin de promouvoir la croissance neuritique.

II.5.2 IQGAP1 et les récepteurs

Plusieurs travaux ont également mis en évidence que la protéine IQGAP1 pouvait participer à la signalisation cellulaire et réguler diverses réponses biologiques en interagissant avec de nombreux récepteurs.

II.5.2.1 Le récepteur à l'EGF (EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*)

L'EGFR est un récepteur à activité tyrosine kinase (Downward, 2001) qui joue un rôle dans la croissance et la prolifération cellulaire. Son mode d'activation, après fixation de son ligand, se traduit par une dimérisation du récepteur et une activation de son activité kinase intrinsèque. Ce mécanisme permet le recrutement et la phosphorylation de nombreuses protéines cibles. Une analyse protéomique par spectrométrie de masse dans des cellules Hela, a permis d'identifier IQGAP1 comme une des protéines cibles du récepteur à l'EGF activé (Blagoev et al., 2003). Une des voies de signalisation activées en aval de ce récepteur est la voie des Ras/MAPK (Downward, 2001), qui, par une cascade de phosphorylations successives, conduit à la croissance et à la prolifération cellulaire. IQGAP1 joue un rôle modulateur de cette voie des MAPK en interagissant avec les protéines MEK1, MEK2, Erk1 et Erk2 (Roy et al., 2004; Roy et al., 2005). Cette interaction module l'activation des MEKs et Erks, en réponse à l'EGF, dans des cellules MCF-7 et influe sur la prolifération de ces cellules. L'EGF (Chan et al., 1998), les protéines Erks (Reszka et al., 1997) et les Rho GTPases (Sahai and Marshall, 2002) sont des molécules capables d'agir sur le cytosquelette. Des dialogues entre la signalisation EGF et les Rho GTPases sont connus puisque une stimulation par l'EGF est capable d'activer en aval les Rho GTPases et qu'en retour ces dernières peuvent activer les protéines Erk 1 et Erk 2 (Sahai and Marshall, 2002). En outre, l'EGF stimule l'association entre IQGAP1 et Cdc42 (Erickson et al., 1997). Ainsi, IQGAP1 constitue un médiateur éventuel entre la signalisation EGF et la dynamique du cytosquelette d'actine pour promouvoir la migration cellulaire.

II.5.2.2 Le récepteur au VEGF de type-2

Dans des HUVECs, IQGAP1 interagit directement avec un des récepteurs au VEGF, le VEGFR-2, un récepteur à activité tyrosine kinase. Le VEGF, par l'intermédiaire de ce récepteur, stimule *in fine* la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Cross et al., 2003). Dans ces cellules, la stimulation par le VEGF se traduit successivement par le recrutement de Rac1 au niveau du complexe IQGAP1/VEGFR-2, par la phosphorylation d'IQGAP1, la production d'espèces réactives à l'oxygène (*ros* : *reactive oxygen species*), la phosphorylation de la protéine Akt et aboutit à la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Des siRNA ciblant IQGAP1 inhibent la production de *ros* et la phosphorylation d'Akt qui se traduisent par une altération de la migration et de la prolifération des HUVEC (Yamaoka-Tojo et al., 2004). Dans cette même étude, une ligature de l'artère carotide entraîne la surexpression d'IQGAP1 et du VEGFR-2 suggérant une activité régénérative d'IQGAP1

dans les cellules endothéliales. Par conséquent, IQGAP1 est impliquée dans la voie de signalisation du VEGF pour contrôler les processus de prolifération et migration des cellules endothéliales ainsi que pour maintenir l'intégrité fonctionnelle des vaisseaux sanguins.

II.5.2.3 Le CD44

Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire qui sert de récepteur au hyaluronan (HA), un composant de matrices extracellulaires (Marhaba and Zoller, 2004). Ce récepteur est capable de se lier à des molécules de signalisation et/ou du cytosquelette. Ces différents partenaires lui permettent de réguler des réarrangements du cytosquelette d'actine au cours de la migration et de la prolifération mais aussi de participer à la progression tumorale. Dans des lignées tumorales humaines d'ovaires IQGAP1 co-immunoprécipite avec le CD44. La stimulation par le HA de ces cellules permet la formation de deux complexes. Le premier se compose du CD44, d'IQGAP1, de la protéine Cdc42 et de l'actine, utile à la migration de ces cellules. Le deuxième comprend les protéines IQGAP1 et Erk2 propice à la stimulation des activités transcriptionnelles des protéines Elk-1 et du récepteur- α aux oestrogènes (Bourguignon et al., 2005). En conclusion, cette étude suppose la participation d'IQGAP1 dans la migration cellulaire et l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcription en aval du CD44.

II.5.2.4 Le récepteur muscarinique à l'acétylcholine M3

Ce récepteur appartient à la famille de récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). Cette famille de récepteurs gouverne, en aval, un grand nombre de voies de signalisation et de réponses biologiques. Après fixation de son ligand, ce récepteur, induit l'activation des kinases c-Jun et Erk (Wylie et al., 1999) et l'adhérence cellule-cellule (Shafer et al., 1999), deux réponses biologiques dans lesquelles IQGAP1 joue le rôle de régulateur. La transfection de formes activées de ce récepteur dans des cellules CHO active la protéine Rac1, engendre son association avec IQGAP1 et leur translocation conjointe aux jonctions cellule-cellule (Ruiz-Velasco et al., 2002). Ces résultats permettent d'établir un lien entre ce récepteur à l'acétylcholine et des remaniements du cytosquelette dans lesquels IQGAP1 pourrait jouer un rôle régulateur notamment au niveau des jonctions adhérentes intercellulaires.

II.5.2.5 IQGAP1 et les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate)

Les récepteurs ionotropiques AMPA sont activés par le glutamate, un neurotransmetteur excitateur clé et le plus répandu dans le cerveau. Ces récepteurs se composent de quatre sous-unités (Glu-R1 à Glu-R4) (Hollmann and Heinemann, 1994). Récemment, par un criblage double-hybride, IQGAP1 a été identifiée comme un nouveau partenaire de la sous-unité 4 (Glu-R4) du récepteur AMPA (Nuriya et al., 2005). Dans cette même étude, une co-localisation de Glu-R4, IQGAP1 et de l' α -actinine est observée dans des neurones de l'hippocampe mais aucune fonction n'est attribuée à ce complexe. Néanmoins, l'interaction de la protéine IQGAP1 avec un récepteur AMPA lui confère un rôle putatif dans le développement de contacts synaptiques dans le cerveau. Dans des neurones de l'hippocampe, un traitement à la latrunculine A, une substance capable de dépolymériser l'actine, conduit à la délocalisation de Glu-R1 et de l' α -actinine dans des régions sans activité synaptique (Allison et al., 1998). Le cytosquelette d'actine apparaît primordial pour une bonne localisation des récepteurs AMPA. IQGAP1, en tant que régulateur de la dynamique du réseau d'actine, pourrait donc contrôler la mise en place de récepteurs AMPA à la surface des projections axonales et dendritiques et ainsi intervenir dans la plasticité synaptique.

III. Régulations fonctionnelles d'IQGAP1

IQGAP1 est capable d'intervenir dans des mécanismes régulant la dynamique du cytosquelette ainsi que dans de nombreuses voies de signalisation et réponses biologiques par son interaction avec une grande diversité de protéines et de récepteurs. Cependant, des facteurs supplémentaires vont influencer la fonction et les interactions protéiques de la protéine IQGAP1 rendant ainsi encore plus complexe la compréhension de son rôle dans diverses fonctions cellulaires.

III.1. Le rôle de la signalisation Ca^{2+} /calmoduline

Le Ca^{2+} est un messager secondaire intracellulaire ubiquitaire qui contrôle de nombreux processus cellulaires (Berridge et al., 2000a; Berridge et al., 2000b). Le médiateur principal de la signalisation calcique est la calmoduline. Le Ca^{2+} en se liant à la calmoduline induit un changement conformationnel qui permet sa fixation sur des domaines spécifiques de diverses protéines cibles. Ces domaines sont préférentiellement les structures en hélices α (O'Neil and DeGrado, 1990) et les motifs « IQ » (Cheney and Mooseker, 1992). Par ce biais,

la calmoduline se lie à IQGAP1 sur les motifs « IQ » avec une meilleure affinité (Ho et al., 1999; Li and Sacks, 2003) que sur le domaine « CHD ». Le Ca^{2+} augmente l'affinité de la calmoduline pour IQGAP1 (Joyal et al., 1997) ce qui provoque la perte de sa liaison avec la protéine Cdc42 (Briggs and Sacks, 2003; Ho et al., 1999) et de son action sur le cytosquelette. De plus, en présence de Ca^{2+} et de calmoduline, l'interaction d'IQGAP1 avec les filaments d'actine et son activité de pontage sont réduites (Fukata et al., 1997; Mateer et al., 2002). Dans les interactions cellule-cellule, IQGAP1 est impliquée dans les jonctions adhérentes dépendantes de la E-cadhérite (Kuroda et al., 1998; Li et al., 1999), une protéine dont l'activité est régulée par le Ca^{2+} . Dans ce contexte, la calmoduline réduit fortement la liaison entre IQGAP1 et la E-cadhérite (Li et al., 1999). IQGAP1 potentialise l'activité transcriptionnelle de la β -caténine mais, en présence de calmoduline, cet effet est aboli (Briggs et al., 2002). La signalisation calcique et la calmoduline contribuent donc largement aux modifications fonctionnelles de la protéine IQGAP1 en modifiant les interactions avec ses différents partenaires.

III.2. La localisation sub-cellulaire

IQGAP1 possède deux rôles majeurs au niveau du cytosquelette et de la signalisation cellulaire. Pour remplir ses deux fonctions cellulaires primordiales, IQGAP1 interagit avec de nombreux partenaires à des sites bien particuliers dans la cellule. Pour la régulation du cytosquelette IQGAP1 peut se situer aux « *leading edges* » de cellules en migration, aux contacts cellule-cellule ou au niveau de cônes de croissance. Pour la signalisation cellulaire, sa localisation pourra être sous-membranaire en interaction avec de nombreux récepteurs, soit cytoplasmique en contact avec différentes molécules de signalisation ou bien en région golgienne pour le trafic vésiculaire (Briggs and Sacks, 2003; Brown and Sacks, 2006).

III.3. L'oligomérisation

Une seule étude fait état d'une forme oligomérisée de la protéine IQGAP1. L'oligomérisation de la protéine IQGAP1 serait nécessaire pour son activité pontante des filaments d'actine (Fukata et al., 1997).

III.4. Les modifications post-traductionnelles

Récemment, IQGAP1 a été observée au niveau de projections neuritiques de neurones et impliquée dans leur croissance. Ce phénomène s'avère dépendant de la phosphorylation de la protéine (Li et al., 2005). De plus, IQGAP1 est capable d'interagir avec des récepteurs à

activité tyrosine kinase, l’EGFR (Blagoev et al., 2003) et le VEGF-R2 (Yamaoka-Tojo et al., 2006; Yamaoka-Tojo et al., 2004), possédant une capacité d’auto- et de trans-phosphorylation de substrats à proximité. C’est ainsi que dans des HUVEC, une phosphorylation d’IQGAP1 a été observée après stimulation par le VEGF (Yamaoka-Tojo et al., 2004). Cette modification post-traductionnelle, découverte récemment, ne permet pas de savoir si elle est requise pour toutes les fonctions régulatrices contrôlées par la protéine IQGAP1.

A retenir

D’un point de vue bibliographique, les éléments concernant la protéine IQGAP1 sont assez riches et vastes. De ce fait, les différents points mentionnés ci-dessous résument les données primordiales à retenir et à intégrer pour la compréhension de mon travail de thèse.

- 1- L’interaction d’IQGAP1 avec les protéines CLIP-170 et APC permet un lien avec le réseau microtubulaire.
- 2- En tant qu’effecteur des Rho GTPases Rac et Cdc42, IQGAP1 intervient dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d’actine.
- 3- L’action centrale d’IQGAP1 dans la régulation du cytosquelette cellulaire lui confère un rôle dans les mécanismes de polarité et de migration cellulaires.
- 4- Les nombreux domaines d’interactions d’IQGAP1 lui permettent, en liant certaines molécules et récepteurs, d’intervenir dans la signalisation cellulaire.

Les études menées au cours de ce travail de thèse s’articulent autour de ces propriétés intrinsèques d’IQGAP1 et portent sur la fonction régulatrice de cette protéine au cours de la neurogenèse adulte et sur sa caractérisation au cours de la carcinogenèse cérébrale.

IV. Les cellules souches neurales dans le système nerveux central adulte

IV.1 Historique et contexte scientifique contemporain

A l'heure actuelle, le cerveau reste encore un grand mystère et l'un des organes les plus méconnus du corps humain. Depuis de nombreuses années, les recherches en neurobiologie visent à comprendre toutes les étapes intervenant au cours du développement du système nerveux central (SNC), à élucider son fonctionnement global au cours de la vie de manière à guérir n'importe quelles neuropathies, au combien invalidantes.

Dès le milieu du XIX^{ème} siècle, des études ont fourni de précieux éléments morphologiques et histologiques des différents types cellulaires présents dans le cerveau en développement. Ainsi Wilhem His en 1850, se mit à rechercher l'origine embryonnaire des cellules neuronales et gliales en examinant la région de l'épithélium neural. La neurobiologie développementale était née. Il décrivit deux populations cellulaires majeures, d'une part des petites cellules mitotiques rondes proches de la lumière du tube neural qualifiées de précurseurs neuronaux et d'autre part des cellules à la morphologie plus allongée qu'il nomma spongioblastes puis glie radiaire, considérées comme étant des précurseurs de cellules gliales. A partir de ses observations, Wilhem His conclut que les neurones et la glie avaient une origine développementale différente, provenant de deux populations de cellules « précurseurs » bien distinctes. Une hypothèse fut alors élaborée suggérant qu'au cours du développement, au niveau du tube neural précoce, se mettait en place deux types de précurseurs destinés à donner soit des neurones soit de la glie (Ming and Song, 2005).

Puis, au début du XX^{ème} siècle, un autre champ de recherche concernant la production de neurones ou neurogenèse a vu le jour. Ce processus met en œuvre des cellules « précurseurs » capables de générer des neurones fonctionnels. Ce phénomène semblait se dérouler uniquement durant les stades embryonnaires chez les mammifères (Ramon y Cajal, 1913). Le dogme « *no new neurons after birth* » a perduré pendant près d'un siècle grâce à de nombreux arguments étayant cette théorie.

- 1- Les petites cellules rondes décrites initialement comme des précurseurs neuronaux disparaissent massivement par apoptose après la naissance.
- 2- Une faible proportion de cellules prolifère dans l'ensemble du SNC adulte.
- 3- La population neuronale est post-mitotique chez l'adulte.
- 4- Chez les mammifères, aucune régénération neuronale n'est observée après une lésion cérébrale.

5- Les zones prolifératives responsables de la neurogenèse embryonnaire s'atrophient après la naissance.

Pourtant, les travaux d'Hamilton en 1901 puis d'Allen en 1912, décrivaient clairement que des cellules se divisaient dans le SNC adulte et dans certaines régions bien précises (Allen, 1912). Seulement les techniques d'investigation de l'époque ne permettaient pas de suivre la destinée de cette population ni d'affirmer que cette population était réellement des neurones. A la fin des années 1950, une nouvelle technique de marquage des cellules en prolifération fut élaborée. Elle reposait sur l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules en phase S du cycle cellulaire et à leur révélation par autoradiographie (Sidman et al., 1959). L'utilisation de cette technique permit à Joseph Altman, dans les années 1960, d'avancer les preuves d'une existence de neurones proliférants dans plusieurs zones du cerveau de rat adulte (Altman, 1962; Altman, 1963; Altman, 1966; Altman and Das, 1966), notamment au niveau du gyrus denté de l'hippocampe (Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b), du néocortex (Altman, 1966; Altman and Das, 1966) et du bulbe olfactif (Altman, 1969a; Altman, 1969b). Cependant, ces observations ne révélaient pas clairement la nature et la fonctionnalité neuronale de ces cellules mais les dogmes ont la « peau dure » et l'existence d'une neurogenèse chez l'adulte n'était toujours pas admise.

Ce n'est qu'à la fin des années 1970 que l'idée d'une neurogenèse adulte réapparut avec les travaux sur l'hippocampe de Kaplan (Kaplan and Bell, 1983; Kaplan and Bell, 1984; Kaplan and Hinds, 1977). En effet, ces études démontrent que des neurones nouvellement synthétisés perduraient au cours du temps, qu'ils étaient fonctionnels par leur capacité à recevoir des signaux synaptiques (Kaplan and Bell, 1983; Kaplan and Bell, 1984; Kaplan et al., 1985) et à émettre des prolongements dendritiques et axonaux (Stanfield and Trice, 1988).

Dans les années 1980, le laboratoire de Nottebohm, travaillant sur les canaris, démontre l'existence irréfutable d'un renouvellement neuronal dans le télencéphale adulte (Burd and Nottebohm, 1985; Goldman and Nottebohm, 1983; Nottebohm, 1989). Cette découverte fut confirmée chez le lézard et les poissons (Garcia-Verdugo et al., 1989; Lopez-Garcia et al., 1988; Lopez-Garcia et al., 1992; Lopez-Garcia et al., 1984) mais complètement ignorée des neurobiologistes mammaliens. Ce n'est que quelques années plus tard que l'existence de cellules souches neurales chez l'adulte, source putative de neurones, sera enfin démontrée chez les mammifères (Reynolds et al., 1992). Cette découverte sera à l'origine d'un grand bouleversement idéologique et conceptuel dans la neurobiologie développementale moderne. La mise en culture de cellules du striatum adulte en présence de facteurs de croissance bien déterminés, l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et le bFGF (*basic*

Fibroblast Growth Factor), révéla qu'une faible proportion de cellules était capable de se multiplier en suspension, et de former des amas cellulaires dénommés « neurosphères » (Reynolds et al., 1992; Weiss et al., 1996). Ces neurosphères ont démontré des capacités totalement inattendues, notamment celle de générer, dans des conditions de culture particulières, les trois populations cellulaires les plus représentées dans le système nerveux central (SNC) : les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones. On disposait enfin d'une preuve de l'existence de cellules multipotentes isolables et capables de donner des neurones *in vitro* qui, par extrapolation, devaient certainement pouvoir en générer *in vivo*.

Après dissociation de ces neurosphères et leur ensemencement en cellule unique en présence d'EGF et bFGF, une sous-population était à nouveau capable de former des neurosphères dites secondaires et multipotentes. Ces propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation multiple sont encore aujourd'hui les critères de base pour définir une cellule souche. Cette population de cellules souches est isolable à partir de nombreuses régions précises du cerveau adulte de mammifères (Gottlieb, 2002), y compris du cerveau humain (Gottlieb, 2002; Kukekov et al., 1999). Dans le même temps, les techniques d'investigations de la neurogenèse, *in vivo*, ont largement évolué avec la technique de marquage au Bromodeoxyuridine (BrdU) (Gratzner, 1982), les infections rétrovirales (Lewis and Emerman, 1994) et les souris transgéniques (Overstreet et al., 2004; Yamaguchi et al., 2000).

Puis différentes études ont mis en lumière le fait que de nouveaux neurones étaient produits tout au long de la vie dans deux régions particulières du télencéphale de mammifères adultes : la zone sous-ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Alvarez-Buylla et al., 2000; Alvarez-Buylla et al., 2002; Doetsch et al., 1997; Garcia-Verdugo et al., 1998; Kirschenbaum et al., 1999; Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996) et la couche sous-granulaire (SGL) du gyrus denté de l'hippocampe (Cameron and McKay, 2001; Cameron et al., 1993; Gage et al., 1998; Palmer et al., 1997). Ces découvertes successives ont finalement conduit à la caractérisation précise de ces zones de neurogenèse chez l'adulte et à l'identification de ces cellules souches neurales adultes.

IV.2 La neurogenèse chez les mammifères adultes

Pendant longtemps, la production de nouveaux neurones chez les mammifères adultes semblait une hérésie. Après plusieurs années de débats conceptuels et de progrès méthologiques et techniques, il est maintenant clairement établi qu'une neurogenèse persiste dans deux régions déterminées du télencéphale adulte, la zone sous-ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral et la couche sous-granulaire (SGL) du gyrus denté de l'hippocampe.

IV.2.1 La zone sous-ventriculaire adulte (SVZ)

La SVZ est une région germinale spécialisée qui s'étend le long du ventricule latéral. Son rôle est de produire de nouveaux précurseurs de neurones, ou neuroblastes, qui après avoir migré sur de longues distances (3 à 8 mm chez la souris) vont rejoindre le bulbe olfactif où ils se différencieront en interneurones glomérulaires et périglomérulaires du bulbe olfactif (Doetsch, 2003; Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch et al., 1997).

L'existence de nombreuses cellules se divisant au niveau de la SVZ est connue depuis 1912 grâce aux travaux d'Allen (Allen, 1912). Cette zone de prolifération active est présente chez de nombreux vertébrés tels que les rongeurs (souris et rats), le lapin, le chien, le singe et l'homme (Garcia-Verdugo et al., 2002). Néanmoins le devenir de ces cellules n'était pas clairement établi. Si Altman pensait que ces cellules avaient un devenir neuronal (Altman, 1969b; Altman and Das, 1965a), certains suggéraient qu'elles jouaient un rôle de réservoir pour la fabrication de cellules gliales (Messier et al., 1958; Privat, 1977; Privat and Leblond, 1972) et d'autres proposaient que ces cellules n'étaient pas utilisées et mourraient après s'être divisées (Morshead and van der Kooy, 1992). La démonstration que les cellules générées dans cette région étaient, en grande partie, des précurseurs neuronaux, est venue des travaux de l'équipe d'Alvarez-Buylla. En effet, après une injection de thymidine tritiée chez des souris, des explants de la SVZ furent mis en culture et donnèrent 98% de neurones et 2% de glie (Lois and Alvarez-Buylla, 1993). Cette même équipe a ensuite été en mesure de marquer les cellules de la SVZ puis de suivre, *in vivo*, leur devenir. Les cellules en prolifération de la SVZ donnent naissance à de nouveaux précurseurs de neurones, qui migrent ensuite tangentially jusqu'au bulbe olfactif le long d'une voie de migration dite « rostrale » communément appelée RMS (*Rostral Migratory Stream*) pour s'y différencier en interneurones olfactifs (figure 6). Ce mécanisme de neurogenèse adulte permet par conséquent le renouvellement d'interneurones olfactifs (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Luskin, 1993). *In vivo*, ces cellules souches neurales sont donc probablement maintenues dans la SVZ adulte pour assurer la fabrication quotidienne de précurseurs

neuronaux. *In vitro*, des études complémentaires montrent que des cellules isolées à partir de la SVZ adulte, possèdent toutes les propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence inhérentes aux cellules souches neurales et peuvent être cultivées en présence de facteurs de croissance tels que l'EGF, le bFGF ou les deux (Gritti et al., 1999; Gritti et al., 1996; Reynolds et al., 1992; Rietze et al., 2001; Vescovi et al., 1993). L'auto-renouvellement est évalué par leur capacité à reformer des neurosphères après chaque dissociation. La multipotence est testée en sevrant les cellules en facteurs de croissance, et en principe chaque neurosphère a la capacité de donner des astrocytes, oligodendrocytes et des neurones (Gritti et al., 2002; Gritti et al., 1999; Gritti et al., 1996). Des cellules souches neurales peuvent également être extraites d'autres régions du cerveau mais seules celles issues de la SVZ peuvent générer des sphères en la seule présence d'EGF (Reynolds et al., 1992; Reynolds and Weiss, 1996).

Afin d'identifier ces cellules souches, des études descriptives déterminant la composition et l'organisation cellulaire de la SVZ ont été réalisées (Doetsch et al., 1997), figure 6). La SVZ ou zone sous-épendymaire, est physiquement séparée de la lumière du ventricule latéral par une monocouche de cellules épendymaires ciliées qui servent notamment à la circulation du liquide céphalo-rachidien (LCR). Le long du mur ventriculaire, la SVZ contient des clusters de précurseurs neuronaux ou neuroblastes (appelées cellules de type « A ») qui forment un réseau de voies de migration (Doetsch, 2003; Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b). Chaque voie met en place une migration sous forme de chaînes (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996; Wichterle et al., 1997). Ensuite, ces différentes voies de migration de neuroblastes se regroupent au niveau antérieur dorsal de la SVZ pour la quitter et former une seule et même voie, la RMS. Cette voie de migration achemine rostalement les cellules de type « A » vers le bulbe olfactif où elles se différencieront en interneurones glomérulaires et périglomérulaires (Doetsch et al., 1997; Doetsch and Scharff, 2001; Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Lois et al., 1996), figure 6). Dans la SVZ, comme dans la RMS ces neuroblastes sont engainés par des prolongements de cellules nommées de type « B » qui forment littéralement des tubes à l'intérieur desquels les neuroblastes se déplacent (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch et al., 1997; Peretto et al., 2005; Peretto et al., 1997). Les cellules de type « B » possèdent toutes les caractéristiques phénotypiques et ultra-structurales d'astrocytes : un cytoplasme peu dense, des granules de glycogène, des jonctions serrées et l'expression de la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1997). Certaines de ces cellules « B » ont la capacité de proliférer mais ce phénomène est rare. On trouve également

un autre type cellulaire, dit de type « C » ou progéniteur neural, qui forme des petits clusters de cellules hautement proliférantes, dispersés le long de la SVZ et de la RMS (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1997; Gritti et al., 2002). En outre, la dernière caractéristique de la SVZ est sa forte vascularisation qui va conférer, nous le verrons, un rôle important aux vaisseaux sanguins dans la régulation du microenvironnement de ces cellules souches neurales. Cette description exhaustive des différents types cellulaires composant la SVZ n'a pas apporté d'éléments permettant une identification précise des cellules souches neurales avant 1999.

Pour cela, l'équipe d'Alvarez-Buylla a mis en œuvre une technique d'élimination des cellules proliférantes par une drogue anti-mitotique, l'Ara-C et observa la régénération séquentielle de cette zone. Ils définirent, ainsi, une hiérarchie et un lignage entre les différents types cellulaires de la SVZ en fonction de leur ordre de réapparition. Après 6 jours de perfusion cérébrale avec l'Ara-C, les précurseurs neuronaux (type « A ») et les progéniteurs neuronaux (type « C ») sont détruits alors que les astrocytes (type « B »), en majorité non ou peu proliférants, sont épargnés par le traitement au même titre que les cellules épendymaires (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b). Les résultats ont révélé que 12 heures après l'arrêt du traitement, les premières cellules se remettant à proliférer étaient les cellules astrocytaires de type « B » (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1999b). Ce résultat surprenant suggéra, en premier lieu, que la drogue induisait une gliose réactionnelle. Cependant, une approche expérimentale complémentaire consistant en un marquage des astrocytes proliférants à la thymidine tritiée, montra que ce marquage persistait séquentiellement dans les cellules de type « C » puis de type « A ». Ces résultats sont clairement en faveur d'un lignage direct entre les différents types cellulaires de la SVZ. Avec les progrès de la génétique et des techniques d'investigation *in vivo*, des souris transgéniques viendront confirmer cette filiation. Le couplage de l'utilisation de souris transgéniques portant le récepteur d'un rétrovirus aviaire sous le contrôle du promoteur du gène codant la GFAP et d'un rétrovirus aviaire portant le gène codant la phosphatase alcaline a permis l'obtention d'un marquage spécifique des astrocytes de la SVZ (Holland and Varmus, 1998). Ainsi, l'injection stéréotaxique du virus dans la SVZ de ces souris transgéniques permet de marquer et de suivre le devenir des astrocytes de cette région. L'utilisation de ce modèle a révélé que les astrocytes de la SVZ sont responsables de la genèse des neuroblastes qui migrent jusque dans le bulbe olfactif où ils se différencient en neurones. Ces éléments ont mis en lumière que ce phénomène neurogénique se déroulait également en conditions non régénératives (Doetsch et al., 1999a). Nous avons vu précédemment qu'une population de la SVZ était capable de répondre, *in vitro*, aux facteurs de croissance EGF et bFGF afin de produire des neurosphères

primaires puis secondaires en conservant leur multipotence. Les travaux de Doetsch et ses collaborateurs ont démontré qu'*in vitro*, les cellules de la SVZ, après le traitement à l’Ara-C, sont capables de générer des sphères en réponse à l’EGF et de multipotence. Cependant, les cellules de type « C » sont plus aptes à répondre à l’EGF et conservent, sous l’action de ce facteur, les propriétés de multipotence attribuées aux cellules souches (Doetsch et al., 2002). Plus récemment, d’autres travaux sont venus confirmer que les cellules souches neurales expriment la *gfap* *in vitro* et *in vivo*. Ces expériences utilisaient une lignée de souris transgéniques exprimant le thymidine kinase (TK) du virus herpes simplex (HSV-TK) sous le contrôle du promoteur du gène codant la GFAP. L’action antivirale du ganciclovir (GCV) injectée, *in vivo*, dans la SVZ des souris transgéniques permettait la destruction des astrocytes de type « B ». Après trois jours de traitement, quasiment toutes les cellules de la SVZ capables de former des neurosphères ont disparu et la neurogenèse *in vivo* est largement affectée (Garcia et al., 2004; Imura et al., 2003). Les astrocytes de la SVZ se comportent donc comme des précurseurs primaires de neurones.

Une autre équipe a suggéré également, sur la base de leur faible taux de prolifération, que les cellules épendymaires seraient de bonnes candidates pour être les cellules souches neurales adultes (Johansson et al., 1999). Néanmoins, aucune autre étude n’a permis de confirmer cette hypothèse.

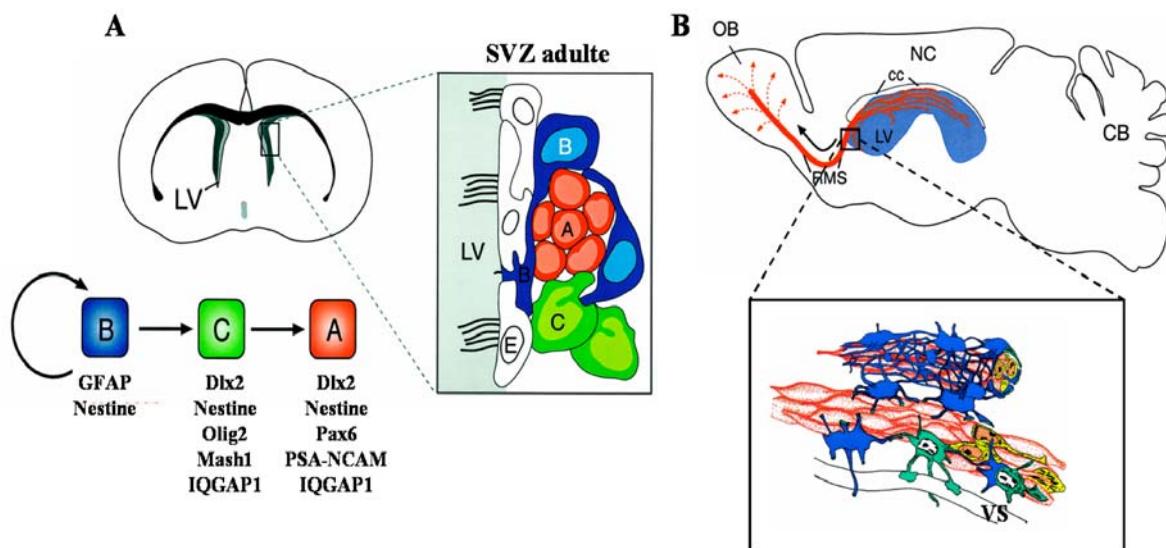


Figure 6 : Organisation de la zone sous-ventriculaire (SVZ) adulte et de la voie de migration rostrale (RMS) (d'après Alvarez-Buylla et al., 2002)

(A) La SVZ se compose de quatre types cellulaires majeurs. Les cellules épendyamières (type « E », blanc) ciliées sont responsables du mouvement du liquide céphalo-rachidien et bordent la lumière du ventricule latéral (LV). Les précurseurs neuronaux ou neuroblastes (type « A », rouge) sont organisés en chaînettes et entourés par les extensions des astrocytes (type « B », bleu). Les cellules à haut potentiel prolifératif (type « C », vert) sont adjacentes à ces chaînes de neuroblastes. Le lignage cellulaire qui existe entre les différents types cellulaires présents dans la SVZ est également représenté. Les cellules souches neurales de type « B » se divisent afin de produire les cellules progénitrices neurales de type « C » générant ensuite les précurseurs neuronaux ou neuroblastes de type « A ». Les principaux marqueurs et facteurs de transcription connus pour ces différents types cellulaires sont indiqués.

(B) Représentation schématique de la voie de migration rostrale (RMS). Les neuroblastes (type « A », rouge) forment des réseaux de chaînes de migration, le long du mur ventriculaire, qui vont fusionner pour ne former plus qu'une voie unique, la RMS. Ces neuroblastes migrent au travers de tunnels formés par les cellules astrocytaires (bleu), en contact avec les vaisseaux sanguins (VS) par leurs pieds astrocytaires, le long de la RMS pour rejoindre le bulbe olfactif (OB) où ils se différencieront en interneurones olfactifs. NC : néocortex ; CB : cervelet ; CC : corps calleux.

IV.2.2 La couche sous-granulaire de l'hippocampe (SGL)

L'hippocampe est une structure bilatérale et symétrique, faisant partie du système limbique qui gère les émotions, les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation. La SGL est une fine couche germinale située entre le hile de l'hippocampe et la couche granulaire. La SGL du gyrus denté de l'hippocampe est la seconde région où l'on observe la production de nouveaux neurones chez l'adulte (figure 7).

Cette zone neurogénique a été observée chez les oiseaux (Barnea and Nottebohm, 1994), les reptiles (Garcia-Verdugo et al., 1989; Lopez-Garcia et al., 1992), les rongeurs (Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b), les primates et chez l'homme (Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1999a; Gould et al., 1997; Gould et al., 1999b). Dans le gyrus denté, des nouveaux neurones sont générés à partir de la SGL, migrent sur de courtes distances et se

différencient en neurones granulaires. La neurogenèse dans l'hippocampe a été corrélée à des mécanismes d'apprentissage et de mémorisation (Barnea and Nottebohm, 1994; Gould et al., 1999a; Gould et al., 1999c; Kempermann et al., 1998a; Kempermann and Gage, 1999; Kempermann and Gage, 2000; Kempermann and Gage, 2002; Kempermann et al., 1997a; Kempermann et al., 1997b; Kempermann et al., 1998b; Shors et al., 2001). Des premières études descriptives de l'hippocampe indiquaient la présence de petites cellules sombres, d'aspect indifférencié, dans la SGL s'apparentant à des précurseurs neuronaux (Altman and Das, 1965a; Altman and Das, 1965b; Kaplan and Bell, 1983; Kaplan and Bell, 1984; Kaplan et al., 1985). Dans le même temps, d'autres travaux révélaient que des cellules astrocytaires se divisaient dans la SGL et le hile du gyrus denté adulte (Cameron and McKay, 2001; Cameron et al., 1993; Christie and Cameron, 2006; Kaplan and Bell, 1984), mais ce processus a été attribué à une gliogenèse locale servant au maintien des fonctions neuronales. Bien plus tard, des études *in vitro* suggèrent que dans l'hippocampe adulte réside également des cellules ayant les propriétés de cellules souches (Gage, 2000; Gage et al., 1998; Palmer et al., 1997). En effet, l'observation d'astrocytes proliférants dans la SGL (Palmer et al., 2000; Seri et al., 2004; Seri et al., 2001) va permettre d'élaborer, comme pour la SVZ, le concept de précurseurs primaires de neurones dans l'hippocampe chez l'adulte. Par les mêmes approches expérimentales que celles réalisées dans la SVZ, un traitement anti-mitotique et l'utilisation de souris transgéniques, Seri et ses collaborateurs ont montré que les astrocytes de la SGL jouent le rôle de précurseurs primaires de neurones et qu'il existe une filiation entre les différents types cellulaires du gyrus denté (Seri et al., 2004; Seri et al., 2001), figure 7).

La description du gyrus denté adulte a révélé au moins deux populations d'astrocytes, à morphologie radiaire et à morphologie horizontale. Les deux catégories expriment la GFAP mais seuls les astrocytes radiaux expriment la nestin, marqueur caractéristique des progéniteurs neuraux (Filippov et al., 2003). De plus, les astrocytes radiaux possèdent les mêmes caractéristiques ultra-structurales que les astrocytes de type « B » de la SVZ (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1997; Seri et al., 2004; Seri et al., 2001), ils seront donc nommés type « B » dans l'hippocampe. Leur corps cellulaire se situe au niveau de la SGL et leur extension radiaire traverse la couche granulaire de neurones (figure 7). Juste après l'incorporation de BrdU, un marqueur de la prolifération cellulaire, près de la moitié des cellules marquées dans la SGL correspondent aux astrocytes (Garcia et al., 2004; Seri et al., 2001). En revanche, si l'animal est sacrifié quelques heures après l'incorporation de BrdU, le nombre de cellules marquées augmente considérablement et caractérise une population de petites cellules sombres (type « D » ou de type « 2 », figure 7) n'exprimant pas la GFAP

(Garcia et al., 2004; Seri et al., 2001). Ces cellules de type « D » correspondent à des progéniteurs intermédiaires qui proviennent de la division d'astrocytes radiaires (Seri et al., 2001). Ceci a été démontré à l'aide de la même approche expérimentale que celle utilisée pour la SVZ, à savoir par un traitement anti-mitotique à l'Ara-C et l'utilisation de souris transgéniques exprimant le récepteur d'un virus aviaire sous le contrôle du promoteur du gène codant la GFAP (Seri et al., 2001). Des travaux ultérieurs confirmeront qu'*in vivo* les cellules GFAP+ sont à l'origine de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe (Ahn and Joyner, 2005; Garcia et al., 2004).

L'ensemble de ces travaux a permis de définir les différents types cellulaires et leur filiation qui interviennent dans ce mécanisme de neurogenèse dans l'hippocampe adulte. Les astrocytes germinaux donnent naissance à un progéniteur de type « D » qui possède des propriétés électrophysiologiques de jeunes neurones (Kempermann et al., 2004a; Seri et al., 2004). Ces progéniteurs évoluent ensuite vers une différenciation neuronale en exprimant séquentiellement tout un ensemble de marqueurs neuronaux comme la doublecortine (DCX), PSA-NCAM, NeuroD, Prox1 et NeuN pour devenir des neurones granulaires matures. Au cours de leur différenciation neuronale, les cellules progénitrices intermédiaires, sont classifiées en différents sous-types « D1, D2, D3 » en fonction des marqueurs qu'elles expriment (Kempermann and Gage, 2000; Kempermann et al., 2004a; Kempermann et al., 2004b).

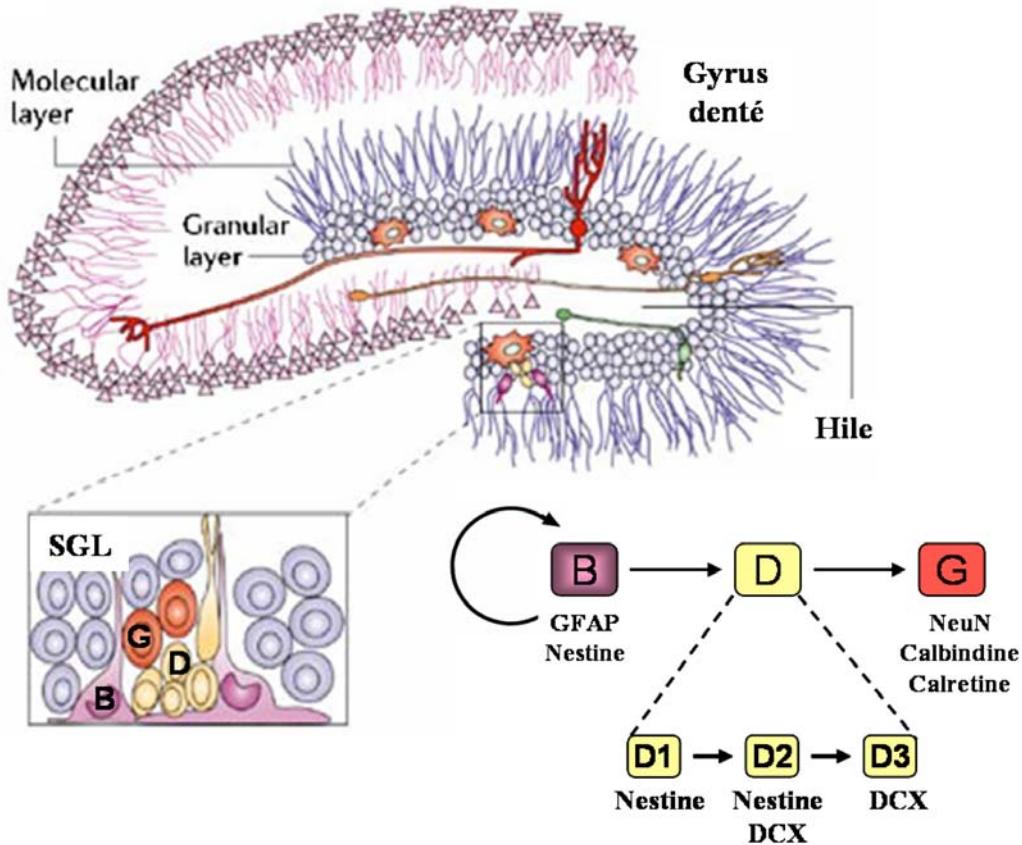


Figure 7 : Organisation de la couche sous-granulaire (SGL) dans le gyrus denté de l'hippocampe adulte (d'après (Seri et al., 2001; Vescovi et al., 2006))

Les astrocytes de la SGL (type « B », rose) possèdent une morphologie de glie radiaire avec une extension pénétrant dans la couche de neurones granulaires (type « G », rouge). Les cellules de type « B » se divisent afin de générer des précurseurs neuronaux immatures (type « D », jaune) qui vont évoluer et se diviser pour donner des neurones matures granulaires. Ce lignage fait également état des principaux marqueurs exprimés au cours de cette neurogenèse adulte.

IV.3 Les mécanismes intrinsèques et extrinsèques contrôlant la neurogenèse adulte dans la voie SVZ/RMS/Bulbe Olfactif (BO)

L'hypothèse de l'existence d'une neurogenèse et de la présence de cellules souches chez l'adulte a été largement étudiée et démontrée ces dernières années. Il est maintenant important de comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent cette neurogenèse. En effet, dans l'optique de développer des thérapies utilisant les capacités des cellules souches en médecine régénérative, il est primordial de comprendre les mécanismes intrinsèques et extrinsèques qui contrôlent leur activité et leur devenir. Quel est l'ensemble des facteurs qui contrôle l'activation, la prolifération, la spécification/différenciation et la migration de ces cellules souches neurales adultes ?

IV.3.1 Les mécanismes moléculaires de régulation intrinsèque des cellules souches de la SVZ adulte

Si de nombreux travaux se sont focalisés sur l'identification de ces cellules souches neurales chez l'adulte, d'autres se sont attachés à élucider l'origine de ces cellules souches. Des études se sont ainsi appuyées sur l'hypothèse que des cellules souches présentes chez l'embryon étaient capables d'évoluer et de persister chez l'adulte postulant ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement par ces cellules pourraient être transposables chez l'adulte. Des études probantes portant sur l'évolution de la glie radiaire au cours du développement sont venues étayer cette hypothèse.

IV.3.1.1 Persistance des cellules souches neurales de l'embryon à l'adulte

Lors de la neurogenèse corticale, qui débute à E10 chez la souris, la glie radiaire permet aux neurones néo-synthétisés de migrer le long de son extension pour qu'ils colonisent les différentes couches corticales (Gotz, 2003; Gotz et al., 2002; Rakic, 2003). Au cours de la gliogenèse, plus tardive (E18 chez la souris), la glie radiaire rétracte son extension, pénètre dans le parenchyme et se transforme en astrocytes (Levitt and Rakic, 1980; Rakic, 2003; Voigt, 1989) (figure 8).

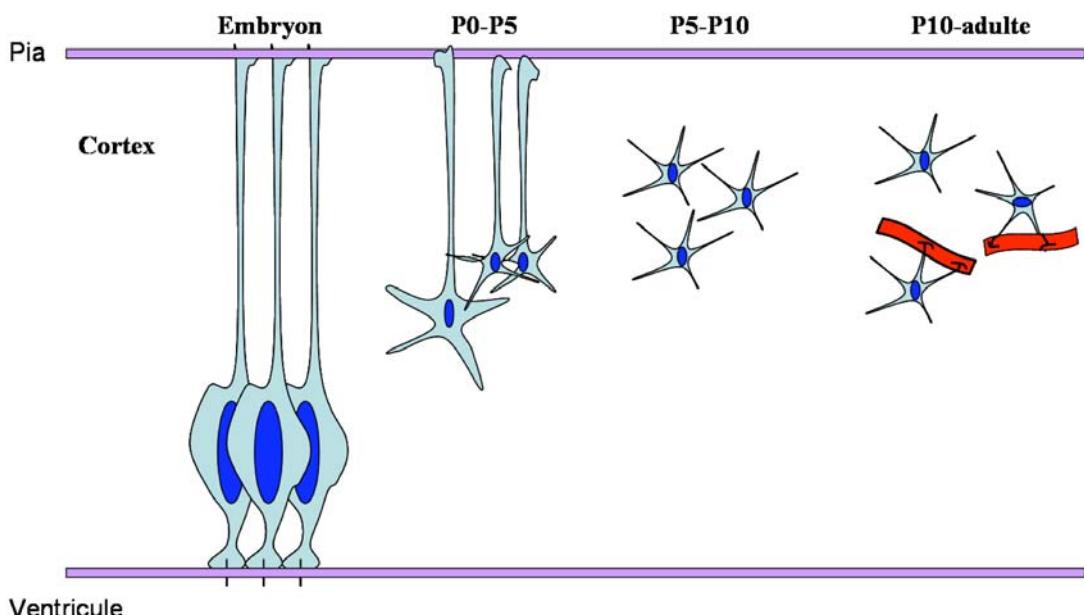


Figure 8 : Transformation séquentielle de la glie radiaire au cours du développement

Au cours des phases embryonnaires, les cellules de la glie radiaire sont arrimées au niveau du ventricule par un pied ventriculaire possédant un cil pénétrant dans la lumière du ventricule et projettent leur extension radiaire à la surface du cerveau (pia). A la naissance, ces cellules perdent leur pied ventriculaire et se rétractent le long de leur extension, pénètrent progressivement dans le parenchyme cérébral en changeant de morphologie au niveau de leur corps cellulaire. Quelques jours après la naissance, les cellules se détachent de la pia et acquièrent une morphologie étoilée de cellules astrocytaires immatures. Au cours des premières semaines post-natales, ces astrocytes deviennent matures et fonctionnels notamment en projetant leurs pieds astrocytaires sur les vaisseaux sanguins (rouge) afin de mettre en place la barrière hémato-encéphalique.

La glie radiaire, chez la souris, comme chez d'autres mammifères persiste au niveau du mur ventriculaire (future SVZ) même après la naissance (Tramontin et al., 2003) (figure 8 et 9). Les équipes d'Alvarez-Buylla et de Gotz ont mis au point des techniques permettant de marquer et de suivre le devenir de la glie radiaire. Leurs approches utilisent le système Cre-Lox. L'ADN recombinase Cre reconnaît des sites Lox et enlève la portion d'ADN située entre deux sites Lox. Les deux équipes ont fait appel à des lignées de souris transgéniques porteuses d'un gène rapporteur fluorescent dont l'expression est générée par la présence d'un codon stop « floqué » (situé entre deux sites Lox). De ce fait, la présence de l'enzyme Cre permettra d'ôter ce codon et d'exprimer le gène rapporteur. Les deux approches expérimentales vont ensuite diverger dans le mode d'expression de l'enzyme Cre.

L'équipe d'Alvarez-Buylla utilise une infection virale du striatum par un adénovirus capable d'exprimer la *Cre*. La glie radiaire projetant ses extensions au niveau du striatum se retrouve spécifiquement marquée de façon rétrograde. Les résultats font état, différents temps après l'infection, d'une glie radiaire marquée, capable de donner naissance aux cellules

épendymaires, aux interneurones du bulbe olfactif et aux astrocytes du striatum et de la SVZ adulte (Merkle et al., 2004) (figure 9).

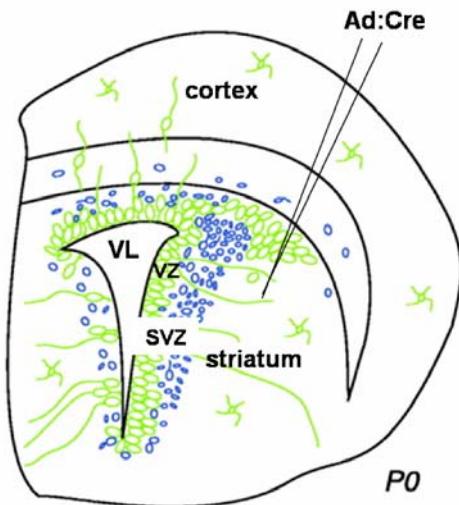


Figure 9 : Marquage spécifique de la glie radiaire dans le cerveau de souris nouveaux-nés (P0)

Les extensions de la glie radiaire latérale s'étendent à P0 chez la souris notamment de la zone ventriculaire (VZ) jusque dans le striatum (cellules vertes). L'injection de l'adénovirus « Ad:Cre » dans le striatum permet d'infecter de façon rétrograde les cellules de la glie radiaire et de suivre leur devenir par l'expression d'un gène rapporteur permise par l'action de l'ADN recombinase Cre dans ces cellules.

Les travaux du laboratoire de Magdalena Gotz ont fait appel à une autre lignée de souris transgéniques pour exprimer la Cre sous le contrôle du promoteur du gène codant la GFAP humaine. Ce gène s'exprime spécifiquement dans la glie radiaire murine au cours du développement. Le croisement de ces deux lignées de souris transgéniques permet ainsi l'expression du gène rapporteur dans toutes les cellules de la glie radiaire et l'observation de leur devenir. Les résultats ont mis en lumière les capacités neurogéniques et oligodendrogéniques de la glie radiaire embryonnaire (Malatesta et al., 2003). D'autres données avaient préalablement démontré le rôle de la glie radiaire comme précurseur neuronal (Kriegstein and Gotz, 2003). L'ensemble de ces résultats prouve que la glie radiaire a des potentialités multiples *in vivo*. De plus, *in vitro*, ces cellules de la glie radiaire ont la capacité de générer des neurosphères multipotentes. Au cours du développement, la glie radiaire peut évoluer en astrocytes de la SVZ chez l'adulte et possède de nombreuses potentialités propres aux cellules souches neurales (figure 8 et 9).

IV.3.1.2 Les mécanismes moléculaires contrôlant la SVZ adulte

Comme des cellules souches, présentes chez l'embryon, semblent pouvoir persister chez l'adulte on peut imaginer qu'elles utilisent les mêmes mécanismes moléculaires pour réguler leur activité et leur devenir. De nombreuses études se sont intéressées aux facteurs de transcription de type « bHLH » (*basic Helix Loop Helix*). En effet, de récentes découvertes dans l'embryon ont mis en évidence l'implication des facteurs de transcription de type « bHLH » dans le contrôle de la prolifération, la spécification et la différenciation de progéniteurs du télencéphale dans le SNc en développement (Bertrand et al., 2002; Ross et al., 2003). Ces facteurs de transcription se lient à l'ADN en combinaison avec des protéines E (Cabrera and Alonso, 1991; Massari and Murre, 2000), reconnaissent des boîtes « E » ou « N » et peuvent activer ou réprimer la transcription de gènes cibles. Certaines recherches se sont donc focalisées sur l'étude de la présence et du rôle de ces facteurs de transcription dans les cellules souches et/ou progénitrices neurales adultes *in vitro* et *in vivo*.

L'équipe de Gotz a mis en évidence l'expression des facteurs de transcription *Olig2* et *Pax6* dans les neurosphères générées à partir de cellules de la SVZ adulte et a étudié leur rôle respectif *in vitro* (Hack et al., 2004). Des approches de siRNA ciblant *Olig2* dans les neurosphères adultes ont mis en évidence que ce facteur est impliqué dans le contrôle de l'auto-renouvellement et de la prolifération des cellules progénitrices et que son absence perturbe également leur capacité à se différencier en neurones et en oligodendrocytes (Hack et al., 2004). En ce qui concerne *Pax6*, l'expression forcée de ce gène dans des astrocytes permet d'induire une différenciation neuronale (Heins et al., 2002). *In vitro*, l'étude de *Pax6* dans les neurosphères adultes révèle un rôle identique de spécification neuronale dans les cellules qui l'expriment (Hack et al., 2004). De plus, *Pax6* joue un rôle activateur dans la neurogenèse par son action sur la spécification d'interneurones dopaminergiques et GABAergiques (Hack et al., 2005).

Dans la SVZ adulte, *Olig2* est principalement exprimé dans les cellules de type « C ». Sa surexpression dans la SVZ, suite à une infection rétrovirale, favorise l'oligodendrogenèse au détriment de la neurogenèse (Hack et al., 2005). Ces résultats montrent pour la première fois qu'une oligodendrogenèse peut avoir lieu chez l'adulte et que celle-ci peut mettre en œuvre les cellules de type « C », normalement vouées à donner les neuroblastes. Ces données vont être confirmées à l'aide d'infections rétrovirales des cellules de la SVZ adulte. En effet, à l'aide de rétrovirus exprimant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) les astrocytes de type « B » et les cellules de type « C » vont être marqués et suivis à partir de la SVZ adulte. Les résultats démontrent que les cellules infectées de la SVZ adulte sont capables d'adopter deux

destinées différentes en migrant, d'une part tangentiellement vers le bulbe olfactif où ces cellules se différencieront en interneurones olfactifs et d'autre part radialement pour coloniser les régions du corps calleux, de la fimbria et du striatum où elles se différencieront en oligodendrocytes (figure 10). De plus, ce mécanisme d'oligodendrogenèse physiologique chez l'adulte est amplifié dans des cas pathologiques de démyélinisations induites (Menn et al., 2006). Les études des mécanismes moléculaires sous-jacents mettent en évidence l'expression précoce du facteur de transcription *Olig2* dans les cellules de type « C » qui, par la suite, adopteront un devenir neuronal en migrant le long de la voie neurogénique RMS/BO et oligodendroglial en migrant dans les régions du corps calleux, de la fimbria et du striatum (Menn et al., 2006).

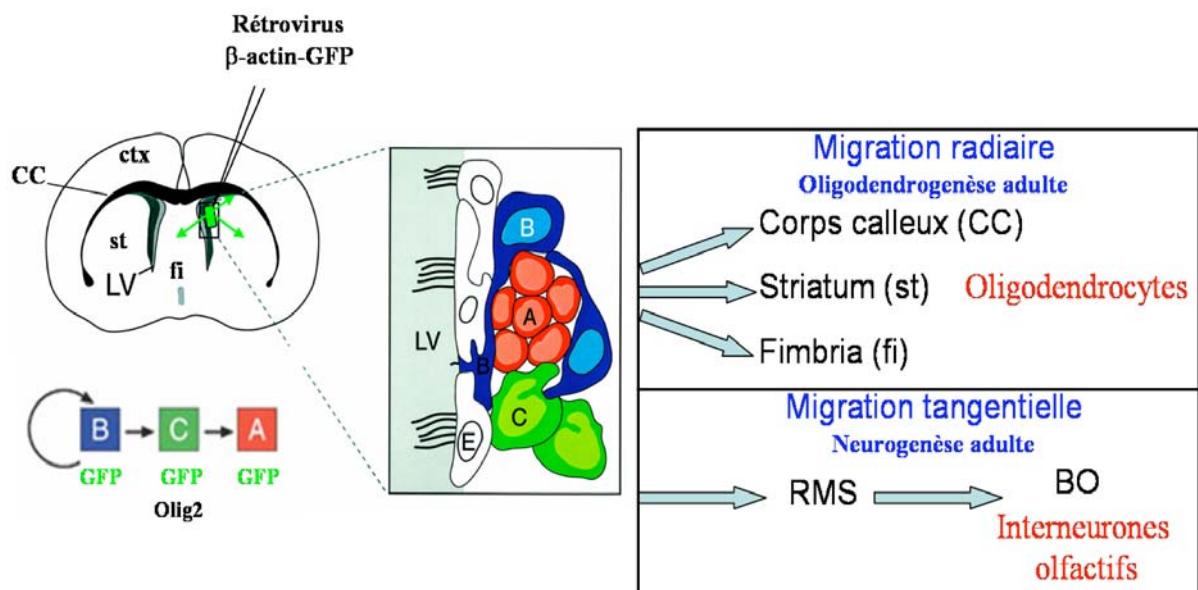


Figure 10 : Mise en évidence d'une oligodendrogenèse physiologique chez l'adulte (d'après (Menn et al., 2006))

L'injection stéréotaxique d'un rétrovirus exprimant la GFP dans la SVZ adulte permet de marquer et de suivre la destinée des cellules de la SVZ infectées. Le lignage cellulaire qui existe entre les différents types cellulaires présents dans la SVZ adulte est représenté. Les cellules souches neurales de type « B » (bleu) se divisent afin de produire les cellules progénitrices neurales de type « C » (vert) qui génèrent ensuite les cellules de type « A » (rouge). Au cours de la neurogenèse adulte, ces dernières forment des chaînettes et migrent tangentiellement le long de la RMS pour rejoindre le bulbe olfactif (BO) où elles se différencieront en interneurones olfactifs. Cependant, les expériences mentionnées ci-dessus ont mis en évidence un mécanisme de migration radiaire des cellules de la SVZ vers le corps calleux (CC), le striatum (st) et la fimbria (fi) (flèches vertes) où les cellules se différencieront en oligodendrocytes. ctx : cortex ; LV : ventricule latéral

L'étude d'un autre facteur de transcription de type « bHLH », Mash1, a révélé, d'une part qu'il est exprimé dans les cellules de type « C » de la SVZ post-natale et chez l'adulte et

d'autre part qu'il joue un rôle dans la différenciation neuronale et oligodendrogliale (Parras et al., 2004). Les cellules de la SVZ possèdent donc intrinsèquement une combinaison de facteurs de transcription qui agiront sur la prolifération, l'auto-renouvellement et le devenir de chaque cellule.

IV.3.2 Les cellules souches et leur microenvironnement : les « niches » de la SVZ

Dans de nombreux tissus, les cellules souches sont rares, se concentrent dans une région bien localisée et sont finement régulées par des cellules et des facteurs environnementaux. Ce microenvironnement particulier responsable du contrôle des cellules souches est nommé « niche » (Ohlstein et al., 2004; Schofield, 1978). Ce terme fait référence à l'écologie où la niche d'un organisme se définit comme l'endroit où il vit, évolue, se reproduit et interagit avec son environnement proche. Concernant les cellules souches neurales, dévolues à la production de nouveaux neurones, on parlera de « niche neurogénique » (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Doetsch, 2003).

En effet, un environnement proche spécifique leur permet une neurogenèse contrôlée dans des conditions physiologiques et des régénéérations multiples dans des régions restreintes dans le SNC (Emsley et al., 2005). Ces « niches » permettent une régulation fine de l'auto-renouvellement et de l'activation des cellules souches ainsi que la prolifération, la spécification/différenciation et la migration de leurs cellules filles progénitrices (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Doetsch, 2003; Ohlstein et al., 2004; Spradling et al., 2001). Il est donc important, pour une avancée dans le domaine de la thérapie cellulaire utilisant les capacités des cellules souches, de comprendre comment les facteurs extrinsèques agissent dans la biologie des cellules souches. La composition d'une niche de la SVZ adulte est assez complexe. L'ensemble des facteurs solubles ou sécrétés par les différentes composantes cellulaires que sont les cellules épendymaires, astrocytaires et endothéliales sera pris en compte ainsi que les interactions cellule-cellule. En outre, ces niches ont la particularité de posséder une membrane basale spécialisée et font intervenir de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire dans leur régulation (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Li et al., 2006; Mercier et al., 2002; Ohlstein et al., 2004; Spradling et al., 2001).

Le devenir neuronal des cellules souches et/ou progénitrices neurales de la SVZ, notamment chez l'adulte, semble plus intimement lié à leur environnement qu'à leurs facteurs intrinsèques. En effet, des expériences de transplantation de cellules de la SVZ montrent un comportement normal en cas d'injection dans une SVZ hôte, à savoir une genèse d'interneurones olfactifs. En revanche si la réimplantation se fait dans une région qualifiée de

« non neurogénique » ces cellules perdent leur potentialité. Si des progéniteurs de la SGL sont réimplantés dans la RMS, ils seront capables de migrer normalement et de produire des interneurones olfactifs (Gage, 2000; Lim et al., 2000). En revanche, des neuroblastes (PSA-NCAM+) déjà avancés dans le lignage neuronal, isolés par tri cellulaire, et réimplantés dans la région du corps calleux donneront en majorité des oligodendrocytes et non plus des neurones (Cayre et al., 2006). De ce fait, l'environnement des cellules de la SVZ adulte semble permissif et informatif vis-à-vis de la neurogenèse.

IV.3.2.1 Le rôle des facteurs de croissance dans la neurogenèse

IV.3.2.1.1 Les rôles des ligands de la famille des récepteurs à l'EGF : l'EGF, le bFGF, le TGF α (*Transforming Growth Factor*) et les neurégulines.

In vitro, des cellules issues de la SVZ et de l'hippocampe forment des neurosphères multipotentes sous l'influence de facteurs de croissance tels que le bFGF et/ou l'EGF (Gage et al., 1995; Gritti et al., 1999; Gritti et al., 1996; Reynolds et al., 1992; Reynolds and Weiss, 1996). *In vivo*, les cellules de la SVZ de type « B » et « C » expriment le récepteur à l'EGF (Doetsch et al., 2002) rendant possible l'action de deux ligands potentiels, l'EGF et le TGF- α . Les travaux de plusieurs équipes ont démontré les actions mitogènes de ces différents facteurs, *in vivo*, dans la SVZ et l'hippocampe (Craig et al., 1996; Kuhn et al., 1997; Tropepe et al., 1997).

La perfusion intra-ventriculaire d'EGF augmente la prolifération des cellules de type « C », diminue la neurogenèse et induit un changement morphologique des cellules épendymaires et astrocytaires (Craig et al., 1996; Doetsch et al., 2002; Fallon et al., 2000; Gregg and Weiss, 2003; Kuhn et al., 1997). En outre, si le bFGF favorise la neurogenèse dans le bulbe olfactif et dans l'hippocampe, l'EGF, au contraire, induit une différenciation gliale (Kuhn et al., 1997). L'étude de souris invalidées pour le gène *Tgf- α* démontre que ce facteur de croissance est nécessaire à la prolifération des cellules de la SVZ et à la neurogenèse dans le bulbe olfactif (Tropepe et al., 1997). Plus récemment, les neurégulines 1 et 2 et leur récepteur ErbB4 ont été détectés dans différents types cellulaires de la SVZ. Les perfusions intra-ventriculaires des neurégulines 1 et 2 provoquent une prolifération des progéniteurs neuraux (type « C ») et des cellules souches dans la SVZ ainsi qu'une augmentation de la neurogenèse chez l'adulte le long de la voie RMS/bulbe olfactif (Ghashghaei et al., 2006).

IV.3.2.1.2 Le rôle de l'*Insulin-Like Growth Factor-1* (IGF-1)

IGF-1 est un polypeptide de 70 acides aminés qui possède des caractéristiques structurales similaires à l'insuline. IGF-1 est produit dans de nombreux tissus de l'organisme, notamment dans le cerveau adulte de rat, dans l'hippocampe, le bulbe olfactif, les cellules épendymaires et les cellules épithéliales du plexus choroïde (Dore et al., 1999a; Dore et al., 1999b; Lesniak et al., 1988; Marks et al., 1991a; Marks et al., 1991b). Des souris, sur-exprimant le gène codant l'IGF-1, développent des cerveaux plus gros en taille caractérisés par un plus grand nombre de neurones (Carson et al., 1993; D'Ercole, 1993; D'Ercole, 1996; D'Ercole et al., 1996a; D'Ercole et al., 1996b; Dentremont et al., 1999; O'Kusky et al., 2000; Ye et al., 1996). A l'inverse l'invalidation du gène codant l'IGF-1 provoque un retard dans la croissance cérébrale. Au cours du développement embryonnaire l'IGF-1, *in vitro*, favorise la prolifération des progéniteurs (Arsenijevic et al., 2001; DiCicco-Bloom and Black, 1988; Drago et al., 1991; Learish et al., 2000) du système nerveux central tout en promouvant la spécification neuronale de leur descendance (Anlar et al., 1999; Arsenijevic and Weiss, 1998). Enfin, la maturation neuronale, marquée par une activité électrique et la production de neurotransmetteurs, est également tributaire d'IGF-1 (Torres-Aleman, 1999). Les effets de l'IGF-1 sur la prolifération et la différenciation neuronale sont conservés dans les zones neurogéniques adultes. En effet, l'IGF-1 stimule la prolifération de cellules souches et progénitrices, favorise la neurogenèse dans l'hippocampe chez l'adulte et cet effet est potentialisé par le bFGF (Aberg et al., 2000; Aberg et al., 2003; Anderson et al., 2002). De plus, l'injection sous-cutanée d'IGF-1 dans des rats hypophysectomisés provoque une prolifération des progéniteurs du gyrus denté de l'hippocampe adulte accompagnée d'une augmentation de neurones néo-formés (Aberg et al., 2000). Enfin sur les bases de travaux menés par D'Ercole, montrant qu'IGF-1 joue un rôle dans la biologie des oligodendrocytes au cours du développement (D'Ercole et al., 1996a; D'Ercole et al., 1996b), l'équipe de Gage a mis en évidence qu'IGF-1, *in vitro* et *in vivo*, peut spécifier les progéniteurs multipotents adultes de l'hippocampe dans un lignage oligodendroglial (Hsieh et al., 2004).

IV.3.2.2 Les relations entre la neurogenèse et la signalisation cellulaire

IV.3.2.2.1 La signalisation *Sonic Hedgehog* (Shh)

Shh est un facteur sécrété connu pour son action de ventralisation du tube neural (Jessell and Sanes, 2000). Dans le néo-cortex en développement, Shh régule le comportement de cellules ayant des propriétés de cellules souches (Palma and Ruiz i Altaba, 2004). De ce fait des travaux récents se sont intéressés au rôle de la voie Shh dans le contrôle de la

neurogenèse adulte. Shh augmente la prolifération cellulaire et la neurogenèse dans les zones neurogéniques de la SVZ et de la SGL, et agit en synergie avec l'EGF. Cette voie de signalisation régule l'auto-renouvellement des cellules souches *in vivo* et *in vitro* et contrôle, de ce fait, la production de neurones (Ahn and Joyner, 2005; Lai et al., 2003; Machold et al., 2003; Palma et al., 2005; Palma and Ruiz i Altaba, 2004; Polyak and Hahn, 2006). En outre, un facteur de transcription activé par la voie Shh, Gli1, est exprimé dans les cellules souches et progénitrices de la SVZ et de la SGL (Ahn and Joyner, 2005; Palma et al., 2005; Polyak and Hahn, 2006). Des expériences de perfusions intra-cérébrales d'Ara-C, détruisant les cellules en prolifération, démontrent que la signalisation Shh est directement impliquée dans l'activation des cellules souches quiescentes puisque *Gli1* est activé dans les cellules souches neurales se remettant à proliférer et donneront astrocytes, neurones et oligodendrocytes (Ahn and Joyner, 2005). Cette étude établit clairement, qu'*in vivo*, les cellules souches astrocytaires adultes sont multipotentes et sont capables d'être activées et régulées par la voie Shh.

IV.3.2.2.2 La signalisation Notch

Notch est un récepteur interagissant avec les membres de la famille de ligands Serrate/Jagged (Lindsell et al., 1995). La signalisation Notch est connue pour activer en aval les gènes de la famille *Hairy/Enhancer of Split (Hes,Hey)* (Kageyama and Ohtsuka, 1999). Ces gènes codent des facteurs de transcription Hes de type « bHLH », responsables dans les progéniteurs neuraux de la répression transcriptionnelle de gènes pro-neuraux (Castella et al., 1999; Cau et al., 2000). *Hes1*, un gène cible majeur de la voie Notch, est surexprimé lors de l'activation du récepteur et réprime l'expression de *Mash1*, un gène pro-neural, en se fixant sur son promoteur (Chen et al., 1997). L'activation de la voie Notch inhibe indirectement la différenciation neuronale, *via* l'action inhibitrice de ces facteurs de transcription Hes. De ce fait, des cellules exprimant une forme constitutivement active de Notch se différencient préférentiellement en cellules gliales (Bao and Cepko, 1997; Dorsky et al., 1995; Nye et al., 1994). Des infections rétrovirales du tube neural à E9.5 avec des formes activées de Notch, ont permis l'apparition précoce de la glie radiaire et une production massive d'astrocytes dans la SVZ post-natale au détriment de la neurogenèse (Gaiano et al., 2000; Lardelli et al., 1996). Par la même approche rétroviroïdale au cours de la neurogenèse (E14.5), des injections intraventriculaires ont pour effet d'inhiber la neurogenèse dans la SVZ et le bulbe olfactif en bloquant la prolifération et la différenciation des neuroblastes (Chambers et al., 2001). La même étude révèle que si les infections sont réalisées, au cours de la gliogenèse, en période post-natale dans la SVZ, les cellules infectées se mettent à proliférer et génèrent

préférentiellement des astrocytes. De façon intéressante, Notch et un de ses ligands Jagged sont exprimés au niveau de la SVZ et de la SGL au cours du développement post-natal et chez l’adulte (Irvin et al., 2004; Irvin et al., 2001; Stump et al., 2002). L’étude récente d’un mutant conditionnel de Jagged en période post-natale, a mis en évidence que ce ligand est requis pour la prolifération des cellules de la SVZ. De plus, *in vitro*, Jagged stimule l’auto-renouvellement et le pouvoir neurogénique des cellules souches et participe au maintien de leur multipotence (Nyfeler et al., 2005). Chez l’adulte, la signalisation Notch/Jagged jouerait peut-être un rôle important dans les niches de la SVZ en maintenant l’auto-renouvellement des cellules souches.

IV.3.2.2.3 La voie de signalisation canonique Wnt/β-caténine

Cette voie de signalisation est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire au cours du développement du système nerveux central. Les invalidations de *Wnt1* et de *Wnt3A* conduisent à des malformations du cervelet, de la moelle épinière (Ikeya et al., 1997; McMahon et al., 1992) et à la perte totale de l’hippocampe (Lee et al., 2000). L’observation de ces mutants suggère que ces défauts sont dus à la perturbation de la prolifération des cellules souches et progénitrices de la zone ventriculaire au cours du développement (Dickinson et al., 1994). Des travaux récents sont venus étayer cette hypothèse. En effet, des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de la β-caténine, le médiateur principal de la voie Wnt, dans les précurseurs neuroépithéliaux (sous le contrôle du promoteur du gène *nestine*), présentent une surface corticale plus importante et des ventricules latéraux élargis (Chenn and Walsh, 2002). Ces animaux possèdent une population de cellules précurseurs plus importante due au fait que ces cellules ré-entrent dans un cycle de prolifération au lieu de se différencier. Deux études complémentaires ont montré que les facteurs Wnt favorisent la différenciation neuronale au cours du développement du néo-cortex (Hirabayashi et al., 2004; Muroyama et al., 2004). Une étude portant sur l’hippocampe adulte a établi la présence des composantes de la voie Wnt et du facteur Wnt3a dans le gyrus denté et leur rôle dans la régulation de la neurogenèse. *In vitro*, des expériences de co-cultures d’astrocytes et de cellules souches de l’hippocampe montrent que le facteur Wnt3A favorise la différenciation neuronale. En revanche, l’utilisation d’inhibiteurs de cette voie Wnt diminue la neurogenèse *in vitro* et l’abolit *in vivo* (Lie et al., 2005). La voie Wnt joue donc un rôle prépondérant au niveau du gyrus denté où elle régule la production et la différenciation de neurones de l’hippocampe chez l’adulte.

IV.3.2.3 Les composantes cellulaires des niches neurogéniques de la SVZ

IV.3.2.3.1 Les cellules épendymaires dans la neurogenèse

Les cellules épendymaires, cellules ciliées bordant la lumière du ventricule latéral, sont parties prenantes des niches neurogéniques de la SVZ. Ces cellules produisent la protéine Noggin (Lim et al., 2000) qui joue, en se fixant aux *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), un rôle antagoniste en empêchant leur fixation sur leurs récepteurs (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1997). Au cours du développement embryonnaire, les BMPs jouent un rôle d'inducteur de la différenciation gliale, au détriment de la neurogenèse (Gross et al., 1996; Shou et al., 1999). Les cellules de la SVZ adulte sécrètent des BMPs et expriment leurs récepteurs, ce qui rend primordiale la sécrétion de Noggin par les cellules épendymaires pour générer un microenvironnement favorable à la neurogenèse et à la différenciation neuronale dans cette région. En effet, si la surexpression de BMPs dans la zone sous-épendymaire réduit la prolifération des cellules de la SVZ et abolit la genèse de neuroblastes, l'expression ectopique de *Noggin* favorise la différenciation neuronale de cellules de la SVZ transplantées dans le striatum (région non neurogénique) (Lim et al., 2000). Noggin apparaît donc comme un facteur neurogénique important.

Plus récemment, un autre facteur sécrété par les cellules épendymaires a été identifié, le PEDF (*Pigment Epithelium Derived Factor*) (Ramirez-Castillejo et al., 2006). Ce facteur a été initialement purifié à partir de cellules épithéliales pigmentaires de rétine humaine et caractérisé comme un facteur de différenciation de cellules de rétinoblastomes (Steele et al., 1993; Tombran-Tink et al., 1991). L'introduction de ce facteur dans la SVZ promeut la prolifération des cellules de type « B » et la neurogenèse en découlant. *In vitro*, le PEDF favorise l'auto-renouvellement des cellules souches (Ramirez-Castillejo et al., 2006). Les sécrétions des facteurs Noggin et PEDF par les cellules épendymaires sont donc importantes pour l'auto-renouvellement des cellules souches et primordiales dans la régulation des niches neurogéniques de la SVZ (Lim et al., 2000; Ramirez-Castillejo et al., 2006).

IV.3.2.3.2 Les cellules astrocytaires dans la neurogenèse

Les astrocytes, traditionnellement considérés comme des cellules de soutien, sont abondants dans le système nerveux central adulte et s'avèrent, fonctionnellement et structuralement, être de bons candidats pour la régulation de microenvironnements locaux (Ma et al., 2005; Nedergaard et al., 2003). Des expériences de co-cultures montrent que les astrocytes, issus de cerveaux de nouveaux nés ou d'hippocampes adultes, sont capables d'induire la prolifération des cellules souches neurales de la SVZ et de la SGL adulte, et de

promouvoir leur différenciation neuronale (Lim and Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002). Les cellules souches (de nature astrocytaire) et progénitrices de la SVZ sont capables d'exprimer également des molécules de signalisation de type éphrine et leur récepteur à activité tyrosine kinase Eph. L'injection intra-ventriculaire d'éphrine B2 provoque une prolifération astrocytaire accrue dans la SVZ (Conover and Allen, 2002; Conover et al., 2000). Des travaux complémentaires portant sur ces deux classes de molécules, nécessitant des contacts cellule-cellule, prouvent qu'elles peuvent intervenir dans la régulation des « niches » de la SVZ en jouant sur la prolifération des cellules souches et/ou progénitrices qui se répercute sur la neurogenèse adulte (Holmberg et al., 2005; Ricard et al., 2006).

IV.3.2.3.3 Les cellules endothéliales dans la neurogenèse

La SVZ a bien été décrite et fait état d'une forte vascularisation, plaçant ainsi les vaisseaux sanguins au rang d'éléments importants de ce microenvironnement particulier (Doetsch, 2003; Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1997). En outre, les cellules de la SVZ sont séparées des cellules endothéliales et des péricytes, composantes des vaisseaux sanguins, par une lame basale particulière qui permet de séquestrer différents facteurs et molécules utiles à la régulation de cette niche (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Li et al., 2006; Mercier et al., 2002). Au niveau de l'hippocampe, les cellules souches et/ou progénitrices se localisent également dans des régions périvasculaires (Palmer, 2002; Palmer et al., 2000; Wurmser et al., 2004). La proximité des cellules souches et progénitrices et des cellules endothéliales au niveau des deux zones de neurogenèse chez l'adulte suggère une communication éventuelle entre ces deux types cellulaires. L'une des premières preuves est la division spatialement et temporellement coordonnée, au niveau de capillaires de la SGL du gyrus denté, entre des cellules exprimant des marqueurs endothéliaux et des cellules exprimant des marqueurs neuraux (neurones et glie) (Palmer et al., 2000). De plus, l'angiogenèse et la neurogenèse peuvent être conjointement régulées par les mêmes facteurs tels que le bFGF, IGF-1 ou le TGF- α (Doetsch, 2003). La mise en place de leur réseau respectif présente de nombreuses similarités (Carmeliet, 2003a; Carmeliet, 2003b; Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005; Eichmann et al., 2005; Mukouyama et al., 2005; Mukouyama et al., 2002; Weinstein, 2005). Sur la base de ces observations, un concept de guidage mutuel a été proposé qui permettrait d'expliquer l'alignement des nerfs et des vaisseaux sanguins chez l'adulte (Carmeliet, 2003a; Carmeliet, 2003b; Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005). Un lien entre la vasculogenèse et la neurogenèse a clairement été établi dans le cerveau adulte de canaris (Louissaint et al., 2002). Les cellules endothéliales sécrètent plusieurs facteurs pouvant jouer des rôles sur la

prolifération, la différenciation et/ou la survie de neurones (Doetsch, 2003; Jin et al., 2002; Li et al., 2006; Palmer et al., 2000; Shen et al., 2004). Des co-cultures de cellules endothéliales et de cellules souches/progénitrices, issues de cortex de souris embryonnaires, montrent que les facteurs endothéliaux stimulent l'auto-renouvellement des cellules souches et la neurogenèse (Shen et al., 2004). L'un des facteurs sécrétés le plus connu et le plus étudié est le VEGF. Ce dernier et ses récepteurs sont exprimés dans des neurosphères adultes issues de différentes régions neurogéniques, comme l'hippocampe, la SVZ et le bulbe olfactif (Galvan et al., 2006; Maurer et al., 2003), voir article n°1). L'injection intra-ventriculaire de VEGF augmente la prolifération des cellules de la SVZ et de la SGL (Jin et al., 2002). Le VEGF stimulate la prolifération des cellules progénitrices neurales *in vitro* et *in vivo* dans la SVZ et la SGL de rats et de souris adultes et favorise ainsi la neurogenèse (Jin et al., 2002; Schanzer et al., 2004; Sun et al., 2006). En revanche, des souris *vegf-b* *-/-* ne présentent plus de neurogenèse dans ces deux régions (Sun et al., 2006). En outre, le VEGF est capable de jouer le rôle de chimio-attractant pour les progéniteurs neuraux (Zhang et al., 2003), de facteurs neurotrophiques (Silverman et al., 1999) en conditions physiologiques au cours du développement (Le Bras et al., 2006), et de bloquer l'activité des caspases en conditions pathologiques. Dernièrement, l'isolation de cellules endothéliales de la SVZ a montré qu'elles sécrètent également le PEDF qui va favoriser l'auto-renouvellement des cellules souches dans cette région (Ramirez-Castillejo et al., 2006).

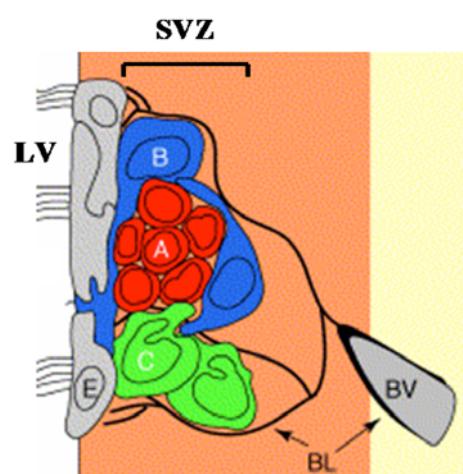


Figure 11 : Niche de la SVZ adulte (d'après (Alvarez-Buylla and Lim, 2004))

La niche de la SVZ adulte se compose d'un groupe de cellules (épendymaires, astrocytes, endothéliales) interagissant entre elles et/ou avec la matrice extracellulaire (membrane basale, BL). Cette niche génère tout un ensemble de facteurs extrinsèques, incluant des molécules régulatrices, de voies de signalisation et des facteurs de croissance, qui contrôlent la prolifération, la différenciation, l'activation, le devenir et la migration des cellules souches neurales. BV : vaisseaux sanguins, VL : ventricule latéral, SVZ : zone sous-ventriculaire.

IV.3.3 Les mécanismes moléculaires régulant la migration et la différenciation neuronale le long de la RMS et dans le bulbe olfactif

Les cellules souches neurales adultes sont régulées intrinsèquement et extrinsèquement dans les zones neurogéniques de la SVZ et de la SGL chez l'adulte de façon à maintenir la production de neurones tout au long de la vie d'un individu. Les cellules souches se divisent de façon asymétrique pour générer une cellule souche fille et une cellule progénitrice intermédiaire hautement proliférante. Ces cellules se transforment ensuite en précurseurs neuronaux qui migrent, soit localement dans le gyrus denté de l'hippocampe vers la couche granulaire de neurones, soit sur de longues distances (5 à 8 mm chez les rongeurs) le long de la RMS vers le bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones. Ces migrations « unidirectionnelles » reposent sur l'intégration de plusieurs signaux incluant des molécules sécrétées et/ou des molécules matricielles. A l'heure actuelle, tous les mécanismes permettant de réguler ces phénomènes migratoires ne sont pas clairement élucidés.

Nous ne développerons pas ici ce qui se passe au niveau du gyrus denté de l'hippocampe adulte. Une observation récente a décrit que les neurones immatures nouvellement formés, migrant localement pour rejoindre la couche granulaire, se localisent à proximité des extensions radiales d'astrocytes (Seri et al., 2004). De ce fait, l'hypothèse d'un phénomène migratoire utilisant la glie radiale, similaire à celui observé dans la mise en place du cortex au cours du développement, a été suggérée.

En revanche, tout semble bien plus compliqué, dans l'acheminement des neuroblastes de la SVZ vers le bulbe olfactif (BO). Les niches de la SVZ sont responsables de la production de neuroblastes. Ces derniers entreprennent un long voyage et sont confrontés à de nombreux facteurs qui permettent leur maintien dans un état indifférencié et leur migration rostrale coordonnée. Les neuroblastes migrent tangentiellement et de façon rostrale, sous forme de chaînettes, dans des tunnels formés par des prolongements astrocytaires le long de la RMS pour rejoindre le bulbe olfactif. A ce niveau, ils adoptent une migration radiale pour coloniser les différentes couches d'interneurones olfactifs où ils se différencieront. Le comportement de ces cellules va donc dépendre également de facteurs environnementaux.

IV.3.3.1 Les molécules d'adhérences et matricielles dans la régulation de la neurogenèse adulte

IV.3.3.1.1 La protéine NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) et son résidu acide poly-sialylé (PSA)

Cette molécule appartient à la super famille des Immunoglobulines (Ig) très largement étudiée pour son rôle régulateur des interactions cellule-cellule et cellule-substrat. Dans la SVZ et le long de la RMS, cette molécule est caractéristique des neuroblastes en migration au cours du développement et chez l'adulte (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch et al., 1999a). Les souris *NCAM* -/- présentent une réduction du bulbe olfactif chez l'adulte (Cremer et al., 1994). Ce phénotype est la conséquence de défauts dans la migration des précurseurs neuronaux de la RMS qui s'accumulent et provoquent des élargissements tout au long de cette voie (Chazal et al., 2000). De plus, une forme poly-sialylée (PSA)-NCAM existe. Son expression est spatialement et temporellement régulée au cours du développement et au cours de régénérations du système nerveux central aux niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels (Bruses and Rutishauser, 1998; Bruses and Rutishauser, 2001; Gallagher et al., 2001). Des souris ayant perdu la forme poly-sialylée de la molécule NCAM révèlent une atrophie du bulbe olfactif attribuée à la réduction de la migration des neuroblastes (Chazal et al., 2000; Tomasiewicz et al., 1993). Des travaux, *in vitro*, combinant des explants de la SVZ et des inhibitions enzymatiques, démontrent que le résidu PSA potentialise la migration des cellules sortant d'explants de la SVZ (Hu et al., 1996; Ono et al., 1994). L'ensemble de ces études « perte de fonction » révèle que la molécule PSA-NCAM est un facteur permissif pour la migration des neuroblastes (Durbec and Cremer, 2001). L'expression de ce résidu « PSA » décroît dans de nombreux tissus après la naissance mais persiste chez l'adulte dans les principales zones neurogéniques du cerveau, la SVZ, la RMS et l'hippocampe. L'état polysialylé engendre une action qui potentialise la migration cellulaire mais qui réduit la rapidité de différenciation (Charles et al., 2000; Charles et al., 2002; Zhang et al., 2004). Si une approche « gain de fonction » est réalisée, basée sur la surexpression de la forme PSA-NCAM, on constate une augmentation de la migration des cellules mais une réduction de la rapidité de différenciation (Franceschini et al., 2004).

IV.3.3.1.2 Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères de sous-unités α et β qui fonctionnent conjointement pour interagir avec des molécules de la matrice extracellulaire et réguler les interactions cellule-substrat qui conditionnent la migration cellulaire. Ces molécules

interviennent dans le guidage d'un grand nombre de cellules, notamment des précurseurs neuraux au cours du développement (Bronner-Fraser, 1993; Galileo et al., 1992). Des travaux portant sur l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ démontrent qu'au contact de la laminine, substrat préférentiel de cette intégrine, les cellules de neurosphères issues de la SVZ de rats nouveaux nés, migrent plus rapidement (Jacques et al., 1998). Les neuroblastes de la RMS expriment l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ et le contact avec la laminine s'avère nécessaire, *in vivo*, pour le bon acheminement des neuroblastes le long de la RMS (Emsley and Hagg, 2003). De façon intéressante, les laminines entrent dans la composition de membranes basales notamment celles présentes au niveau des vaisseaux sanguins omniprésents dans les niches neurogéniques de la SVZ (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Doetsch, 2003; Mercier et al., 2002).

IV.4 Les différents acteurs modulant la neurogenèse adulte

Le concept prédominant, pour expliquer ce phénomène migratoire des neuroblastes, est la dichotomie entre des facteurs répulsifs présents au niveau de la SVZ pour permettre aux neuroblastes de quitter cette zone et des facteurs attractants sécrétés au niveau du bulbe olfactif pour attirer ces cellules. Cependant, il est évident qu'au cours de leur migration entre ces deux compartiments cellulaires, les neuroblastes vont être soumis à d'autres facteurs qu'il leur faudra intégrer pour une migration et une neurogenèse optimale.

IV.4.1 Le système Slit-ROBO

Les protéines Slit sont des molécules sécrétées qui participent à de nombreux aspects du développement du SNC, notamment le guidage axonal (Nguyen-Ba-Charvet and Chedotal, 2002; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002; Nguyen Ba-Charvet et al., 1999) et la migration neuronale (Marin et al., 2003; Zhu et al., 1999). Le septum et le plexus choroïde sécrètent des molécules capables de repousser les neuroblastes de la SVZ (Hu and Rutishauser, 1996). Les molécules Slit1 et Slit2 exprimées dans cette région miment cet effet répulsif (Hu, 1999; Wu et al., 1999). L'analyse phénotypique du KO *Slit1* -/- révèle, *in vitro*, une migration anormale des cellules sortant de neurosphères (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004). Les molécules Slits se fixent sur des récepteurs transmembranaires de la famille Roundabout (ROBO). Cette voie de signalisation Slit/ROBO est impliquée dans la migration neuronale. En effet, suite à une stimulation Slit, le récepteur ROBO interagit avec des protéines hydrolysant le GTP (GAP) qui inactivent la protéine Cdc42, un important régulateur du cytosquelette. Des infections rétrovirales d'explants de la SVZ de rats nouveaux nés avec des formes dominantes négatives de GAP et des formes constitutivement actives de la

protéine Cdc42 montrent une altération de la réponse répulsive des cellules de la SVZ (Wong et al., 2001).

IV.4.2 Le système éphrine-Eph

Ces deux classes de protéines ont des fonctions régulatrices dans le guidage axonal et sont exprimées par les cellules de la SVZ. Les injections intra-ventriculaires d'éphrine B2 ou de son récepteur EphB2 abolissent la migration neuronale au profit d'une augmentation de la division cellulaire dans la SVZ. Ce phénotype, matérialisé par des amas cellulaires dans la SVZ, peut s'expliquer par la combinaison d'une augmentation de la prolifération cellulaire dans la SVZ et/ou d'une accumulation de cellules dans cette région due à une migration défective des neuroblastes (Conover et al., 2000).

IV.4.3 Les neurégulines (NRG) et le récepteur ErbB4

Les récepteurs ErbB appartiennent à la famille des récepteurs à l'EGF et peuvent être activés par les neurégulines. Ces NRG prennent part à la migration radiaire des précurseurs neuronaux dans le cervelet et le cortex *via* respectivement les récepteurs ErbB4 et ErbB2 au cours du développement (Anton et al., 2004; Anton et al., 1997; Rio et al., 1997; Schmid et al., 2003). Des recherches plus récentes se sont focalisées sur le rôle du récepteur ErbB4 et de ses ligands, les NRG 1 et 2 dans l'organisation de la SVZ et dans la migration neuronale chez l'adulte (Anton et al., 2004; Ghashghaei et al., 2006). *ErbB4* est fortement exprimé dans la SVZ adulte ainsi que dans la RMS. Des souris transgéniques présentant des invalidations conditionnelles pour le gène *ErbB4* dans les cellules exprimant la nestine ou la GFAP, présentent toutes deux des défauts notoires dans l'organisation et la migration des neuroblastes le long de la RMS et dans le positionnement et la différenciation des interneurones dans le bulbe olfactif (Anton et al., 2004). En outre, les neurégulines 1 et 2 sont exprimées par les neuroblastes de la SVZ adulte. Si la perfusion intra-ventriculaire de la NRG1 désorganise la migration des neuroblastes le long de la RMS, la perfusion de NRG2, au contraire favorise la migration neuronale et la production d'interneurones GABAergiques dans le bulbe olfactif. Cette activité de la NRG2 stimulant la neurogenèse adulte est dépendante du récepteur ErbB4 (Ghashghaei et al., 2006).

IV.4.4 Les astrocytes de la RMS et le neurotransmetteur GABA

Au cours de la neurogenèse, les précurseurs neuronaux sont en étroits contacts avec les astrocytes dans la SVZ, le long de la RMS et dans le gyrus denté (Alvarez-Buylla and Lim,

2004; Seri et al., 2001). Jusqu'à récemment, aucune fonction régulatrice n'avait clairement été démontrée pour les astrocytes engainant les neuroblastes en migration le long de la RMS chez la souris (Wichterle et al., 1997) ou chez le lapin (Luzzati et al., 2003). Cependant, il s'avère que les neuroblastes en migration expriment des récepteurs au GABA, un neurotransmetteur abondant dans la RMS (Bolteus and Bordey, 2004; Wang et al., 2003). En période post-natale, le GABA réprime la prolifération de précurseurs neuronaux (Nguyen et al., 2003). Des études utilisant des coupes saggittales de cerveau révèlent que le blocage de récepteurs au GABA augmente la vitesse de migration des neuroblastes. De plus, les astrocytes présents le long de la RMS expriment des transporteurs (GAT4) capables de capturer le GABA. Des expériences augmentant, d'une part, le relargage de GABA et, d'autre part, inhibant la capture de GABA par les astrocytes, aboutissent à une diminution de la vitesse de migration des neuroblastes (Bolteus and Bordey, 2004). Cette étude démontre, pour la première fois, un rôle des astrocytes dans la régulation du taux de GABA le long de la RMS qui se répercute sur la vitesse d'acheminement des neuroblastes vers le bulbe olfactif.

IV.4.5 Les facteurs chimio-attractants du bulbe olfactif (BO)

Conceptuellement, il est difficile d'envisager que seules des molécules répulsives soient capables de guider les précurseurs neuronaux de la SVZ jusqu'au BO d'autant plus qu'aucune donnée ne permet de l'affirmer et que l'activité répulsive des molécules Slit semble limitée (Wu et al., 1999). Des facteurs attractants prendraient le relais et/ou coopéreraient avec d'autres facteurs pour réguler cette migration neuronale mais ces hypothèses restent encore très controversées. Les premières études montraient, qu'en l'absence de bulbe olfactif, les neuroblastes étaient capables de se diviser et de migrer normalement (Kirschenbaum et al., 1999). Avec la même approche, il s'avère que la migration des précurseurs neuronaux est ralentie (Liu and Rao, 2003). Dernièrement, la Prokineticine2 (PK2) ayant une activité chimio-attractante a été identifiée comme un facteur sécrété par les cellules présentes dans les couches granulaires et périglomérulaires du bulbe olfactif (Ng et al., 2005). Néanmoins, cette molécule semble avoir une activité plutôt locale dans l'organisation générale du bulbe olfactif et pourrait s'avérer importante dans la migration radiaire des neuroblastes dans le bulbe.

IV.4.6 Les facteurs agissant sur le détachement et la migration radiaire des neuroblastes dans le bulbe olfactif

A leur arrivée dans le bulbe olfactif les neuroblastes reçoivent deux sortes de signaux. Dans un premier temps, ils se détachent des chaînettes formées le long de la RMS et dans un second temps, ils entament une migration radiaire vers les couches d'interneurones olfactifs où ils se différencieront. Deux protéines de la matrice extracellulaire ont été impliquées dans la régulation de ces phénomènes.

Au cours du développement post-natal, l'étude de souris « *Reeler* » dont le gène *Reelin* a été invalidé, une glycoprotéine sécrétée par les cellules mitrales, révèle une accumulation de neuroblastes au niveau du bulbe olfactif et une migration radiaire altérée. *In vitro*, à partir d'explants, la Reelin favorise la migration des neuroblastes en cellules individualisées (Hack et al., 2002). La Reelin serait donc un facteur permettant le détachement des neuroblastes des chaînettes et servirait de molécule de guidage par la suite pour que les neuroblastes regagnent les couches d'interneurones olfactifs. La Tenascine-R exprimée par les cellules des couches granulaires va cibler le changement de mode de migration des neuroblastes. En effet, des injections ectopiques de cellules transfectées avec la Tenascine-R déroutent les progéniteurs neuronaux de leur voie naturelle. A l'inverse, les souris *Tenascine-R -/-* montrent un nombre moins important de neurones dans le bulbe olfactif dû à un mauvais acheminement des précurseurs neuronaux (Saghatelyan et al., 2004).

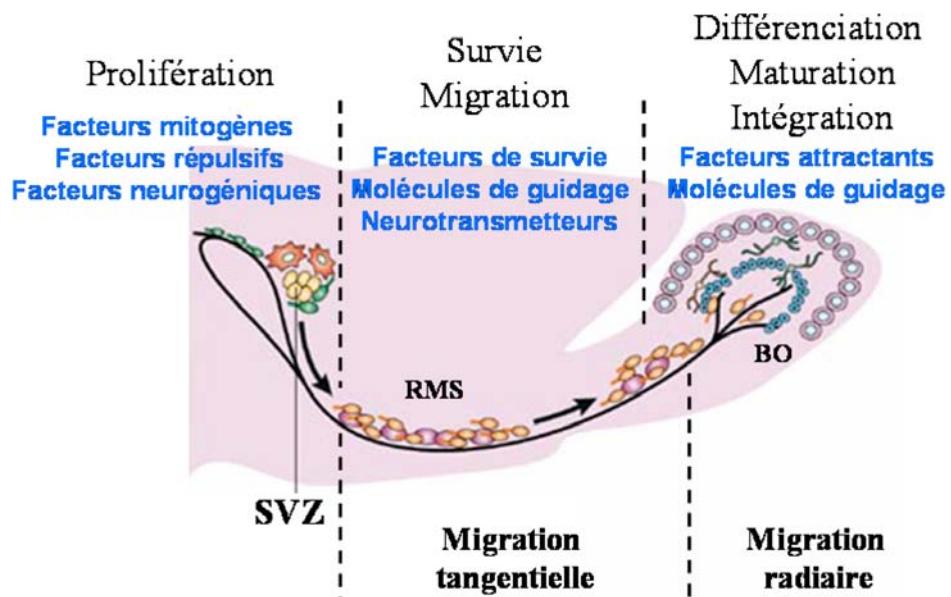


Figure 12 : Synthèse des différentes familles de facteurs régulant la neurogenèse adulte (d'après (Vescovi et al., 2006))

Dans la SVZ adulte, le microenvironnement des cellules souches neurales fournit des facteurs extrinsèques qui permettent un maintien de la prolifération et la genèse de neuroblastes qui quittent ensuite la SVZ pour rejoindre la voie de migration rostrale (RMS). Le long de cette voie tangentiale, les neuroblastes migrent sous forme de chaînettes dans des tunnels formés par des cellules astrocytaires. Ces cellules intègrent de nombreux signaux qui permettent leur survie et leur bon acheminement vers le bulbe olfactif (BO). A ce niveau, les neuroblastes se détachent un à un de ces chaînettes et entament une migration radiaire vers les couches d'interneurones olfactifs où ils se différencient et s'intègrent dans l'épithélium olfactif.

Toutes ces données démontrent que la neurogenèse adulte est un phénomène complexe faisant intervenir une grande diversité de facteurs modulateurs, inducteurs, répresseurs dictés par les cellules présentes dans les zones neurogéniques. L'identification, la caractérisation et la compréhension de tous ces mécanismes moléculaires sont importantes pour espérer, un jour, pouvoir exploiter au mieux toutes les capacités des cellules souches et progénitrices en médecine régénérative.

V. Un cas pathologique du système nerveux central : les tumeurs cérébrales

V.1 Généralités sur le cancer

Le développement de pathologies cancéreuses est décrit comme la conséquence d'une accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques conduisant à la prolifération non contrôlée de certaines cellules. L'étude des bases moléculaires de la tumorigenèse a permis d'établir que ces modifications géniques se traduisent par une dérégulation de l'équilibre entre les voies de signalisation qui contrôlent le cycle cellulaire et celles régulant la mort cellulaire (apoptose). Une cellule de l'organisme peut subir des mutations géniques menant d'une part à l'expression de la version oncogénique de certains gènes, et d'autre part à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (voir figure 13). Ces événements se traduisent par une rupture de l'équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire et conduisent à l'acquisition d'un potentiel de réPLICATION illimité, rendant à ce titre la cellule cancéreuse.

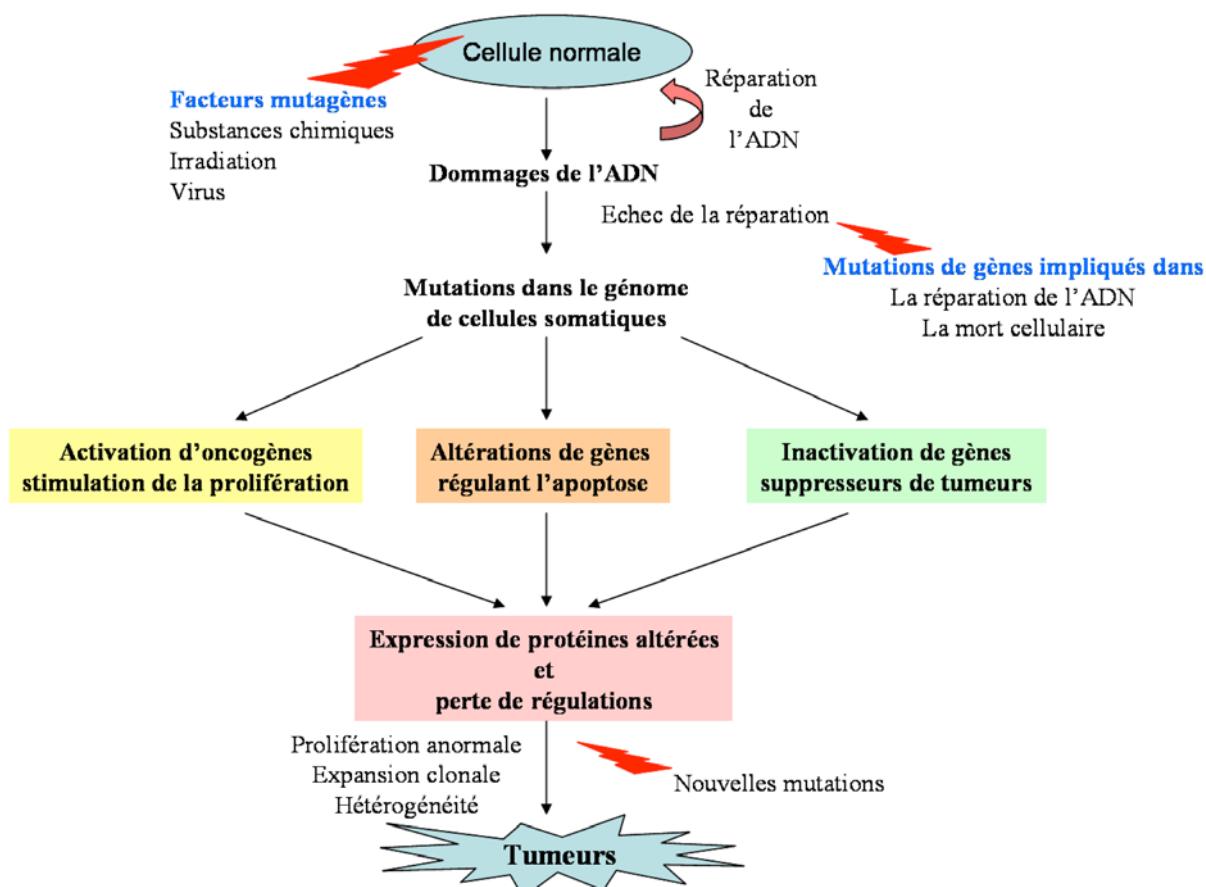


Figure 13 : La cancérisation d'une cellule

Une cellule normale de l'organisme peut être l'objet d'attaques d'agents mutagènes de l'environnement. Ces agents induisent des dommages de l'ADN qui seront ou non réparés. Si des mutations interviennent au niveau de gènes régulant le cycle cellulaire et l'apoptose, la cellule ne pourra pas réparer ses dommages ni être éliminée. Ces mutations seront la source de dérégulations de processus tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Les conséquences seront l'acquisition d'un potentiel de réPLICATION illimitée, non contrôlée et conduiront à la formation de tumeurs.

V.2 Les tumeurs cérébrales

La dernière décennie a connu des progrès considérables dans la compréhension de phénomènes physiologiques et pathologiques du système nerveux central. La révolution de l'imagerie cérébrale a profondément modifié l'approche thérapeutique des tumeurs cérébrales car elle a permis la localisation précise du siège tumoral, et la mise en place de thérapies plus ciblées. Le problème demeure la prédition de ces cancers invalidants qui, comme toutes pathologies du système nerveux, manifestent des symptômes caractéristiques alors que les dégâts sont, la plupart du temps, déjà importants. Bien que les mécanismes fondamentaux de l'oncogenèse commencent à être élucidés, il subsiste encore bien des mystères concernant l'origine et les causes de ce type de tumeurs. Les tumeurs cérébrales font parti des types de cancers les plus agressifs et les plus difficiles à soigner. Leur nombre semble en augmentation avec environ 3000 à 5000 nouveaux cas toutes les années mais de nombreux spécialistes s'accordent à dire que ces résultats sont dûs à une meilleure détection. Les conséquences fonctionnelles qu'occasionnent une tumeur explique la nécessité de trouver des thérapies plus efficaces et adaptées. Seulement, la découverte de ce genre de tumeurs est bien souvent le fruit du hasard au regard de certains symptômes ou lors d'exams de contrôle. De ce fait, la plupart du temps, un grand nombre d'altérations génétiques et/ou chromosomiques sont venues s'ajouter aux mutations pré-existantes laissant ainsi de grands doutes quant à la nature de la cellule originelle touchée et aux premiers événements cellulaires qui ont conduit à la transformation cellulaire. Le développement de thérapies plus efficaces nécessite la compréhension des bases moléculaires et cellulaires de l'initiation, du développement et du fonctionnement tumoral (Philippon, 2004).

V.2.1 La problématique de la classification histologique et le « grading » des tumeurs neuro-épithéliales

Les tumeurs cérébrales se réfèrent à une collection de néoplasmes qui ont une biologie, un pronostic et un traitement propre permettant de les classifier, les répertorier et éventuellement de les traiter. En effet, une classification de ces cancers a été établie sur la base de critères tomographiques mais aussi morphologiques et histologiques des cellules composant la masse tumorale. L'examen histologique reste encore aujourd'hui indispensable aussi bien sur le plan du diagnostic que sur l'évaluation pronostique des tumeurs du système nerveux (Philippon, 2004). La mise au point de biopsies stéréotaxiques, beaucoup moins invasives que les techniques opératoires antérieures, a permis d'améliorer et d'affiner le diagnostic tumoral. Ces prélèvements sont ensuite analysés par l'anatomo-pathologiste qui, en

concertation avec l'équipe médicale, détermine le type de tumeurs en présence et le traitement à engager. Si le plus souvent les colorations et les techniques de microscopie optique suffisent, il est parfois nécessaire de recourir à des techniques immunohistochimiques et à la microscopie électronique pour affiner l'analyse.

De nombreuses corrélations ont déjà été réalisées entre le siège et la nature d'une tumeur mais laissent encore une incertitude que ne permet pas toujours d'éviter l'examen histologique. La faiblesse réside dans l'absence de critères histologiques stables et reproductibles. Une représentation simplifiée de la classification des différents types de tumeurs dérivés du neuroépithélium est présentée dans le tableau 1. Une première classification histologique des tumeurs cérébrales a été publiée en 1926 par Bailey et Cushing (Philippon, 2004). Les bases de ce travail reposaient sur un concept particulier de la « théorie des restes embryonnaires » de Cohnheim (milieu du XIXème siècle) (Cohnheim, 1875) qui stipulait que le développement tumoral se fait à partir de cellules embryonnaires arrêtées à différents stades de leur développement. De plus, les observations de Bailey et Cushing montraient que les cas pour lesquels la durée de vie des patients était la plus longue étaient ceux dont les tumeurs étaient les plus différenciées. Depuis 80 ans maintenant, ce système de classification de tumeurs n'a pas été fondamentalement modifié.

GLIOMES	Tumeurs épendymaires
Tumeurs astrocytaires	
Astrocytomes diffus (grade II)	Ependymomes (grade II)
Astrocytomes anaplasiques (grade III)	Ependymomes anaplasiques (Grade III)
Glioblastomes (grade IV)	
Tumeurs oligodendrogliales	Tumeurs des plexus choroïdes
Oligodendrogliome (grade II)	Tumeurs gliales d'origine incertaine
Oligodendrogliome anaplasique (Grade III)	Tumeurs neuronales et tumeurs mixtes
	neurono-gliales
Gliomes mixtes	Tumeurs neuroblastiques
Oligoastrocytome	Tumeurs du parenchyme pinéal
Oligoastrocytome anaplasique	Tumeurs embryonnaires
	Médulloblastomes
	Tumeur neuro-ectodermique primitive
	supratentorielle (PNET)
	Neuroblastomes

Tableau 1 : Classification simplifiée des tumeurs neuro-épithéliales (d'après (Kleihues and Sabin, 2000) (OMS), 2000)
Ce tableau de classification met en évidence la prépondérance des gliomes avec leurs différentes sous-classes tumorales. Les caractères gras représentent des sous-groupes de néoplasmes qui comprennent également d'autres sous-types tumoraux (caractères simples).

Un outil supplémentaire a fait sensiblement évoluer cette classification : le « grading ». Ce concept repose sur la théorie de l'anaplasie (dédifférenciation) : la dédifférenciation des cellules normales donneraient naissance aux cellules tumorales. Chaque type tumoral a donc bénéficié de ce système de graduation. Il s'échelonne du grade I au grade IV en fonction de la malignité tumorale et repose sur l'analyse de critères facilement évaluables tels que l'index mitotique, le pourcentage de cellules indifférenciées, l'étendue de la nécrose, les atypies nucléaires, le degré de polymorphisme et l'importance de la prolifération vasculaire (tableau 2). Ces moyens d'évaluations pronostiques permettent le regroupement de certains patients présentant des pathologies comparables et la prise de décisions dans les choix thérapeutiques.

Critères	Atypies nucléaires	Mitoses	Prolifération endothéliale	Nécroses
Grades				
I	-	-	-	-
II	+	-	-	-
III	+	+	-	-
IV	+	+	+	+

Tableau 2 : Le grade (« grading ») des tumeurs cérébrales
La malignité des tumeurs, s'échelonnant d'un grade I à IV, est examinée sur la base de différents critères que sont les atypies nucléaires, l'index mitotique, la prolifération endothéliale et la présence de foyers nécrotiques.

La classification histologique de ces tumeurs reste un vrai « casse-tête » du fait d'un nombre important d'entités tumorales identifiées et du fait du nombre important d'observateurs ayant des critères d'évaluation différents. En outre, aucune prédiction sûre de l'évolution de la maladie ne semble envisageable car des tumeurs ayant des critères histologiques communs peuvent contenir des altérations génétiques et des anomalies chromosomiques différentes. Les limites de l'examen prennent tout leur sens et montrent l'ampleur des espoirs fondés sur les avancées de la cytogénétique et de la biologie moléculaire (Philippon, 2004).

V.2.2 Les gliomes : une sous-classe de tumeurs neuro-épithéliales

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes chez l'Homme et constituent un groupe de néoplasmes très hétérogène par rapport à leur apparence morphologique, leur comportement biologique, leurs altérations génétiques, leur réponse aux thérapies et leur devenir clinique. Pour toutes ces raisons, les gliomes ont fait l'objet du plus

grand nombre d'études ces dernières années. Ils sont classés grossièrement en trois sous-groupes, en fonction de leurs critères histologiques, morphologiques et en fonction de la population cellulaire majoritairement présente au sein de la masse tumorale. On distingue donc les astrocytomes, les oligodendrogiomes et les gliomes mixtes. Les oligodendrogiomes (oligodendrogiomes et oligoastrocytomes mixtes) représentent 5 à 18 % de l'ensemble des gliomes (Tews et al., 2006). Les astrocytomes font donc partie des néoplasmes les plus fréquents avec une prépondérance pour la forme la plus maligne, le glioblastome (GBM). La durée médiane de survie des patients porteurs de ce type de tumeur se situe entre 9 et 12 mois. Depuis 50 ans, aucun progrès thérapeutique significatif n'a été enregistré. En effet, si certains types d'oligodendrogiomes, présentant des délétions des régions chromosomiques 1p et 19q, s'avèrent sensibles à la chimiothérapie, il n'en est rien pour les tumeurs astrocytaires (Ohgaki, 2005; Ohgaki et al., 2004). Il est donc important d'identifier des marqueurs ou des mutations spécifiques de gènes qui permettraient de discriminer les différents types de gliomes afin de développer des thérapies plus ciblées et par là même plus efficaces (Koschny et al., 2002; Ohgaki and Kleihues, 2005a; Ohgaki and Kleihues, 2005b). La caractérisation de gènes ou régions chromosomiques mutés ou perdus dans chaque type tumoral permettra, à terme, de comprendre les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation touchés dans le processus de cancérisation et d'envisager de nouvelles pistes et de nouvelles cibles thérapeutiques.

V.2.2.1 Vers une classification moléculaire des gliomes

Des études reposant sur des techniques d'analyse d'expression génique, ont permis d'établir des signatures distinctives entre gliomes (Brat et al., 2004; Fuller and Perry, 2005; Fuller et al., 2002; Huang et al., 2004; Ichimura et al., 2004; Nataf et al., 2005; Perry, 2001; Rickman et al., 2001; Sallinen et al., 2000a; Sallinen et al., 2000b; Sanson et al., 2003; Sanson et al., 2002; Sanson et al., 2004) et de déterminer un jeu de marqueurs spécifiques permettant de diagnostiquer le type et le stade tumoral ainsi que la survie moyenne du patient (Freije et al., 2004; Fuller and Perry, 2005; Mischel et al., 2004; Ohgaki and Kleihues, 2005b; Okamoto et al., 2004; Rich et al., 2005; Watson et al., 2001; Yeh et al., 2002). Du fait de l'hétérogénéité des populations de patients étudiées certains résultats sont flous, ininterprétables voire contradictoires selon les cas. Des études cytogénétiques ont permis d'affiner ces résultats en identifiant les différentes pertes, gains ou anomalies chromosomiques caractéristiques d'un type tumoral donné. Les oligodendrogiomes semblent ainsi caractérisés par la perte des portions chromosomiques 1p et 19q qui leur confèrent une chimio-sensibilité (Bigner et al.,

1999a; Bigner et al., 1999b; Brat et al., 2004; Dong et al., 2004; Fallon et al., 2004; Fuller and Perry, 2005; Huang et al., 2004; Kitange et al., 2001; Law et al., 2005; McLendon et al., 2005; Ohgaki and Kleihues, 2005b; Perry, 2001; Raghavan et al., 2003; Smith et al., 1999; Tews et al., 2006; Walker et al., 2004; Walker et al., 2005). En revanche, la présence de ces portions chromosomiques dans les astrocytomes a permis d'avancer qu'elles contiendraient des gènes contribuant à la chimio-résistance et à leur comportement agressif. Quant aux tumeurs astrocytaires, elles sont caractérisées par des altérations géniques spécifiques que l'on ne retrouve pas dans les tumeurs oligodendrogliales, établissant ainsi des signatures moléculaires spécifiques (voir figure 14A et 14B) (Ichimura et al., 2004; Ohgaki, 2005; Ohgaki et al., 2004; Okamoto et al., 2004; Rao and James, 2004). Une synthèse des voies moléculaires de progression tumorale des tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales est représentée respectivement en figure 14A et 14B). Le concept initial repose sur le fait qu'un astrocytome résulte de la transformation d'un astrocyte sain et qu'un oligodendrogliome est le résultat de mutations et d'altérations chromosomiques intervenant dans les oligodendrocytes.

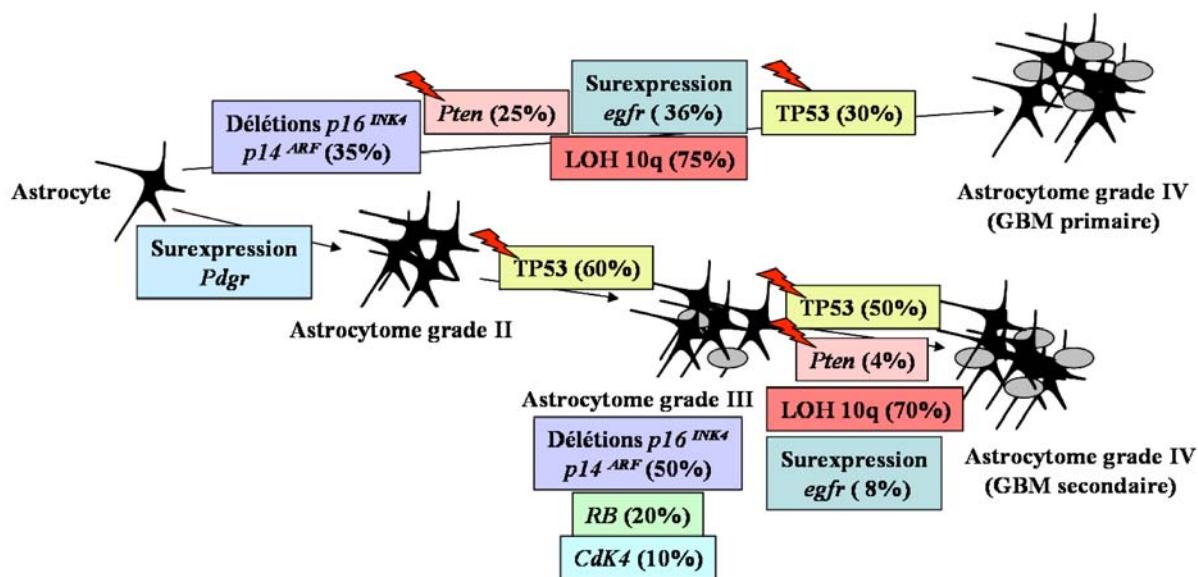


Figure 14A : Mutations génétiques et altérations chromosomiques répertoriées au cours de la progression des astrocytomes

L'éclair rouge symbolise des mutations géniques dans les gènes mentionnés. LOH : perte d'hétérozygotie. Les pourcentages mentionnés entre parenthèses sont le résultat de la synthèse de plusieurs études épidémiologiques.

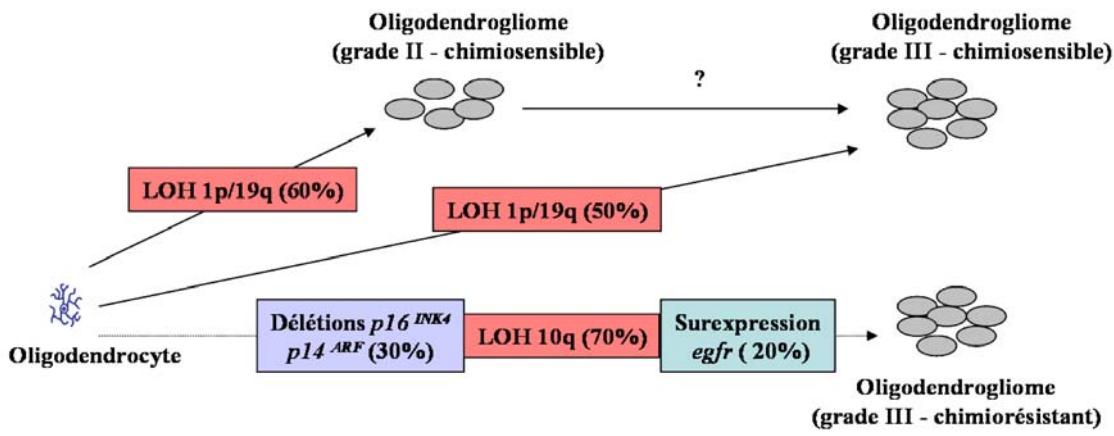


Figure 14B: Voies de progression tumorale des oligodendroglomes

La perte des portions chromosomiques 1p et 19q est fréquente dans les oligodendroglomes et leur confère une chimio-sensibilité. LOH : perte d'hétérozygotie.

Nous verrons que ce concept est un peu réducteur et ne permet pas d'expliquer le phénotype et l'organisation cellulaire de certaines tumeurs malignes. Le phénotype tumoral est le résultat d'événements mutationnels multiples qui fait intervenir plusieurs étapes successives, et chaque mutation fait progresser la cellule dans la voie de la transformation cancéreuse. Ces nombreuses études, s'intéressant aux anomalies génétiques et chromosomiques, ont permis de mettre en évidence des marqueurs pronostics et diagnostics de certains types de tumeurs. Néanmoins, la découverte de tumeurs est souvent le fruit du hasard lors d'examens de routine ou bien suite à des suspicions au regard de certains symptômes. Souvent un grand nombre d'altérations géniques est venu s'ajouter aux mutations pré-existantes et la tumeur est une conséquence de l'ensemble de ces mutations. De ce fait, les premiers événements cellulaires et moléculaires qui conduisent à la transformation tumorale d'une ou plusieurs cellules restent non élucidés. Ainsi, d'autres champs de recherche se sont intéressés à l'origine cellulaire des cancers et notamment des gliomes.

V.3 Implication des cellules souches et/ou progénitrices dans la cancérogenèse

Ces trente à quarante dernières années, un faisceau d'arguments a mis en évidence qu'il existait un lien entre des cellules souches et/ou progénitrices et l'émergence de tumeurs (Jordan et al., 2006; Oliver and Wechsler-Reya, 2004; Reya et al., 2001; Vescovi et al., 2006; Zhang and Rosen, 2006). Cette hypothèse repose sur deux aspects majeurs concernant d'une

part les propriétés intrinsèques de ces cellules souches et/ou progénitrices et d'autre part le phénotype observé dans la plupart des tumeurs malignes.

V.3.1 Les propriétés intrinsèques des cellules souches

Les cellules souches sont présentes en nombre restreint dans de nombreux tissus et participent activement à la physiologie de ceux-ci. En effet, elles sont capables de se diviser de façon asymétrique tout au long de la vie pour générer des cellules plus différenciées participant dans un premier lieu à la mise en place et au développement d'un tissu ou d'un organe puis à son maintien tout au long de la vie (homéostasie cellulaire). Ces cellules possèdent donc un pouvoir d'auto-renouvellement et prolifératif quasiment infini tout comme les cellules cancéreuses. La différence entre ces deux populations cellulaires réside dans le contrôle de cette capacité proliférante. Si la biologie des cellules souches est finement régulée, celle des cellules cancéreuses apparaît comme une anarchie avec la perte de nombreux phénomènes de régulation. En outre, de nombreuses observations cliniques et études génétiques mettent en évidence que la plupart des cancers requièrent une accumulation de plusieurs altérations génétiques (Hanahan and Weinberg, 2000) et que le développement de cancers s'étend sur plusieurs années. Toutes ces données convergent vers l'idée qu'une population ayant une durée de vie longue et un auto-renouvellement lent soit la cible de mutations transformantes. De ce fait, les cellules souches et/ou progénitrices peuvent, par des mutations simples ou complexes, acquérir des caractéristiques de cellules cancéreuses (Jordan et al., 2006; Reya et al., 2001).

V.3.2 Les phénotypes tumoraux

Les analyses histologiques, immunohistochimiques et génétiques d'un grand nombre de tumeurs ont permis d'étayer la thèse que les cellules souches et/ou progénitrices sont responsables de l'initiation et de l'expansion tumorale. Comme dans les tissus normaux, les tumeurs semblent s'organiser de façon hiérarchique avec la présence d'un grand nombre de cellules plus ou moins différenciées. En conséquence, les tumeurs sont pourvues d'une forte hétérogénéité cellulaire suggérant qu'une cellule aux potentialités multiples serait capable de générer le contingent cellulaire de la masse tumorale. D'un point de vue cellulaire, les tumeurs les plus malignes ont la particularité d'être très indifférenciées. Par conséquent, des cellules cancéreuses expriment de nombreux marqueurs de cellules souches et de cellules progénitrices (Al-Hajj and Clarke, 2004; Al-Hajj et al., 2003; Bonnet and Dick, 1997; Hemmati et al., 2003; Ignatova et al., 2002; Jordan et al., 2006; Lapidot et al., 1994; Shoshan

et al., 1999; Singh et al., 2004a; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004b; Wang and Dick, 2005). Des analyses génétiques tumorales révèlent des mutations dans certains gènes intervenant dans des voies de signalisation connues pour réguler l'auto-renouvellement des cellules souches, comme les voies Notch, Shh et Wnt (Reya and Clevers, 2005; Reya et al., 2001; Taipale and Beachy, 2001; Wechsler-Reya and Scott, 2001).

V.3.3 La notion de cellules souches cancéreuses (« *cancer stem cells* »)

Le concept énonçant que les cellules souches pourraient être importantes dans l'étiologie des cancers a été évoqué la première fois en 1875 par Cohnheim dans sa théorie des restes embryonnaires (Cohnheim, 1875). Ce paradigme n'a été repris qu'un siècle plus tard par James Till (Till, 1982). A l'époque, des limites techniques ne permettaient pas de tester le pouvoir tumorigène de cellules dans des êtres vivants. Le concept fut donc délaissé pendant près d'un siècle. C'est le laboratoire de John Dick en 1994, avec des travaux sur la lignée hématopoïétique, qui a mis en évidence pour la première fois ce concept de cellules souches cancéreuses. En effet, le premier argument est que le transfert de cellules souches de la moelle osseuse d'un patient atteint de leucémie vers la moelle de souris irradiées, génère des leucémies (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994). Le deuxième argument est que seulement une faible proportion de cellules tumorales possède ce pouvoir tumorigène et qu'elles ont la capacité de proliférer *in vitro* sur de longues périodes. Ces dernières années, de nombreux travaux sont venus étayer cette théorie mettant en exergue que dans les tumeurs, des cellules souches cancéreuses sont présentes en faible nombre, possèdent un potentiel prolifératif indéfini, sont responsables de l'initiation et de la croissance tumorale et peuvent être la cause des résistances aux thérapies conventionnelles (Al-Hajj et al., 2004; Bonnet and Dick, 1997; Jordan et al., 2006; Lapidot et al., 1994; Polyak and Hahn, 2006; Reya et al., 2001; Singh et al., 2004a; Zhang and Rosen, 2006). L'ensemble de ces données permet d'avancer que des mutations intervenant dans une population de cellules souches peuvent générer ces cellules souches cancéreuses (« *cancer stem cells* »). D'autres études démontrent que des cellules progénitrices mutées peuvent également être à l'origine de l'existence de ces « *cancer stem cells* » (Cozzio et al., 2003; Huntly et al., 2004; Jamieson et al., 2004; Krivtsov et al., 2006). L'ensemble de ces théories est résumé en figure 15.

En conclusion, ces « *cancer stem cells* » se définissent uniquement fonctionnellement par des caractéristiques intrinsèques communes aux cellules souches et par leur aptitude à former de nouvelles tumeurs identiques à celles dont elles proviennent (Clarke et al., 2006; Dalerba et al., 2006; Polyak and Hahn, 2006). Ce concept de « *cancer stem cells* » a été

transposé à différents types de cancers humains et démontré pour les leucémies, les cancers solides du sein et les tumeurs cérébrales (Al-Hajj et al., 2003; Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994; Singh et al., 2004a; Singh et al., 2004b).

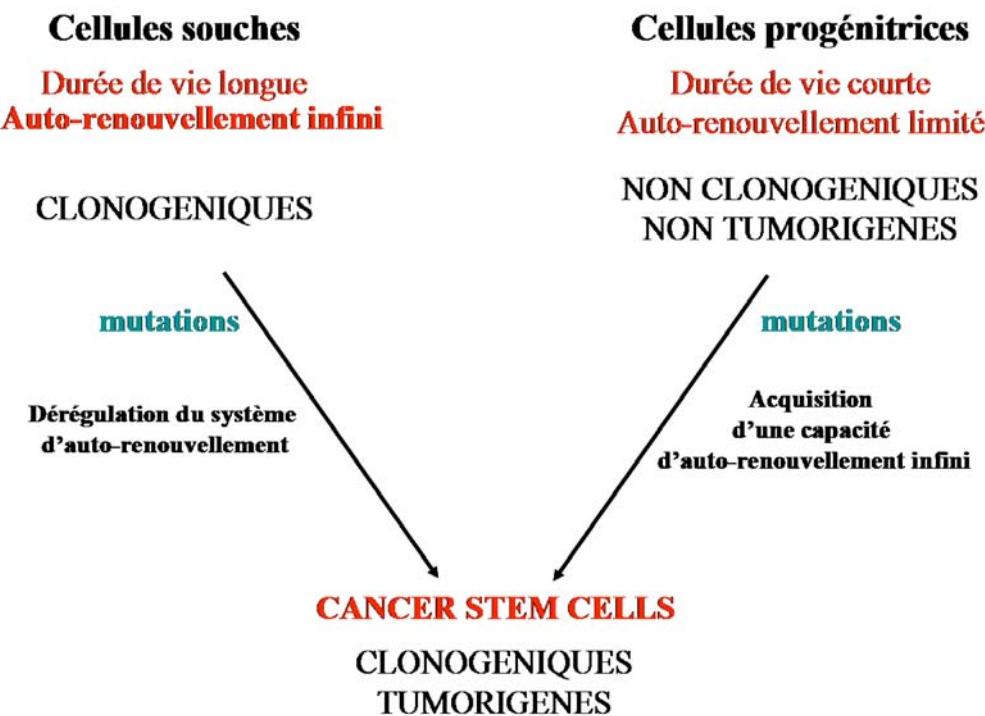


Figure 15 : Les cellules souches et/ou progénitrices, cibles de mutations transformantes

Les cellules souches s'auto-renouvellent à l'infini et sont donc par définition clonogéniques. Ces mécanismes d'auto-renouvellement sont finement régulés au cours du développement et du maintien d'un organe donné. De ce fait, des mutations intervenant dans ce système entraînent des dérégulations et permettent l'acquisition d'un pouvoir tumorigène. De la même façon, les cellules progénitrices peuvent subir également diverses altérations les rendant ainsi clonogéniques et tumorigènes.

V.3.3.1 Les « *cancer stem cells* » dans la lignée hématopoïétique

La biologie des cellules souches du système hématopoïétique est la mieux caractérisée de tous les tissus somatiques. En effet, depuis plusieurs décennies, les propriétés physiques, biologiques et développementales des cellules souches hématopoïétiques normales ont été décrites (Kondo et al., 2003; Shizuru et al., 2005) ne laissant subsister aucun mystère sur le lignage cellulaire des cellules sanguines. Ces connaissances ont permis de comprendre et d'appréhender les principes majeurs de la biologie des cellules souches cancéreuses (Pardal et al., 2003). L'existence de ces « *cancer stem cells* » fut révélée dans le contexte de leucémies pour la première fois (Lapidot et al., 1994). Les premières études montraient qu'une faible proportion de cellules issues de leucémies était capable de proliférer intensivement *in vitro* et *in vivo* (Bruce and Van Der Gaag, 1963), suggérant que toutes les cellules présentes dans la

tumeur ne possédaient pas les mêmes propriétés au moins d'un point de vue prolifératif. Afin de prouver qu'une population particulière de cellules cancéreuses était responsable de la genèse tumorale, des techniques de tri cellulaire, faisant appel à toute un ensemble de marqueurs de surface caractéristiques de différents types cellulaires, en particulier de cellules souches, furent réalisées et ont permis l'isolation de différentes populations tumorales. Le laboratoire de John Dick fut pionnier dans le domaine. A partir de leucémie myéloïde aigue humaine, ils révèlèrent qu'une faible proportion de cellules leucémiques présentent toutes les caractéristiques antigéniques de cellules souches hématopoïétiques normales. A l'aide de ces marqueurs de surface, cette population a pu être isolée et réinjectée dans la moelle osseuse de souris immunodéprimées. Ces cellules sont capables de générer dans ces animaux le même type d'affections sanguines que celles observées dans les patients humains dont les cellules proviennent (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994; Warner et al., 2004). Ces résultats mettent en exergue la véracité de l'existence de « *cancer stem cells* » dans différentes formes de leucémies humaines et que ces cellules possèdent un fort pouvoir tumorigène (figure 16) (Wang and Dick, 2005). Ces cellules seront nommées cellules souches initiatrices de leucémie (*leukemia-initiating-stem cells*).

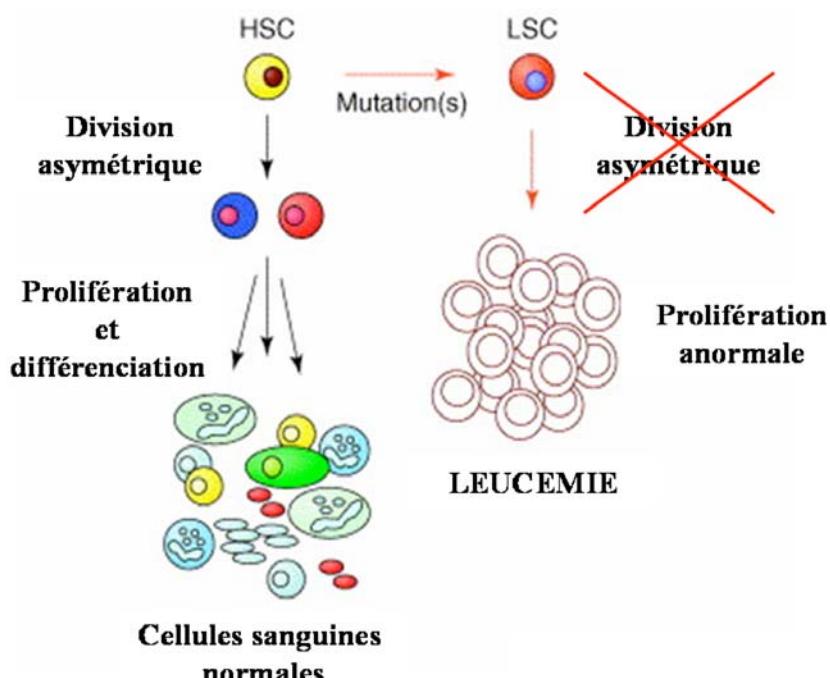


Figure 16 : Les cellules souches hématopoïétiques sont des vecteurs de leucémies

Les cellules souches hématopoïétiques se divisent de façon asymétrique pour donner naissance à des progéniteurs plus différenciés et aux potentialités plus réduites. Ces progéniteurs se différencient pour donner l'ensemble des cellules sanguines. Dans le cas de leucémies, ces cellules souches hématopoïétiques subissent des mutations qui les rendent tumorigènes et malignes et surtout incontrôlables. En effet, la dérégulation de leur système d'auto-renouvellement conduit à une prolifération cellulaire anarchique et génère ainsi une leucémie.

HSC : *Hematopoietic Stem Cells*, LSC : *Leukemia Stem Cells*.

V.3.3.2 Les « *cancer stem cells* » dans les tumeurs solides du sein

Ce concept a été admis par la communauté scientifique puis transposé à d'autres types de tumeurs notamment d'origine épithéliale. C'est ainsi que l'équipe de Michaël Clarke a également mis en évidence, au sein de cancers pulmonaires, la présence d'une faible proportion de « *cancer stem cells* ». Cette population a été isolée grâce au profil de marqueurs de surface CD44+/CD24-. Ces cellules sont capables de former des colonies *in vitro*. La réinjection des fractions cellulaires, triées suivant ces marqueurs, montre d'une part, que seules les cellules CD24- sont aptes à reformer une tumeur similaire à la tumeur originelle et d'autre part qu'elles donnent naissance à des cellules CD24+. De ce fait, les cellules CD24- ont été décrites comme une population de « *cancer stem cells* » responsable de la genèse et du développement tumoral (Al-Hajj and Clarke, 2004; Al-Hajj et al., 2003; Dontu et al., 2003).

V.4 Implication des cellules souches/progénitrices neurales dans l'étiologie des tumeurs cérébrales

Dans le cerveau embryonnaire et chez l'adulte, des cellules souches neurales possèdent des propriétés intrinsèques d'auto-renouvellement et de multipotence. L'identification et la localisation de ces cellules souches chez l'adulte ont bien été démontrées au niveau de la SVZ et de la SGL (Doetsch et al., 1999a; Doetsch et al., 1997; Gage, 2000). Au sein de certains types de tumeurs cérébrales, il existe certaines cellules tumorales qui présentent de nombreuses caractéristiques apparentées aux cellules souches neurales en particulier le comportement en culture, l'expression de marqueurs intracellulaires et de surface, l'activation de voies de signalisation et la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment (Hemmati et al., 2003; Ignatova et al., 2002; Jordan et al., 2006; Singh et al., 2004a; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004b; Taylor et al., 2005; Vescovi et al., 2006). Une des hypothèses formulées pour expliquer ces similarités est que les tumeurs cérébrales dérivent de la transformation de cellules souches neurales et/ou de progéniteurs multipotents (Oliver and Wechsler-Reya, 2004) (figure 17). L'une des preuves majeures est le travail réalisé sur des souris transgéniques dans lesquelles sont exprimées les oncogènes Ras et Akt, sous le contrôle du promoteur du gène *nestin*, un marqueur bien caractérisé de cellules souches et/ou progénitrices. Ces souris développent des tumeurs cérébrales malignes après quelques semaines (Holland et al., 2000). En outre, les régions germinales comme la SVZ sont suspectées depuis longtemps comme des régions potentielles d'émergence de gliomes (Sanai et al., 2005; Vick et al., 1977). Quelques années plus tard, des études démontrent formellement que de nombreuses tumeurs se développent au niveau de la SVZ et que la

plupart exprime la nestin (Dahlstrand et al., 1992; Koos and Horaczek, 1985; Sutton et al., 1992; Tohyama et al., 1992). Cependant, la cause de cette expression est toujours équivoque. Est-elle le résultat d'une aberration génétique ou est ce l'expression endogène d'une cellule indifférenciée (Brustle and McKay, 1995) ? Un grand nombre d'études relate que des marqueurs de cellules souches et de cellules progénitrices s'expriment dans un bon nombre de tumeurs cérébrales (Almqvist et al., 2002; Balenci et al., 2006; Hemmati et al., 2003; Ignatova et al., 2002; Rorke et al., 1997; Shoshan et al., 1999; Singh et al., 2004b). Au sein de ces tumeurs, des analyses génétiques ont mis en exergue des formes mutées de gènes régulant la prolifération et l'auto-renouvellement de cellules souches (Reya and Clevers, 2005; Reya et al., 2001; Taipale and Beachy, 2001; Wechsler-Reya, 2003). Grâce à la mise au point de cultures de neurosphères (Gritti et al., 2002; Gritti et al., 1999; Gritti et al., 1996; Reynolds et al., 1992; Reynolds and Weiss, 1996), les essais de clonogénérité et de multipotence des cellules tumorales ont été simples à mettre en oeuvre.

L'obstacle majeur à la transposition de la notion de « *cancer stem cells* » dans le cerveau était l'absence de marqueurs de surface spécifiques de cellules souches neurales qui permettraient de les isoler. En 2000, un premier marqueur fut identifié pour les cellules souches humaines multipotentes, le CD133. En effet, la population CD133+ isolée par tri cellulaire, est capable de générer des neurosphères et de multipotence *in vitro*. Ces cellules après réimplantation dans le cerveau d'une souris hôte immunodéprimée sont capables de migrer, proliférer et se différencier en neurones et en cellules gliales (Uchida et al., 2000). Le marqueur CD133 a permis d'isoler, au sein de tumeurs cérébrales humaines de différents types, une population de cellules capables de générer des neurosphères cancéreuses (Balenci et al., 2006; Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2004a; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004b; Vescovi et al., 2006). Afin de tester le pouvoir tumorigène de cette population cellulaire, les fractions CD133- et CD133+ ont été extraites de différents types tumoraux et réinjectées, par stéréotaxie, dans le cortex ou le striatum de souris immunodéprimées. Seule la population de cellules exprimant le CD133 est capable d'initier et de reconstituer une tumeur cérébrale identique à celle dont elle a été extraite (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004b). L'ensemble de ces résultats suggère qu'une faible proportion de cellules tumorales est responsable de l'initiation et de la croissance tumorale.

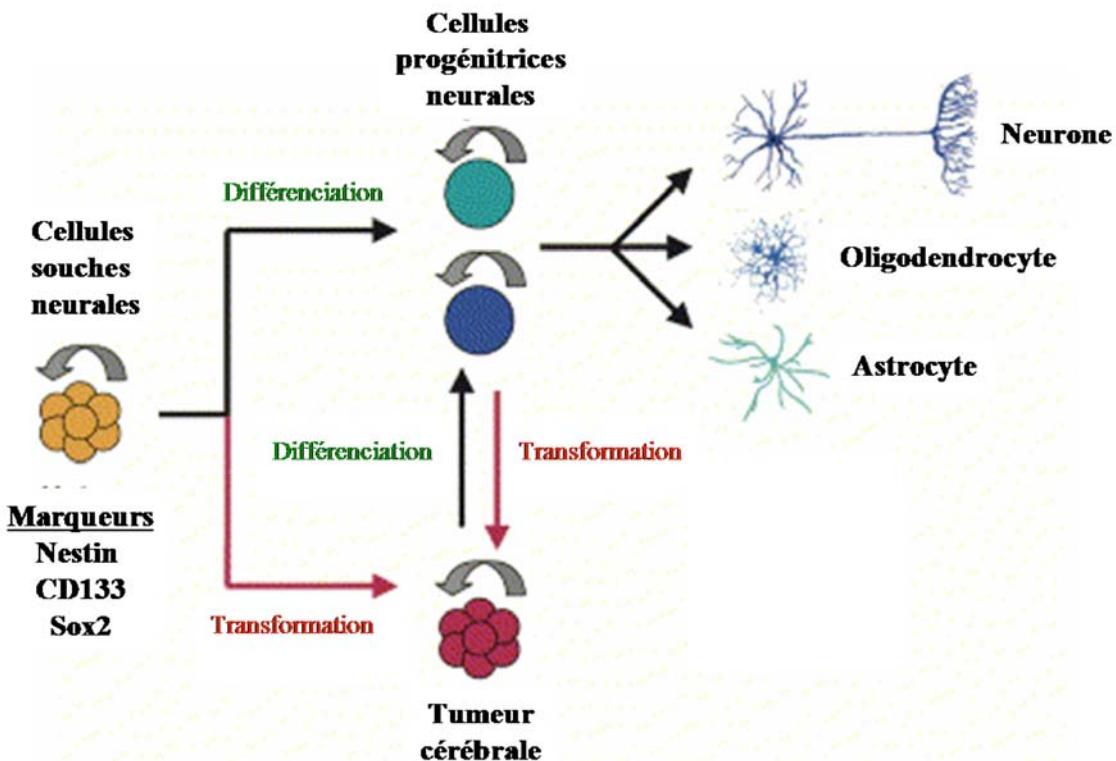


Figure 17 : Implication de cellules souches et/ou progénitrices dans l'émergence de tumeurs cérébrales (d'après (Oliver and Wechsler-Reya, 2004))

Les cellules souches neurales sont sujettes à deux phénomènes. De façon physiologique, elles se divisent et se différencient en cellules progénitrices. En conditions pathologiques, elles peuvent être les cibles de mutations transformantes aboutissant à la formation de tumeurs cérébrales. D'autre part, les cellules progénitrices peuvent, à leur tour, soit se différencier, soit subir des altérations génétiques qui engendreront une genèse tumorale.

V.5 Une dérégulation de la niche à l'origine des cancers

Au sein de tissus normaux, le comportement des cellules souches/progénitrices dépend de communications intercellulaires et de facteurs fournis par leur microenvironnement. L'intégration de tous ces facteurs permet un développement harmonieux de ces tissus, leur maintien au cours de la vie et leur régénération. Dans les cancers, nous venons de voir qu'une sous-population tumorale présente des propriétés apparentées aux cellules souches normales, mais comment sont-elles régulées ? Est-ce que ces cellules fonctionnent de façon autonome ou leur comportement est dépendant de leur environnement ?

Les travaux de ces cinquante dernières années sont en faveur de l'idée que le cancer est une pathologie complexe qui touche non seulement le programme génétique de certaines cellules mais également les informations régulatrices de leur environnement. Au cours de la progression tumorale, des phénomènes inflammatoires et de néo-vascularisation se mettent en place. Conjointement différents facteurs favorisent la prolifération et l'invasion tissulaire et

bloquent la différenciation (figure 18). Par conséquent, la cellule tumorale ne serait pas la seule responsable de la croissance tumorale.

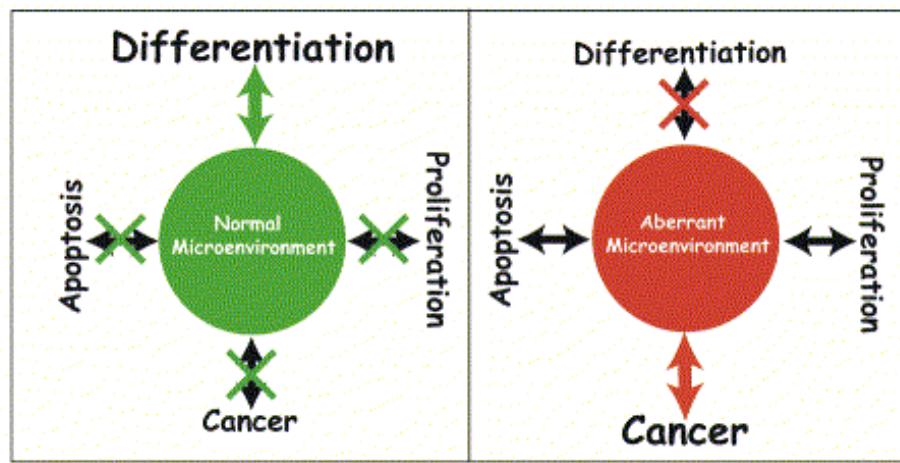


Figure 18 : La dérégulation du microenvironnement dans les cancers (d'après (Bissell and Labarge, 2005))

Au cours du développement et chez l'adulte, les cellules évoluent dans un microenvironnement sécrétant de nombreux facteurs qui régulent finement leur comportement. Au cours de pathologies cancéreuses, des mutations entraînent de nombreuses perturbations de cet équilibre fragile existant entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. De ce fait, l'environnement fournit des facteurs extrinsèques aberrants aux cellules et favorise la prolifération cellulaire et le développement tumoral.

L'environnement tumoral évolue et conditionne le comportement des cellules cancéreuses. Les acteurs qui opèrent ces changements peuvent être les cellules du stroma, les cellules immunitaires, les réseaux sanguins et lymphatiques et la matrice extracellulaire (Bissell and Labarge, 2005). Les « *cancer stem cells* » identifiées sont capables de recréer des niches particulières au sein de masses tumorales qui fournissent des informations aberrantes à ces cellules, permettant ainsi la progression tumorale (Balenci et al., 2006; Li and Neaves, 2006) (figure 18). L'une des caractéristiques principales de cette population cellulaire est son aspect tumorigène *in vivo*. Pour tester cette propriété les cellules sont sorties de leur contexte physiopathologique puis sont réimplantées dans un organisme hôte immunodéprimé sain. Malgré tout, elles ont la capacité d'initier et de reformer une tumeur quasiment à l'identique, ce qui suppose une communication bi-directionnelle entre les cellules cancéreuses et leur environnement. En effet, le comportement de cellules normales est modifié au contact de cellules cancéreuses ; elles se mettent à produire toute une variété de facteurs de croissance, de cytokines et d'enzymes permettant la croissance et l'invasion de la tumeur naissante (Bissell and Labarge, 2005; Joyce, 2005). Par conséquent, les cellules souches tumorales

tumorigènes vont certainement recréer le contexte tumoral dans lequel elles étaient immergées et reformer une niche favorable à leur survie et au développement tumoral.

V.5.1 Les niches de la SVZ, un équilibre fragile

Les régions germinales, comme la SVZ, sont suspectées depuis longtemps d'être des régions potentielles d'émergence de gliomes. En outre, les cellules souches et/ou progénitrices neurales possèdent des propriétés de prolifération à long terme et de multipotence communes avec les propriétés des cellules cancéreuses (Balenci et al., 2006; Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003). Les cellules souches et/ou progénitrices et cellules cancéreuses utilisent les mêmes voies de signalisation (Reya et al., 2001; Vescovi et al., 2006; Wechsler-Reya, 2003) et peuvent développer des propriétés et comportements similaires comme une haute motilité, une association avec les vaisseaux sanguins et peuvent exprimer des marqueurs antigéniques de cellules immatures (Doetsch, 2003; Ignatova et al., 2002; Sanai et al., 2005). La diversité des acteurs permettant de réguler le comportement des cellules de la SVZ est complexe et apparaît donc comme un phénomène hautement et finement régulé (Ohlstein et al., 2004). Le moindre bouleversement de ces niches neurogéniques de la SVZ va avoir des conséquences directes sur les cellules qui la composent. En effet, des injections intra-ventriculaires de différents facteurs de croissance, tels que l'EGF, le bFGF et le VEGF, augmentent la prolifération cellulaire au niveau des cellules de la SVZ (Craig et al., 1996; Fallon et al., 2000; Jin et al., 2002; Kuhn et al., 1997; Schanzer et al., 2004) suggérant que le contrôle du niveau de sécrétion de ces facteurs est nécessaire pour la régulation de la production de neuroblastes. Les cellules composant ces niches constituent des paramètres importants pour la sécrétion d'un certain nombre de facteurs. Les astrocytes et les cellules endothéliales sont les deux principaux acteurs qui participent à la régulation de la neurogenèse chez l'adulte et qui sont incriminés également dans la progression tumorale (voir discussions). En effet, les tumeurs cérébrales s'accompagnent d'une réaction inflammatoire matérialisée par la présence d'une gliose réactionnelle. Ces astrocytes réactionnels viennent soit entourer, soit s'insérer au sein de la masse tumorale et sécrètent un grand nombre de chémokines et cytokines inflammatoires. D'autre part, au cours de la progression tumorale, des mécanismes d'angiogenèse se mettent en place et font appel à un recrutement de cellules endothéliales chargées de la formation de vaisseaux sanguins pour apporter nutriments et oxygène à la tumeur en croissance (Carmeliet, 2003a; Carmeliet, 2005; Hanahan and Folkman, 1996; Hanahan and Weinberg, 2000). Récemment, la preuve directe de l'implication des cellules souches neurales astrocytaires de la SVZ dans la genèse de gliomes

vient d'être mis en évidence. Les astrocytes germinatifs de la SVZ expriment le récepteur au PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et l'injection intra-ventriculaire de ce facteur génère l'arrêt de la production de neuroblastes et induit la formation de foyers hyperplasiques s'apparentant à des gliomes (Jackson et al., 2006).

V.6 Les implications en terme de thérapie

V.6.1 Les radiothérapies et chimiothérapies

La mise en évidence d'une population de « *cancer stem cells* » dans plusieurs types de tumeurs a permis d'expliquer, en partie, l'échec de radiothérapies et chimiothérapies et les récidives fréquentes de certaines tumeurs notamment des tumeurs cérébrales. Les différents modèles permettant d'expliquer ces phénomènes de résistance et/ou de récidives sont présentés en figure 19 et 20.

Le développement de thérapies ciblant ces cellules tumorigènes reste un réel défi dans le domaine de l'oncologie. Comme les « *cancer stem cells* » disposent de propriétés intrinsèques communes aux cellules souches normales, elles devraient proliférer assez faiblement. En effet, dans des cas de leucémies, cette population cellulaire rare se révèle quasiment quiescente comme les cellules souches normales (Guan et al., 2003; Holyoake et al., 1999). De plus, ces « *cancer stem cells* » ont la particularité d'exprimer, comme les cellules souches normales, des gènes codant des protéines intervenant dans les mécanismes d'efflux de drogues cytotoxiques (les protéines du système mdr : *multiple drug resistance*, les transporteurs de la famille ABC) (Donnenberg and Donnenberg, 2005; Gottesman, 2002; Gottesman et al., 2002; Hirschmann-Jax et al., 2005; Hirschmann-Jax et al., 2004; Lowenberg and Sonneveld, 1998; Raaijmakers et al., 2005; Wulf et al., 2001). Ces deux propriétés mettent en exergue toute la difficulté à atteindre cette population, centrale pour le développement tumoral.

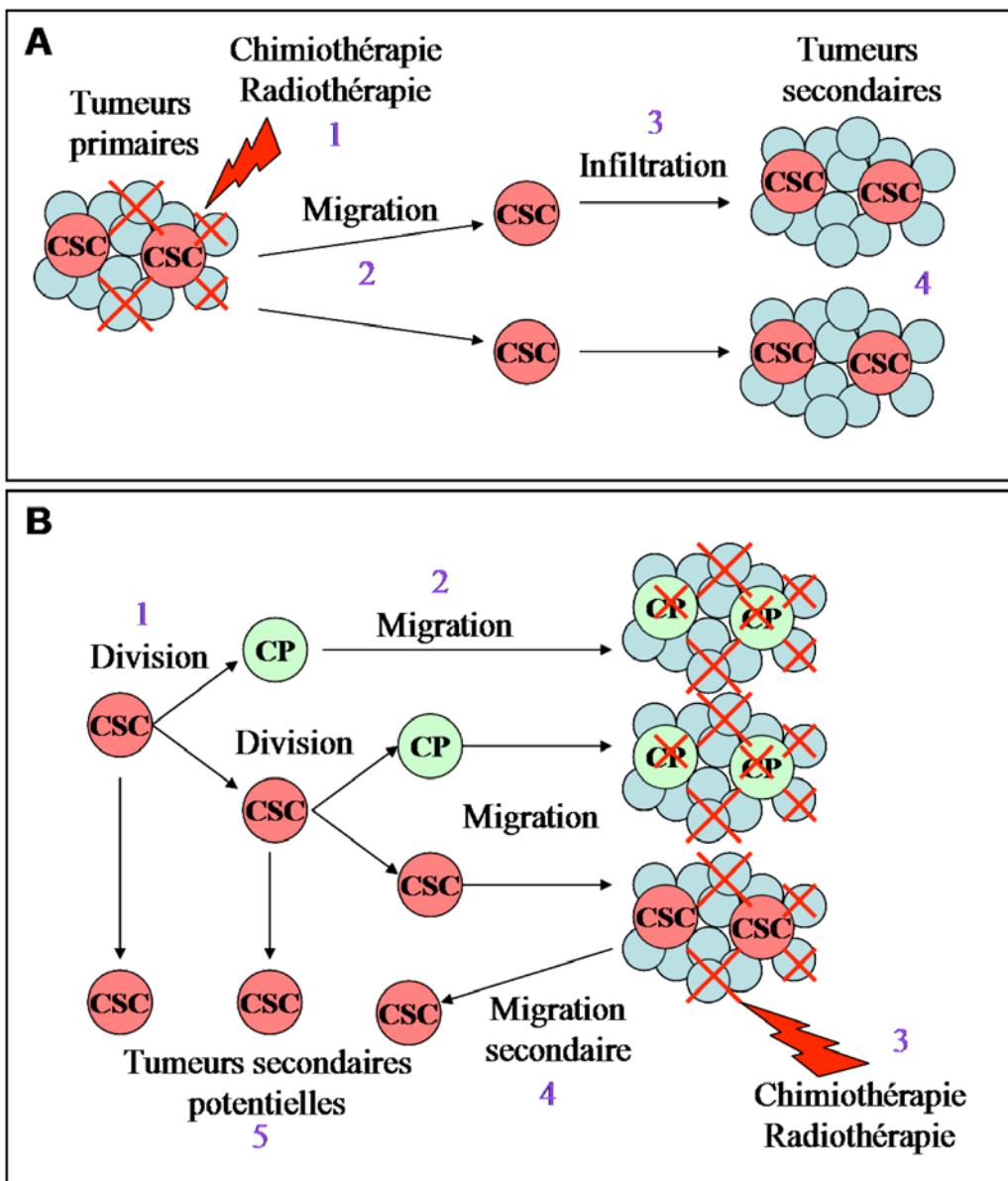


Figure 19 : Modèles expliquant l'échec de thérapies conventionnelles

A : Une tumeur est détectée par imagerie cérébrale. L'équipe médicale entreprend une chimiothérapie ou une radiothérapie (1). Ces traitements ciblent la masse tumorale et tuent un grand nombre de cellules tumorales. Les « *cancer stem cells* » (CSC) s'avèrent beaucoup moins sensibles à ce type d'approche d'une part par la mise en place de mécanismes capables d'expulser toutes substances toxiques et d'autre part par leur faible taux de prolifération. De ce fait, le noyau dur de la tumeur n'est pas éliminé. Les cellules survivantes ont la capacité de migrer (2), de s'infiltrer (3) dans un autre compartiment tissulaire et de reformer une tumeur (4). Ce mécanisme expliquerait les phénomènes de récidives fréquentes après traitement.

B : Dans ce modèle, les « *cancer stem cells* » se divisent (1) de façon asymétrique pour donner naissance à une cellule souche et une cellule progénitrice (CP) cancéreuse. Ces deux types cellulaires migrent (2) et sont capables de générer des tumeurs. A ce niveau, des thérapies s'engagent (3).

Dans un cas, ces traitements sont capables d'atteindre l'ensemble de la masse tumorale très proliférante. Dans l'autre cas, certaines cellules en réchappent, les « *cancer stem cells* » qui migrent secondairement (4) vers un autre tissu pour reformer une tumeur (5). Une autre possibilité est que la « *cancer stem cell* » initiale n'est pas affectée par les traitements car elle ne se situe pas à l'endroit traité. En effet, sa capacité de migration (2) lui permet d'être une cible mobile quasiment inattaquable. Le résultat est qu'elles peuvent générer des foyers tumoraux (5) soit dans leur lieu de résidence soit dans un autre endroit du parenchyme. Par conséquent, les traitements, bien que ciblés, s'avèrent d'une efficacité moindre. Les numéros indiqués établissent la chronologie des événements.

V.6.2 Les thérapies anti-angiogéniques

Les thérapies anti-cancéreuses ciblant les vaisseaux angiogéniques ont été initialement proposées par Folkman (Folkman, 1971). A l'époque cette éventualité était accueillie avec beaucoup de scepticisme et ignorée durant quelques décennies. Aujourd'hui cette approche fait partie de l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux, le but étant de stopper l'apport d'oxygène et de nutriments à la tumeur afin qu'elle meure par hypoxie (Rafii et al., 2002b). Des molécules anti-angiogéniques ont été synthétisées de façon à bloquer les facteurs angiogéniques et leurs récepteurs, et expérimentées en tests précliniques (Papetti, 2002). Cette stratégie évolue et cible, désormais, également les péricytes, qui servent de support aux cellules endothéliales et sécrètent des facteurs trophiques. La maturation vasculaire nécessite une cohésion entre cellules endothéliales et péricytaires et utilisent différentes voies de signalisation comme les systèmes « ligand/récepteur » PDGF-B/PDGFR β , VEGF-A/VEGFR-2, Angiopoïétine/Tie-2 (Carmeliet, 2003a; Carmeliet, 2005). L'emploi d'inhibiteurs du récepteur au PDGF réduit le recrutement de péricytes autour des vaisseaux sanguins et les rend plus vulnérables (Pietras et al., 2003). En outre, l'utilisation combinée d'antagonistes de récepteurs au PDGF et au VEGF, dans un modèle murin de cancer, induit une perturbation des interactions péricytes-cellules endothéliales et conduit à une régression tumorale (Bergers et al., 2003). L'observation la plus intéressante est que cette action ne semble pas affecter la vascularisation normale des tissus.

Un autre champ thérapeutique exploré est le blocage du recrutement de cellules progénitrices endothéliales circulantes au niveau de la tumeur. Bien que la contribution exacte de ces cellules dans la vascularisation tumorale reste controversée, des inhibitions des récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2), impliqués notamment dans la migration et la prolifération de cellules endothéliales (Yamaoka-Tojo et al., 2004), montrent des régressions tumorales dans des modèles murins de xénogreffes. Ce phénomène est attribué à la réduction du recrutement de cellules endothéliales (Lyden et al., 2001; Rafii et al., 2002a; Rafii et al., 2002b). Malgré le fait que ces thérapies anti-angiogéniques semblent avoir une efficacité notable dans des modèles murins de cancers, les résultats initiaux chez l'homme en terme clinique, sont plutôt décevants (Garber, 2002). L'une des raisons avancées est que les xénogreffes de cellules tumorales se font en région sous-cutanée de modèles murins dans les tests pré-cliniques. De ce fait, l'environnement tumoral n'est pas du tout le même que celui présent au niveau de la tumeur endogène initiale. La production de modèles de transplantations orthotopiques semble plus adaptée pour conserver l'environnement des cellules et mimer l'évolution tumorale originelle.

Les échecs thérapeutiques sont en grande partie attribués aux capacités migratoires et infiltrantes communes des cellules souches et/ou progénitrices et des cellules tumorales (figure 19 et 20). Après une blessure, des cellules progénitrices neurales indifférenciées sont capables de migrer de la SVZ où elles résident au site de la blessure à travers le parenchyme cérébral (Goings et al., 2004; Parent and Lowenstein, 2002; Parent et al., 2002; Weinstein, 1996). De leur côté, les cellules cancéreuses sont capables de migrer et de générer un foyer tumoral souvent loin de leur site où les mutations transformantes ont eu lieu (Berger et al., 2004; Salsbury, 1975), figure 19 et 20). Il est donc envisageable que les « *cancer stem cells* » puissent migrer dans d'autres régions avant et après traitement. Dans le premier cas, elles formeraient une tumeur loin de leur site de résidence et dans un deuxième cas, elles seraient capables de s'échapper d'un environnement devenu hostile.

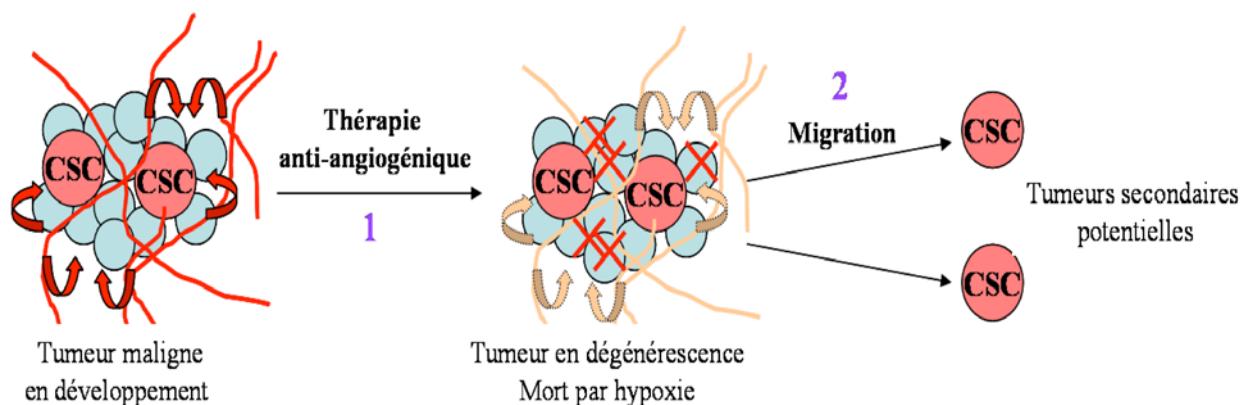


Figure 20 : Modèle putatif permettant d'expliquer l'échec de thérapies anti-angiogéniques

Une tumeur maligne en développement fabrique de nouveaux vaisseaux pour s'alimenter en nutriments et en oxygène. Les thérapies anti-angiogéniques (1) bloquent tous les facteurs sécrétés utiles à la survie et au développement tumoral. Certaines cellules meurent par hypoxie mais les « *cancer stem cells* » dotées d'un potentiel migratoire important migrent (2) au contact de cet environnement hostile et peuvent générer des tumeurs dans un autre endroit du parenchyme. Les numéros indiquent la chronologie des événements.

RESULTATS

I. Objectifs de la thèse

A travers la signalisation calcique, le laboratoire étudie les cellules souches et progénitrices du système nerveux central dans des conditions physiologiques et pathologiques. Dans ce cadre de recherche, l'équipe s'intéresse aux rôles de la calciprotéine S100B et de ses cibles dans la biologie de ces cellules. En 2002, le laboratoire a identifié la protéine IQGAP1 comme une cible cytoplasmique majeure de la S100B au cours de réarrangements membranaires dans une lignée tumorale humaine dérivée de gliomes (Mbele et al., 2002). Cette protéine possède un grand nombre de fonctions régulatrices au niveau cellulaire mais aucune fonction physiologique ne lui a été attribuée. Un faisceau d'observations et de données convergentes nous a poussé à étudier cette nouvelle protéine dans le cerveau. Nous nous sommes intéressés à l'implication fonctionnelle de la protéine IQGAP1 dans la régulation physiologique de la neurogenèse chez l'adulte par une analyse approfondie de ce phénomène au niveau de souris dont le gène *iqgap1* a été invalidé. En parallèle, nous avons caractérisé cette protéine dans un contexte pathologique de tumeurs cérébrales, chez le rat et chez l'homme.

Dans le système nerveux central, deux zones germinales persistent chez l'adulte au niveau de la SVZ adjacente au ventricule latéral et de la SGL dans le gyrus denté de l'hippocampe. Ces deux régions contiennent des cellules souches neurales responsables du phénomène de neurogenèse chez l'adulte. Dans l'optique de développer des thérapies utilisant les capacités de ces cellules souches en médecine régénérative, il apparaît primordial d'élucider et de comprendre tous les mécanismes intrinsèques et extrinsèques qui contrôlent leur comportement et leur devenir. Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent la régulation de la neurogenèse chez l'adulte ne sont pas totalement compris.

La première partie de mon projet de thèse a consisté en l'étude de la fonction de la protéine IQGAP1 dans le cerveau et plus particulièrement dans la régulation de la neurogenèse chez l'adulte. La cartographie de l'expression d'*iqgap1* dans le cerveau a mis en évidence que cette protéine est présente dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins dans le parenchyme cérébral. Au niveau de la SVZ adulte, *iqgap1* est exprimé dans les cellules épendymaires bordant la lumière du ventricule latéral ainsi que dans les cellules progénitrices neurales de type « C » et les précurseurs neuronaux de type « A ». Afin de déterminer les fonctions de cette protéine dans les progéniteurs neuraux, nous avons comparé leurs propriétés *in vivo* et *in vitro* chez des souris sauvages et des souris *knock-out iqgap1-/-*. Les analyses comparatives *in vivo* révèlent une accumulation et un mauvais positionnement

des cellules progénitrices dans la SVZ et le long de la RMS chez les animaux *iqgap1*^{-/-}. *In vitro*, dans les neurosphères adultes, IQGAP1 intervient dans la voie de signalisation du VEGF pour réguler l'activité chimiotactique et la différenciation neuronale des cellules progénitrices neurales. Cette activité migratoire fait intervenir des partenaires connus d'IQGAP1 impliqués dans la régulation du cytosquelette : Rac1, Cdc42 et Lis1. Par ailleurs, *in vivo*, nous avons mis en évidence que seuls les astrocytes présents dans les zones neurogéniques de la SVZ et de la RMS expriment le VEGF. L'ensemble de ces résultats impute un nouveau rôle aux astrocytes dans la régulation de la neurogenèse adulte. Par l'expression du VEGF, ces cellules fourniraient un nouveau facteur environnemental capable de promouvoir le guidage et la spécification neuronale des cellules progénitrices neurales.

L'autre aspect de mon travail de thèse a concerné l'étude de l'implication des cellules souches/progénitrices dans des cas pathologiques de tumeurs cérébrales. De nombreux travaux ces dernières années ont mis en exergue que des cellules tumorales ayant des caractéristiques apparentées à des cellules souches pourraient être à l'origine d'un développement tumoral. Ce concept a vu le jour du fait que les cellules souches et cellules cancéreuses partagent des propriétés d'auto-renouvellement infinies. De plus, l'hétérogénéité et l'organisation cellulaire de certaines tumeurs cérébrales malignes révèlent des similarités avec les tissus normaux. L'identification et la caractérisation de ces cellules tumorigènes apparaissent essentielles pour la compréhension de leur comportement au sein d'une masse tumorale donnée et pour envisager des stratégies thérapeutiques capables de les cibler et de les éliminer. Fort des résultats obtenus lors de la première étude nous avons caractérisé et mesuré l'implication d'IQGAP1 au cours de la neurocarcinogenèse cérébrale.

Pour ce faire, nous avons généré un modèle de carcinogenèse cérébrale chimio-induite chez le rat grâce à un agent mutagène l'N-éthyl-N-nitrosourée (ENU). Chez le rat adulte, *iqgap1* est spécifiquement exprimé au niveau de cellules progénitrices neurales *in vitro* et *in vivo*, mise en évidence par sa co-localisation avec le marqueur nestin. Dans le modèle de gliomes chimio-induits chez le rat, ces deux marqueurs permettent d'identifier une population de cellules progénitrices tumorales hautement prolifératives uniquement présente dans les tumeurs identifiées comme étant des glioblastomes chez le rat. Ces deux marqueurs, IQGAP1 et nestin permettent de discriminer les glioblastomes humains des oligodendrogiomes et d'identifier une population de cellules tumorales progénitrices se localisant à proximité de vaisseaux sanguins. *In vitro*, à partir de glioblastomes humains, la genèse de neurosphères cancéreuses confirme la présence d'IQGAP1 dans une population de cellules présentant les mêmes caractéristiques d'auto-renouvellement et de multipotence que les cellules souches

et/ou progénitrices normales ainsi que l'expression des mêmes marqueurs. A l'aide du marqueur spécifique de surface de cellules souches, le CD133, cette population peut être isolée puis réimplantée dans le cortex de souris NOD/SCID immunodéprimées. Après quelques semaines, *iqgap1* est fortement exprimé dans les tumeurs naissantes où elle co-localise avec le marqueur CD133. Cette population va générer une tumeur identique à celle dont elle a été extraite et sous-tend un rôle putatif d'IQGAP1 dans l'invasion tumorale du parenchyme cérébral.

II. Etude fonctionnelle de la protéine IQGAP1 dans la régulation de la neurogenèse adulte

II.1 ARTICLE n°1 : la protéine IQGAP1 intervient dans la voie de signalisation du VEGF pour réguler la migration des cellules progénitrices neurales

II.1.1 Introduction

La neurogenèse est un phénomène qui persiste chez l'adulte dans la SVZ et la SGL et qui est très finement régulé pour produire quotidiennement une quantité suffisante de neuroblastes pour régénérer les interneurones du bulbe olfactif. L'architecture et l'organisation cellulaire de la SVZ adulte sont connues depuis une dizaine d'années (Doetsch et al., 1997). Dans cette région les cellules souches neurales ont été identifiées comme étant les astrocytes de type « B » qui donneront naissance aux cellules progénitrices de type « C » qui à leur tour généreront des neuroblastes de type « A ». Ces neuroblastes migrent ensuite le long de la voie de migration rostrale pour rejoindre le bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones olfactifs. Au cours de ce phénomène neurogénique, les cellules migrent sur de longues distances et sont confrontées à divers facteurs fournis par l'environnement qui régulent leur comportement et leur devenir. Si certains acteurs cellulaires et moléculaires commencent à être identifiés au niveau de la SVZ, les mécanismes moléculaires intervenant dans l'ensemble de la régulation de la neurogenèse sont toujours méconnus. IQGAP1 par l'intermédiaire de ses multiples partenaires intervient au niveau des processus de motilité et de migration en agissant sur le cytosquelette d'actine et microtubulaire (Kholmanskikh et al., 2006; Noritake et al., 2005; Watanabe et al., 2004; Yamaoka-Tojo et al., 2004). L'ensemble de ces arguments nous a poussé à étudier la protéine IQGAP1 dans le cerveau chez la souris et plus particulièrement à élucider sa fonction dans la régulation de la neurogenèse adulte.

II.1.1.1 IQGAP1 dans le cerveau

Au cours des travaux ayant découvert la protéine IQGAP1, l'étude de son expression tissulaire par northern blot, n'a pas révélé sa présence dans le cerveau (Weissbach et al., 1994). Au cours de ces dernières années, la protéine IQGAP1 a fait l'objet d'un grand nombre d'études cellulaires. De ce fait, des outils concernant cette protéine, notamment des anticorps et des siRNA, se sont développés. Quelques années plus tard, une lignée de souris dont le gène *iqgap1* a été invalidé n'a révélé aucun phénotype drastique si ce n'est une hyperplasie gastrique et la genèse de polypes intestinaux chez des animaux âgés (Li et al., 2000). Cependant, une étude portant sur une lignée de souris transgéniques exprimant la β -caténine

dans une forme constitutivement active sous le contrôle du promoteur du gène *nestin*, un marqueur de cellules progénitrices de la SVZ adulte, révèle une augmentation de la surface corticale ainsi qu'un élargissement des ventricules latéraux. L'analyse approfondie de ce phénotype a conclu à une dérégulation de la balance prolifération/différenciation des cellules progénitrices de la SVZ (Chenn and Walsh, 2002). IQGAP1 est un des partenaires connus de la β -caténine au niveau des jonctions adhérentes intercellulaires où elle joue un rôle de modulateur (Kuroda et al., 1998; Kuroda et al., 1999). Ces régulations intercellulaires sont jugées primordiales dans les niches de la SVZ adulte pour réguler l'activation, la prolifération, la différenciation et la migration des cellules souches et/ou progénitrices (Doetsch, 2003). De ce fait, il nous a paru judicieux d'étudier le rôle d'IQGAP1 au niveau de la SVZ au cours de la neurogenèse adulte.

Dans des expériences préliminaires à ce travail, nous avons mis en évidence qu'IQGAP1 apparaît au cours de la période post-natale et s'exprime de façon croissante jusqu'au stade adulte (figure 21). En revanche, la β -caténine, son partenaire, est exprimée de manière constante de la période embryonnaire jusque chez l'adulte. Comme l'expression d'*iqgap1* est maximale à l'état adulte, nous avons plus particulièrement porté notre attention sur ce stade de développement au cours de notre étude.

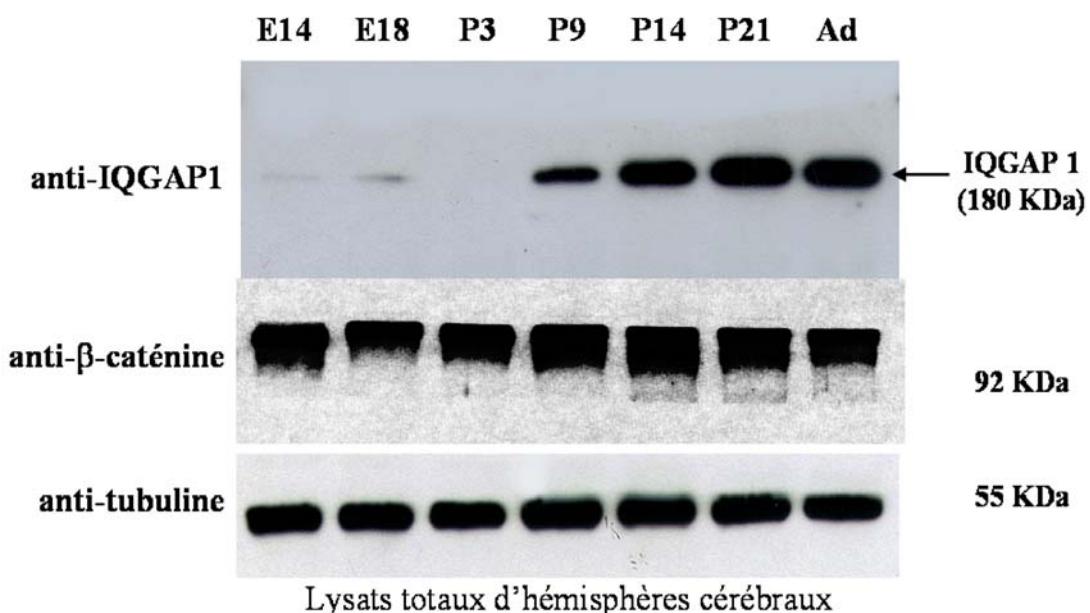


Figure 21 : Expression d'*iqgap1* dans le cerveau au cours du développement

L'analyse par western blot de lysats totaux d'hémisphères cérébraux montre qu'IQGAP1 est faiblement présente au cours du développement embryonnaire puis s'exprime de façon croissante jusque chez l'adulte.

De façon surprenante, dans le cerveau adulte, IQGAP1 est ubiquitaire (figure 22). Par des analyses immunohistochimiques sur des coupes coronales de cerveaux de souris sauvages, nous avons déterminé le patron d'expression de cette protéine. Dans le parenchyme cérébral, IQGAP1 apparaît au niveau des vaisseaux sanguins où elle co-localise avec un marqueur spécifique de cellules endothéliales, PECAM1 ou CD-31 (figure 23, A). Un co-marquage réalisé avec les anticorps dirigés contre IQGAP1 et la GFAP, marqueur caractéristique des astrocytes, démontre la projection des pieds astrocytaires (GFAP, rouge) sur les vaisseaux sanguins (IQGAP1, vert) du parenchyme cérébral (figure 23, B).

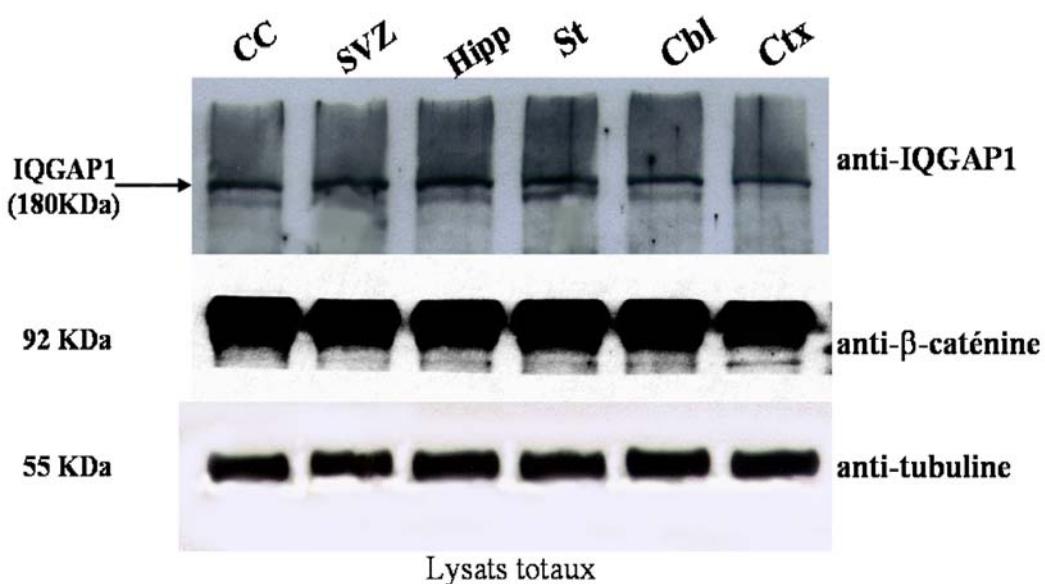


Figure 22 : IQGAP1 est ubiquitaire dans le cerveau adulte

L'analyse par western blot de lysats totaux de différentes régions cérébrales montre qu'IQGAP1 est ubiquitaire dans le cerveau adulte.

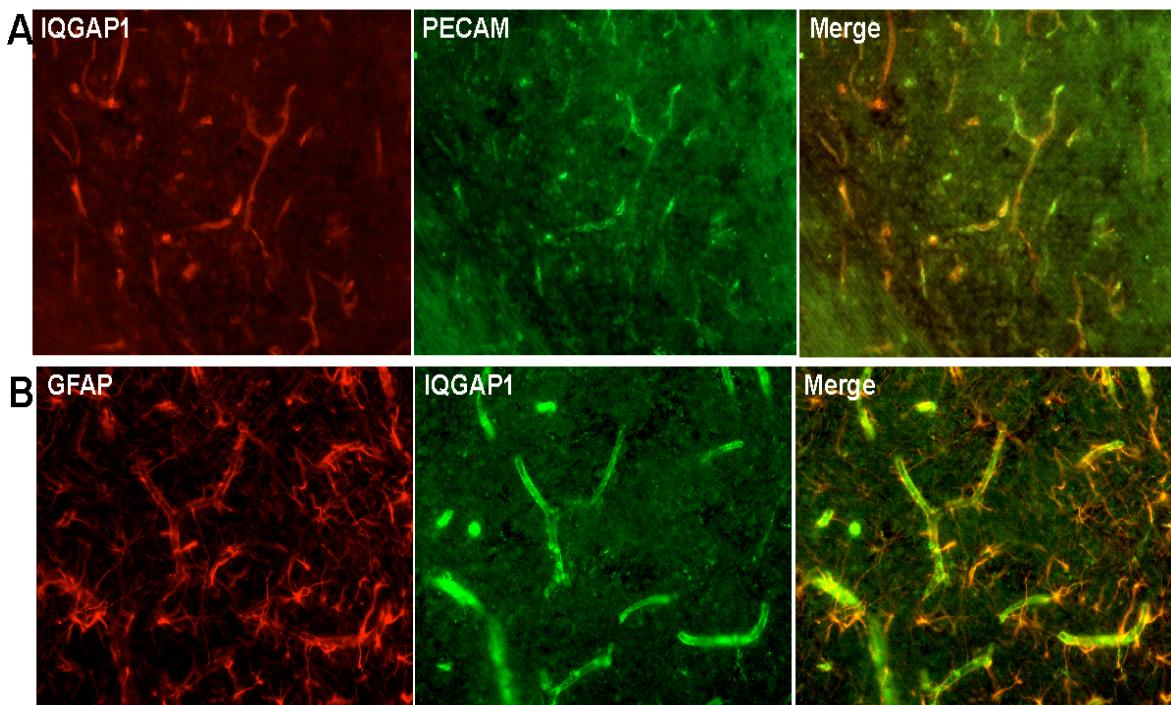


Figure 23 : IQGAP1 est présente dans les vaisseaux sanguins du parenchyme cérébral adulte

L'analyse immunohistochimique de coupes coronales de cerveau adulte révèle qu'IQGAP1 (rouge) co-localise avec PECAM1 (CD-31) (vert), un marqueur de cellules endothéliales (A) dans le parenchyme cérébral. En (B), une analyse immunohistochimique complémentaire montre l'apposition des pieds astrocytaires (GFAP, rouge) sur les vaisseaux sanguins révélés par la protéine IQGAP1 (vert).

Afin de vérifier la pertinence du système IQGAP1/ β -caténine au niveau de la SVZ adulte, nous avons cherché, en premier lieu, si ces deux partenaires étaient présents dans des neurosphères adultes. En effet, les résultats montrent que les protéines IQGAP1 et β -caténine co-localisent au niveau des jonctions intercellulaires de neurosphères adultes (figure 24).

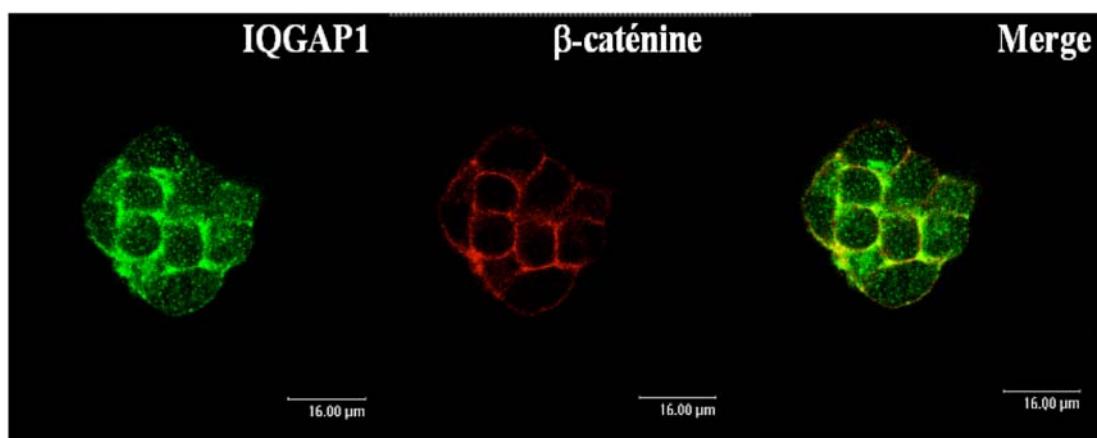


Figure 24 : IQGAP1 et la β -caténine co-localisent dans les neurosphères adultes

Une double immunocytochimie sur des neurosphères adultes révèle que les protéines IQGAP1 et β -caténine co-localisent au niveau des jonctions intercellulaires.

II.1.2 ARTICLE N°1

The Journal of Neuroscience

IQGAP1 regulates VEGF-triggered neural progenitors migration.

Journal:	<i>Journal of Neuroscience</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Regular Manuscript
Manuscript Section:	Cellular Molecular
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Balenci, Laurent; INSERM EMI 104, DRDC, CEA Grunwald, Didier; INSERM EMI 104, DRDC, CEA Deloulme, Jean Christophe; CEA-Grenoble, DRDC-TS, INSERM 0104 Saoudi, Yasmina; INSERM U 366, DRDC, CEA Bernards, André; Massachusetts General Hospital, Cancer Center Baudier, Jacques; Cea de Grenoble, DRDC-TS, INSERM 0104
Keywords:	IQGAP1, VEGF, Migration, neural precursor, neuronal progenitor cell, Rac1, Rho GTPases, scaffolding proteins
Themes & Topics:	d. Neural stem cells: Neurogenesis after birth < 1. Neurogenesis and Gliogenesis < Theme A: Development, f. Cell migration < 1. Neurogenesis and Gliogenesis < Theme A: Development



Cellular/Molecular Neuroscience**Senior Editor : Dr. Marie T. Filbin****IQGAP1 regulates VEGF-triggered neural progenitors migration.**

Abbreviation title: IQGAP1 regulates neural progenitors migration.

Laurent Balenci¹², Didier Grunwald¹², Jean Christophe Deloulme¹², Yasmina Saoudi³, André Bernards⁴, and Jacques Baudier¹²

¹INSERM EMI 0104, Grenoble, France, ²DRDC-TS, CEA Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France, ³INSERM Unité 366, Grenoble, France, ⁴Massachusetts General Hospital Cancer Center, Bldg. 149, 13th Street, Charlestown, MA 02129, USA.

Correspondence should be addressed to:

Jacques Baudier

INSERM EMI 0104 / TS-DRDC

CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs

38054 Grenoble Cedex 9

France

Tel: (33)4 38 78 43 28; FAX: (33)4 38 78 50 58

Email: jbaudier@cea.fr**Number of Figures: 8****Keywords:** Cdc42, IQGAP1, migration, neural progenitors, neurogenesis, VEGF.

Acknowledgments: We thank Prof. J. LaMarre (Guelph University) for critical reading of the manuscript, Dr.Daniel Vittet (INSERM EMI-219, Grenoble) for VEGF-A gift and stimulating discussions and N. Bertacchi for animal genotyping. This work was supported by grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC N° 4725), la Région Rhône Alpes (Emergence N°8HC04H00), and l’Institut National du Cancer (PL114).

Abstract.

In the germinative zone of the adult rodent brain, neural progenitors migrate into niches delimited by astrocyte processes to differentiate into neural precursors. In the present study we report a modulating role for the IQGAP1 scaffolding protein in neural progenitor migration. IQGAP1 protein is expressed in amplifying neural progenitor and precursor cells of the sub ventricular zone (SVZ) and the rostral migration stream (RMS). To determine functions for IQGAP1 in neural progenitor cells, we compared properties of neural progenitor cells from wild-type and *Iqgap*-null mice *in vivo* and *in vitro*. The *in vivo* studies reveal a delay in the transition of *de novo* neural progenitors into precursor cells in *Iqgap*-null mice. *In vitro*, IQGAP1 is demonstrated to be a key downstream effector of the VEGF-dependent motility response of neural progenitor cells that also impacts on neuronal differentiation. The Rho-family GTPase associated with cell motility, Cdc42 and Rac1, are two major partners of IQGAP1 in neural progenitors. Finally, astrocytes of the neurogenic SVZ and RMS are shown to express VEGF. Taken together, these studies suggest that VEGF synthesized by astrocytes is involved in the guidance of neural progenitors to neurogenic niches, and that IQGAP1 and Cdc42/Rac1 are involved in the transduction of this VEGF-dependent motility signal.

Introduction.

Neurogenesis persists in the adult mammalian brain in restricted proliferative zones, including the anterior subventricular zone (aSVZ) of the lateral wall of the lateral ventricles (Temple and Alvarez-Buylla, 1999). Three major cell types constitute the neurogenic sub-ependymal layer (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). These are, GFAP+ cells which are the neural stem cells in this brain region (also called type B cells). Type B cells give rise to multipotent neural progenitors, designated type C cells, which lack morphological or immunohistochemical characteristics of either glia or neuroblasts. Type C cells are the most actively dividing cells in the aSVZ (Doetsch et al., 1997). After several cycles of division, type C cells migrate into niches delimited by astrocyte processes to differentiate into neural precursors (type A cells) that express the cell surface adhesion molecule PSA-NCAM. Type A cells are still capable of proliferation, although at a much lower rate than type C cells (Doetsch et al., 1997; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Type A cell chains coalesce in the proximal rostral extension (RE) of the aSVZ forming a restricted path called the rostral migratory stream (RMS) and migrate to the olfactory bulb (OB) where they differentiate into interneurons (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Recent studies have shown that stem cells and neural progenitors are not exclusively confined to the SVZ, but are also present in the entire RMS, including the distal portion within the OB (Gritti et al., 2002).

Little is known about the signals that promote proliferation of neural progenitors, their directed migration toward glial tunnels and their subsequent differentiation into neural precursors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been implicated in these different aspects of neural progenitors biology. VEGF promotes neural progenitor expansion *in vivo* (Jin et al., 2002; Schanzer et al., 2004) and promotes directed migration of undifferentiated neural progenitors *in vitro* (Zhang et al., 2003). Characterization of VEGF signaling in neural progenitors may help to clarify the function of VEGF in adult mammalian neurogenesis. We identify here the IQGAP1 protein as a regulator of the chemotaxis of neural progenitors in response to VEGF stimulation.

IQGAP1 is a scaffolding protein, abundant in epithelial and endothelial cells, that binds to a diverse array of signaling and structural molecules (For review see (Brown and Sacks, 2006). By interacting with its target proteins, IQGAP1 participates in multiple cellular functions, including cell-cell adhesion (Lui et al., 2005; Noritake et al., 2005) and migration (Fukata et al., 2002; Mataraza et al., 2003; Yamaoka-Tojo et al., 2004; Kholmanskikh et al., 2006). Surprisingly, in light of the multiple functions that have been attributed *in vitro* to IQGAP1, mouse *Iqgap1*- null mutants show no obvious defects during development or for most of their adult life (Li et al., 2000). We here show that in brain, IQGAP1 is not only expressed by epithelial and endothelial cells but also by neural progenitors and their precursor progeny and that IQGAP1 is an important part of the VEGF signaling pathway involved in the guidance of neural progenitors to neurogenic niches for neuronal differentiation.

Materials and methods

Animals.

Germline *Iqgap1*-null mutant mice were generated previously by Li et al. (2000) and maintained on SV-129 background. Double heterozygous mice were crossed to produce deficient (*Iqgap1* -/-) and wild type animals. Animals were genotyped by PCR-based assays according to standard protocols used by Li et al. (2000).

Antibodies.

The following primary antibodies were used: IQGAP1(H-109) (rabbit polyclonal , Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, France); Nestin (mouse monoclonal IgG, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) ; GFAP (mouse monoclonal IgG, Chemicon International, Inc., Euromedex, France ; chicken polyclonal, Abcam, France) ; rabbit polyclonal IgG, DAKO Cytomation, S.A, France); VEGF (rabbit polyclonal , Abcam, France); VEGFR-2 (Flk-1) (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, France); BrdU (rat monoclonal, Immunologicals Direct.com.); Ki-67 (mouse monoclonal IgG, Abcys, S.A, France); PSA-NCAM (mouse monoclonal IgM, Abcys, France); Tuj-1 (or β III-tubulin) (rabbit polyclonal, Eurogentec, France); O4 (mouse monoclonal IgM, home made hybridoma medium); Rac-1 (mouse monoclonal, BD Biosciences, France); Cdc-42 (mouse monoclonal, BD Biosciences, France). β -catenin (mouse monoclonal, Pharmingen). Secondary anti mouse and anti-rat antibodies conjugated to Cyanin 3 or Cyanin 5 were from Jackson immunoresearch Laboratories. Secondary anti-mouse and anti-rat antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 were from Molecular Probes Inc. Anti Chicken polyclonal -IgY-ab6569 was from Abcam.

Immunohistochemistry.

Three month-old animals were deeply anesthetized and killed by transcardial perfusion of saline solution (NaCl 150 mM) followed by 4% para-formaldehyde. After 24h in 4% para-formaldehyde, brains were cryopreserved and 14 μ m-sagittal and 20 μ m-coronal cryostat (Leica CM 3000) sections were cut. Cryosections were permeabilized in Tris Buffered Saline (TBS) containing 0.2% Triton X-100 and blocked in 5% normal goat serum-TBS (NGS-TBS). After incubation with primary antibodies in NGS-TBS over night at 4°C, sections were washed in TBS and stained with the appropriate secondary antibodies. Sections were counterstained with nuclear marker Hoechst 33258 (1 μ g/ml). Images were obtained with a Zeiss (Axiovert 200M) microscope and with Leica (TCS SP2) confocal microscope.

Immunocytochemistry.

Cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma)-coated glass coverslips, washed in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.2% Triton X-100. After incubation with

primary antibodies in NGS-TBS over night at 4°C, cells were washed in TBS and stained with the appropriate secondary antibodies.

BrdU administration and labeling.

Different protocols of BrdU (Sigma-Aldrich, France) intra-peritoneal injections were performed (100 mg/kg per body weigh) to label different dividing cell populations: (1) A single injection, 30 min before euthanasia which preferentially labels label rapidly dividing “type C” cells. (2) Three successive injections (1 per hour) with the sacrifice of animals 1h after the last injection to label an important pool of S-phase cycling cells. For counting experiments, serial sections in the aSVZ were selected. Counting experiments represent an average of three independent experiments. For quantitative analysis of the percentage of BrdU+/PSA-NCAM and BrdU+/PSA-NCAM+ cells, two wild type and *Iqgap1*-null mice from the same litter were injected with BrdU 3 times (1 per hour) and sacrificed 1h after the last injection. From each animal, we selected five serial sections in four different precise regions extending rostro-caudally from the olfactory bulb to the lateral ventricles. Presented results are the average of two independent experiments. After fixation and cryosectioning, brain slices were permeabilized as describe above, incubated in HCl 2N at room temperature, neutralized in sodium borate buffer 0,1M and washed in TBS buffer. Immunohistochemical staining was performed as describe above.

Neurosphere cultures, differentiation and chemoattractant assays.

Null-mutant and wild-type mice were killed by cervical dislocation. Brains were removed and placed in Phosphate Buffered Saline (PBS), the ventricular walls were dissected, transferred in dissociation medium containing Trypsin (5000U, Sigma), 0,67mg/ml hyaluronidase (2000U/mg,Sigma) and 0,2mg/ml kynurenic acid (Sigma) and kept 30min in incubator (37°C,5%CO₂). Tissues were washed in DMEM medium with 20% Fetal Bovine Serum (FBS) to inactivate the enzyme activity and then carefully triturated with a Pasteur Glass pipette. After homogenization, cells were centrifuged and resuspended in basal neurosphere medium (DMEM/F12/B27/BSA 0.1%) complemented with both EGF and bFGF mitogens (20 ng/ml) (Gritti et al. 2002). To assess cell multipotencies, cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma)-coated glass coverslips or onto poly-L-lysine-coated permanox plastic Lab-Teks. Differentiation experiments were performed between 1 and 15 days *in vitro* (DIV) in basal medium in presence of 3% Foetal Bovine Serum. To examine VEGF-A (165) (Abcys S.A, France) effects onto adult neurospheres, dissociated cells from primary neurospheres were firstly expanded 3 days *in vitro* in neurosphere proliferation medium as defined above. After 3 extensive washings with basal neurosphere medium, neurospheres were plated on poly-L-lysine-coated glass-bottom dishes and cultivated in basal medium with N2-complement (Invitrogen, France) supplemented with only 20ng/ml of VEGF-A for videomicroscopy experiments. For chemoattractant assays, cells

were plated onto poly-L-lysine-coated glass coverslips in N2 basal medium closed to VEGF-A source, embedded in Matrigel, (50ng/ml) at a higher concentration to maintain a gradient during 2h.

Immunoprecipitation.

Cells were lysed on ice in lysis buffer (50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.5% Triton X100, 2mM EDTA/EGTA) supplemented with phosphatase inhibitor and protease inhibitor cocktails. Lysates were passed thru a 26G needle and centrifuged to remove insoluble material. Supernatant were either boiled in 1X DTT laemlli buffer (total cell lysates), or incubated with anti IQGAP1 antibodies together with protein A Sepharose (Pharmacia) for 30 min rotating at 4°C. The immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, transferred to a new eppendorf tube and the beads boiled in 1X laemlli with 20mM DTT. Proteins were separated by SDS-PAGE using 6% or 10% polyacrylamide concentrations. Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes.

Video microscopy.

For time-lapse microscopy, secondary neurospheres derived from adult wild-type and IQGAP null mice were transferred to poly-L-Lysine-coated glass-bottom dishes covered by a membrane permeable to CO₂ in the absence or presence of VEGF-A (20 ng/ml), and then placed inside the video microscopy platform equipped with a device enabling regulation of temperature and CO₂ level. Time lapse of Z series images (Z= 13) for multiple positions (n=10) were collected with a inverted motorized microscope (Axiovert 200M, Zeiss, Germany) controlled by MetaMorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA). Cells were observed with an plan neofluar objective 40x 0.75 NA and phase contrast images were acquired with a CoolSnap HQ charge-coupled device camera (Roper Scientific, Trenton, NJ) every 2 min for 8 hours with an acquisition time of 25 ms under a low halogen illumination to avoid cell damage. For each position, the best focus was chosen before the reconstitution of the movie.

Reverse transcription-PCR from adult neurospheres.

Total RNA were extracted with Trizol solution (Invitrogen, France) and cDNA were isolated using the SuperScript™ First Strand kit (Invitrogen, France). 1 µg of RNA was used to synthesize cDNA with oligo-(dT) 12-18 primers and 1 µl of SuperScript II reverse transcriptase and was pursued according to manufacturer's instructions. For PCR (95°C > 45s, 57°C > 25s, 72°C > 50s, 40 cycles) experiments, 1 µl of cDNA was used to amplify specific sequences for Flt-1 (forward, 5'-CATGCCTCTGGCCACTTG-3'; reverse, 5'-CTCTGATGGTATCGTGG-3') and Flk-1 (forward, 5'-TGGCATCAAGGAAGTGTATCC-3'; reverse, 5'-TATTCCCAGAGAACACACC-3').

Results.

IQGAP1 is expressed by neural progenitor and precursor cells in the subventricular germinal zone and the rostral migration stream in the adult mouse brain.

Affinity purified antibodies against an N-terminal epitope were used to probe IQGAP protein expression in brain extracts derived from wild-type and *Iqgap1*-null mice (Fig. 1A). The antibodies recognize a single protein band with the molecular mass corresponding to IQGAP1 (Mr. 180 kDa). The protein band is not detected in extracts derived from *Iqgap1*-null mice. In wild-type brain, the IQGAP1 protein is most abundant in extracts obtained from the sub-ventricular zone (SVZ).

To investigate the cellular expression of IQGAP1 protein in adult mouse brain, we compared the immunostaining pattern observed with IQGAP1 antibodies in *Iqgap1*-null mice and wild-type animals (Fig. 1B-C). The IQGAP1 immunoreactivity is completely absent in *Iqgap1*-null mice, confirming the specificity of the antibodies (Fig. 1B). In the brain of wild-type animals IQGAP1 antibodies stain the endothelial cells, whereas there is no labeling of astrocytes, oligodendrocytes and neuronal cell soma. In the sub-ventricular zone (SVZ), strong IQGAP1 immunoreactivity is associated with the plasma membrane of the epithelial ependymal cells that form the walls of the brain ventricles and with dense clusters of cells that appose the ependymal cell layer in the aSVZ (Fig. 1C).

To identify the IQGAP1+ cells in the aSVZ, brain slices were triple immunostained for IQGAP1, GFAP and the type A cell specific antigen, PSA-NCAM (Fig. 2 A-B). Results show that PSA-NCAM+ cells ensheathed within GFAP+ astrocyte processes express IQGAP1 (Fig. 2A). There are also individual or small clusters of IQGAP1+/PSA-NCAM cells isolated from type A cells by astrocyte processes (Fig. 2A, arrowhead). The IQGAP1+/PSA-NCAM cells often appear as mitotic cells (Fig. 2B, arrowhead) and are strongly labeled with BrdU after a 30 min. BrdU pulse (Fig. 2C, arrowheads). All these characteristics are features of neurogenic progenitors (type C cells) (Doetsch et al., 1997; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002).

IQGAP1 immunoreactivity persists in the entire RMS (Fig. 3 A-D). In the proximal RE, the IQGAP1+ cells are often found ensheathed through glial processes in close association with blood vessels (Fig. 3 A-B). Within these perivascular niches, the IQGAP1+ cells are immunopositive for PSA-NCAM (Fig. 3A) and Ki-67 antigen that specify proliferating cells (Fig. 3B). Within the RMS, IQGAP1+/PSA-NCAM cells can also be found as clusters lining the chains of PSA-NCAM+ precursors (Fig. 3C, arrowhead). These IQGAP1+/PSA-NCAM- cells are labeled with BrdU after 30 min BrdU pulse, and may thus correspond to the neural progenitors cells that reside within the RMS (Gritti et al., 2002). In the most distal part of the RMS, IQGAP1 immunoreactivity persists into neural progenitor (PSA-NCAM+) and precursor (PSA-NCAM+) cells (Fig. 3D). In this region, IQGAP1 immunoreactivity markedly decreases in PSA-NCAM+ neuroblasts that migrate to the OB (Fig. 3D, panels e-g).

Taken together, our immunohistochemistry studies identify IQGAP1 as a new marker of amplifying neural progenitors and precursors in the adult mouse brain.

***Iqgap1*-null mice show apparent delay in differentiation of neural progenitors.**

Comparison of wild-type and *Iqgap1*-null mouse brain revealed no apparent phenotype associated with the cellular organization of the SVZ, the rostral extension (RE) of the SVZ, the RMS and the OB. Because IQGAP1 is preferentially expressed in proliferating cells, we examined whether IQGAP1 could play a role in the control of neural progenitor and precursor cells proliferation. Wild type and *Iqgap1* null mice were injected with BrdU and euthanized 30 min after injection. With 30 min pulse labeling, neural progenitors are preferentially labeled (Doetsch et al., 1997). Counting the number of BrdU labeled cells in the SVZ revealed no significant difference between wild-type and mutant mice (data not shown). The same result was obtained with mice that received three successive BrdU injections (1 per hour) with euthanasia of animals 1h after the last injection (not shown). These results suggest that the absence of IQGAP1 do not affect neural progenitor and precursor cell proliferation. However, significant differences between wild type and mutant mice were revealed by comparing the ratio of *de novo* amplifying neural progenitors (BrdU+/PSA-NCAM-) and precursor (BrdU+/PSA-NCAM+) cells (Fig. 4 A-B). In these studies, wild type and *Iqgap1* null mice from the same litter received three successive BrdU injections (1 per hour) with the euthansia of animals 1h after the last injection. Serial sections extending rostro-caudally from olfactory bulb to lateral ventricles were double immunostained with BrdU and PSA-NCAM antibodies. Representative immunostaining of sections in the proximal RE (Fig. 4A, panels a and c) and the RMS (Fig. 4A, panels b and d) of wild type and *Iqgap1* null mice show that both neural progenitors (PSA-NCAM) and precursor cells (PSA-NCAM+) incorporated BrdU. BrdU-labeled neural progenitors can also be distinguished from BrdU-labeled precursor cells by their large irregular nuclei (arrowhead in panel c) and their localisation at the periphery of the chain of migrating PSA-NCAM+ cells (arrowhead in panel d) (Doetsch et al., 1997). Analysis of the ratio between BrdU+/PSA-NCAM and BrdU+/PSA-NCAM+ in wild-type and mutant mice revealed that *Iqgap1* null mice have nearly twice the number of BrdU+/PSA-NCAM-cells than their wild-type counterparts (Fig. 4 B). These observations suggest that the absence of IQGAP1 delays differentiation of neural progenitors. Such apparent delay in differentiation might be an intrinsic property of *Iqgap1*-null neural progenitors or could result from altered migration of neural progenitors to neurogenic niches for neuroblast differentiation.

IQGAP1 regulates VEGF-triggered neural progenitors migration *in vitro*.

To shed light on specific functions function of IQGAP1 in neural progenitor migration/differentiation we performed *in vitro* studies using neural progenitors grown as neurospheres. neural progenitors have

been isolated from adult wild-type and *Iqgap1*-null mouse SVZ and grown as neurospheres as previously described (Gritti et al., 2002). We first confirmed the expression of IQGAP1 protein in neural progenitors by indirect immunofluorescence and Western blot (see Fig. 7), and controlled the absence of IQGAP1 immunoreactivity in neurospheres derived from *Iqgap1*-null mice (data not shown). We next compared the proliferation and differentiation properties of wild-type and IQGAP1 null cells. Analysis of cell cycle duration on secondary neurospheres revealed no significant differences between wild-type and mutant cells (data not shown), confirming the *in vivo* observation that IQGAP1 do not markedly affect on neural progenitor cell proliferation.

We also investigated the intrinsic differentiation capacity of neural progenitors upon withdrawal of the mitogens in low serum-containing medium (Gritti et al., 2002; Shen et al., 2004). During 15 days we analyzed the kinetics of differentiation as well as the percentage of neurons (Tuj-1+), astrocytes (GFAP+) or oligodendrocytes (O4+) produced by wild-type and IQGAP1 null cells. Results show that progenitor differentiation capacity and specificity is not dependent on IQGAP1 (Supplemental Fig. 1). Because IQGAP1 has recognized functions in cell motility signal transduction (Fukata et al., 2002; Briggs and Sacks, 2003; Mataraza et al., 2003; Kholmanskikh et al., 2006), we next investigated whether IQGAP1 could function as a regulator of VEGF-triggered neural progenitor migration (Zhang et al., 2003). As previously found with rat neural progenitors (Zhang et al., 2003), mouse wild-type and mutant neural progenitors do express VEGF-A receptor (VEGF-R) 1 (Flt1) and 2 (Flk1) (Fig. 5A). The VEGF-R2 specifically mediates the chemotactic activities of VEGF in rat neural progenitors (Zhang et al., 2003). We used time-lapse video microscopy to monitor the behavior of wild-type and IQGAP1 deficient neurospheres plated on polylysine-coated glass slides in medium depleted of EGF and bFGF but supplemented with physiological VEGF concentration (20 ng/ml). Clear-cut differences between wild-type and IQGAP1-null cells were observed (Fig. 5B). Wild-type cells displayed strong positive chemokinesis as revealed by cell cells spreading from the neurospheres. In contrast, *Iqgap1*-null cells show absolutely no chemotactic response to VEGF during the time of the experiment. These experiments were repeated with VEGF embedded into matrigel and placed on one side of the culture dish. Only wild-type cells dissociated from the neurospheres and migrated asymmetrically toward the VEGF source (data not shown). These data show that IQGAP1 protein is a key downstream effector in the chemotactic response of undifferentiated neural progenitors to VEGF stimulation.

IQGAP1 regulates VEGF-triggered neuronal differentiation *in vitro*.

To determine the fate of the neurosphere cells migrating in response to VEGF, we performed immunocytochemical characterization of the wild-type neurospheres, after 2h and 8h of VEGF stimulation (Fig. 6A). In this experiment, neurosphere cells were double immunostained with NG2 antibodies that strictly label multipotent progenitors cells *in vitro*, and with Tuj-1 antibodies that label cells committed to neuronal differentiation. Results showed that after 2h, cells that migrated out of

the neurospheres had lost NG2 immunoreactivity and many stained positively with Tuj-1 antibodies (panels d-f). After 8 h, NG2 immunoreactivity is residual and most of the cells adopted a neuronal fate (panels g-i). In contrast to differentiation induced in low serum-containing medium (Supplemental Fig. 1), none of the cells differentiated into oligodendrocytes (O4+) or astrocytes (GFAP+) (not shown).

We next compared the effects of VEGF-A on the timing of neuronal differentiation of wild-type and *Iqgap1*-null neurosphere cells (Fig. 6 B-D). Neurosphere cells stimulated with VEGF for 8h or 24h were fixed and double immunostained with nestin and Tuj-1 antibodies. The staining pattern revealed that neuronal differentiation correlated with transition of multipotent neural progenitors (nestin+/Tuj-1-) into cells with intermediate nestin+/Tuj-1+ phenotype. The nestin+/Tuj-1+ cells could represent the neural precursor stage. Nestin+/tuj-1+ cells subsequently differentiate into nestin-/Tuj-1+ neuroblasts. Figure 6B illustrates a typical staining of wild-type cells after 24h stimulation. It shows that there is a strict correlation between the distance of cell migration and the transition from the intermediate nestin+/Tuj-1+ stage to the nestin-/Tuj-1 neuroblast stage. Quantitative analysis revealed that the timing for neuroblast differentiation is severely delayed in *Iqgap1* null neurospheres compared to wild-type cells (Fig. 6 C-D). Thus, IQGAP1 regulates VEGF-triggered neural progenitor migration that also impacts on neuronal differentiation *in vitro*.

Cdc42 and Rac1 are two major targets of IQGAP1 in the VEGF pathway of neural progenitor chemotaxis.

To investigate the molecular mechanism involving IQGAP1 in the VEGF-dependent chemotactic response, we examined the interaction of IQGAP1 with recognized targets previously identified as key components of IQGAP1 signal transduction in cell motility and migration, including the Rho-family GTPases Rac1 and Cdc42 (Fukata et al., 2002; Mataraza et al., 2003; Kholmanskikh et al., 2006).

We first analyzed the effect of VEGF stimulation on Rac1 and IQGAP1 sub-cellular localization by confocal microscopy (Fig. 7A). In control neurospheres (panels a-b), Rac1 immunostaining clearly defined cell-cell contacts, whereas IQGAP1 immunoreactivity gave more diffuse punctate staining. Upon VEGF stimulation (panels c-d), IQGAP1 immunoreactivity rapidly re-located to the cell-cell contacts where it co-localizes with Rac1 (Fig. 7A). Co-immunoprecipitation studies confirmed that VEGF stimulation significantly enhanced the interaction between IQGAP1 and Rho-family GTPases (Fig. 7B, compare lane 2 and lanes 3-4). Moreover, there was a marked enrichment of Cdc42 and of Rac1 in IQGAP1 immunoprecipitates compared to total lysate levels, clearly identifying Cdc42 and Rac1 as major partners for IQGAP1 in neural progenitors.

IQGAP1 in complex with Cdc42 and Rac1 can serve as a template for the recruitment of other proteins. In neuronal cells, Lis1 is a key component of neuronal motility signal transduction that complexes with IQGAP1, Cdc42 and Rac1 (Kholmanskikh et al., 2006). In neural progenitors, Lis1

protein is also found associated with IQGAP1 immunoprecipitates (Fig. 7B). Lis1 signal present in IQGAP1 immunoprecipitates is specific since it is not present in control immunoprecipitates using *Iqgap1*-null cells (not shown). However, the amount of Lis1 protein complexed to IQGAP1 is relatively minor compared to the protein present in total cell extract (see also discussion).

Astrocytes of the neurogenic SVZ and the RMS areas express VEGF.

Because VEGF is an attractive guidance cue for the migration of neural progenitors, it was essential to identify potential sources of VEGF in the germinative SVZ and RMS where neural progenitors reside. Indirect immunofluorescence analysis revealed that, in the mouse brain, astrocytes of the SVZ and RMS are characterized by high VEGF immunoreactivity (Fig. 8A), compared to astrocytes of other non neurogenic brain regions (Fig. 8B). It is significant to note that VEGF synthesis by astrocytes associated with de novo neurogenesis has also been observed during post-natal development of the cerebellum (Acker et al., 2001), in brains subjected to enriched environments and performance in the hippocampus (Cao et al., 2004) and after brain injury (Lee et al., 1999). Thus, specialized astrocytes of the neurogenic regions are an endogenous sources of VEGF that might contribute to directed migration of neural progenitors.

Discussion.

In order to use neural stem/progenitor cells in regenerative medicine, a detailed understanding of intrinsic properties and environmental cues that control their behavior and their fate is required. We present here, for the first time, a modulating role of the IQGAP1 scaffolding protein in the context of adult neurogenesis. In the adult brain, IQGAP1 is expressed by the parenchyma endothelial cells, the epithelial ependymal cells of the ventricles and by neural progenitor and precursor cells in the SVZ and the RMS. To shed light on critical functions for IQGAP1 in neural progenitor cells, we compared properties of neural progenitor cells in wild-type and *Iqgap1*-null mice. The major neural phenotype that characterizes *Iqgap1*-null mice is an apparent delay in the differentiation of neural progenitors into precursor cells (Fig. 4). To provide information on the functional role of IQGAP1 in neural progenitors/precursors we used *in vitro* neurosphere cultures. Comparison of the response of wild-type and *Iqgap1*-null neural progenitors to VEGF stimulation revealed a role for IQGAP1 in VEGF-dependent neural progenitor migration. We also found that VEGF stimulation of multipotent neural progenitors elicit both migratory and neuronal differentiation signals, suggesting that these two phenomenon are coupled. The connection between VEGF-dependent migration and neuronal differentiation has not been made previously. We also show that neuronal differentiation accompanying VEGF-mediated migration is delayed in *Iqgap1*-null cells, providing evidence that

IQGAP1 has an integral role in the both VEGF-induced responses. Our immunohistochemical data showing that VEGF immunoreactivity is largely confined to the astrocytes of the aSVZ and the RMS in mouse brain suggest that VEGF synthesized by astrocytes could participate in the recruitment of neural progenitors to new neurogenic environment for neuroblast differentiation. These data corroborate a recent study reporting that VEGF synthesized by astrocytes of the dentate gyrus are important in regulating directed migration of neural progenitors from the germinative sub-granular zone to the granular layer where they differentiate into new neurons (Cao et al., 2004). Because IQGAP1 directly participates in the migration of progenitors in response to VEGF *in vitro*, we propose that *in vivo*, IQGAP1 contributes to neural progenitors migration to new environment for neuronal differentiation. In support to this hypothesis, we have shown that IQGAP1+ neural progenitors which acquired neural precursor phenotype (IQGAP1+/PSA-NCAM+) are often found forming perivascular niches ensheathed through astrocyte processes (Fig. 3 A-B). This new environment, provided by both nearby astrocytes and endothelial cells, most likely contributes to their commitment to neuronal phenotypes. It has already been established that neurogenesis occurs in foci closely associated with blood vessels (Palmer et al., 2000), that astrocytes are important for neurogenesis (Song et al., 2002), and that endothelial cells secrete factors that stimulate neural progenitor survival and differentiation (Louissaint et al., 2002; Shen et al., 2004). In *Iqgap1*-null mice, altered VEGF-dependent progenitor migration to neurogenic niches might explain their delay differentiation into neural precursors (Fig. 4).

In vitro, motility signal triggered in neural progenitor by VEGF correlates with enhanced formation of stable complex between IQGAP1 with Rho family GTPases Cdc42 and Rac1 (Fig. 7), two major partners of IQGAP1 in motility signal transduction (Fukata et al., 2002; Mataraza et al., 2003; Yamaoka-Tojo et al., 2004; Kholmansikh et al., 2006). It has been previously demonstrated that IQGAP1 is phosphorylated on Tyr and Ser residues in endothelial and epithelial cells by membrane-associated kinases such as receptor-associated Tyr kinase and protein kinase C, and this could influence IQGAP1 activities (Yamaoka-Tojo et al., 2004; Li et al., 2005). So we have investigated whether phosphorylation of IQGAP1 by VEGF-receptor associated kinases could contribute to enhance interaction of IQGAP1 with Rho family GTPases in neural progenitors (Supplemental Fig. 2). In neurosphere cells, IQGAP1 did not incorporate phosphate on Ser/Thr nor Tyr residues in resting cells or after VEGF stimulation. It is therefore likely that other signaling pathways triggered upon VEGF stimulation of neural progenitors are responsible for stimulating IQGAP1 interaction with Rho-family GTPase. Calcium signaling is a strong candidate. Previous studies reported that calcium influx promotes IQGAP1 delocalization from the cytosol to the plasma membrane (Mbele et al., 2002) and that Ca²⁺ influx regulates the interaction of IQGAP1 with Rho-family GTPase (Kholmansikh et al., 2006). We also have found that VEGF stimulation of neural progenitors does promote transient Ca²⁺ increase in neurosphere cells (data not shown). These observations corroborate a recent study showing that VEGF-R2 stimulation triggers sustained Ca²⁺ increase in stimulated endothelial cells (Dawson et

al., 2006). Deciphering the role of Ca²⁺ signaling in IQGAP1-mediated motility signal transduction in neural progenitors requires further investigations.

In the RMS, IQGAP1 is also expressed by migrating neural precursors (type A cells). The expression of IQGAP1 in neural precursors is consistent with a recent study showing that IQGAP1 is expressed by cerebellar neuroblasts grown *in vitro*. In isolated cerebellar neuroblasts, IQGAP1 regulates motility signal transduction in response to Ca²⁺ influx triggered via NMDA receptors (Kholmanskikh et al., 2006). However, comparison between wild-type and IQGAP1 null mice revealed no significant differences in the timing of migration of neural precursor cells and neuroblast cells to reach the granular layers of the OB (Supplemental Fig. 3). Hence, the effect of IQGAP1 down regulation on neuroblasts migration is predominantly observed *in vitro*. This suggests that IQGAP1 has only a modulator function rather than an essential role and that mice can develop compensatory mechanisms. It is important to note that, in contrast to neural progenitors, neuroblasts (PSA-NCAM+) do not respond to chemoattraction by VEGF (Zhang et al., 2003). It is thus expected that differences in motility signal transductions may also exist between neural progenitors and neuroblasts. Although common signaling proteins, such as Rho-GTPases, participate with IQGAP1 in neural progenitor and neuroblast motility (present study and Kholmanskikh et al. 2006), we noted two major differences in the proteins present in IQGAP1 immunoprecipitates from neural progenitors compared to neuroblasts. First, robust co-immunoprecipitation between IQGAP1 and Lis1 has been reported in neuroblasts (Kholmanskikh et al., 2006), whereas only a very small amount of Lis1 was recovered in IQGAP1 immunoprecipitate from undifferentiated neural progenitors (Fig. 7B). Next, in neuroblasts, Lis1 interaction with IQGAP1 augments the association of the IQGAP1/Rho-GTPases complex with CLIP-170, whereas we have not been able to detect CLIP-170 associated with IQGAP1 immunoprecipitates from undifferentiated neural progenitors (not shown). The identification and characterization of IQGAP1 partner proteins in neural progenitors would certainly help reveal its specific function in neural progenitors and should also open new perspectives regarding VEGF signaling in neural progenitor chemotaxis.

Finally, the proposed function of IQGAP1 in the regulation neural progenitor motility can be extended to the amplifying tumorigenic cells in human GBM. In a rat model of GBM and in human GBM, but not in oligodendrogiomas, IQGAP1 has been identified as a new molecular marker of niches of amplifying tumor cells that share common antigenic characteristics and architectural organization with neural progenitors (Balenci et al., 2006). It is likely that the IQGAP1 signaling pathway might also play an essential role in the control of the amplifying tumor cell migration in these highly invasive tumors.

Figure legends.

Figure 1. Characterization of IQGAP1 protein in the mouse brain.

A: Western blot analysis of IQGAP1 protein in mouse brain. Brain extracts derived from the SVZ (lanes 1-2) and the brain parenchyma (lanes 3-4) of wild-type (lanes 1 and 3) and mutant (lanes 2 and 4) mice were analyzed with anti-IQGAP1 and anti- β catenin antibodies.
B-C: Indirect immunofluorescence analysis of IQGAP1 immunoreactivity in the aSVZ of *Iqgap1* null (B) and wild-type (C) mice. LV: lateral ventricle, St: striatum. Bar: 50 μ M.

Figure 2: Confocal microscope characterization of IQGAP1+ cells in coronal section of the mouse aSVZ.

A: Triple immunostaining of the mouse aSVZ with IQGAP1 (a), PSA-NCAM (b) and GFAP (c) antibodies. IQGAP1+/PSA-NCAM+ cells are ensheathed within astrocyte processes forming tunnel-like structure (panel d). In a and d, the arrowhead points to IQGAP1+/PSA-NCAM+ cells localized outside the glial tunnel. Bar: 20 μ M.
B: Triple immunostaining of the mouse aSVZ with IQGAP1 (a), PSA-NCAM (b) and GFAP (c) antibodies. Slice was counterstained with Hoescht for DNA (d). In the aSVZ, IQGAP1+/PSA-NCAM+ cells often appear as mitotic cells (arrow head in a and d). Panel d shows a reconstituted cellular composition of the aSVZ. Yellow: ependymal cells; green: type C cells; red: type A cells; blue: astrocyte. Bar: 4 μ M.
C: Mouse was injected with BrdU for 30 min and the wall of the lateral ventricles was triple immunostained with IQGAP1 (a-d), BrdU (b-d) and GFAP (c-d) antibodies. IQGAP1+ cells (arrow head in a, b and d) localized outside the glial tunnel facing the striatal parenchyma are co-labeled with BrdU. Bar: 10 μ m. LV: lateral ventricle.

Figure 3: Characterization of the IQGAP1 positive cells in the proximal rostral extension of the SVZ and the RMS.

A: Coronal section focused on the proximal RE triple immunostained with IQGAP1 (a and d), PSA-NCAM (b and d) and GFAP (c and d) antibodies shows that IQGAP1+/PSA-NCAM+ type A cells ensheathed within glial processes accumulate around blood vessels (BV) (d). Bar: 20 μ M.
B: Triple immunostaining with Hoescht for DNA (a), IQGAP1 antibodies (b and d) and Ki-67 antibody (c and d) show that IQGAP1+ cells are Ki-67+. Bar: 10 μ m.
C: Sagittal section in the RMS of a mouse injected with BrdU for 30 min triple immunostained with IQGAP1 (a and d), BrdU (b and d) and PSA-NCAM (c and d) antibodies. IQGAP1+ cells lining the chains of PSA-NCAM+ neuroblasts (arrow head) are co-labeled with BrdU (d). Bar: 20 μ m.

D: Sagittal section in the most distal part of the RMS stained with Hoescht for DNA (a), and double immunostained with IQGAP1 antibodies (b, d, e and g) and PSA-NCAM antibody (c, d ,f and g). Panels e,f and g are enlargement of boxed area in b,c and d respectively. Arrowhead points to IQGAP1-/PSA-NCAM+ migrating neuroblasts. Bar: 50 μ m

Figure 4. *Iqgap1*- null mice show accumulation of neural progenitors.

A-B: Wild type and *Iqgap1*-null mice from the same litter were injected with BrdU 3 times (1 per hour) and sacrificed 1h after the last injection. A: Representative double immunostaining for BrdU (green) and PSA-NCAM (red) on sagittal sections in the proximal RE (panels a and c; Bar: 20 μ M) and the RMS (panels b and d; Bar: 50 μ M) of wild-type (a-b) and *Iqgap1* null mutant (c-d) mice. Arrowheads point to BrdU+ cells with neural progenitor features.

B: Quantitative analysis of the percentage of BrdU+/PSA-NCAM and BrdU+/PSA-NCAM+ cells in wild type and *Iqgap1*-null mice. Results represent the average of two independent experiments. A total of 2673 BrdU+ cells in wild-type animal and 2877 BrdU+ cells in *Iqgap1* null mice were analysed.

Figure 5. IQGAP1 regulates VEGF-dependent neural progenitor cell migration.

A: RT-PCR analysis performed on wild-type and *Iqgap1* null mutant neurospheres reveal expression of both VEGF receptors Flk-1 (VEGF-R2) and Flt-1(VEGF-R1).

B: Phase contrast reconstitution of time lapse imaging of wild-type and *Iqgap1* null mutant derived neurospheres in response to VEGF (20 ng/ml) stimulation.

Figure 6. VEGF-dependent neural progenitor chemokinesis correlates with neuronal differentiation.

A: Wild-type neurospheres were plated on polylysine-coated glass slides in a basal medium containing N2 complement and supplemented only with VEGF (20 ng/ml). Cells were immediately fixed (a-c) or left 2h (d-f) and 8h (g-i) in the presence of VEGF prior to fixation. Cells were stain with Hoescht for DNA (a, d, g) and double immunostained with anti-NG2 (b, e, h) and anti-Tuj-1 (c, f, i) antibodies. Bar: 20 μ M (a-f) and 40 μ M (g-i).

B-D: The effect of VEGF on the timing of neuronal differentiation. B; Representative wild type neurospheres stimulated with VEGF for 24h and double immunostained with anti nestin (a) and anti Tuj-1 (b) antibodies. Bar: 50 μ M. C-D; Comparison of kinetic of neuronal phenotype acquisition between wild type (C) and *Iqgap1* null mutant (D) neurospheres. Wild type and *Iqgap1* null mutant neurospheres were stimulated with VEGF (20 ng/ml) for 8h and 24h, and double immunostained with anti nestin and anti-Tuj-1 antibodies. Three different differentiation stages were identified based on nestin and Tuj-1 immunoreactivities (see text for details). Results are the average of three independent experiments.

Figure 7. Analysis of IQGAP1 in neurospheres stimulated with VEGF.

A: VEGF stimulation enhances co-localisation of IQGAP1 with Rac1 at to cell membranes. Unstimulated (a-b) or VEGF-stimulated neurospheres (c-d) were double immunostained with anti Rac1 (a and c) and anti-IQGAP1 (b and d) antibodies. Bar: 20 μ M.

B: Characterization of IQGAP1 immunoprecipitates from neurospheres stimulated with VEGF. Total neurosphere extracts (lane 1) and IQGAP1 immunoprecipitates from neurospheres not stimulated (lane 2) or stimulated with VEGF for 10 min (lanes 3) or 30 min (lanes 4) were analyzed by Western blot with polyclonal IQGAP1, and monoclonal Cdc42, Rac1 and Lis1 antibodies as indicated. Results are representative of three independent experiments.

Figure 8. Astrocytes of the germinative SVZ and the RMS express VEGF.

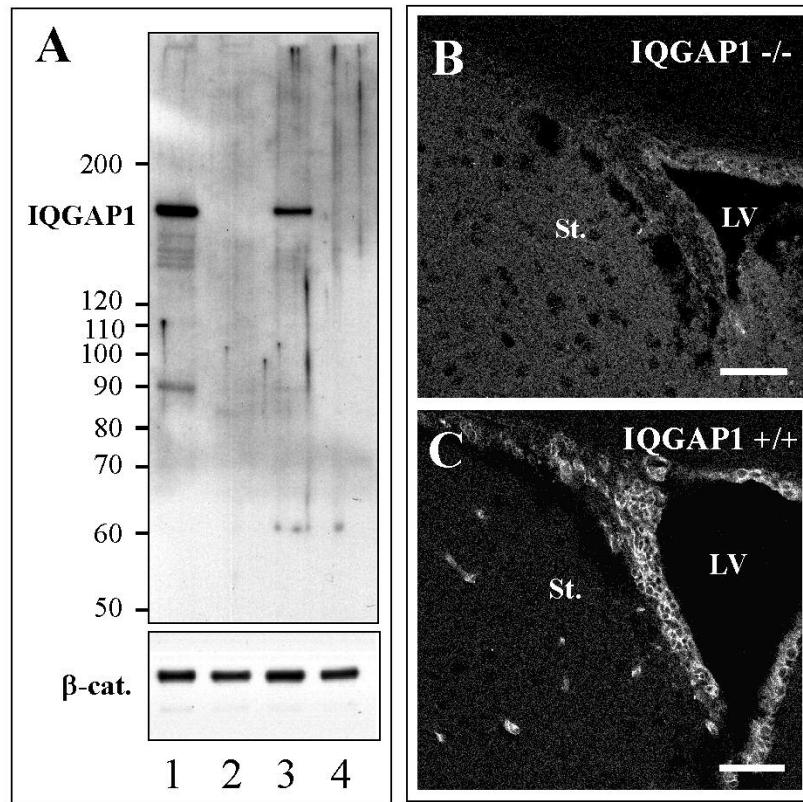
A: Immunostaining on sagittal adult mouse brain sections with anti-GFAP (a, d and e; blue) and anti-VEGF (b and d; green), and anti PSA-NCAM (c and e; red) antibodies demonstrates a co-localization of VEGF with GFAP+ astrocytes in the aSVZ and RMS. LV: lateral ventricle. Bar: 50 μ M.

B: Double immunostaining of adult mouse striatum with anti-VEGF (a and c) and anti GFAP (b and c) antibodies. Slice was counterstained with Hoescht for DNA (c). VEGF immunoreactivity is not detected in astrocytes of the striatal parenchyma. Bar: 50 μ M.

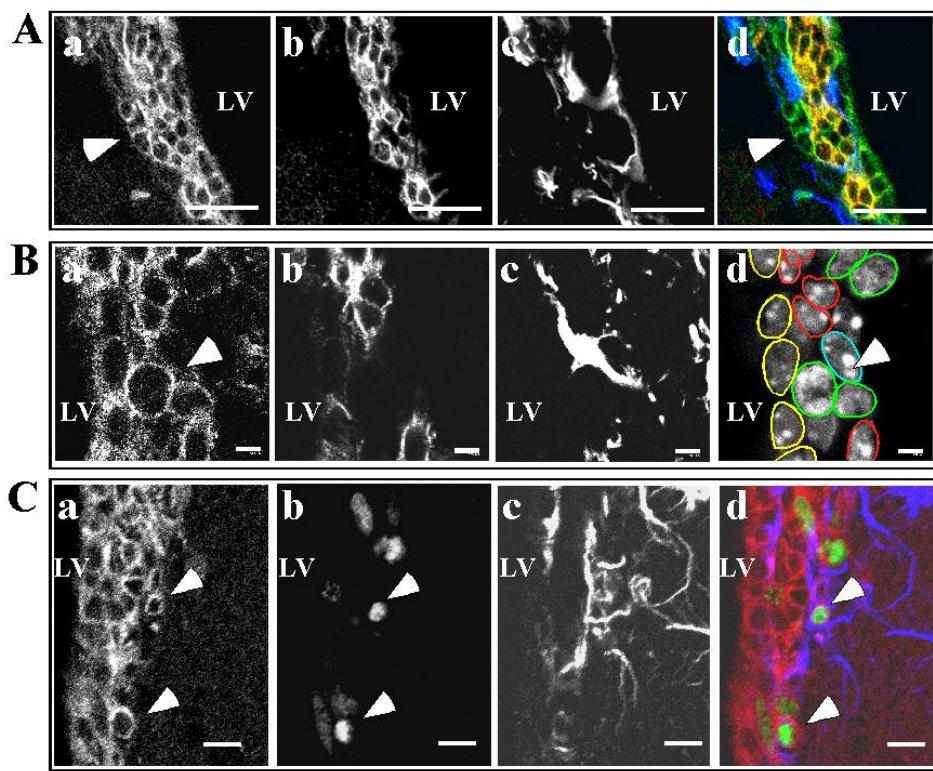
References.

- Acker T, Beck H, Plate KH (2001) Cell type specific expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 and -2 suggests an important role of astrocytes in cerebellar vascularization. *Mech Dev* 108:45-57.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Balenci L, Clarke ID, Dirks PB, Assard N, Ducray F, Jouvet A, Belin MF, Honnorat J, Baudier J (2006) IQGAP1 Protein Specifies Amplifying Cancer Cells in Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res* 66:9074-9082.
- Briggs MW, Sacks DB (2003) IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* 4:571-574.
- Brown MD, Sacks DB (2006) IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol* 16:242-249.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ (2004) VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 36:827-835.
- Dawson NS, Zawieja DC, Wu MH, Granger HJ (2006) Signaling pathways mediating VEGF165-induced calcium transients and membrane depolarization in human endothelial cells. *Faseb J* 20:991-993.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046-5061.
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F, Kaibuchi K (2002) Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109:873-885.
- Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL (2002) Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci* 22:437-445.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.
- Kholmanskikh SS, Koeller HB, Wynshaw-Boris A, Gomez T, Letourneau PC, Ross ME (2006) Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat Neurosci* 9:50-57.
- Lee MY, Ju WK, Cha JH, Son BC, Chun MH, Kang JK, Park CK (1999) Expression of vascular endothelial growth factor mRNA following transient forebrain ischemia in rats. *Neurosci Lett* 265:107-110.
- Li S, Wang Q, Chakladar A, Bronson RT, Bernards A (2000) Gastric hyperplasia in mice lacking the putative Cdc42 effector IQGAP1. *Mol Cell Biol* 20:697-701.
- Li Z, McNulty DE, Marler KJ, Lim L, Hall C, Annan RS, Sacks DB (2005) IQGAP1 promotes neurite outgrowth in a phosphorylation-dependent manner. *J Biol Chem* 280:13871-13878.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Louissaint A, Jr., Rao S, Leventhal C, Goldman SA (2002) Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 34:945-960.

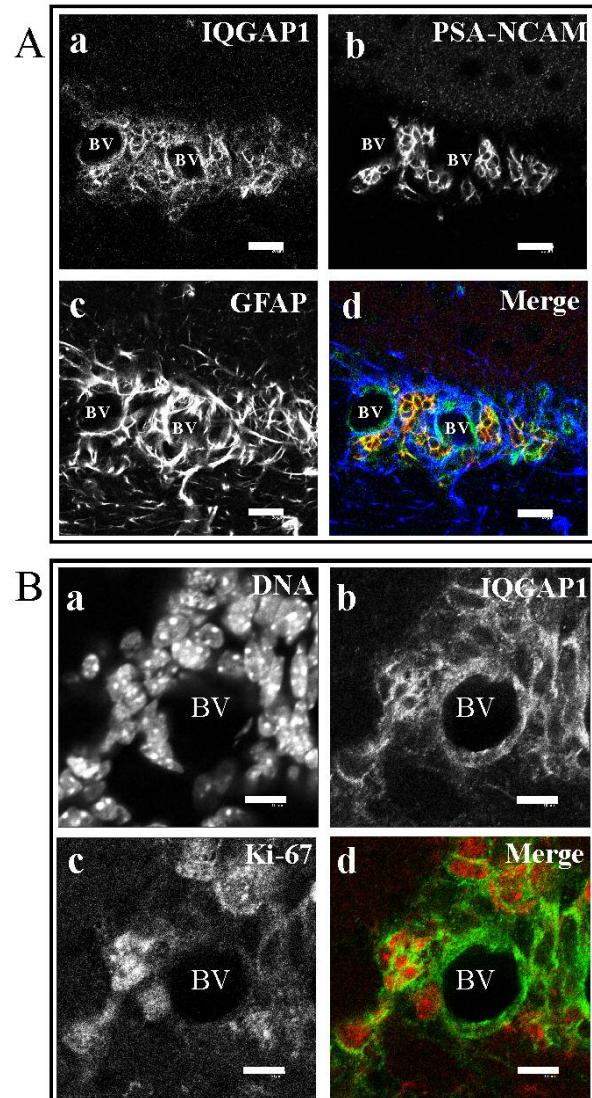
- Lui WY, Mruk DD, Cheng CY (2005) Interactions among IQGAP1, Cdc42, and the cadherin/catenin protein complex regulate Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis. *J Cell Physiol* 202:49-66.
- Mataraza JM, Briggs MW, Li Z, Entwistle A, Ridley AJ, Sacks DB (2003) IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *J Biol Chem* 278:41237-41245.
- Mbele GO, Deloulme JC, Gentil BJ, Delphin C, Ferro M, Garin J, Takahashi M, Baudier J (2002) The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *J Biol Chem* 277:49998-50007.
- Noritake J, Watanabe T, Sato K, Wang S, Kaibuchi K (2005) IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* 118:2085-2092.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG (2004) Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14:237-248.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304:1338-1340.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.
- Temple S, Alvarez-Buylla A (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:135-141.
- Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, Dikalov SI, Chen YE, Tojo T, Fukai T, Fujimoto M, Patrushev NA, Wang N, Kontos CD, Bloom GS, Alexander RW (2004) IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res* 95:276-283.
- Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, Kiss JZ (2003) VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* 163:1375-1384.



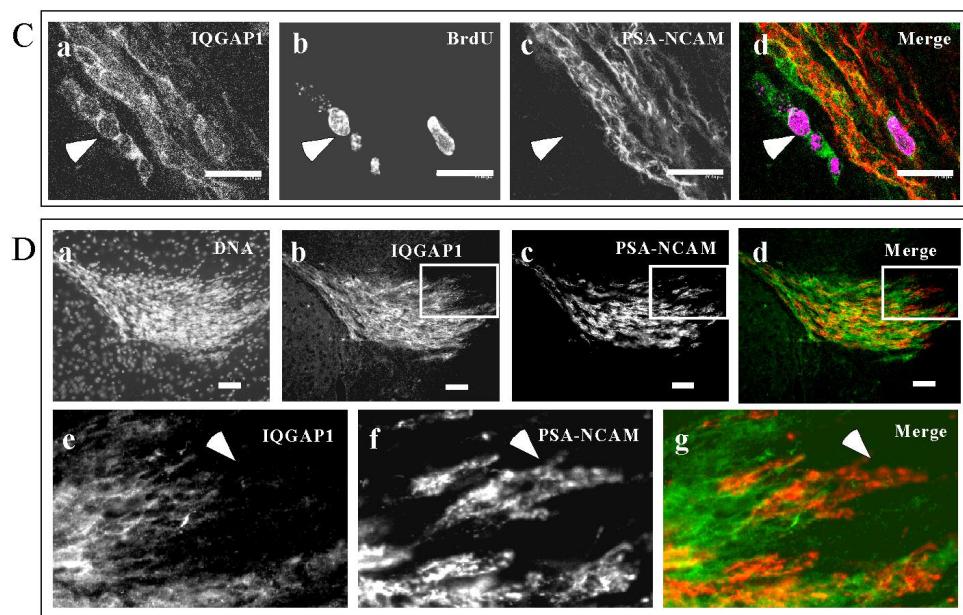
Balenci et al. Fig. 1A-C



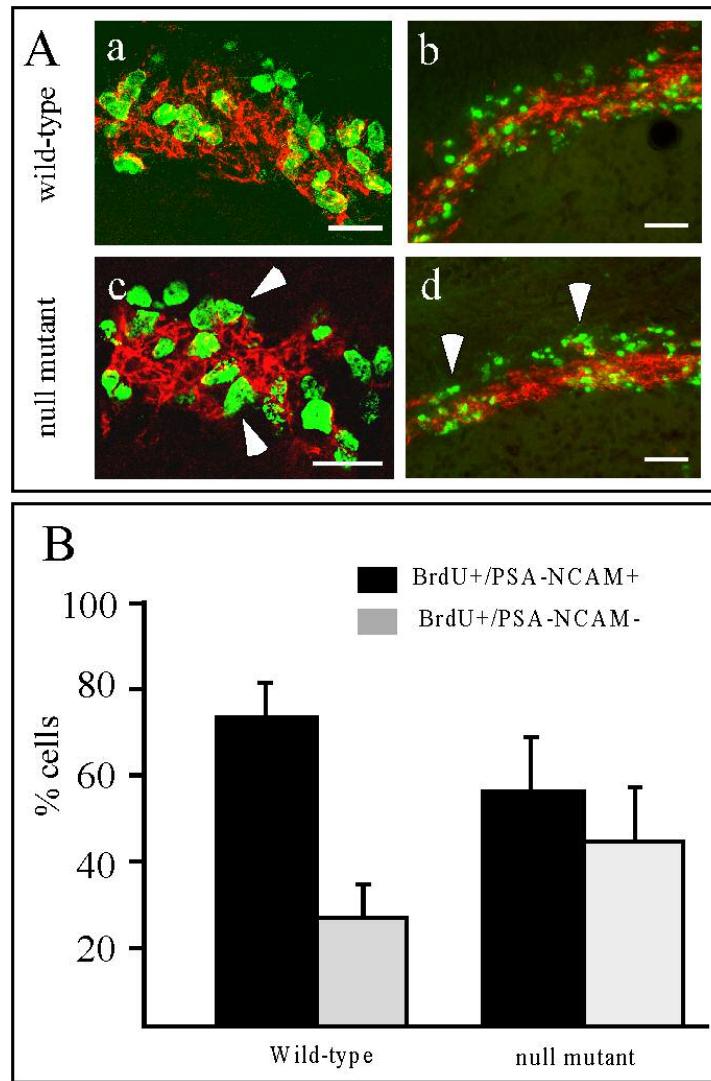
Balenci et al. Figure 2 A-C



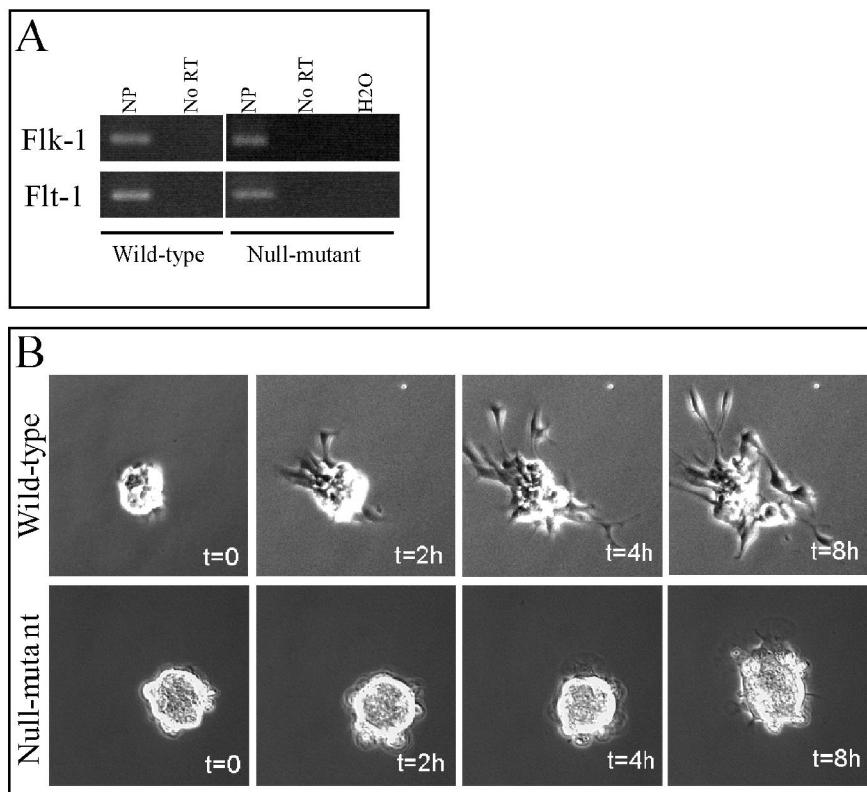
Balenci et al. Fig. 3A-B



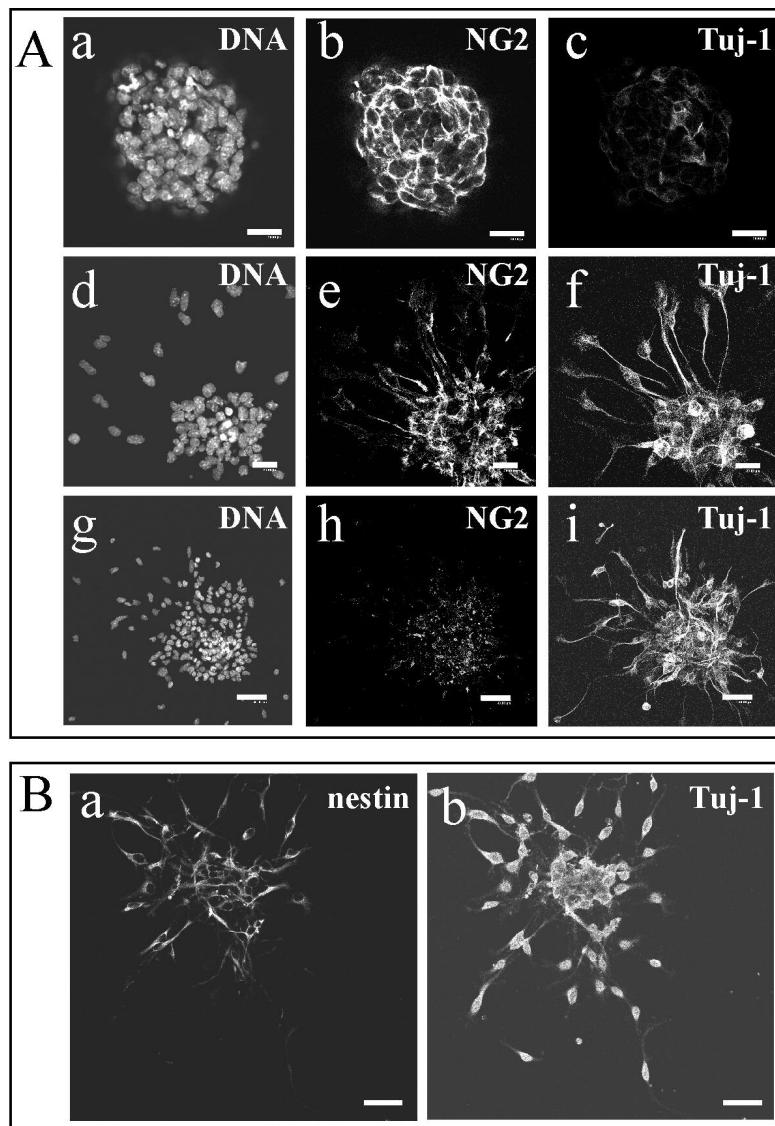
Balenci et al. Fig. 3 C-D



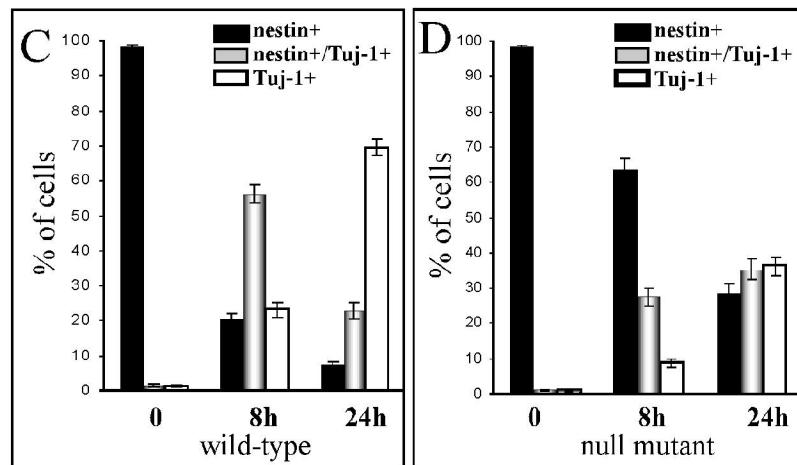
Balenci et al. Fig. 4 A-B



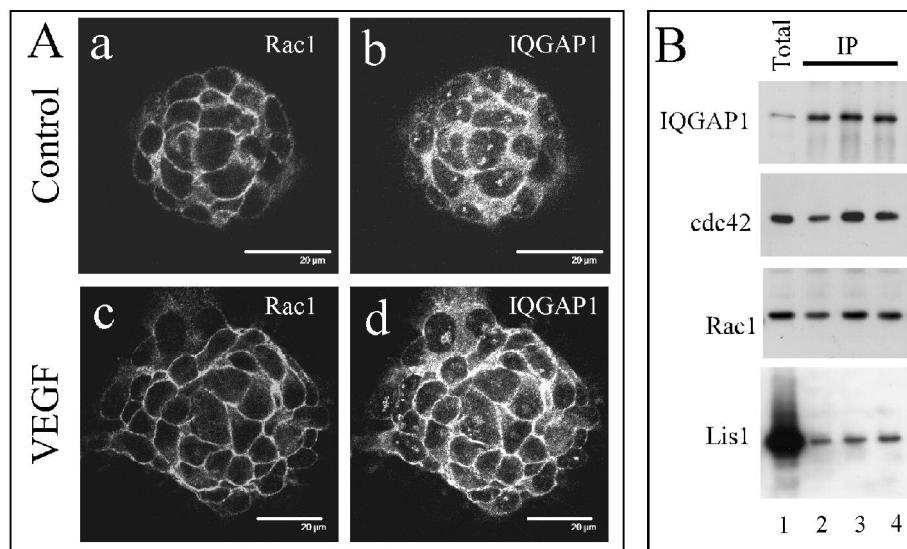
Balenci et al. Fig. 5 A-B



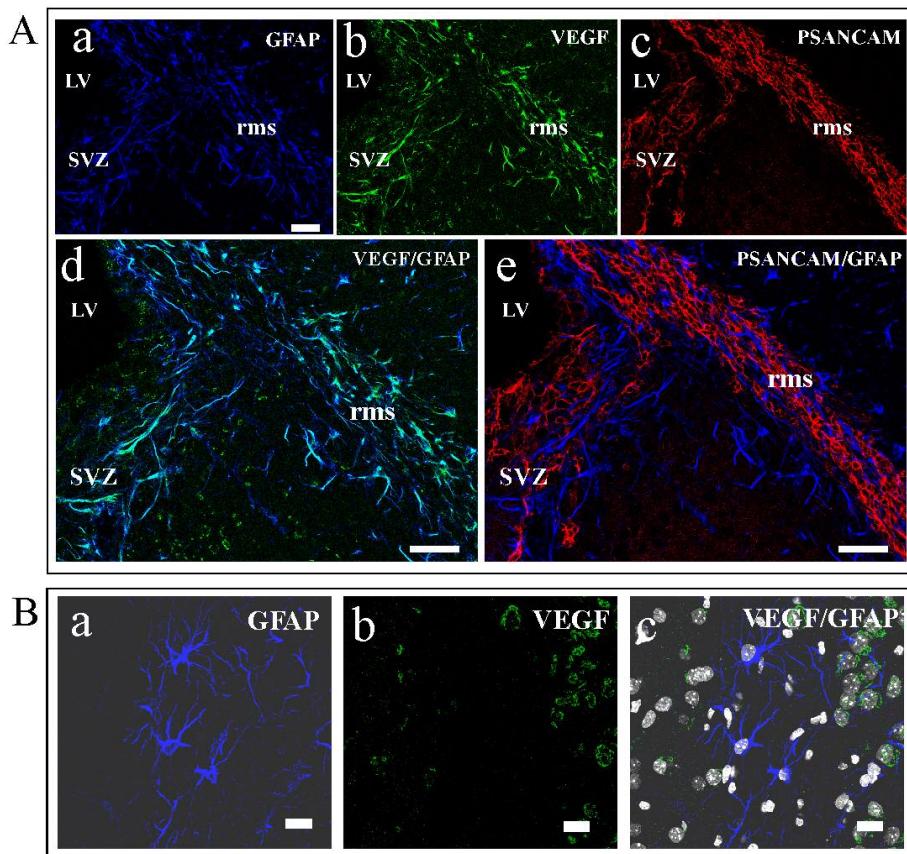
Balenci et al. Fig. 6A-B



Balenci et al. Fig. 6 C-D



Balenci et al. Fig. 7 A-B



Balenci et al. Fig. 8 A-B

Supplemental figure legends.**Supplemental Figure 1. *In vitro* comparison of intrinsic differentiation capacity of wild-type and *Iqgap1* null neurosphere cells.**

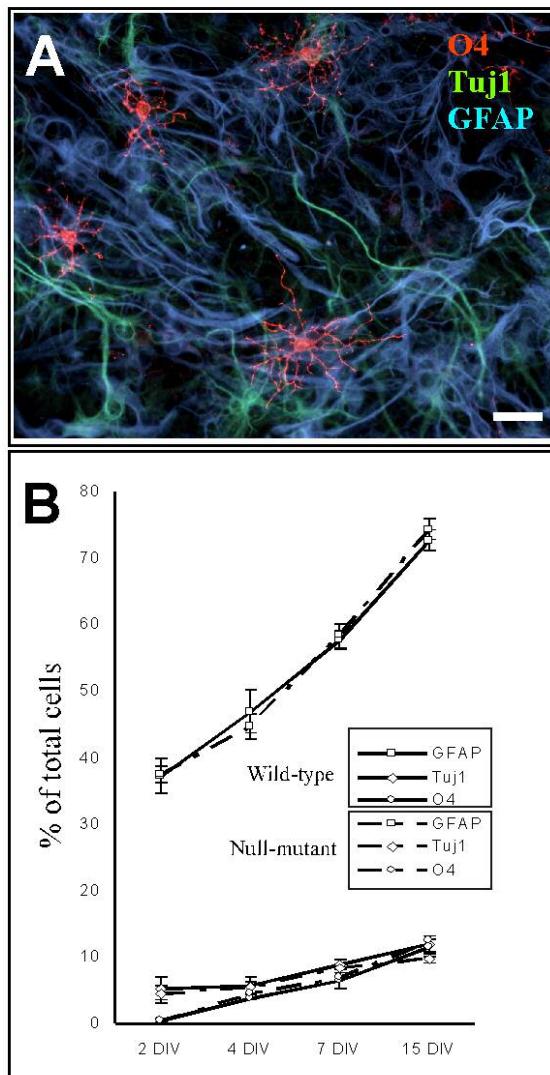
A-B: Wild-type and *Iqgap1* null neurospheres were plated on polylysine-coated glass slides in conditioned medium supplemented with 3% FBS. After 2, 4, 7 and 15 days in culture (DIV) cells were triple immunostained with neural cell markers GFAP, O4 and Tuj-1 (Gritti et al. 2002; Shen et al. 2004) and analysed by confocal microscopy. A: representative triple immunostaining of *Iqgap1* null neurosphere at 15 DIV. B: Quantitative analysis of the different cell populations in wild-type and *Iqgap1* null cultures.

Supplemental Figure 2. IQGAP1 is not phosphorylated in VEGF-stimulated neurospheres.

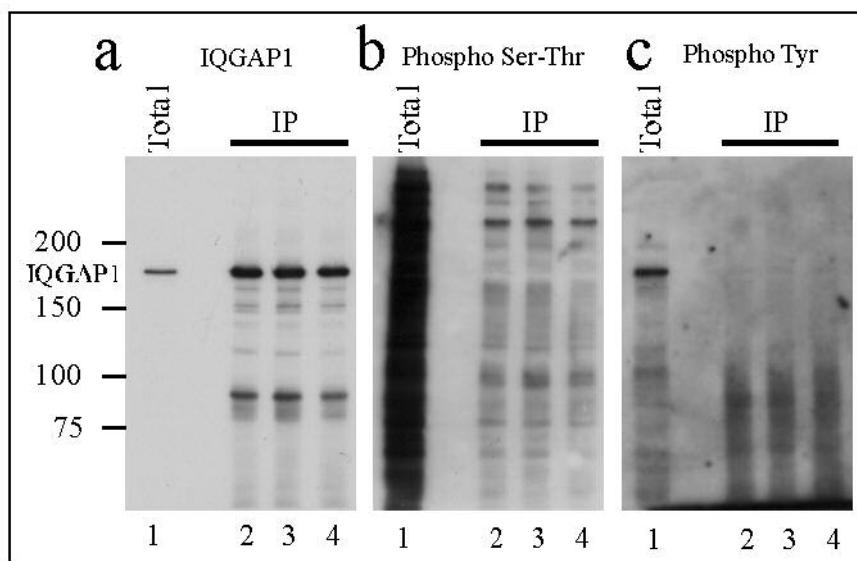
Total neurosphere extract (lanes 1) and IQGAP1 immunoprecipitates from neurospheres not stimulated (lanes 2) or stimulated with VEGF for 10 min (lanes 3) or 30 min (lanes 4) were analyzed by Western blot with: polyclonal IQGAP1 (a), and monoclonal Phospho Ser-Thr antibodies (b) and Phospho Tyr antibody (c). The phosphoprotein band in total neurosphere extract (lane 1) in panel c, migrating in close proximity to IQGAP1 most likely correspond to auto-phosphorylated EGF receptor.

Supplemental Figure 3. *Iqgap1* null mice show no obvious defects in neuroblast migration.

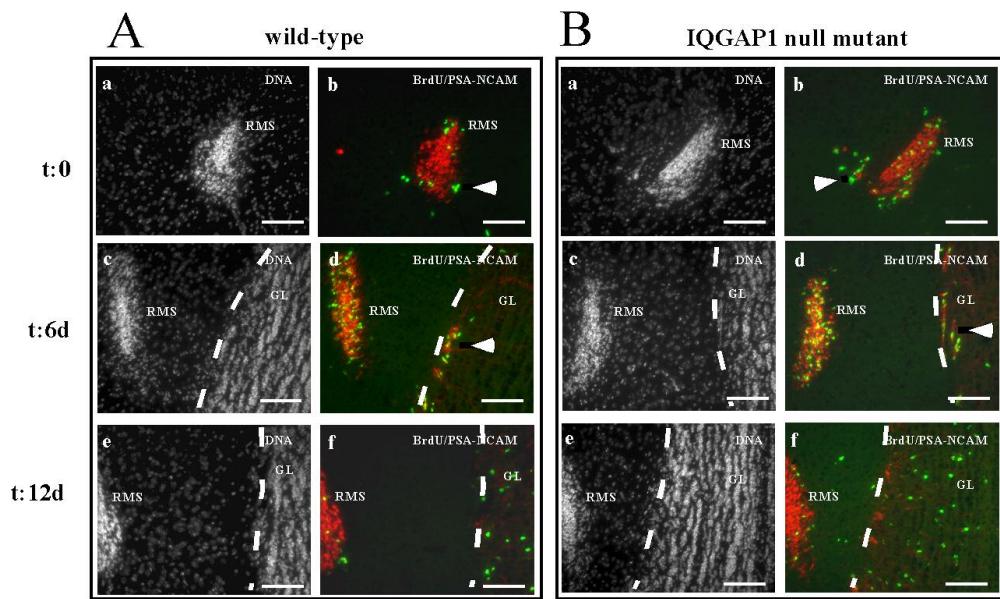
Two wild-type (A) and *Iqgap1*-null (B) mice from the same litter received three successive BrdU injections each hours. Animals were sacrificed 1h after the last injection (t: 0), or six day (t: 6d) or 12 days (t: 12d) after injection. Coronal sections (20 μ M of thickness) of olfactory bulbs were stained with Hoechst for DNA (panels a, c, e) and double immunostained with anti-BrdU (green) and anti-PSA-NCAM (red) antibodies (panels b, d, f). One hour after the last injection (panels a-b), only few BrdU+/PSA-NCAM+ cells are found in the distal RMS. Some BrdU+/PSA-NCAM+ cells (arrowhead) are juxtaposed to the chains of migrating neuroblasts (PSA-NCAM+) and correspond to neural progenitors (Gritti et al., 2002). After a 6 day chase (panels c-d), BrdU+ cells within the distal RMS drastically increased corresponding to neural precursors/neuroblasts migrating to the OB. Some BrdU+/PSA-NCAM+ neuroblasts already reached the OB granular layers (arrowhead). Comparison between wild-type and *Iqgap1* null mice revealed no significant difference in the apparent timing of migration of BrdU-labeled neuroblasts to distal RMS. After 12 days-chase (panels e-f), most of the BrdU labeled neuroblasts have migrated to the granular layers and differentiated into mature neurons (BrdU+/PSANCAM-). Comparison between wild-type and IQGAP1 null mice revealed no significant differences in radial migration of BrdU-labeled neuroblasts to the OB granular layers. GL: granular layer. Bar: 100 μ M.



Balenci et al. Supplemental Fig. 1 A-B



Balenci et al. Supplemental Fig. 2



Balenci et al. Supplemental Fig. 3

II.1.3 Résultats complémentaires

La protéine IQGAP1 se localise dans des cellules proliférantes au niveau de la SVZ adulte. Pour élucider son rôle dans cette zone neurogénique, nous avons analysé qualitativement et quantitativement la population de cellules proliférantes dans la SVZ d'animaux sauvages et mutantes pour le gène *iqgap1*. Les résultats exposés dans la figure 25 montrent un nombre beaucoup plus important de cellules Ki-67+ dans la SVZ de souris *iqgap1*-/-.

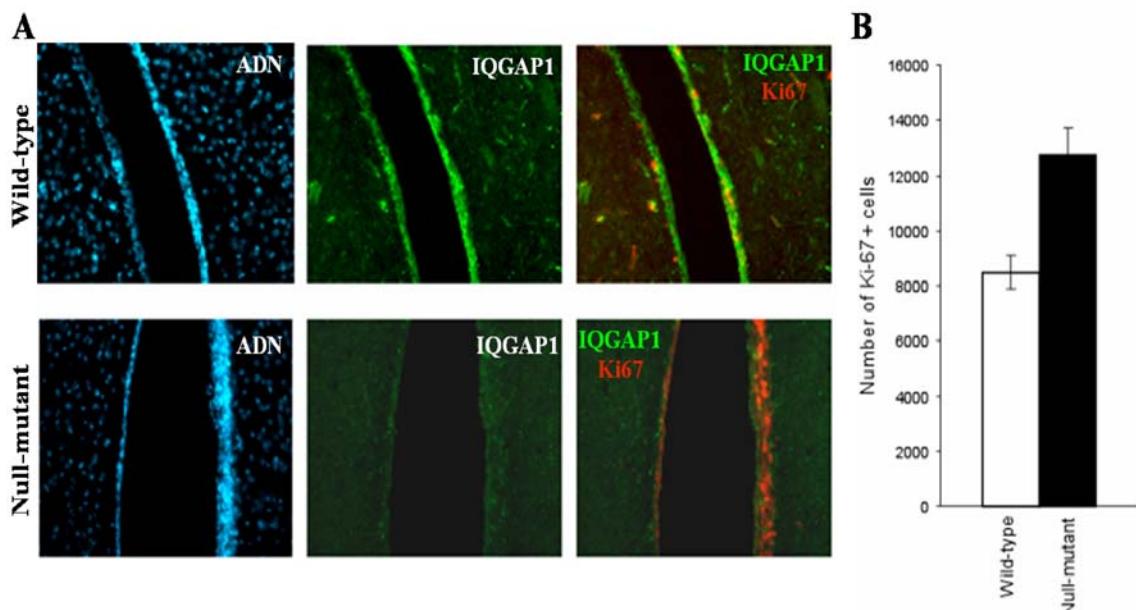


Figure 25 : Accumulation de cellules Ki-67+ dans la SVZ de souris mutantes

Une double immunohistochimie utilisant les anticorps anti-IQGAP1 et anti-Ki-67 complétée par un comptage des cellules de la SVZ de souris sauvages (Wild-type) et de souris mutantes (Null-mutant) démontrent la spécificité de notre anticorps ainsi qu'une accumulation de cellules en prolifération (Ki-67+) dans la SVZ d'animaux mutants.

Ces données permettent d'émettre différentes hypothèses pouvant expliquer un tel phénotype. L'accumulation ou le mauvais positionnement de ces cellules progénitrices neurales peuvent être la conséquence de défauts au niveau de la prolifération, de la différenciation, de la survie ou de la migration. Les tests « TUNEL » n'ont pas démontré de variations significatives au niveau de la survie des cellules présentes dans la SVZ. En effet chez l'adulte, très peu de cellules meurent par apoptose dans cette région. Nous avons ensuite testé l'hypothèse d'un défaut prolifératif ou migratoire par différents modes d'incorporations de BrdU. Une incorporation courte de 30 min de BrdU permet d'évaluer la prolifération de cellules progénitrices de type « C » en majorité. Le comptage des cellules BrdU+ dans les

SVZ de souris sauvages et mutantes ne révèle aucune différence significative (figure 26, A), suggérant que les paramètres du cycle cellulaire sont similaires et que le phénotype observé n'est pas dû à une prolifération accrue.

Par ailleurs, IQGAP1 est connue pour réguler des phénomènes migratoires, nous avons analysé l'éventualité d'un retard dans la migration des progéniteurs neuraux. L'expérience consiste en une seule injection de BrdU, 24h avant le sacrifice des animaux. Les résultats montrent clairement que les cellules marquées au BrdU sont plus abondantes au niveau de la SVZ de souris mutantes. Ce phénotype est cohérent avec un défaut notoire dans la migration de ces cellules. En effet, au lieu d'entamer leur phénomène migratoire le long de la RMS, les cellules progénitrices proliférantes s'accumulent le long du mur ventriculaire (figure 26, B).

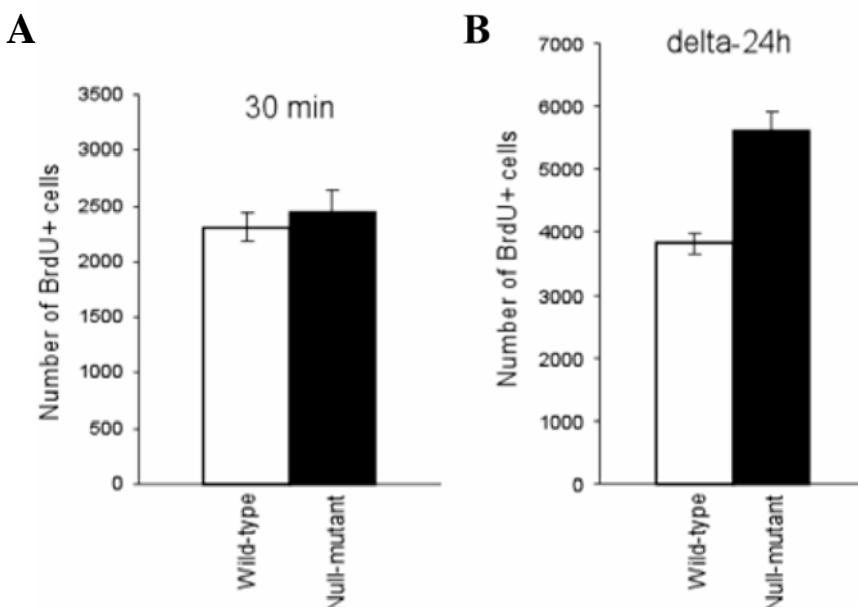


Figure 26 : IQGAP1 intervient dans la migration des cellules progénitrices neurales

A : Comparaison du nombre de cellules BrdU + dans la SVZ adulte de souris sauvages (Wild-type) et de souris *iqgap1*-/- (Null-mutant) après une incorporation de 30 min de BrdU.

B : Comparaison du nombre de cellules BrdU+ dans la SVZ adulte d'animaux sauvages et mutants après une seule incorporation de BrdU suivie d'une chasse de 24h.

In vivo, le phénotype observé met en cause des défauts migratoires au niveau des progéniteurs neuraux. Nous avons donc voulu confirmer ces données, *in vitro*, par une étude comparative de neurosphères générées à partir de la SVZ de souris sauvages et mutantes. Si les propriétés de différenciation ne semblent pas affectées (article n°1, Supplemental data figure 2), les caractéristiques d'adhérence sont légèrement différentes (figure 27).

L'enregistrement de neurosphères adultes placées dans un milieu contenant 3% de sérum de veau foetal, montre que les cellules présentes dans les neurosphères sauvages ont une plus grande facilité à s'étaler et à sortir des neurosphères (figure 27 A et B, flèches blanches). Toutefois, ces différences intrinsèques entre les neurosphères sauvages et mutantes n'apparaissent pas réellement significatives au regard du phénotype observé *in vivo*.

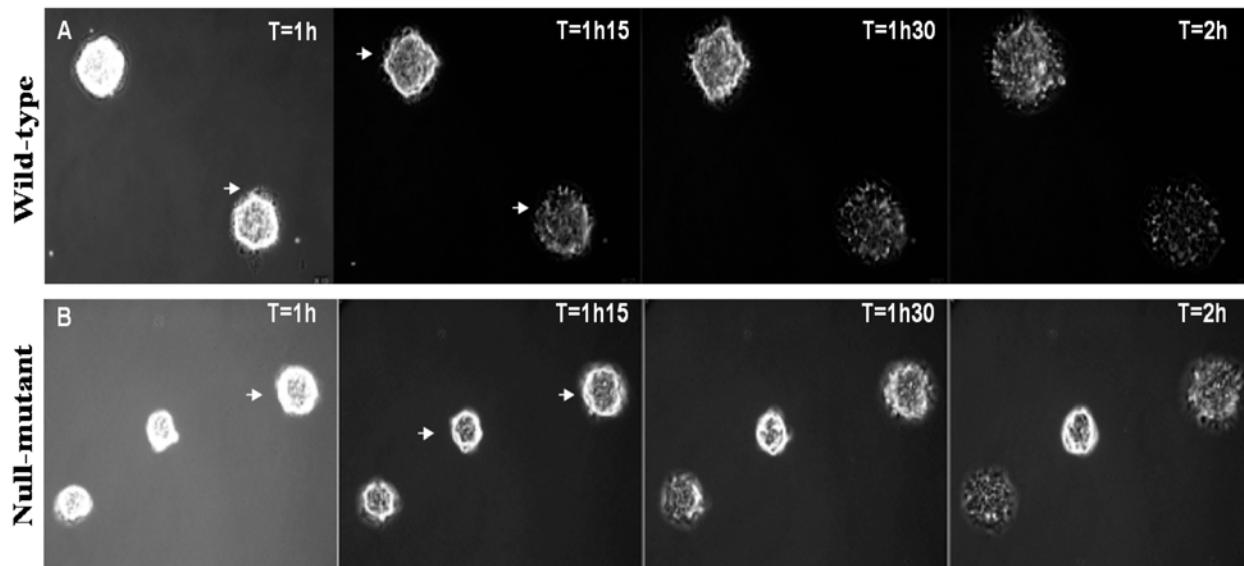


Figure 27 : IQGAP1 est impliquée dans les propriétés d'adhérence des cellules progénitrices neurales

Par vidéo-microscopie, la comparaison du comportement de neurosphères adultes issues de la SVZ de souris adultes sauvages et mutantes, en présence de sérum, révèle que les cellules présentes dans les neurosphères issues d'animaux sauvages (Wild-type, A) s'étalent plus rapidement que celles présentes dans les neurosphères issues d'animaux mutants (Null-mutant, B).

Dans la SVZ et le long de la RMS, les progéniteurs neuraux sont soumis à bon nombre de facteurs environnementaux qui conditionnent leur comportement et leur devenir. Compte tenu de ses multiples effets sur la biologie des cellules progénitrices neurales et de son rôle dans la neurogenèse, nous avons testé l'effet du VEGF sur le comportement des neurosphères. De plus, une interaction fonctionnelle entre IQGAP1 et le VEGFR-2 est connue dans les cellules endothéliales pour promouvoir la prolifération et la migration de ces cellules (Yamaoka-Tojo et al., 2004).

La stimulation par le VEGF induit une différenciation neuronale matérialisée par l'induction de l'expression du marqueur neuronal, la β -III tubuline ou Tuj-1. Après 24h de stimulation, l'expression de la *nestin* diminue et de façon concomitante l'expression de la β -III tubuline

augmente et ce phénomène est affecté dans les neurosphères issues d'animaux *iqgap1*-/- (figure 28).

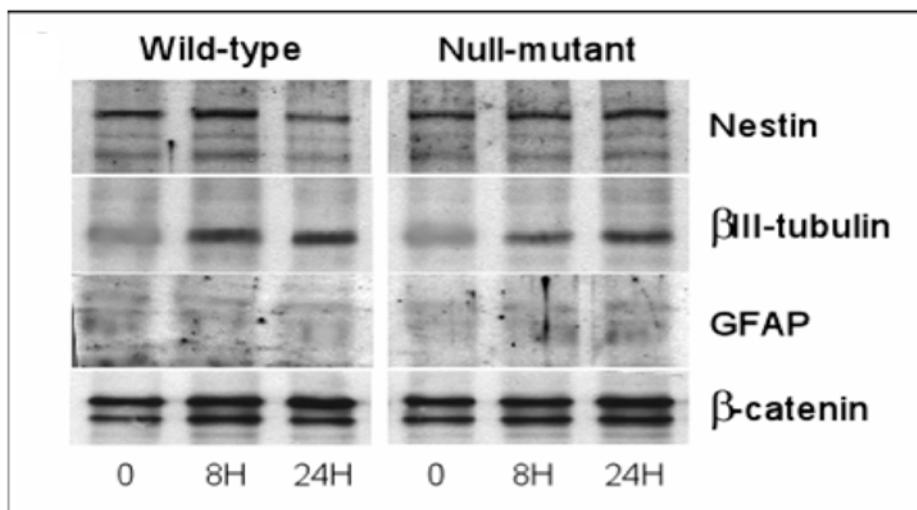


Figure 28 : IQGAP1 est impliquée dans la différenciation neuronale induite par le VEGF

L'analyse par western blot de lysats cellulaires de neurosphères adultes issues de la SVZ de souris sauvages (Wild-type) et *iqgap1*-/- (Null-mutant) montre, après 8h de stimulation par le VEGF-A (20 ng/ml), une différenciation neuronale matérialisée par l'expression de la β -III tubuline. En revanche, aucune présence de la protéine GFAP n'est observée. Après 24h de stimulation, cette différenciation neuronale se caractérise par la diminution de l'expression de la nestin et une augmentation de l'expression de la β -III tubuline. Ce phénomène n'est observé que dans les extraits protéiques issus de neurosphères sauvages suggérant un retard dans l'induction neuronale dans les neurosphères mutantes.

Le VEGF intervient dans un phénomène couplé de migration et de différenciation neuronale dans les progéniteurs neuraux. Pour discriminer ces deux effets, des neurosphères dissociées sont mises en présence de VEGF. Trois stades différents de différenciation sont évalués en fonction de l'expression des marqueurs Nestin et Tuj-1 (ou β -III tubuline) (figure 29, A). L'analyse quantitative de ces différentes populations révèle que les cellules sauvages et mutantes possèdent la même capacité à se différencier en neurones après une même cinétique de stimulation par le VEGF (figure 29, B).

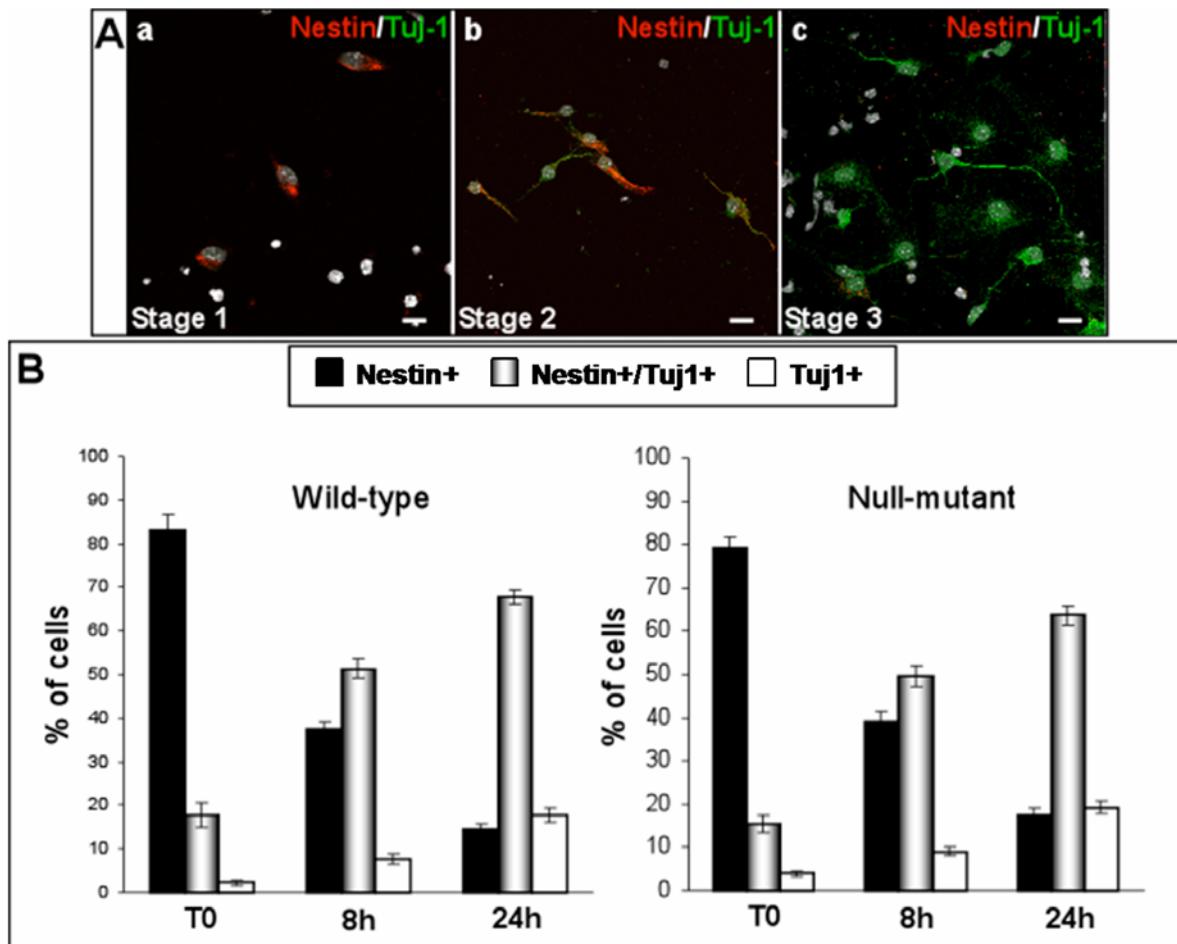


Figure 29 : Le VEGF induit une différenciation neuronale

A : Visualisation par immunocytochimie des trois stades de différenciation observables au cours de la différenciation neuronale induite par le VEGF. Les cellules évoluent d'un stade 1 à un stade 3 au cours de la différenciation en exprimant initialement seulement la *nestin* (a) puis passent par un état intermédiaire en co-exprimant la *nestin* et la β -III tubuline (b) et aboutissent à un état neuronal où elles n'expriment plus que la β -III tubuline (c).

B : Comparaison de la capacité de différenciation neuronale induite par le VEGF, des cellules issues de la dissociation de neurosphères adultes sauvages (Wild-type) et mutantes (Null-mutant).

II.1.4 Discussion et perspectives

Par cette étude, nous avons caractérisé un nouveau marqueur de cellules progénitrices neurales et de précurseurs neuronaux, IQGAP1, et étudié son rôle dans la biologie de ces cellules. Grâce à des études comparatives entre souris sauvages et souris *knock-out* (KO) du gène *iqgap1* basées sur des approches *in vivo* et *in vitro*, nous avons mis en évidence le rôle modulateur de cette protéine dans le processus de neurogenèse chez l'adulte et plus particulièrement dans la migration des cellules progénitrices neurales.

II.1.4.1 IQGAP1 un nouveau marqueur de cellules progénitrices neurales

Du fait de son expression dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins dans le parenchyme cérébral, la protéine IQGAP1 apparaît comme ubiquitaire dans le cerveau (figures 22 et 23). Cependant, au niveau de la SVZ adulte, source majeure de cellules souches et/ou progénitrices neurales dans le cerveau, *iqgap1* est spécifiquement exprimé dans les cellules épendymaires qui bordent la lumière du ventricule latéral ainsi que dans les cellules progénitrices neurales de type « C » et les précurseurs neuronaux de type « A » (article 1, figure 2A). Ce patron d'expression se perpétue le long de la RMS où les cellules de type « C » et « A » coexistent (article 1, figure 3A et 3C) (Gritti et al., 2002). Par ailleurs, *iqgap1* est également exprimé dans les neurosphères adultes aux contacts intercellulaires (figure 24), jugés importants au niveau des niches de la SVZ pour réguler le comportement des cellules souches et/ou progénitrices (Doetsch, 2003).

II.1.4.2 IQGAP1 est un régulateur de la migration des cellules progénitrices

IQGAP1 intervient dans la régulation du cytosquelette afin de promouvoir la motilité et la migration d'un bon nombre de types cellulaires (Kholmanskikh et al., 2006; Mataraza et al., 2003; Noritake et al., 2005; Watanabe et al., 2004; Yamaoka-Tojo et al., 2004). Dans ce premier article, la comparaison des propriétés de cellules progénitrices *in vivo* dans des souris sauvages et des souris *iqgap1*-/- fait état d'un défaut de migration de cellules progénitrices neurales matérialisé par une accumulation et un mauvais positionnement de ces cellules dans la SVZ et le long de la RMS (figure 25, 26B ; article 1, figure 4). Ce phénotype se traduit par un retard de la différenciation neuronale le long de la RMS (article 1, figure 4). *In vitro*, les cultures de neurosphères nous ont permis de déterminer que la protéine IQGAP1 intervenait dans la voie de signalisation du VEGF pour réguler la migration de cellules progénitrices (article 1, figure 5B). Une autre étude dans des HUVEC a également révélé qu'IQGAP1 était

impliquée dans la migration de ces cellules après stimulation par le VEGF en se liant au VEGFR-2 (Yamaoka-Tojo et al., 2004).

II.1.4.3 Les facteurs environnementaux contrôlant la neurogenèse adulte

Afin d'utiliser et d'exploiter les capacités des cellules souches/progénitrices en médecine régénérative, la compréhension des propriétés intrinsèques et des facteurs environnementaux qui contrôlent leur comportement et leur devenir est requise. Il est clair qu'intrinsèquement, l'absence de la protéine IQGAP1 n'affecte pas ou peu les propriétés et le comportement des cellules progénitrices (figure 27 ; article 1, supplemental figure 1), mais il en est autrement en ce qui concerne la réponse à des facteurs extrinsèques, comme le VEGF.

II.1.4.4 Le VEGF dans la neurogenèse

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une connexion entre la migration des progéniteurs neuraux et leur différenciation neuronale. En effet, le VEGF induit dans un premier temps une réponse migratoire et dans un second un engagement dans le lignage neuronal (article 1, figure 6A et 6B). Ces réponses conjointes sont altérées dans les neurosphères issues de la SVZ d'animaux mutants (figure 28 ; article 1, figure 6C et 6D). Pour discriminer ces deux réponses, des stimulations par le VEGF de cellules progénitrices isolées ont été réalisées et ne démontrent aucune différence dans la différenciation cellulaire (figure 29).

Le VEGF est un facteur angiogénique à qui on a attribué ces dernières années de nombreux rôles dans le système nerveux central notamment celui d'intervenir dans les phénomènes neurogéniques (Galvan et al., 2006). Le VEGF stimule la prolifération de cellules de la SVZ et de la SGL et favorise la neurogenèse *in vivo* et *in vitro* (Cao et al., 2004; Jin et al., 2002; Schanzer et al., 2004). En revanche, dans des souris invalidées pour le gène codant le VEGF-B, la neurogenèse est absente dans les régions de la SVZ et de la SGL (Sun et al., 2006). Dans l'hippocampe, la neurogenèse peut être induite par des expériences de mémorisation et d'apprentissage sur des animaux. Si ces animaux sont soumis à une injection intra-hippocampale d'un siRNA bloquant spécifiquement le VEGF, le mécanisme de neurogenèse induite est inhibé (Cao et al., 2004). En outre, les récepteurs pour le VEGF sont exprimés dans les cellules de la SVZ (Jin et al., 2002). Dans notre étude, les deux récepteurs Flt-1 (VEGFR-1) et Flk-1 (VEGFR-2) du VEGF-A sont exprimés dans les neurosphères adultes (article 1, figure 5A). La stimulation de ces dernières par le VEGF induit la migration et la différenciation neuronale des cellules progénitrices neurales. La même expérience de

stimulation sur des neurosphères adultes dissociées révèle que le VEGF est capable d'induire une différenciation neuronale. Il reste à déterminer si en bloquant les récepteurs présents nous pouvons altérer l'une ou les deux réponses induites par le VEGF. Ces effets pourraient également être observés *in vivo* par l'injection intra-cérébrale de molécules bloquant la signalisation VEGF au niveau de la SVZ adulte. L'autre approche serait de générer une lignée de souris transgéniques qui, sous le contrôle d'un promoteur inducible, serait capable de bloquer la ou les sources de VEGF (VEGF-trap) endogènes. Il resterait ensuite à observer les conséquences phénotypiques.

II.1.4.5 Les influences astrocytaires dans la neurogenèse

Fort des résultats obtenus *in vitro*, nous avons voulu caractériser la (ou les) source(s) potentielle(s) endogène(s) de VEGF. A notre grande surprise, nous avons découvert que seuls les astrocytes présents dans les zones neurogéniques de la SVZ et de la RMS expriment le VEGF et se présentent comme de bons régulateurs du phénomène de neurogenèse chez l'adulte (article 1, figure 8).

Les astrocytes ont longtemps été considérés comme des cellules inertes de soutien notamment au niveau de la RMS (Wichterle et al., 1997) dans laquelle ils servent uniquement de route physique pour la conduction des neuroblastes vers le bulbe olfactif. Cependant, ces dernières années ce concept a été complètement remis en question. En effet, ces cellules sont jugées structuralement et fonctionnellement aptes à former des environnements locaux et sont devenues des composantes cellulaires primordiales au niveau des niches neurogéniques de la SVZ et de la SGL (Doetsch et al., 1997; Ma et al., 2005; Seri et al., 2004). En outre, ces cellules sont capables de sécréter des facteurs stimulant la neurogenèse (Lim and Alvarez-Buylla, 1999; Song et al., 2002) et de participer à la migration de neuroblastes le long de la RMS en régulant le taux du neurotransmetteur GABA (Bolteus and Bordey, 2004). Comme le VEGF est également connu pour être un facteur attractant des cellules progénitrices (Zhang et al., 2003), le phénotype observé dans les animaux *iqgap1*-/- nous a permis de proposer un nouveau rôle des astrocytes dans le guidage des progéniteurs neuraux et leur spécification neuronale. Cependant, il reste à déterminer si ces astrocytes sécrètent réellement le VEGF ou si elles le capturent pour en réguler le taux dans ces zones neurogéniques.

II.1.4.6 Les cellules endothéliales et la neurogenèse

Une des autres sources potentielles de VEGF peut provenir des cellules endothéliales. Des liens entre vasculogenèse et neurogenèse ont été clairement démontrés dans le cerveau

(Louissaint et al., 2002; Palmer et al., 2000). En outre, des co-cultures ont mis en évidence que des facteurs sécrétés par des cellules endothéliales favorisent la neurogenèse (Shen et al., 2004). L'un des facteurs canoniques sécrétés par ces cellules endothéliales est le VEGF, et les vaisseaux sanguins font partie intégrante des niches de la SVZ (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Li et al., 2006) où ils sont en étroit contact avec les cellules souches et/ou progénitrices neurales adultes (Wurmser et al., 2004) ; article 1, figure 3A et 3B ; article n°2, figure 1C).

II.1.4.7 Les mécanismes moléculaires impliqués dans la migration des précurseurs neuraux

Par la suite, l'analyse détaillée des mécanismes moléculaires sous-jacents à cette réponse migratoire induite par le VEGF identifie des partenaires connus d'IQGAP1, Rac1, Cdc42 et Lis1 permettant la régulation coordonnée du cytosquelette d'actine et microtubulaire pour promouvoir la motilité et la migration dans différents types cellulaires (article 1, figure 7) (Fukata et al., 2003; Kholmansikh et al., 2006; Mataraza et al., 2003; Noritake et al., 2005; Yamaoka-Tojo et al., 2004). IQGAP1 intervient dans la signalisation VEGF dans les HUVEC pour promouvoir leur migration. Dans ce modèle cellulaire, IQGAP1 interagit avec Flk-1 qui après stimulation par son ligand induit la phosphorylation d'IQGAP1. Cette modification post-traductionnelle peut s'avérer importante pour réguler sa fonction (Li et al., 2005).

Toutefois, dans notre système de neurosphères adultes, IQGAP1 n'est pas phosphorylée suite à la stimulation par le VEGF (article 1, supplemental figure 2) bien qu'en aval, un complexe multi-protéique incluant Rac1, Cdc42 et Lis1 se forme, suggérant que la phosphorylation n'est pas requise pour cette réponse biologique. L'ensemble de ces partenaires ainsi que la protéine CLIP-170 interviennent dans la motilité des neuroblastes après une activation des récepteurs NMDA (Kholmansikh et al., 2006). Etant donné que l'activation des récepteurs NMDA permet un influx de Ca^{2+} dans la cellule (Deisseroth et al., 2004), ce dernier est suspecté de jouer le rôle de messager secondaire en permettant la libération d'IQGAP1 et le recrutement de ses partenaires aux « *leading edges* » des neuroblastes en migration (Kholmansikh et al., 2006). Cette hypothèse est en partie vérifiée par nos propres travaux faisant état qu'un influx de Ca^{2+} dans les cellules permet la délocalisation d'IQGAP1 du cytosol vers la membrane plasmique (Mbele et al., 2002). Néanmoins, le Ca^{2+} est sensé renforcer l'interaction entre IQGAP1 et la calmoduline et inhiber l'interaction avec les Rho GTPases Rac1 et Cdc42 (Briggs M.W., 2003). Des travaux ont montré que la stimulation par le VEGF de cellules endothéliales stimule leur migration via

une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Dawson et al., 2006) confirmant ainsi nos études préliminaires ayant établi que certaines cellules de la neuroosphère adulte subissent un influx calcique après la stimulation par le VEGF.

II.1.4.8 IQGAP1 n'intervient pas dans la régulation de la migration des neuroblastes

Le long de la RMS, les neuroblastes migrent en chaînettes sur de longues distances jusqu'à rejoindre le bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones olfactifs. De façon surprenante, bien qu'*iqgap1* soit exprimé dans les neuroblastes elle ne semble pas intervenir dans la migration de ces cellules. Nos expériences de « *pulse-chase* » de BrdU, réalisées sur nos animaux sauvages et *iqgap1*-/-, ne révèlent aucune différence notable dans la conduction des neuroblastes vers le bulbe olfactif (article 1, supplemental figure 3). Ces résultats étaient prévisibles, d'une part, car la taille du bulbe olfactif n'est pas affectée et d'autre part, parce que les effets de la seule absence d'IQGAP1 ne sont pas significatifs au niveau des progéniteurs neuraux. En revanche, IQGAP1 intervient dans la voie de réponse du VEGF, un facteur environnemental auquel sont soumis les cellules progénitices et les neuroblastes de la SVZ et le long de la RMS. Si l'expression des récepteurs au VEGF est détectée dans les neurosphères adultes (article 1, figure 5A) et les cellules progénitrices de la SVZ (Jin et al., 2002), cela ne semble pas être le cas pour les neuroblastes qui sont donc dans l'incapacité de répondre au VEGF (Jin et al., 2002; Schanzer et al., 2004; Zhang et al., 2003).

III. Caractérisation de la protéine IQGAP1 dans un contexte pathologique de tumeurs cérébrales chez le rat et chez l'Homme

III.1 ARTICLE n°2 : La protéine IQGAP1 caractérise une population de cellules souches et/ou progénitrices cancéreuses dans les glioblastomes

III.1.1 Introduction

L'autre aspect de mon travail de thèse a porté sur l'étude de l'implication des cellules souches/progénitrices neurales dans l'étiologie de tumeurs cérébrales, qui font partie des types de cancers les plus agressifs et les plus difficiles à soigner. Dans la très grande majorité des cas, la cause de ces tumeurs ainsi que la ou les cellules qui leur ont donné naissance sont inconnues. Les conséquences fonctionnelles qu'occasionnent une tumeur explique la nécessité de trouver au plus vite des thérapies adaptées et efficaces. Le développement de ces thérapies est indissociable de la compréhension des bases cellulaires et moléculaires de l'initiation, du développement et du fonctionnement tumoral. Les tumeurs cérébrales primitives les plus répandues sont les gliomes dont la forme la plus agressive, le glioblastome, est la plus fréquente. Sur la base d'observations histologiques, immunohistochimiques et génétiques de certains gliomes, les cellules souches et/ ou progénitrices ont été suspectées d'être des cibles de la transformation cellulaire et à l'origine des gliomes (Clarke, 2004; Oliver and Wechsler-Reya, 2004; Reya et al., 2001; Sanai et al., 2005). De plus, des études récentes ont montré que certaines cellules tumorales présentent de nombreuses caractéristiques apparentées aux cellules souches et/ou progénitrices neurales (Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2004a; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004b; Yuan et al., 2004). Cette sous-population tumorale est isolable à partir de tumeurs malignes grâce à un marqueur de surface spécifique de cellules souches et/ou progénitrices neurales humaines, le CD133. Après réinjection de ces cellules dans le cortex de souris immunodéprimées, une tumeur humaine se développe après quelques semaines avec toutes les caractéristiques histologiques et antigéniques de la tumeur d'origine (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004b). L'identification et la caractérisation précises de ces cellules tumorigènes malignes sont primordiales pour comprendre leur comportement au sein de la masse tumorale et pour établir des stratégies thérapeutiques ciblant cette population. Pour cela, il est nécessaire de découvrir d'autres marqueurs de ces cellules dont les fonctions sont connues dans la biologie des cellules souches et/ou progénitrices normales.

Dans un contexte physiologique, nous avons identifié la protéine IQGAP1 comme un nouveau marqueur fiable de cellules progénitrices neurales chez les rongeurs adultes. De par son niveau d'expression, sa localisation et ses partenaires, IQGAP1 est suspectée d'intervenir

dans des mécanismes liés à la cancérogenèse (Briggs and Sacks, 2003). Nous avons donc étudié et caractérisé IQGAP1 dans des tumeurs cérébrales humaines et chimio-induites chez le rat.

III.1.1.1 IQGAP1 et la cancérogenèse

IQGAP1 a été découverte fortuitement dans des ostéosarcomes humains métastatiques (Weissbach et al., 1994), et de nombreux travaux sont venus étayer l'hypothèse qu'IQGAP1 intervient dans des phénomènes cancéreux. Les premières études concernent la lignée de souris invalidée pour le gène *iqgap1* qui développe des polypes intestinaux et des hyperplasies gastriques (Li et al., 2000). *Iqgap1* se retrouve également surexprimé dans de nombreux types de carcinomes gastriques (Sugimoto et al., 2001), colorectaux et ovariens en particulier au front d'invasion (Nabeshima et al., 2002). IQGAP1 joue de multiples rôles régulateurs variant en fonction de sa localisation subcellulaire et de l'interaction avec ses partenaires. Ainsi, dans des cas de carcinomes gastriques avancés, IQGAP1 se retrouve aux contacts intercellulaires et inhibe l'adhérence cellule-cellule dépendante de la E-cadhérine (Takemoto et al., 2001). Les protéines β -caténine, calmoduline et les Rho GTPases sont des cibles d'IQGAP1 qui interviennent dans de nombreux types tumoraux malins et métastatiques (Polakis, 1999; Sahai and Marshall, 2002). Cependant, rien n'est encore connu de l'implication de la protéine IQGAP1 dans les gliomes. Néanmoins, notre laboratoire a mis en évidence qu'elle était fortement exprimée dans des lignées tumorales humaines dérivées de gliomes au niveau de renflements membranaires et des « *leading edges* » de ces cellules (Mbele et al., 2002). La convergence de ces données a fait naître le projet de caractérisation de cette protéine IQGAP1 dans un modèle de tumeurs chimio-induites chez le rat généré au laboratoire et en parallèle chez l'homme à travers l'étude d'une banque de tumeurs gliales fournie par le Centre Hospitalier Universitaire de Lyon (banque NeuroBiotec).

III.1.1.2 Présentation du modèle de rat de tumeurs chimio-induites

Le point de départ de cette étude a été la mise au point d'un modèle animal de tumorigenèse chimio-induite chez le rat. L'agent mutagène utilisé, la N-Ethyl-N-NitrosoUrée (ENU) était une substance de choix pour les expériences de neuro-oncologie expérimentale dans les années 70-80 (Lantos, 1986; Lantos and Cox, 1976; Vick et al., 1977). Ce carcinogène chimique alkyle les bases « guanine » de l'ADN et induit préférentiellement des tumeurs au niveau des zones germinales du cerveau (Vick et al., 1977). Ce dérivé des nitrosamines est également utilisé en chimiothérapie pour causer des mutations dans les

cellules cancéreuses. L'injection de cette substance se fait chez une ratte gestante au moment de la gliogenèse, entre le 19^{ième} et 20^{ième} jour du développement embryonnaire (E19-E20). Après une période de trois mois, l'ensemble des rats développe deux types de tumeurs asymptomatiques qui s'apparentent aux oligodendrogiomes et glioblastomes humains de par leurs similarités histologiques et immunohistochimiques (figure 30).

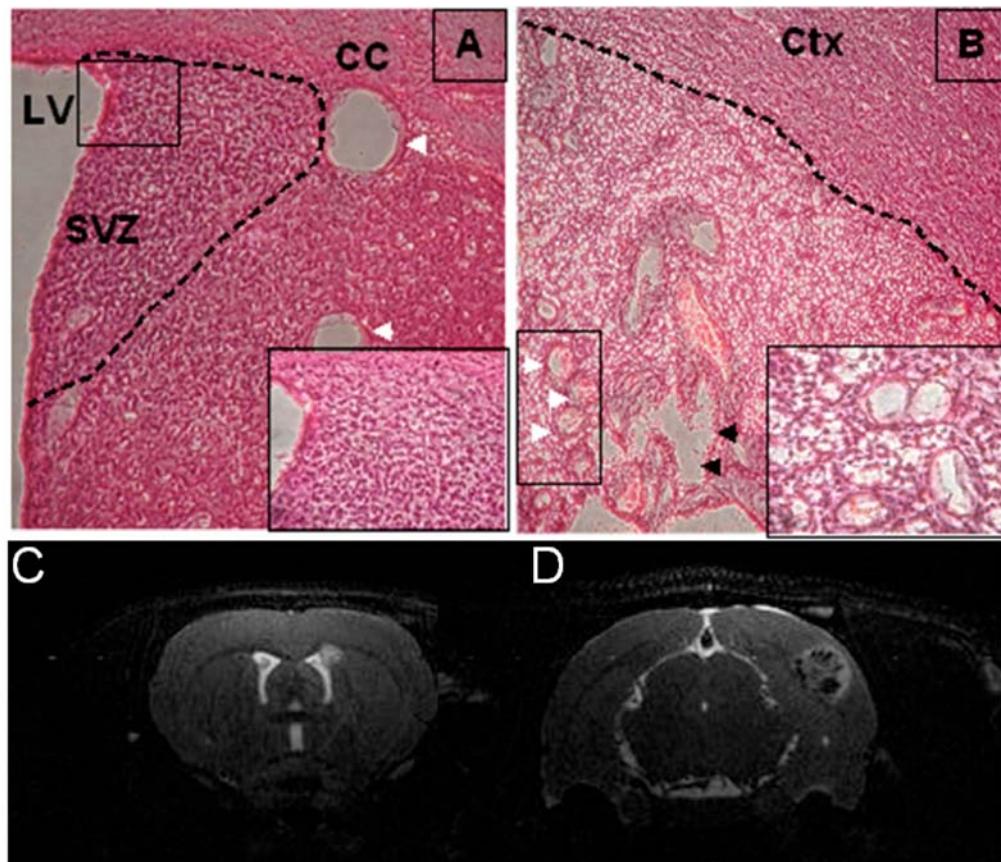


Figure 30 : Histologie et tomographie des tumeurs cérébrales chimio-induites par l'ENU chez le rat

A, B : Histologie d'une tumeur apparentée à un oligodendrogiome en région périventriculaire (A) et d'une tumeur corticale présentant les caractéristiques d'un glioblastome (B). L'observation d'un oligodendrogiome montre une faible vascularisation et une homogénéité cellulaire. Le glioblastome présente tous les critères de malignité avec une forte vascularisation (têtes de flèches blanches), une forte hétérogénéité cellulaire et des foyers nécrotiques (têtes de flèches noires).

C, D : Visualisation par IRM des cerveaux de rat atteints par ces deux types de tumeur, un mois avant l'euthanasie. Ces images nous permettent de localiser avec précision le siège tumoral (Collaboration Animage-CERMEP, Lyon). LV : ventricule latéral ; SVZ : zone sous-ventriculaire ; CC : corps calleux ; CTX : cortex.

En collaboration avec des physiciens du CERMEP à Lyon nous avons mis au point une technique de visualisation, par IRM, des tumeurs chimio-induites dans le parenchyme cérébral de rat. L'analyse statistique sur 5 portées de rat montre que 100% des rats développent une tumeur dans des proportions de 80% pour les tumeurs analogues aux oligodendrogiomes au niveau de la SVZ et de la RMS et de 20% pour les glioblastomes dans le cortex.

III.1.2 ARTICLE N°2

IQGAP1 Protein Specifies Amplifying Cancer Cells in Glioblastoma Multiforme

Laurent Balenci,¹ Ian D. Clarke,² Peter B. Dirks,² Nicole Assard,¹ François Ducray,³ Anne Jouvet,³ Marie-Françoise Belin,³ Jérôme Honnorat,³ and Jacques Baudier¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale EMI 0104, Département de Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA Grenoble, Grenoble, France; ²The Arthur and Sonia Labatt Brain Tumor Research Center, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada; and ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 433, Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon, Faculté Laennec, Lyon, France

Abstract

The accurate identification and thorough characterization of tumorigenic cells in glioblastomas are essential to enhance our understanding of their malignant behavior and for the design of strategies that target this important cell population. We report here that, in rat brain, the scaffolding protein IQGAP1 is a marker of brain nestin⁺ amplifying neural progenitor cells. In a rat model of glioma, IQGAP1 also characterizes a subpopulation of nestin⁺ amplifying tumor cells in glioblastoma-like tumors but not in tumors with oligodendrogloma features. We next confirmed that IQGAP1 represents a new marker that may help to discriminate human glioblastoma from oligodendroglomas. In human glioblastoma exclusively, IQGAP1 specifies a subpopulation of amplifying nestin⁺ cancer cells. Neoplastic IQGAP1⁺ cells from glioblastoma can be expanded in culture and possess all the characteristics of cancer stem-like progenitors. The similarities between amplifying neural progenitors and glioblastoma amplifying cancer cells may have significant implications for understanding the biology of glioblastoma. (Cancer Res 2006; 66(18): 9074-82)

Introduction

Gliomas are the most common primary malignant brain tumors and are classified into two major groups: oligodendroglomas and astrocytomas, including glioblastomas. It is implicit in such definitions that these neoplasms originate from either oligodendrocytes or astrocytes. There is, however, evidence that these brain tumors can also result from the transformation of undifferentiated glial progenitor cells or cells with stem cell characteristics (1–3). The first indication that some brain tumors can arise from transformation of neural stem cells or neural progenitors comes from mouse models, in which combined expression of Ras and Akt oncogenes under the control of the nestin promoter induced glioblastoma formation (4). In adult rodent brain, nestin is considered as a marker for both neural stem cell and neural progenitors (5, 6). The identification of transformed neural stem cell-like cells in cultures derived from human medulloblastomas and glioblastoma tumors

has brought further support to the hypothesis that these tumors contain cancer stem cells that may participate in brain tumorigenesis (7–11). More recently, a population of brain tumor-initiating cells, with characteristics of stem cells (nestin⁺/CD133⁺), has been purified from human gliomas (8). In the more aggressive glioblastomas, this population represents up to 30% of the total tumor cell population (8). The neural stem cell concept for the origin of gliomas sheds light on their heterogeneity but also raises questions as to understand the high malignancy of some of these tumors, such as glioblastoma (3). A model has been proposed where cancer stem cells generate transformed progenitor cells that divide rapidly but are incapable of complete differentiation *in vivo* (3). The accurate identification and thorough characterization of the tumor amplifying progenitor cells is now essential to enhance our understanding of malignant gliomas. To reach this goal, it will be necessary to identify more definitive markers of these cells. Moreover, if these markers have recognized specific functions, they might help to develop new therapeutic strategies for more effective cancer treatments.

We first report here that the IQGAP1 protein is a reliable marker of nestin⁺ amplifying neural progenitors in rat brain. Mammalian IQGAP1 is considered to be a scaffolding protein at the crossroads of several signaling pathways involved in the control of cell adhesion (12, 13), polarization (14, 15), and directional migration (15, 16). A recent study has identified IQGAP1 as a key component of neuronal motility signal transduction (17). Several studies have also implicated IQGAP1 in epithelial carcinogenesis and metastasis (18). Consistent with its possible implication in tumorigenesis, IQGAP1 is highly abundant in rat and human glioma cell lines (19). To investigate possible regulation of IQGAP1 during neurocarcinogenesis, we analyzed IQGAP1 expression in a rat model of ethylnitrosourea (ENU)-induced glioma (20). We show that IQGAP1 specifies a subpopulation of amplifying tumor cells in glioblastoma-like tumors but not in tumors with oligodendrogloma features. We next confirmed in human glioma the specific expression of IQGAP1 in glioblastoma amplifying cancer cells. Our results may have considerable implications for further understanding the biology of these invasive tumors and the development of specific and more effective therapies.

Materials and Methods

Antibodies. The following primary antibodies were used: IQGAP1 (H-109; rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, France), nestin (mouse monoclonal IgG, clone Rat-401, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), specific human nestin (mouse monoclonal, Chemicon International, Inc., Euromedex, France), NG2 (mouse monoclonal, Upstate Laboratories, Upstate, Euromedex, France), Olig-2 (rabbit polyclonal, generous gift from Dr. H. Chneiweiss, INSERM U114, Collège de France, Paris, France), GFAP (mouse monoclonal IgG, Chemicon; chicken polyclonal,

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

J. Honnorat and J. Baudier contributed equally to this work.

Requests for reprints: Jacques Baudier, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale EMI 0104/TS-DRDC, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Phone: 33-4-38-78-43-28; Fax: 33-4-38-78-50-58; E-mail: jbaudier@cea.fr.

©2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0761

Abcam, France; rabbit polyclonal IgG, DAKO Cytomation, S.A, France), PECAM (CD31; mouse monoclonal, BD PharMingen, BD Biosciences, France), specific human PECAM (CD31; mouse monoclonal, DAKO), Ki-67 (mouse monoclonal IgG, Novocastra Laboratories, Ltd., AbCys, S.A, France), specific human Ki-67 (rabbit polyclonal, Zymed Laboratories, Inc., Clinisciences, France), β III-tubulin (Tuj-1; rabbit polyclonal, Eurogentec, France), β -tubulin (mouse monoclonal, a gift from Dr. D. Job, INSERM U366, Laboratoire du Cytosquelette, Grenoble, France), and CD133/1 and CD133/2 (mouse monoclonal, Miltenyi Biotec, France). Secondary anti-mouse and anti-rat antibodies conjugated to cyanin 3 or cyanin 5 were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Interchim, France). Secondary anti-mouse and anti-rat antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 were from Molecular Probes, Inc., (Invitrogen, France). Secondary anti-chicken polyclonal IgY (ab6569) was from Abcam.

Transplacental administration of ENU. All procedures on animals were approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale in compliance with European and French law. OFA Sprague-Dawley strain adult rats were provided by Charles River Laboratories (France). Pregnant rats were injected i.v. via tail vein with 60 mg/kg ENU (Sigma-Aldrich, France) at gestational day 19 (20).

Human tumors. Tumor samples were obtained during surgery from patients of the Neurological Hospital of Lyon (Lyon, France). Inform consent was obtained for all patients before the surgery as approved by the Research Ethics Board at the Hospices Civils de Lyon (Lyon, France). All patients had surgery for the first time and never received chemotherapy or radiotherapy. Samples were collected immediately after surgical resection, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -196°C in liquid nitrogen (NeuroBioTec Banques, Biological Resources Center of Hospices Civils de Lyon). A sample of glioblastoma 280, which was used for sphere culture, was progressively frozen in RPMI 1640/20% FCS/10% DMSO and then stored at -196°C in liquid nitrogen before to be used in culture. Hemalin phloxine saffron (HPS)-stained slide of all frozen samples was reviewed by a neuropathologist (A.J.) and graded with the WHO grading classification to confirm the diagnosis and exclude samples without typical aspects of the tumor. All samples containing significant regions of normal brain ($>10\%$) and/or excessively large amounts of necrotic material were excluded. Clinical presentation of all patients was reviewed by physicians (F.D. and J.H.) to select only patients with typical clinical and radiological presentation of glioblastomas, low-grade oligodendroglomas, or anaplastic oligodendroglomas. Using all these clinical and histologic criteria, nine glioblastomas (samples no. 280, 410, 431, 492, 581, 532, 596, 658, and 733) and nine oligodendroglomas (grade 2 WHO oligodendrogloma samples no. 344, 409, 512, 559, and 592; grade 3 WHO oligodendrogloma samples no. 450, 552, 701, and 756) were selected.

Immunohistochemistry. Three- to 8-month-old animals were deeply anesthetized and killed by transcardial perfusion of saline solution (150 mmol/L NaCl) followed by 4% paraformaldehyde. After 24 hours in 4% paraformaldehyde, brains were cryopreserved and 20- μm cryostat (Leica CM 3000 Camera, AG, Germany) sections were cut. Cryopreserved human biopsies were cut into 20- μm cryostat sections and postfixed with 4% paraformaldehyde. Cryosections were permeabilized in TBS containing 0.2% Triton X-100 and blocked in 5% normal goat serum-TBS (NGS-TBS). After incubation with primary antibodies in NGS-TBS overnight at 4°C , sections were washed in TBS and stained with the appropriate secondary antibodies. Sections were counterstained with nuclear marker Hoechst 33258 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Images were obtained with a Carl Zeiss, AG, Germany (Axiovert 200 M) microscope and with Leica (TCS SP2) confocal microscope.

Immunocytochemistry. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized with 0.2% Triton X-100. After incubation with primary antibodies in NGS-TBS overnight at 4°C , cells were washed in TBS and stained with the appropriate secondary antibodies. For CD133 immunostaining, neurospheres were fixed and partially permeabilized with 4% paraformaldehyde.

Western blotting. Cultured neurospheres and postsurgical human glioma samples were lysed in SDS sample buffer. Proteins were run on 6% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting was done with the different antibodies described above and revealed with adequate secondary antibodies coupled to peroxidase.

Blots were revealed by chemiluminescence according to the manufacturer's instructions (enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences, GE Healthcare, France). All Western blot analyses were done in duplicates.

Rat neurosphere culture. Three-month-old rat was killed by decapitation. Brains were removed and placed in PBS and the ventricular walls were dissected, transferred in dissociation medium containing trypsin (5,000 units; Sigma), 0.67 mg/mL hyaluronidase (2,000 units/mg; Sigma), and 0.2 mg/mL kynurenic acid (Sigma), and kept 30 minutes in incubator (37°C , 5% CO_2). Tissues were washed in DMEM with 20% fetal bovine serum (FBS) to inactivate the enzyme activity and then carefully triturated with a Pasteur glass pipette. After homogenization, cells were centrifuged and resuspended in chemically defined medium: proliferation neurosphere medium (DMEM/F12/B27complement/0.1% bovine serum albumin) supplemented with 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF) and 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF; ref. 21).

Primary human tumor sphere culture. Human tumor sample corresponding to glioblastoma 280 was intensively washed in growth factor serum-free neural stem cell medium (9) acutely dissociated in trypsin/EDTA solution. After filtration, primary tumor cells were cultivated in noncoated bacterial dishes in DMEM/F12 medium containing B27 complement and 20 ng/mL of both EGF and bFGF and leukemia inhibitory factor (1,000 units; Chemicon). For differentiation experiments, neurospheres were plated onto polylysine-coated (Sigma) glass coverslips in a defined medium containing DMEM/F12/B27 supplemented with either 3% FBS or in 48-hour starved conditioned medium of EaHY endothelial cell line.

Intracranial cell transplantation into nonobese diabetic-severe combined immunodeficient mice. Purified CD133⁺ cells from a human glioblastoma were injected stereotactically into immunodepressive nonobese diabetic-severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mouse frontal cortex as described previously (8). Two months after cell injection, mouse brains were embedded in paraffin. Paraffin-embedded, 5- μm formalin-fixed tissue sections were mounted on microscope slides. Tissue sections were then treated as described previously (8).

Results

IQGAP1 is expressed by amplifying neural progenitors in the adult rat brain. Affinity-purified antibodies against an NH₂-terminal epitope that is conserved in rodent and human protein were used to probe IQGAP1 protein in adult rat brain. The specificity of these antibodies was first shown by Western blot and indirect immunofluorescence analysis using mouse brain derived from wild-type and *iqgap1*^{-/-} animals (data provided to reviewers for examination). In adult rat brain extracts, IQGAP1 antibodies recognize a single protein band with the expected molecular weight of IQGAP1 (M_r 180 kDa; Fig. 1A, lane 1). By immunohistochemistry analyses on rat brain sections, we determined IQGAP1 immunoreactivity in endothelial cells, in the epithelial ependymal cells lining the lateral ventricles, and in neural progenitor cells of the germinal anterior subventricular zone (aSVZ) and of the rostral migratory stream (RMS; Fig. 1B and C). In the aSVZ, IQGAP1 is associated with clusters of neural progenitor cells coimmunostained with nestin marker (Fig. 1B, a and b). These IQGAP1⁺ cells were stained by a mitotic nuclear marker antigen Ki-67 (Fig. 1B, c and d), suggesting that they correspond to amplifying neural progenitors. In the RMS, IQGAP1 persists in proliferating neural progenitors, which are closely associated with blood vessels (Fig. 1C, a-c).

Amplifying neural progenitors have been isolated from adult rat SVZ and grown as neurospheres as previously described for mice neural progenitors (21). Western blot (Fig. 1A, lane 2) and indirect immunofluorescence (Fig. 1D) on neurospheres confirmed the coexpression of IQGAP1 and nestin in neural progenitors. The glial marker GFAP is not detected in neurospheres (Fig. 1A, lane 2),

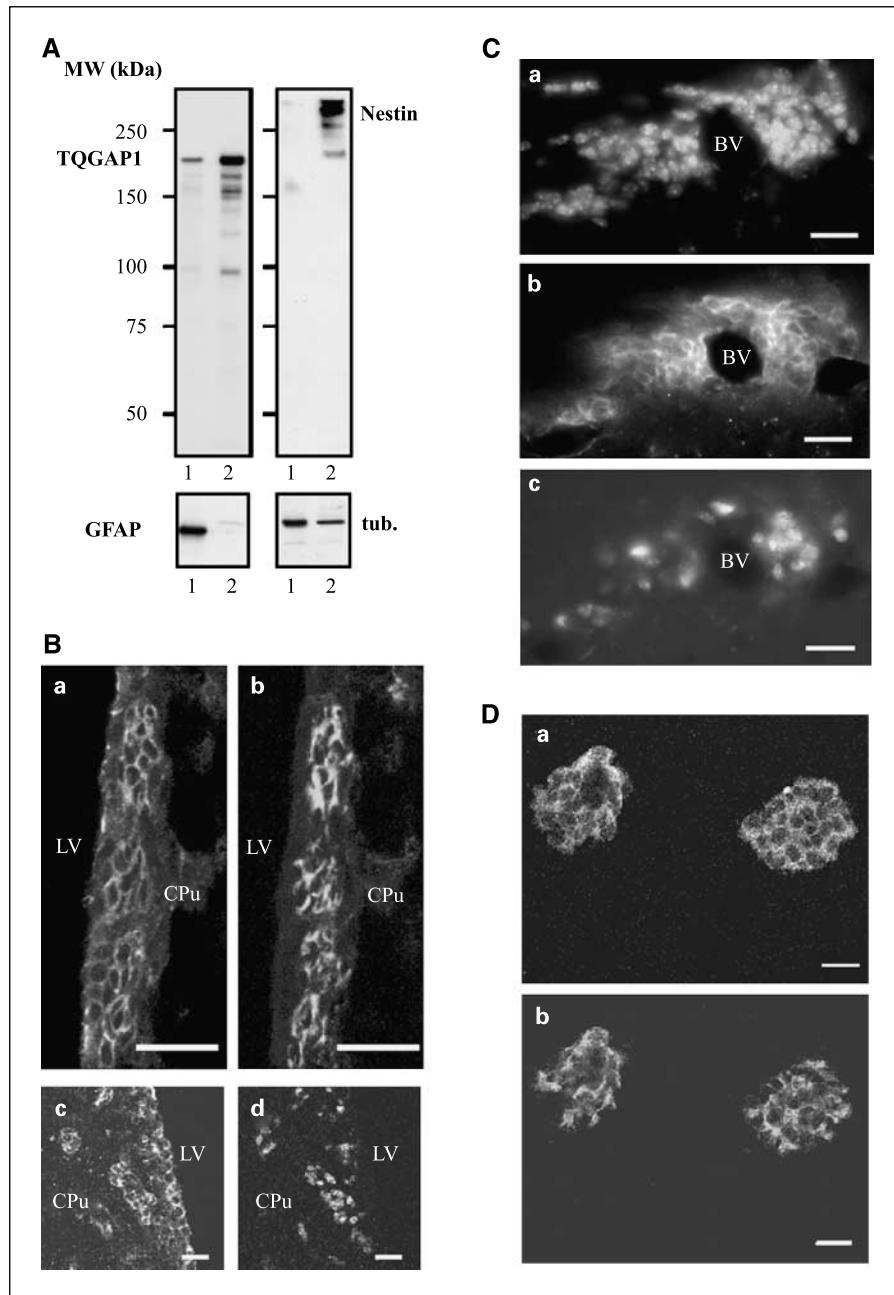


Figure 1. IQGAP1 is expressed in amplifying neural progenitor cells in adult rat brain. *A*, Western blot analysis of total adult rat brain extract (*lane 1*) and of neurospheres derived from adult rat SVZ (*lane 2*) with anti-IQGAP1, anti-nestin, anti-GFAP, or anti- β -tubulin (*tub.*). *B*, confocal microscope analysis of coronal rat brain section showing the aSVZ double immunostained with IQGAP1 antibodies (*a* and *c*) and either nestin (*b*) or Ki-67 (*d*) antibody. *LV*, lateral ventricle; *CPu*, caudate nucleus. Bar, 20 μ m. *C*, optical microscope analysis of sagittal section of rat brain RMS triple immunostained with Hoechst for DNA (*a*), IQGAP1 antibodies (*b*), and Ki-67 antibody (*c*). *BV*, blood vessel. Bar, 20 μ m. *D*, neurospheres derived from adult rat SVZ grown in the presence of EGF and FGF were double labeled with IQGAP1 (*a*) and nestin (*b*) antibodies. Bar, 20 μ m.

whereas the protein is highly abundant in total brain extracts (Fig. 1*A*, *lane 1*).

IQGAP1 specifies a population of nestin⁺ tumor cells in a rat model of glioblastoma-like tumor. In differentiated cells of the adult rat brain, IQGAP1 immunoreactivity is below the detection limit. However, IQGAP1 protein is highly abundant in rat and human cell lines derived from glioma (19). We therefore investigated possible regulation of IQGAP1 expression during neurocarcinogenesis.

In the rat, a single transplacental injection ENU into pregnant female rat at E19 induces the development of brain tumors in virtually 100% of offspring after several months (20). Many animals developed more than one intraparenchymal tumors. Three months after injection, 25 intraparenchymal tumors in 10 rats were

examined for their histologic and immunophenotypic characteristics. Immunohistochemical characterizations included expression of the astrocyte marker (GFAP), the oligodendrocyte progenitor markers (Olig-2/NG2), and the neural progenitor markers (nestin and IQGAP1). Two types of tumors have been distinguished based on these criteria. Representative results are shown in Figs. 2 and 3.

Nineteen primitive hyperplastic lesions examined have histologic characteristics that resemble human oligodendrogloma. Figure 2 shows a representative image of such hyperplastic lesion located in the angle of the lateral ventricle between the corpus callosum and the caudate nucleus. Histologically, these tumors show moderate cellularity with relatively monomorphous round nuclei and an arborized capillary network. As reported for human oligodendroglomas (22), the majority of tumor cells have a uniform

phenotype characterized by intense immunoreactivities for the oligodendrocyte precursor markers, including the nuclear transcription factor Olig-2 and the cell surface NG2 proteoglycan (Fig. 2, A and B) and the platelet-derived growth factor- α receptor (data not shown). Within these tumors, IQGAP1 immunoreactivity is exclusively confined to the capillary network (Fig. 2, C). A costaining with the endothelial marker PECAM confirmed the restriction of IQGAP1 in oligodendrogloma-like endothelial cells (Supplementary Fig. S1). These tumors also incorporate reactive astrocytes identified based on their morphology and immunoreactivity for GFAP marker (Fig. 2, D). Tumor cells, as well as reactive astrocytes, are not stained with nestin antibodies, and only very few cells express the proliferation-associated Ki-67 antigen (data not shown). Low mitotic index is also a feature of human oligodendrogloma.

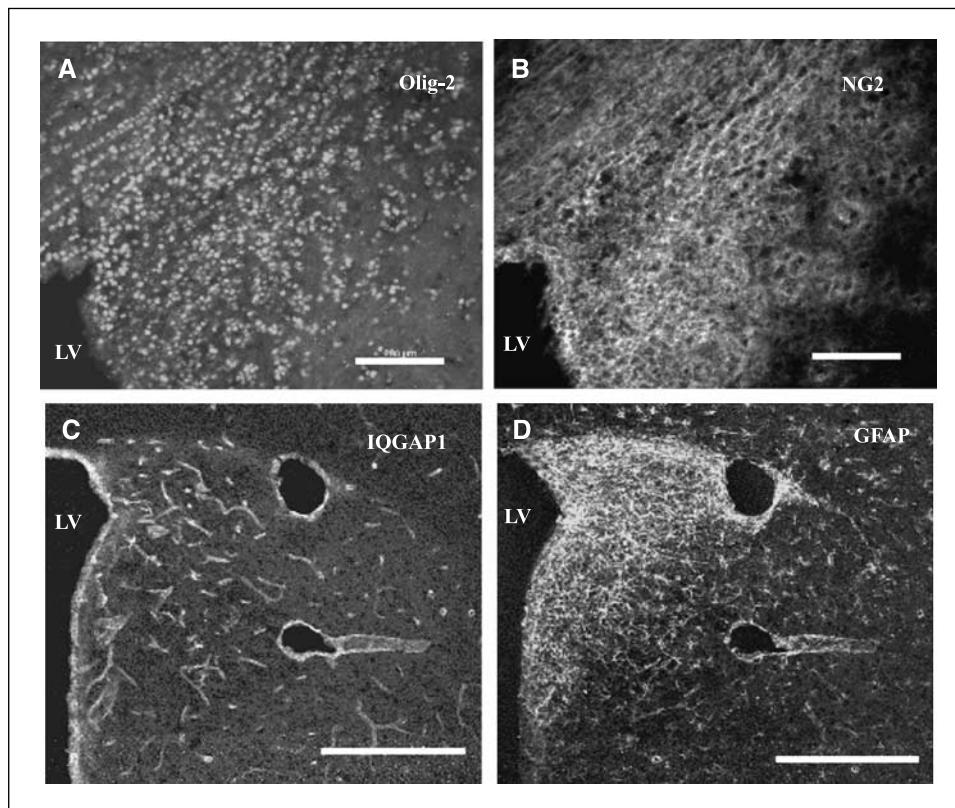
The second type of parenchymal tumor is histologically more heterogeneous and reveals an apparent complexity of phenotypes that closely resembled human glioblastoma. These tumors are characterized by clusters of IQGAP1 $^{+}$ cells surrounded by GFAP $^{+}$ cells (Fig. 3, a and b). The IQGAP1 $^{+}$ cells are coimmunostained with nestin (Fig. 3, c-e). The tumor GFAP $^{+}$ cells have mixed phenotypes depending on their localization within the tumor bulk. The GFAP $^{+}$ astrocyte population, which unsheathed clusters of IQGAP1 $^{+}$ /nestin $^{+}$ cells, can be colabeled with nestin. In contrast, GFAP $^{+}$ astrocytes, which accumulate to the periphery of the tumors, are nestin $^{-}$ (data not shown). These nestin $^{-}$ astrocytes are likely associated with reactive gliosis that accompanies tumor development. The cellular heterogeneity of the tumors is also illustrated by the presence of many tumor cells with strong NG2 immunoreactivity (data not shown). However, in contrast to oligodendrogloma-like tumors, the NG2 $^{+}$ tumor cells are totally devoid of

nuclear Olig-2 immunoreactivity (data not shown). We noted a large number of proliferating Ki-67 $^{+}$ cells in these tumors in agreement with a malignant grade. Most of the Ki-67 $^{+}$ cells form clusters unsheathed within astrocyte processes (Fig. 3, f-h). Double immunostaining with Ki-67 and IQGAP1 antibodies shows that most of the Ki-67 $^{+}$ cells are IQGAP1 $^{+}$ (Fig. 3, i-l), indicating that IQGAP1 $^{+}$ cells are part of the proliferating component of the tumor. Hoechst staining does not reveal fragmented nuclei, confirming that Ki-67 $^{+}$ cells are not undergoing apoptosis (Fig. 3, i).

IQGAP1 expression identifies tumor amplifying cells in human glioblastoma. Having identified IQGAP1 as a specific marker of amplifying tumor cells in a rat model of glioblastoma, we next investigated whether IQGAP1 might also help to discriminate human glioblastoma from oligodendrogloma. We first compared the expression of IQGAP1 and nestin in nine human glioblastoma and nine human oligodendrogloma (grades 2 and 3) by Western blot (Fig. 4A). Results show that nestin is highly expressed in tumors classified as glioblastoma and almost undetectable in oligodendrogloma with low or anaplastic features. Western blot analysis also reveals a correlation between nestin expression and IQGAP1 content in all glioblastoma extracts. Significant nestin expression was observed only in one oligodendrogloma (patient 756). Interestingly, this tumor had characteristics of glioblastoma in some regions. In contrast, the astrocyte marker GFAP does not discriminate glioblastoma from oligodendrogloma.

Triple indirect immunofluorescence analysis with IQGAP1, GFAP, and the endothelial marker PECAM (Fig. 4B) reveals that, within low-grade oligodendrogloma (Fig. 4B, a-d) and in anaplastic oligodendrogloma characterized by higher vascular development (Fig. 4B, e-h), IQGAP1 immunoreactivity is exclusively associated with endothelial cells. This contrasts with glioblastoma, where

Figure 2. Immunohistochemical characterization of rat oligodendrogloma-like tumors. Representative oligodendrogloma-like tumor in the angle of the lateral ventricle between the corpus callosum and the caudate nucleus from a 90-day-old rat exposed to ENU and double immunostained with either Olig-2 (A) or NG2 (B) antibodies or with IQGAP1 (C) and GFAP (D) antibodies. Bar, 200 μ m.



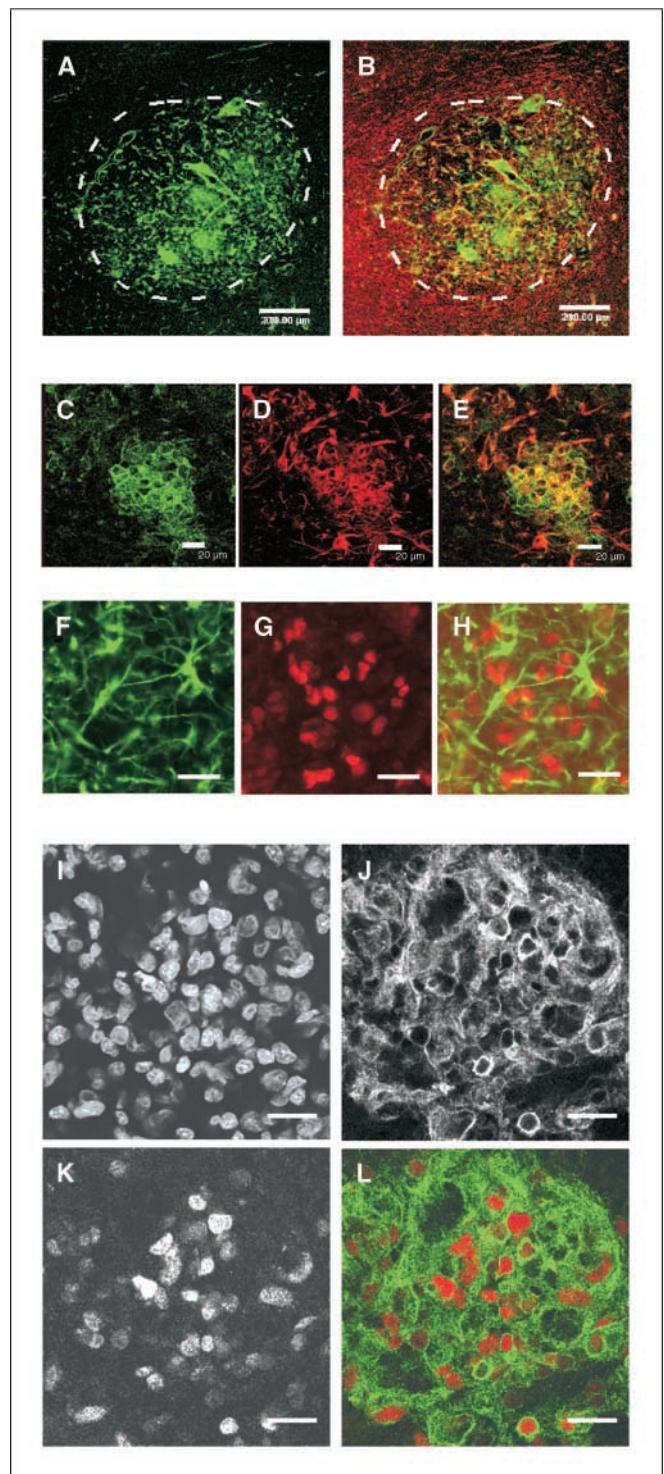


Figure 3. Immunohistochemical characterization of rat glioblastoma-like tumors. Representative glioblastoma-like tumor in the cortex above the corpus callosum from a 90-day-old rat. *A* and *B*, low-power view section immunostained with IQGAP1 (green, *A* and *B*) and GFAP (red, *B*) antibodies shows clusters of IQGAP1⁺ cells surrounded by GFAP⁺ astrocytes. Dashed line, tumor is outlined. Bar, 200 μ m. *C* to *E*, double immunostaining with IQGAP1 and nestin antibodies shows that clusters of IQGAP1⁺ cells (*green*, *C* and *E*) express nestin (*red*, *D* and *E*). Bar, 20 μ m. *F* to *H*, double immunostaining with anti-GFAP (*green*, *f* and *h*) and anti-Ki-67 (*red*, *g* and *h*) antibodies shows that tumor cells labeled with Ki-67 are not GFAP⁺. Bar, 50 μ m. *I* to *L*, cluster of IQGAP1⁺ cells stains with Hoechst for DNA (*I*) and double immunostained with anti-IQGAP1 (*J* and *L*) and anti-Ki-67 (*K* and *L*) antibodies shows that tumor cells labeled with Ki-67 correspond to IQGAP1⁺ cells. Bar, 50 μ m.

IQGAP1 immunoreactivity is present both in endothelial cells and also in a cell population that is not stained with GFAP (Fig. 4*B*, *i-l*). In all glioblastoma, the IQGAP1⁺/GFAP⁻ cells are preferentially located around blood vessels.

Based on these observations, we did a systematic characterization of the IQGAP1⁺/GFAP⁻ cells in human glioblastoma biopsies. Representative results obtained with glioblastoma sample 280 are shown.

HPS coloration on tumor sections shows histologic features of a human glioblastoma (Supplementary Fig. S2a). A GFAP staining done on the same tumor sample shows that certain tumor cell subtypes are not positive for this astrocyte marker showing the cell heterogeneity in human glioblastoma (Supplementary Fig. S2b). We next used indirect immunofluorescence to refine the immunologic phenotype of the different tumor cell populations (Fig. 5, *A-J*). Triple immunostaining with GFAP, nestin, and IQGAP1 reveals clusters of cells coexpressing IQGAP1 and nestin surrounded by GFAP⁺ cells (Fig. 5, *A-C*). The GFAP⁺ tumor cells, which surround the IQGAP1⁺/nestin⁺ clusters, remain heavily stained with nestin (Fig. 5, *A* and *B*). At higher magnification, the IQGAP1⁺/nestin⁺ clusters show a clear colocalization of IQGAP1 and nestin (Fig. 5, *D-F*). Triple immunostaining with IQGAP1, GFAP, and the endothelial marker PECAM confirms that the IQGAP⁺ cells accumulate around blood vessels (Fig. 5, *G-J*). On serial sections of this human glioblastoma sample, we also analyzed the proliferation status of the different tumor cell populations (Fig. 5, *J-R*). Low magnification observation of the tumor double immunostained with GFAP and Ki-67 clearly shows that the majority of proliferating cells (Ki-67⁺) are located within clusters surrounded by GFAP⁺ cells (Fig. 5, *J-L*). Triple immunostaining with GFAP, nestin, and Ki-67 constantly revealed that the clusters of Ki-67⁺ cells correspond to nestin⁺/GFAP⁻ cells (Fig. 5, *M-O*). It has not been possible to do colabeling of Ki-67 with IQGAP1 due to the rabbit origin of the two antibodies. Nevertheless, taking into account that clusters of nestin⁺/GFAP⁻ cells are IQGAP1⁺ (Fig. 5, *D-F*) and that clusters of nestin⁺/GFAP⁻ cells are Ki-67⁺ (Fig. 5, *M-O*), we can logically conclude that Ki-67⁺/nestin⁺/GFAP⁻ cells correspond to IQGAP1⁺ tumor cells. There are some nestin⁺/GFAP⁺ cells present within the tumor mass that are also Ki-67⁺ (Fig. 5, *P-R*). These cells may correspond to tumor cells that have acquired more differentiated phenotype but still retain the capacity to proliferate.

IQGAP1⁺/nestin⁺ cells derived from glioblastoma have *in vitro* and *in vivo* characteristics of amplifying cancer progenitor cells. To confirm that the IQGAP1⁺/nestin⁺/GFAP⁻ cells present in human glioblastoma represent the tumor amplifying cells, we produced neurospheres from postsurgery specimens of glioblastoma 280 as described in Materials and Methods. Western blot analysis revealed that IQGAP1 is highly expressed in the total tumor extract (Fig. 6*A*, *lane 1*) and in the corresponding cancerous neurospheres (Fig. 6*A*, *lane 2*). These cancerous neurospheres do not express GFAP, whereas the protein is present in the original total tumor extract (Fig. 6*A*, *lanes 1* and *2*). Two recognized marker of tumorigenic glioblastoma stem-like progenitors were then chosen to characterize the expanded spheres: nestin and CD133 (8, 11). Double indirect immunofluorescence reveals that the IQGAP1⁺ cells within neurospheres express both nestin and CD133 (Fig. 6*B* and *C*). The intensity of staining between IQGAP1 and nestin may vary among cells. These differences might either reflect subtle heterogeneity of neurosphere cells or are due to a difference in antigen accessibility. The

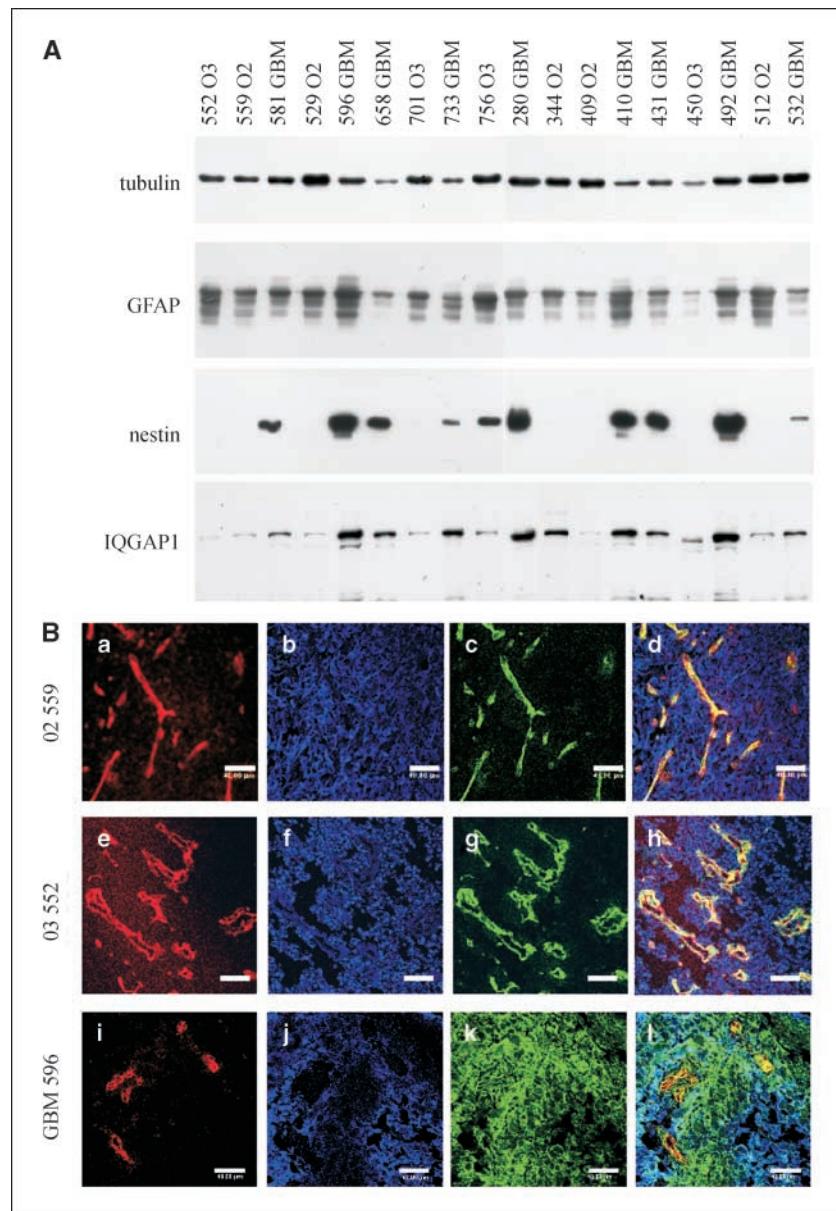


Figure 4. Immunohistochemical characterization of human glioma. *A*, samples of human brain tumors, representing grade 2 or 3 oligodendrogloma (O2 and O3) and glioblastoma (GBM), were analyzed by Western blot for β -tubulin, GFAP, nestin, and IQGAP1 content. *B*, triple immunofluorescence analysis of low-grade oligodendrogloma (patient 559; *a-d*), high-grade oligodendrogloma (patient 552; *e-h*), and glioblastoma (patient 596; *i-l*) stained with PECAM antibodies for endothelial cells (*a, e, and i*), GFAP (*b, f, and j*), and IQGAP1 (*c, g, and k*). Bar, 40 μ m.

neurospheres can be dissociated in a single cell and they are able to reform a secondary neurospheres for a long time, confirming their self-renewal potency. These cells have been expanded for >30 passages with an average doubling time estimated to 3 days. Moreover, the cell immunophenotypes remained constant throughout passages.

A property of tumorigenic glioblastoma stem-like progenitors grown as neurospheres is their multipotency (9, 11). To examine the *in vitro* multipotency of the 280 glioblastoma-derived neurospheres, cells were cultured in different culture conditions. Neurospheres were firstly plated onto polylysine-coated coverslips in a low serum-containing medium. Results show that cells spread out from the spheres and differentiate down astrocyte lineage, which characterizes the original tumor phenotype. Most of the cells express GFAP, and many of them coexpress nestin and still proliferate as revealed by Ki-67 staining (Supplementary Fig. S3A). Only rare cells express the neuronal marker Tuj-1 (data not shown). To analyze the neurogenic potential of the glioblastoma amplifying

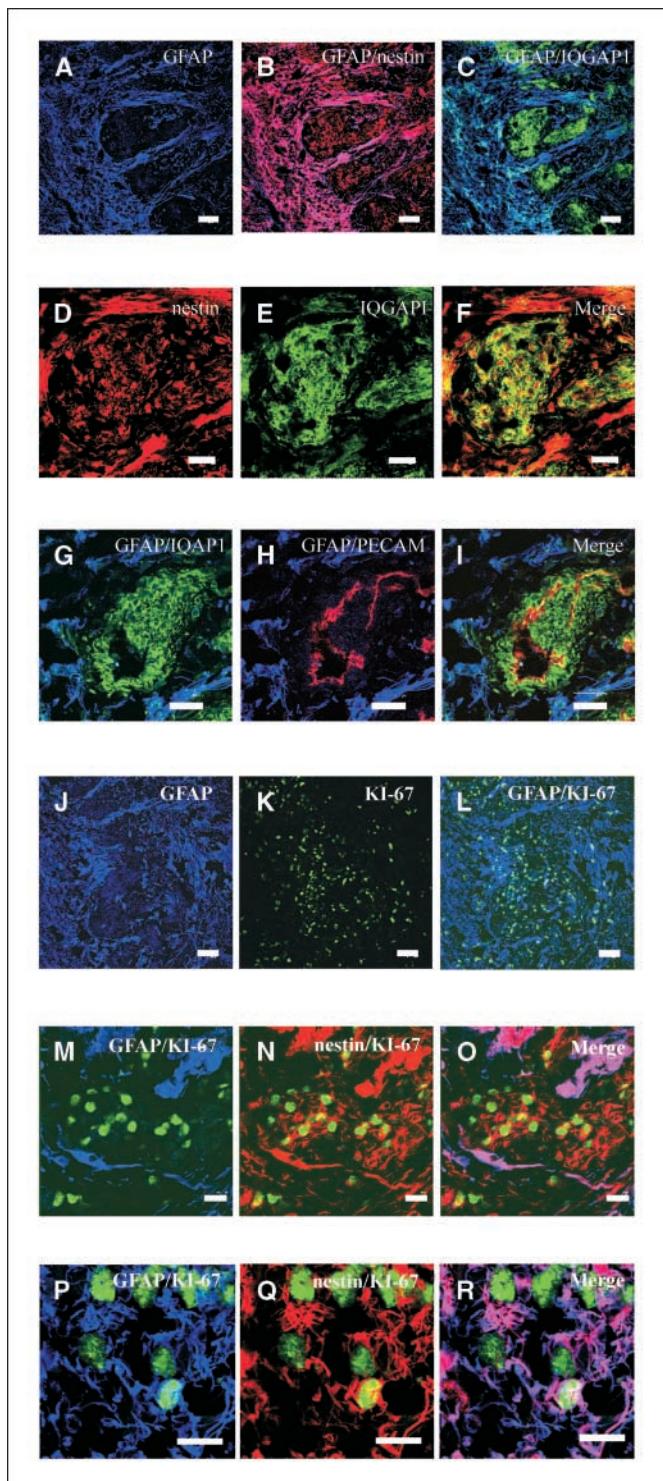
cancer cells, we plated neurospheres onto polylysine-coated slides in conditioned medium of endothelial cells. Enhancement of neuron production from multipotent neural progenitors by factors secreted by endothelial cells has been previously reported (23). In this culture condition, after 4 days, most of the glioblastoma-derived cells express the neuronal marker Tuj-1 (Supplementary Fig. S3B). As observed by others (9), a fraction of cells were colabeled with both neuronal and glial markers. This abnormal type of cells likely reflects aberrant differentiation program in tumor neural progenitors.

CD133⁺ cells can be purified from human glioblastoma, and as few as 100 CD133⁺ cells can produce a tumor when injected into the brain of NOD-SCID mouse (8). Analysis of IQGAP1 immunoreactivity in the xenograft at an early stage of the neoplastic process reveals that most of the amplifying tumor cells are heavily immunostained with IQGAP1 antibodies (Fig. 6D, *a* and *b*). Double immunofluorescence staining reveals that the IQGAP1⁺ xenograft tumor cells do also express CD133 immunoreactivity (Fig. 6D,

c and d), confirming the specific expression of IQGAP1 and CD133 in glioblastoma amplifying cancer progenitor cells *in vivo*.

Discussion

Detailed investigation of IQGAP1 expression in adult rat brain by indirect immunofluorescence has revealed a restricted pattern of accumulation of the protein in brain endothelial cells, in the epithelial ependymal cells lining the ventricles, and in amplifying



neural progenitor cells abundant in the germinative SVZ and RMS. We have confirmed the expression of IQGAP1 protein in amplifying neural progenitors isolated from adult rat SVZ and grown as neurospheres *in vitro*. In the rat brain and in neurosphere cells, IQGAP1⁺ cells also express the neural progenitor marker nestin. The IQGAP1⁺/nestin⁺ neural progenitors associate as dense clusters and are generally concentrated around blood vessels. This location places neural progenitor cells in close proximity to the endothelial cells, facilitating interaction and communication between these two cell types. These cellular interactions are important to control neural progenitor self-renewal and differentiation (23–25). In a rat model of glioblastoma-like tumors, IQGAP1 is also expressed by a subpopulation of nestin⁺/GFAP[−] cells. The mitotic cells present in the tumors express IQGAP1, indicating that the IQGAP1⁺/nestin⁺ cells are part of the proliferating component of the tumor. Our results corroborate previous study showing that, in ENU-induced rat glioma, nestin⁺ cells frequently incorporated bromodeoxyuridine (BrdUrd), whereas other tumor cells expressing GFAP were only rarely colabeled with BrdUrd (20). Rat cell lines can be derived from ENU-induced glioma. One example is the C6 cell line used as a cellular model of brain glioma. A side population of tumorigenic cancer stem-like cells persists in the C6 glioma cell line (26). We have purified C6 side population cells by flow cytometry (26) and shown that they express both IQGAP1 and nestin (data not shown). These observations suggest that the IQGAP1⁺/nestin⁺ cells may be important in the early stages of brain tumorigenesis. Several possibilities exist for the source of such cells. One possibility is that a precursor cell or a differentiated cell in the parenchyma undergoes transformation, after which it expresses nestin and IQGAP1. Alternatively, a nestin⁺/IQGAP1⁺ neural progenitor in the SVZ and the RMS could migrate to this area after transformation. Very recent studies have shown that amplifying neural progenitors capable of proliferation and multipotential differentiation can indeed migrate to the brain parenchyma to produce new neurons and glia (27).

In contrast to rat glioblastoma, IQGAP1⁺/nestin⁺ tumor cells are absent in rat tumors with oligodendroglial phenotypes. Because oligodendrogloma-like tumors express oligodendrocyte progenitor markers (Olig-2/NG2), it is likely that these tumors are related to oligodendrocyte progenitors as already suggested for human oligodendroglomas (22). Oligodendroglomas might arise from a stem cell that acquires oligodendrocyte progenitor phenotypes determined by environment (3) or might directly derive from multipotent oligodendroglial progenitors (28). The exact origin of

Figure 5. IQGAP1 expression specifies tumor amplifying cells in human glioblastoma. Human glioblastoma (patient 280) sections were analyzed by indirect immunofluorescence and confocal microscopy. A to C, triple indirect immunofluorescence analysis with anti-GFAP (blue), anti-nestin (red), and anti-IQGAP1 (green) antibodies shows that nestin⁺/IQGAP1⁺ cells form clusters surrounded by GFAP⁺/nestin⁺ cells. Bar, 80 μm. D to F, higher magnification of the nestin⁺/IQGAP1⁺ clusters shows overlap between the two markers. Bar, 40 μm. G to I, triple immunostaining with anti-GFAP (blue), anti-IQGAP1 (green), and anti-PECAM (red) antibodies shows that IQGAP1⁺ cells form perivascular niches surrounded by GFAP⁺ cells. Bar, 40 μm. J to L, double immunostaining with anti-GFAP and anti-Ki-67 antibodies shows that cells with the highest mitotic index are located within clusters surrounded by GFAP⁺ cells. Bar, 80 μm. M to O, higher magnification of a cluster of nestin⁺/GFAP[−] cells triple immunostained with anti-GFAP (blue), anti-nestin (red), and anti-Ki-67 (green) antibodies shows that nestin⁺/GFAP[−] cells actively proliferate. Bar, 20 μm. P to R, triple immunostaining with anti-GFAP (blue), anti-nestin (red), and anti-Ki-67 (green) antibodies shows that some cells that form the tumor mass and that express both nestin and GFAP are also able to proliferate. Bar, 20 μm.

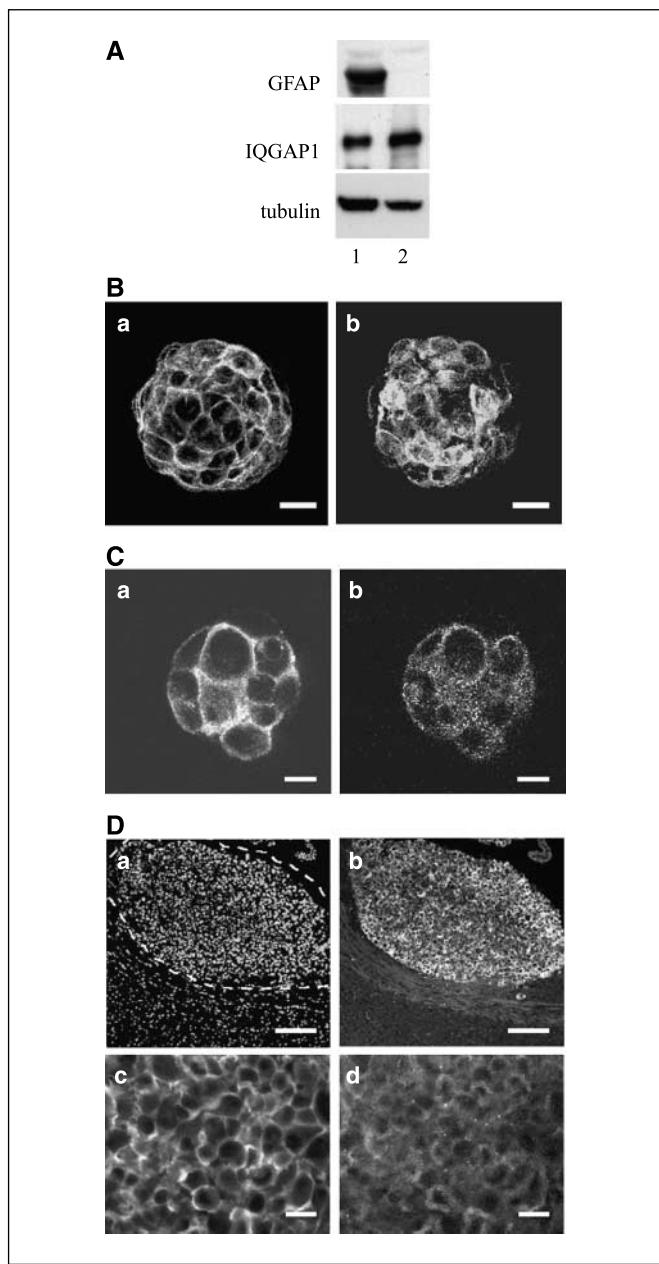


Figure 6. IQGAP1⁺ cells derived from glioblastoma have *in vitro* and *in vivo* characteristics of amplifying cancer cells. *A*, sample of human glioblastoma (280; lane 1) and corresponding neurospheres (lane 2) was analyzed by Western blot for GFAP, IQGAP1, and β -tubulin content. *B*, 280 glioblastoma-derived neurospheres grown in the presence of EGF and FGF were double labeled with IQGAP1 (*a*) and nestin (*b*) antibodies. Bar, 20 μ m. *C*, 280 glioblastoma-derived neurospheres grown in the presence of EGF and FGF were double labeled with IQGAP1 (*a*) and CD133 (*b*) antibodies. Bar, 20 μ m. *D*, immunohistochemical characterization of human glioblastoma xenograft. *a* and *b*, section of mouse xenografted tumor derived from human CD133⁺ glioblastoma tumor cells was stained for DNA with Hoechst (*a*) and immunostained with IQGAP1 antibodies (*b*). Dashed line, tumor is outlined. Bar, 200 μ m. *c* and *d*, xenograft was double labeled with IQGAP1 (*c*) and CD133 (*d*) antibodies. Bar, 20 μ m.

oligodendroglomas remains to be further studied. To validate our results with rat brain tumor model, we next studied IQGAP1 expression in human oligodendrogloma and glioblastoma. We confirmed that IQGAP1 is a reliable marker that may help to distinguish oligodendrogloma from glioblastoma. Although in

both tumors IQGAP1 is expressed by endothelial cells, only in glioblastoma it specifies a population of amplifying tumor cells. Remarkably, IQGAP1 is absent from the astrocytic contingency of the tumors, which often induces bias in brain tumor classification. IQGAP1 may thus represent a protein marker that may have significant implication in the classification of human brain tumors. The human glioblastoma IQGAP1⁺ cells can be expanded *in vitro* as neurospheres and exhibit features of multipotent glioblastoma tumorigenic neural precursors (Fig. 6; Supplementary Fig. S3). *In vivo*, the amplifying IQGAP1⁺ cancer cells are surrounded by tumor cells that have down-regulated IQGAP1 expression and express the differentiation-associated marker antigen GFAP. Nonetheless, GFAP expression does not correlate with full differentiation, as the cells still express the stem/progenitor cell marker nestin. Although, these GFAP⁺/nestin⁺ cells are still able to proliferate, *in vivo* and *in vitro*, they have lost their tumorigenicity (8). All together, these findings suggest that the amplifying IQGAP1⁺ cancer cells are closer to a multipotent progenitor cells and represent the most aggressive cancer cell population in glioblastoma. The clusters of IQGAP1⁺ tumor cells most likely correspond to the glioblastoma amplifying cancer cells that represent up to 30% of the glioblastoma tumor cell population (8) and maybe the cell population, which has to be target for more effective cancer therapies of glioblastoma. The close association between IQGAP1⁺ amplifying cancer cells with blood vessels might contribute to maintain cancer cells undifferentiated with high tumorigenic potential. Several studies have already pointed out that endothelial cells are important in the regulation of neural progenitor proliferation and differentiation (23–25). The close association between amplifying cancer cells and endothelial cells also raises the possibility that the tumorigenic cells may use blood vessels to migrate and disseminate throughout the brain parenchyma. Indeed, in both rat and human glioblastomas, the perivascular clusters of amplifying cancer cells are not concentrated within a single tumor area but are found dispersed within the tumor mass. The migratory potential of tumorigenic cells could explain the local recurrence of gliomas after surgical resection or radiotherapy that targets the tumor mass but does not necessarily include the zones where cancer cells might have migrated. The IQGAP1 signaling pathway might play an essential role in the control of these migration and invasion processes. IQGAP1 is a key component of cell motility signal transduction (16–18). In neural precursors, in response to intracellular Ca²⁺ elevation, IQGAP1 forms a complex with Rho family GTPases, CLIP-170 and Lis1, and enhances neuronal motility (17). In endothelial cells, IQGAP1 interacts with the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (VEGF-R2) to promote endothelial cell migration (16). VEGF-R2 is also expressed by neural progenitors and mediates the chemotactic activities of VEGF on neural progenitors (29). We have found that neurospheres derived from wild-type mice respond to the VEGF-mediated chemokinesis but not those derived from *iqgap1* null mice, suggesting that IQGAP1 signaling pathway might play an essential role in the control of neural progenitor migration.⁴ Considering the similarities between IQGAP1⁺ amplifying neural progenitors and IQGAP1⁺ glioblastoma amplifying cancer cells, the proposed function of IQGAP1 in the regulation of neural progenitor migration can be extended to the amplifying tumor cells in human glioblastoma. A better understanding of the

⁴ L. Balenci, A. Bernards, and J. Baudier, unpublished data.

IQGAP1 signaling in amplifying tumor cells may open new avenue to develop pharmacologic approach aiming to neutralize these cells, which represent the most aggressive cell type in glioblastoma.

Acknowledgments

Received 2/27/2006; revised 7/1/2006; accepted 7/25/2006.

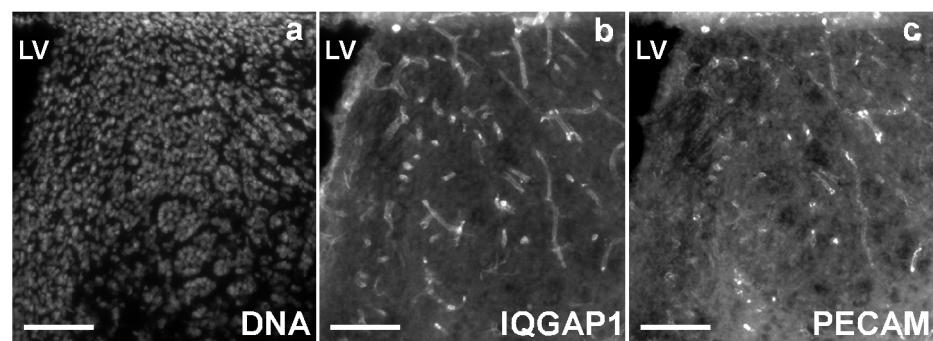
Grant support: Association pour la Recherche sur le Cancer grant 4725 and Région Rhône-Alpes Emergence grant 8HC04H00 (J. Baudier) and Institut National du Cancer grant PL114 (J. Baudier and J. Honnorat).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

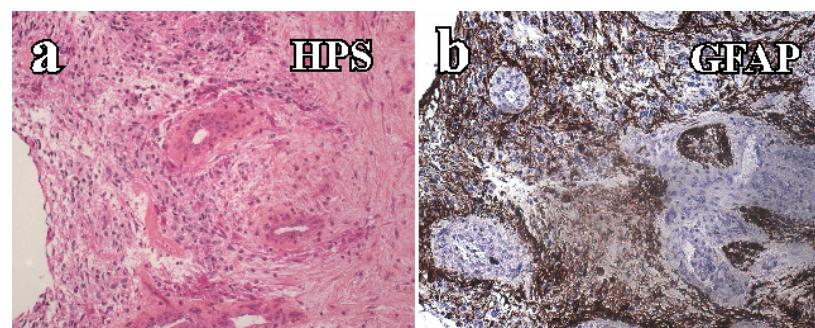
We thank Dr. H. Chneiweiss for generous gift of Olig-2 antibodies, Prof. J. LaMarre (Guelph University, Guelph, Ontario, Canada) for critical reading of the article, Dr. D. Grunwald for assistance in confocal microscopy analysis, and Dr. J.C. Deloulme for advices in neurosphere cultures.

References

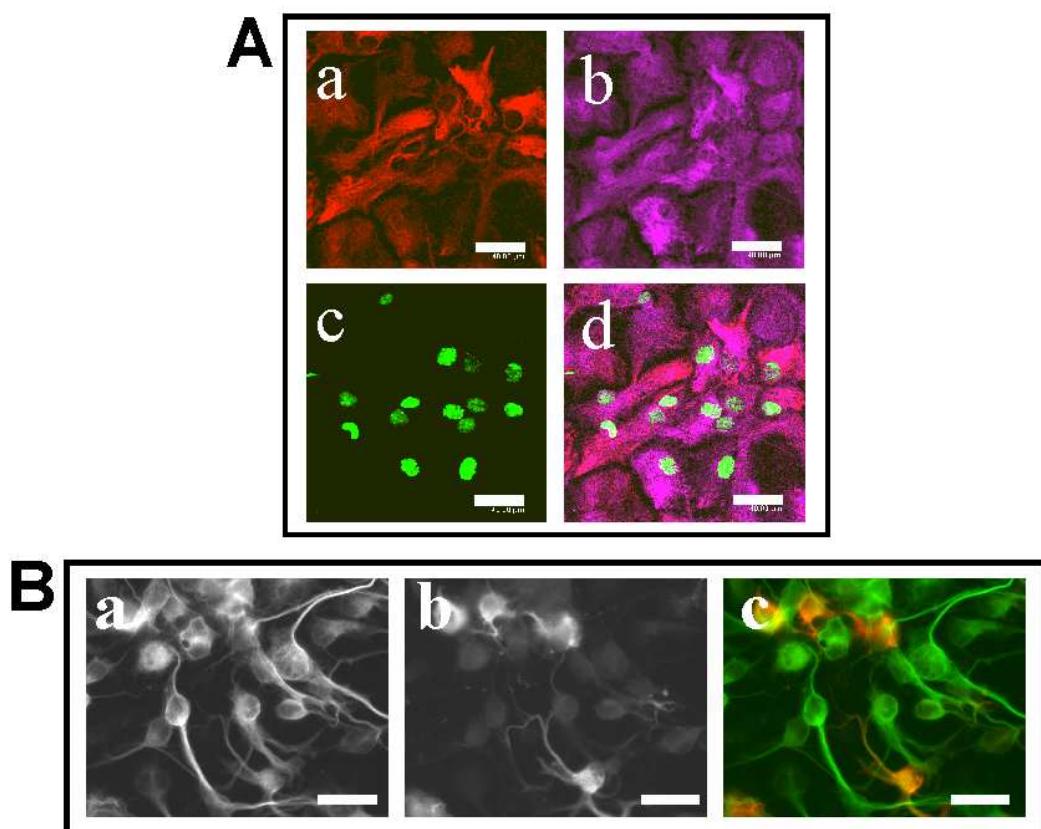
- Oliver TG, Wechsler-Reya RJ. Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron* 2004;42:885–8.
- Clarke MF. Neurobiology: at the root of brain cancer. *Nature* 2004;432:281–2.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 2005;353:811–22.
- Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 2000;25:55–7.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60:585–95.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997;17:5046–61.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15178–83.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396–401.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004;64:7011–21.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821–8.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, et al. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 2004;23:9392–400.
- Katata T, Irie K, Fukuhara A, et al. Involvement of nestin in the localization of IQGAP1 at the cell-cell adhesion sites through the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Oncogene* 2003;22:2097–109.
- Lui WY, Mruk DD, Cheng CY. Interactions among IQGAP1, Cdc42, and the cadherin/catenin protein complex regulate Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis. *J Cell Physiol* 2005;202:49–66.
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, et al. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 2002;109:873–85.
- Watanabe T, Wang S, Noritake J, et al. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell* 2004;7:871–83.
- Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, et al. IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species-dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res* 2004;95:276–83.
- Kholmansikh SS, Koeller HB, Wynshaw-Boris A, Gomez T, Letourneau PC, Ross ME. Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat Neurosci* 2006;9:50–7.
- Briggs MW, Sacks DB. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep* 2003;4:571–4.
- Mbele GO, Deloulme JC, Gentil BJ, et al. The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *J Biol Chem* 2002;277:49998–50007.
- Jang T, Litofsky NS, Smith TW, Ross AH, Recht LD. Aberrant nestin expression during ethylnitrosourea(ENU)-induced neurocarcinogenesis. *Neurobiol Dis* 2004;15:544–52.
- 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;36:1021–34.
- Shoshan Y, Nishiyama A, Chang A, et al. Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10361–6.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 2004;304:1338–40.
- Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH. Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science* 2004;304:1253–5.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000;425:479–94.
- Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:781–6.
- Bull ND, Bartlett PF. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* 2005;25:10815–21.
- Aguirre A, Gallo V. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* 2004;24:10530–41.
- Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, Kiss JZ. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol* 2003;163:1375–84.



Balenci et al. Supplemental Figure 1



Balenci et al. Supplemental Fig. 2 a-b



Balenci et al. Supplemental. Fig. 3 A-B

Balenci et al. Supplemental data.

Supplemental Figure 1: IQGAP1 is expressed by endothelial cells in rat oligodendrogloma.

Rat oligodendrogloma, as shown in Figure 2, was stained with Hoescht (a) and double immunostained with anti-IQGAP1 (b) and anti-PECAM (c) antibodies. LV: lateral ventricle. Bar: 50 μ M.

Supplemental Figure 2: Histopathological features of patient 280 GBM. a- Hemalin Phloxine Saffran (HPS) section shows GBM cytoarchitecture. b-The tumor expresses the astrocyte cell marker GFAP (brown) but sub-populations of tumor cells remain GFAP-.

Supplemental Figure 3: IQGAP1+ cells derived from human 280 GBM have *in vitro* characteristics of multipotent cancer cells.

A: 280 GBM neurospheres were plated on poly-lysine coated coverslips in defined medium supplemented with 3% FBS. After 96h cells were fixed and triple immunostained for nestin (red, a and d), GFAP (purple, b and d) and Ki-67 (green, c and d).

B: 280 GBM neurospheres were plated on poly-lysine coated coverslips in conditioned medium of EaHY endothelial cell line for 96h and double immunostained for Tuj-1 (green, a and c) and GFAP (red, b and c).

III.1.3 Discussion et perspectives

Les résultats de ce deuxième article s'articulent autour de l'étude de l'implication des cellules souches et/ou progénitrices neurales dans l'étiologie de tumeurs cérébrales. Dans ce travail, nous avons confirmé l'expression, *in vivo* et *in vitro*, d'*Iqgap1* dans les cellules progénitrices neurales de rat adulte. Par conséquent, IQGAP1 est un nouveau marqueur de cellules progénitrices neurales chez les rongeurs adultes. Ce dernier nous a permis d'identifier une sous-population de cellules cancéreuses dans des tumeurs malignes de rat et les glioblastomes humains qui présente toutes les caractéristiques inhérentes aux cellules souches et/ou progénitrices neurales normales. Cette population tumorale a pu être isolée à l'aide d'un marqueur de surface spécifique de cellules souches normales, le CD133. La réinjection de ces cellules triées a mis en évidence que cette population est capable d'initier et de reformer une tumeur identique à celle dont elles ont été extraites. Ces cellules tumorigènes expriment *in vitro* et *in vivo* dans les tumeurs naissantes la protéine IQGAP1 suggérant un rôle potentiel de cette protéine dans la malignité tumorale en favorisant l'invasion des cellules cancéreuses.

III.1.3.1 IQGAP1 est un marqueur de cellules progénitrices neurales dans le cerveau de rongeurs adultes

Bien que jusqu'alors la protéine IQGAP1 n'était pas détectée, ni étudiée dans le cerveau, nous avons confirmé que la protéine IQGAP1 s'affiche comme un nouveau marqueur fiable de cellules souches progénitrices dans le cerveau de rongeurs adultes. En effet, chez le rat adulte, IQGAP1 présente le même patron d'expression que dans le cerveau de souris adultes aussi bien dans le parenchyme cérébral, que dans la voie neurogénique de la SVZ/RMS et *in vitro* dans les neurosphères adultes (article 2, figure 1). Dans chaque cas, elle co-localise avec un marqueur connu de cellules souches/progénitrices, la nestine. En revanche, IQGAP1 n'est pas détectée dans les cellules différenciées.

III.1.3.2 IQGAP1 caractérise une population de cellules progénitrices cancéreuses dans les tumeurs malignes de rat et les glioblastomes humains

Dans la littérature, des données convergentes sur le niveau d'expression, la localisation, les nombreuses fonctions cellulaires et partenaires d'IQGAP1 évoquent que cette protéine pourrait intervenir dans les cancers (Briggs and Sacks, 2003). De plus, nous avons révélé que cette protéine était un marqueur de cellules progénitrices dans le cerveau. Fort de ces deux arguments et voulant mesurer l'implication des cellules souches/progénitrices dans l'étiologie des tumeurs cérébrales nous avons déterminé l'expression de cette protéine dans

des tumeurs humaines et des tumeurs chimio-induites chez le rat. De façon tout à fait intéressante, si dans les oligodendrogiomes IQGAP1 semble restreinte aux vaisseaux sanguins (article 2, figure 2C et figure 4B, panels a-h), dans les tumeurs malignes de type glioblastome IQGAP1 est également présente dans les vaisseaux, mais caractérise une sous-population cancéreuse hautement proliférative (article 2, figure 3, panels I à L, figure 5). Ceci se traduit par une surexpression d'*iqgap1* dans les tumeurs malignes et par une surexpression concomitante du marqueur nestin (article 2, figure 4A). Ces données nous ont permis ainsi de discriminer deux sous-types tumoraux, les oligodendrogiomes et les glioblastomes.

III.1.3.3 L'origine cellulaire des oligodendrogiomes et des glioblastomes

Des analyses histologiques et des caractérisations immunohistochimiques complémentaires au profil d'expression des marqueurs IQGAP1 et nestin nous ont permis d'affiner le diagnostic de ces deux types de tumeurs, de valider notre modèle de rat et d'émettre l'hypothèse d'une origine cellulaire différente pour ces deux types de tumeurs. En effet, la nature homogène des oligodendrogiomes et l'expression de marqueurs antigéniques et de facteurs de transcription spécifiques du lignage oligodendrogial (article 2, figure 2) (Hoang-Xuan et al., 2002; Lu et al., 2001; Marie et al., 2001; Shoshan et al., 1999) nous a permis de suspecter l'implication de cellules progénitrices oligodendrogliales (CPO) dans leur genèse. En revanche, l'hétérogénéité cellulaire inhérente aux tumeurs malignes, notamment les glioblastomes, et la mise en évidence de l'expression de marqueurs de cellules souches/progénitrices (article 2, figure 3 et 5) (Almqvist et al., 2002; Ignatova et al., 2002) ont permis de penser que ce type de tumeur résulte de la transformation de cellules souches/progénitrices qui conduit à la naissance de cellules souches tumorales ou « *cancer stem cells* ». Cette population cellulaire se définit fonctionnellement suivant des critères d'auto-renouvellement infini et de multipotence *in vitro*, et de tumorigénérité *in vivo*. Néanmoins, le fait de discriminer des cellules sur la base de fonctionnalités ne permet pas de distinguer un type cellulaire particulier. De ce fait, les origines cellulaires ne peuvent être que supposées. En outre, la visualisation de ces néoplasmes nécessite un certain volume tumoral donc une avancée non négligeable dans la progression tumorale. Par conséquent, il est impossible de définir les premiers événements cellulaires et moléculaires qui conduisent à la genèse de ces foyers néoplasiques. Par ailleurs, en se basant sur l'expression de marqueurs spécifiques, nous ne pourrons pas déterminer si ce sont les marqueurs de la cellule d'origine ou s'ils ont été acquis suite à des altérations géniques.

III.1.3.4 La population de « *cancer stem cells* » dans les tumeurs malignes

Les nombreux travaux de ces dernières années démontrent que certaines cellules tumorales cérébrales présentent toutes les caractéristiques apparentées aux cellules souches et/ou progénitrices neurales normales (Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004b; Vescovi et al., 2006). A partir de biopsies humaines de glioblastomes, nous avons généré des neurosphères cancéreuses qui expriment bon nombre de marqueurs de cellules souches et/ou progénitrices comme la nestin, le marqueur de surface CD133 et la protéine IQGAP1 (article 2, figure 6B). Ces neurosphères sont capables de s'auto-renouveler puisque même après 20 dissociations, des neurosphères se reforment. En outre, ces neurosphères placées sur un substrat de poly-L-lysine dans un milieu dépourvu de facteurs de croissance sont capables de se différencier en cellules gliales et neuronales, attestant de la multipotence de ces cellules (article 2, supplemental figure 3).

Le marqueur spécifique de surface de cellules souches/progénitrices normales humaines CD133 permet d'isoler les « *cancer stem cells* » de tumeurs malignes, cependant un tel marqueur n'existe pas chez les rongeurs. De ce fait, une alternative a été trouvée se basant sur les mécanismes de protection d'efflux de drogues cytotoxiques mis en place par les cellules souches. Ce mécanisme a été examiné *via* un critère d'expulsion du Hoechst vital des cellules. Un tri cellulaire se basant sur ce critère a permis d'isoler une sous-population rare de cellules cancéreuses, nommée « *side population* », dans la lignée tumorale maligne de rat (C6) dérivée de gliomes induits par l'ENU. *In vitro*, cette population présente également toutes les caractéristiques de cellules souches/progénitrices normales (Kondo, 2006; Kondo et al., 2004). Nos expériences sur une lignée commerciale de cellules C6 ont mis en évidence qu'*iqgap1* s'exprime dans cette « *side population* » validant ainsi la présence de cette protéine dans les cellules s'apparentant aux « *cancer stem cells* » dans les tumeurs malignes de rat. A partir de tumeurs humaines, le tri cellulaire basé sur le marqueur CD133 permet d'isoler deux populations et de tester leur tumorigénéité respective par leur injection dans le cerveau de souris NOD/SCID immunodéprimées. Seules les cellules, exprimant ce marqueur, sont capables d'initier et de reformer une tumeur identique à celle dont elles ont été initialement extraites (Galli et al., 2004; Singh et al., 2004b). Nous avons démontré que les xénogreffes de cellules CD133+ issues de glioblastomes dans le cortex de souris immunodéprimées génèrent une tumeur et expriment les marqueurs IQGAP1 et CD133 (article 2, figure 6D). Connaissant le rôle clé de la protéine IQGAP1 dans les processus de motilité et de migration cellulaire, il est pensable qu'au sein de ces tumeurs malignes elle puisse jouer un rôle dans l'invasion de ces « *cancer stem cells* » et permettre ainsi l'expansion tumorale.

III.1.3.5 La biologie des tumeurs malignes

La régulation du comportement des cellules souches/progénitrices se fait en grande partie par l'intermédiaire de leur microenvironnement. Nous venons de voir que dans les tumeurs malignes, une population s'apparentant à des cellules souches/progénitrices est présente d'où l'idée que leur comportement pourrait également être dicté par des facteurs environnementaux. Dans les zones neurogéniques adultes de la SVZ et de la SGL les cellules souches/progénitrices se retrouvent souvent à proximité de vaisseaux sanguins. Cette étroite association autorise à penser que les cellules progénitrices et les cellules endothéliales pourraient communiquer. Des travaux ont mis en évidence que les comportements de ces deux types cellulaires étaient liés (Li and Neaves, 2006; Li et al., 2006; Louissaint et al., 2002; Palmer et al., 2000; Wurmser et al., 2004) et que des facteurs sécrétés par les cellules endothéliales peuvent influencer l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches/progénitrices neurales (Shen et al., 2004). Dans les glioblastomes humains la sous-population de « *cancer stem cells* » identifiée par l'expression d'*iqgap1* a également été observée à proximité de vaisseaux et engainée dans des cellules astrocytaires (article 2, figures 4B et 5). Les cellules souches/progénitrices tumorales semblent donc recréer l'organisation cellulaire des niches dans lesquelles les cellules souches normales résident physiologiquement (Li and Neaves, 2006). Les niches physiologiques et tumorales font intervenir les mêmes composantes cellulaires. Si dans un contexte physiologique, l'influence de facteurs environnementaux commencent à être élucidée au niveau de la régulation du comportement des cellules souches/progénitrices normales, en revanche on ne connaît rien des interactions cellulaires et moléculaires que développent les « *cancer stem cells* » pour évoluer au sein de masses tumorales. Pour comprendre la biologie de ces tumeurs agressives et invasives, et pouvoir les traiter efficacement, il est primordial de découvrir comment ces « *cancer stem cells* » sont régulées au sein de ces tumeurs. Le VEGF, un facteur pléiotropique qui a déjà démontré de nombreux rôles dans la biologie des cellules souches/progénitrices neurales (Jin et al., 2002; Schanzer et al., 2004; Zhang et al., 2003) ; article 1), est réputé pour son action angiogénique dans un contexte tumoral. Les vaisseaux angiogéniques sécrètent le VEGF qui pourrait influer sur la balance prolifération/différenciation des « *cancer stem cells* » en les maintenant dans un état prolifératif et indifférencié. Par ailleurs, la seule réinjection de cellules CD133+ dans un environnement sain est capable d'initier et de reformer une tumeur identique à l'originelle, ce qui laisse supposer que ces cellules sont capables de recréer le même environnement que celui dans lequel elles évoluaient en agissant sur les cellules saines. Des données récentes abondent dans ce sens, en révélant notamment

que les cellules CD133+ sont capables de sécréter du VEGF utile à leur dissémination et à l'angiogenèse (Bao et al., 2006). Par conséquent, il serait intéressant de marquer ces cellules pour examiner leur comportement et leur devenir, une fois réimplantées dans un cerveau sain et extrapoler ces phénomènes à ceux s'étant déroulés initialement.

La protéine IQGAP1 est liée fonctionnellement au VEGF pour promouvoir la migration de cellules souches/progénitrices (article 1) et de cellules endothéliales (Yamaoka-Tojo et al., 2004). Le CD133 s'est révélé comme un marqueur de cellules souches/progénitrices neurales humaines mais également de cellules progénitrices de cellules endothéliales. Par conséquent, une action du VEGF sur ces cellules en conditions pathologiques est concevable. La compréhension de la fonction d'IQGAP1 dans ces « *cancer stem cells* » pourrait apporter des avancées considérables dans la connaissance du comportement de ces cellules malignes et dans les approches thérapeutiques anti-cancéreuses. Des expériences préliminaires montrent que les cellules présentes dans les neurosphères cancéreuses, en migrant, expriment IQGAP1 au niveau des « *leading edges* » de ces cellules. De ce fait, il serait judicieux de mettre en place des expériences de siRNA invalidant IQGAP1 *in vitro* et *in vivo* afin d'éclaircir son rôle dans la biologie de ces cellules et d'envisager des approches pharmacologiques ciblant cette protéine pour éviter la dissémination tumorale. La figure 31 représente un des traitements envisageables.

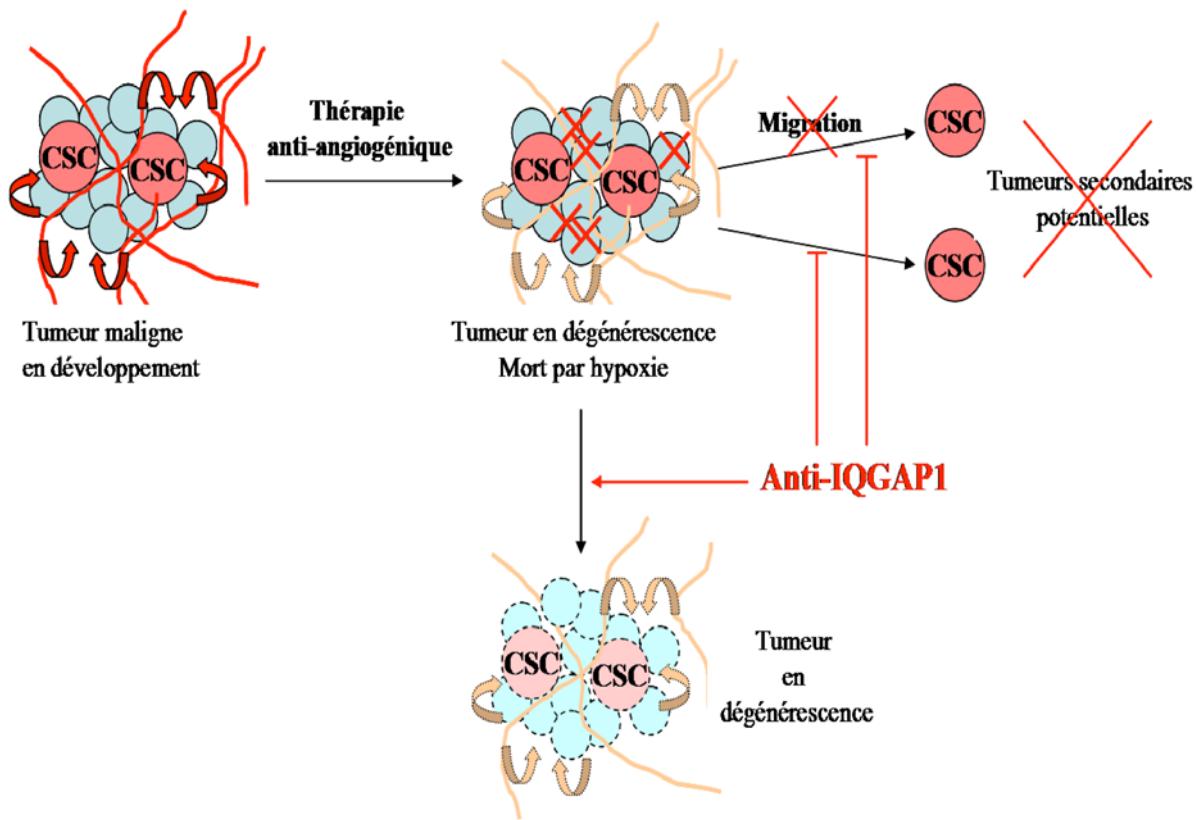


Figure 31 : IQGAP1 ou la thérapie de demain

Dans une tumeur maligne en développement, les vaisseaux angiogéniques sécrètent de nombreux facteurs importants pour le maintien et la croissance tumorale. Une thérapie anti-angiogénique, permettant de bloquer certains de ces facteurs, entraîne la mort de cellules cancéreuses par hypoxie. Cependant, les « *cancer stem cells* » (CSC) présentes dans la masse tumorale, plus résistantes, peuvent migrer dans un environnement plus favorable pour reformer une tumeur. Ce phénomène de récidive est fréquent mais n'est toujours pas élucidé à l'heure actuelle. Comme IQGAP1 est impliquée dans la migration de cellules souches et/ou progénitrices, il est pensable qu'elle puisse jouer la même fonction dans les « *cancer stem cells* » en disséminant ces cellules. Par conséquent, une approche pharmacologique ciblant la protéine IQGAP1 pourrait être un atout pour stopper la dissémination des cellules et éviter les récidives cancéreuses.

CONCLUSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la protéine IQGAP1 dans le cerveau. En tout premier lieu, nous avons étudié la fonction régulatrice putative de la protéine IQGAP1 dans la neurogenèse chez l'adulte puisque les mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent la régulation de ce phénomène sont encore méconnus. La cartographie de l'expression d'*iqgap1* dans le cerveau a mis en évidence que cette protéine est ubiquitaire dans le cerveau du fait de sa présence dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins dans le parenchyme cérébral. La « voie » neurogénique de la SVZ/RMS a particulièrement attiré notre attention, puisque d'une part IQGAP1 se localise *in vitro* aux jonctions intercellulaires dans les neurosphères adultes extraites de la SVZ et d'autre part, *in vivo*, *iqgap1* est exprimé dans les cellules progénitrices neurales de type « C » et les précurseurs neuronaux de type « A » de la SVZ et de la RMS. Afin d'examiner les fonctions de cette protéine dans les progéniteurs neuraux, nous avons comparé les propriétés de ces cellules *in vivo* et *in vitro* dans des souris sauvages et invalidées pour le gène *iqgap1*. Les observations comparatives des propriétés intrinsèques de ces progéniteurs n'ont pas décelé de différences notoires. En revanche, nous avons mis en évidence qu'IQGAP1 intervient dans la voie de signalisation du VEGF, un facteur environnemental connu pour réguler certains processus touchant spécifiquement la biologie des cellules progénitrices neurales, notamment la neurogenèse. La stimulation de neurosphères adultes par le VEGF montre que ce facteur agit sur la migration des cellules progénitrices neurales et sur leur différenciation neuronale. Ces deux réponses couplées sont retardées dans les neurosphères issues d'animaux mutants. Des études complémentaires sur des neurosphères dissociées stimulées par le VEGF montrent qu'IQGAP1 n'intervient pas dans la différenciation neuronale induite. IQGAP1 est clairement impliquée dans le phénomène migratoire induit par le VEGF, ce qui se répercute sur la différenciation neuronale. Ces résultats sont en accord avec le phénotype observé chez les animaux *iqgap1*-/- où un défaut de migration des cellules progénitrices neurales dans la SVZ et le long de la RMS est constaté et se traduit par un retard dans leur différenciation neuronale. Par la suite, nous avons disséqué les mécanismes moléculaires sous-jacents en observant la formation d'un complexe entre les protéines Rac, Cdc42, IQGAP1 et Lis1 suite à la stimulation des neurosphères par le VEGF. Ce complexe est connu pour également intervenir dans la motilité de précurseurs neuraux du cervelet (Kholmanskikh et al., 2006). Enfin, pour la première fois, nous avons mis en évidence que les astrocytes présents dans la SVZ et le long de la RMS sont une source

endogène de VEGF. Les perspectives de ce projet seront d'étudier de façon plus approfondie l'influence et le rôle du VEGF sur la neurogenèse. Est-ce que ce facteur sert uniquement à la migration des progéniteurs neuraux ou est-il également un facteur de spécification neuronale ? Dans ce cas quelles sont ces cibles ? Si l'on bloque la signalisation du VEGF en inhibant directement ce facteur ou indirectement ses récepteurs quelles seront les conséquences sur la neurogenèse adulte *in vitro* et *in vivo* ? Il serait également très judicieux de développer des outils génétiques ciblant le VEGF pour observer son influence *in vivo*. Ces résultats seront capitaux en terme de thérapie cellulaire surtout si le VEGF influence le devenir neuronal des cellules souches et/ou progénitrices. La difficulté actuelle est la genèse de neurones *in vivo* car nous ne connaissons pas de facteur environnemental qui serait capable de différencier les cellules souches et/ou progénitrices en neurones.

L'autre aspect novateur est la mise en évidence, *in vivo*, que seuls les astrocytes présents dans les zones neurogéniques de la SVZ et de la RMS expriment le VEGF. Ce résultat suggère un nouveau rôle pour les astrocytes dans la régulation de la neurogenèse adulte. Nous proposons que ces astrocytes, par l'expression du VEGF, fournissent un nouveau facteur environnemental capable de promouvoir le guidage et la spécification neuronale des cellules progénitrices neurales. Cependant, il reste à déterminer si ce sont de réelles sécrétions astrocytaires qui sont en jeu où si ces cellules sont capables de capturer le VEGF provenant d'ailleurs comme cela a déjà été démontré pour le neurotransmetteur GABA (Bolteus and Bordey, 2004). Le plus simple serait de mettre en culture les astrocytes de la SVZ adulte et d'identifier les facteurs sécrétés dans le milieu de culture. Des preuves apportées par des expériences de co-cultures entre astrocytes et cellules souches abondent dans le sens de sécrétions favorisant la neurogenèse (Lim and Alvarez-Buylla, 1999; Ma et al., 2005; Song et al., 2002). Ces données permettraient d'affiner nos connaissances sur le contrôle environnemental de cellules souches et/ou progénitrices au cours de la neurogenèse. La compréhension de ces mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation du comportement et du devenir des cellules souches et/ou progénitrices adultes sont indispensables si l'on désire, dans le futur, utiliser ces cellules dans le cadre de thérapies régénératives.

En parallèle, nous avons étudié l'implication de ces cellules souches/progénitrices dans l'étiologie des tumeurs cérébrales en caractérisant la protéine IQGAP1 dans des cas pathologiques de gliomes de rat et humains. Dans un premier temps, nous avons confirmé par sa co-localisation avec le marqueur nestine qu'IQGAP1 est un nouveau marqueur de cellules progénitrices neurales dans le cerveau de rat adulte. Dans notre modèle de gliomes induits

chez le rat, ces deux marqueurs identifient une population de cellules tumorales hautement proliférante uniquement dans les tumeurs présentant des aspects malins.

Chez l'homme, IQGAP1 et la nestine permettent de discriminer également les glioblastomes humains des oligodendrogiomes et de caractériser une population de cellules progénitrices tumorales se localisant à proximité de vaisseaux sanguins et engainée dans des cellules astrocytaires. La genèse de neurosphères cancéreuses à partir de glioblastomes humains confirme qu'*iqgap1* s'exprime dans une population tumorale qui présente les mêmes caractéristiques antigéniques, d'auto-renouvellement et de multipotence que les cellules souches et/ou progénitrices normales. Cette population a ensuite été isolée de glioblastomes humains à l'aide d'un tri cellulaire utilisant le CD133, marqueur spécifique de cellules souches neurales humaines, puis réimplantée dans le cortex de souris NOD/SCID immunodéprimées. Après quelques semaines, une tumeur s'est développée au point d'injection des cellules au sein de laquelle IQGAP1 est fortement exprimée et co-localise avec le marqueur CD133. L'identification et la caractérisation de ces cellules tumorigènes apparaissent essentielles à la compréhension de leur comportement au sein d'une masse tumorale donnée et à la mise en place de stratégies thérapeutiques capables de les cibler et de les éliminer. Dans la première étude, nous avons mis en évidence que la protéine IQGAP1 joue un rôle modulateur dans la migration des cellules progénitrices neurales, elle pourrait par conséquent jouer un rôle similaire au sein de tumeurs malignes pour disséminer les cellules progénitrices tumorales.

En outre, l'observation de glioblastomes humains démontre que les « *cancer stem cells* » exprimant IQGAP1 recréent une niche physiologique de cellules souches/progénitrices normales en étant proches de vaisseaux sanguins angiogéniques et entourées de cellules astrocytaires. Par conséquent, la connaissance de tous les mécanismes environnementaux régulant la motilité et la migration des progéniteurs neuraux normaux pourrait s'avérer utile pour la compréhension des mécanismes d'invasion tumorale. En effet, les vaisseaux angiogéniques sécrètent du VEGF à proximité de cellules exprimant IQGAP1 dont nous avons vu l'implication dans la migration des cellules progénitrices neurales. Deux processus peuvent ainsi être envisagés :

- 1- Le VEGF sécrété attire les cellules progénitrices tumorales au niveau des vaisseaux afin qu'elles soient alimentées par un certain nombre de facteurs permettant leur survie, le maintien de leur état prolifératif et indifférencié.
- 2- Le VEGF sécrété permet la dissémination et l'expansion tumorale en favorisant l'invasion de ces cellules dans le parenchyme cérébral.

De ce fait, IQGAP1 apparaît comme une nouvelle cible thérapeutique pour bloquer l'expansion tumorale et la dissémination de cellules en complément d'un traitement anti-cancéreux (figure 31) ayant pour but d'en améliorer l'efficacité.

Des études complémentaires sur la nature et le comportement de ces cellules tumorigènes sont nécessaires pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans l'étiologie des tumeurs cérébrales. De cette façon, nous aboutirons à éclaircir la biologie de ces tumeurs malignes et à mieux les traiter. Les suites du projet consisteront à générer des siRNA ciblant IQGAP1 afin d'examiner ses fonctions *in vitro* et *in vivo* dans la biologie de ces cellules malignes. Une autre approche serait de mettre au point un protocole de cancérogenèse cérébrale chez la souris et d'observer si dans les animaux *iqgap1-/-*, la genèse tumorale est possible.

En conclusion, les éléments cellulaires et moléculaires régulant intrinsèquement et extrinsèquement le comportement et le devenir des cellules souches et/ou progénitrices pourront être bénéfiques sur le plan médical dans le cadre de médecine régénérative et de thérapies anti-cancéreuses. Dans ces deux domaines, nous avons démontré que la protéine IQGAP1 possède un grand potentiel.

REFERENCES

Références

- Aberg, M.A., N.D. Aberg, H. Hedbäcker, J. Oscarsson, and P.S. Eriksson. 2000. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 20:2896-903.
- Aberg, M.A., N.D. Aberg, T.D. Palmer, A.M. Alborn, C. Carlsson-Skwirut, P. Bang, L.E. Rosengren, T. Olsson, F.H. Gage, and P.S. Eriksson. 2003. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 24:23-40.
- Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J.* 16:3797-804.
- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12):3655-63.
- Adachi, H., Y. Takahashi, T. Hasebe, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and K. Sutoh. 1997. Dictyostelium IQGAP-related protein specifically involved in the completion of cytokinesis. *J Cell Biol.* 137:891-8.
- Adams, C.L., and W.J. Nelson. 1998. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 10:572-7.
- Ahn, S., and A.L. Joyner. 2005. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature.* 437:894-7.
- Al-Hajj, M., M.W. Becker, M. Wicha, I. Weissman, and M.F. Clarke. 2004. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 14:43-7.
- Al-Hajj, M., and M.F. Clarke. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene.* 23:7274-82.
- Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3983-8.
- Alexander, K.A., B.T. Wakim, G.S. Doyle, K.A. Walsh, and D.R. Storm. 1988. Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin-binding protein. *J Biol Chem.* 263:7544-9.
- Allen, E. 1912. The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp. Neurol.* 22:547-568.
- Allison, D.W., V.I. Gelfand, I. Spector, and A.M. Craig. 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci.* 18:2423-36.
- Almqvist, P.M., R. Mah, U. Lendahl, B. Jacobsson, and G. Hendson. 2002. Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors. *J Histochem Cytochem.* 50:147-58.
- Altman, J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science.* 135:1127-8.
- Altman, J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec.* 145:573-91.
- Altman, J. 1966. Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol.* 16:263-78.
- Altman, J. 1969a. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol.* 136:269-93.

- Altman, J. 1969b. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 137:433-57.
- Altman, J., and G.D. Das. 1965a. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124:319-35.
- Altman, J., and G.D. Das. 1965b. Post-natal origin of microneurones in the rat brain. *Nature.* 207:953-6.
- Altman, J., and G.D. Das. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.* 126:337-89.
- Alvarez-Buylla, A., and J.M. Garcia-Verdugo. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 22:629-34.
- Alvarez-Buylla, A., D.G. Herrera, and H. Wichterle. 2000. The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. *Prog Brain Res.* 127:1-11.
- Alvarez-Buylla, A., and D.A. Lim. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 41:683-6.
- Alvarez-Buylla, A., B. Seri, and F. Doetsch. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull.* 57:751-8.
- Anderson, M.F., M.A. Aberg, M. Nilsson, and P.S. Eriksson. 2002. Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 134:115-22.
- Anlar, B., K.A. Sullivan, and E.L. Feldman. 1999. Insulin-like growth factor-I and central nervous system development. *Horm Metab Res.* 31:120-5.
- Anton, E.S., H.T. Ghashghaei, J.L. Weber, C. McCann, T.M. Fischer, I.D. Cheung, M. Gassmann, A. Messing, R. Klein, M.H. Schwab, K.C. Lloyd, and C. Lai. 2004. Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci.* 7:1319-28.
- Anton, E.S., M.A. Marchionni, K.F. Lee, and P. Rakic. 1997. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development.* 124:3501-10.
- Arsenijevic, Y., and S. Weiss. 1998. Insulin-like growth factor-I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 18:2118-28.
- Arsenijevic, Y., S. Weiss, B. Schneider, and P. Aebischer. 2001. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J Neurosci.* 21:7194-202.
- Ayme-Southgate, A., P. Lasko, C. French, and M.L. Pardue. 1989. Characterization of the gene for mp20: a *Drosophila* muscle protein that is not found in asynchronous oscillatory flight muscle. *J Cell Biol.* 108:521-31.
- Balenci, L., I.D. Clarke, P.B. Dirks, N. Assard, F. Ducray, A. Jouvet, M.F. Belin, J. Honnorat, and J. Baudier. 2006. IQGAP1 protein specifies amplifying cancer cells in glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* 66:9074-82.
- Bao, S., Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, A.B. Hjelmeland, Q. Shi, R.E. McLendon, D.D. Bigner, and J.N. Rich. 2006. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res.* 66:7843-8.

- Bao, Z.Z., and C.L. Cepko. 1997. The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *J Neurosci.* 17:1425-34.
- Barnea, A., and F. Nottebohm. 1994. Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:11217-21.
- Barth, A.I., K.A. Siemers, and W.J. Nelson. 2002. Dissecting interactions between EB1, microtubules and APC in cortical clusters at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 115:1583-90.
- Bashour, A.M., A.T. Fullerton, M.J. Hart, and G.S. Bloom. 1997. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *J Cell Biol.* 137:1555-66.
- Bazenet, C.E., M.A. Mota, and L.L. Rubin. 1998. The small GTP-binding protein Cdc42 is required for nerve growth factor withdrawal-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:3984-9.
- Behrens, J., J.P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, and W. Birchmeier. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 382:638-42.
- Berger, F., E. Gay, L. Pelletier, P. Tropel, and D. Wion. 2004. Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet Oncol.* 5:511-4.
- Bergers, G., S. Song, N. Meyer-Morse, E. Bergsland, and D. Hanahan. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest.* 111:1287-95.
- Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman. 2000a. Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science.* 287:1604-5.
- Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman. 2000b. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21.
- Bertrand, N., D.S. Castro, and F. Guillemot. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 3:517-30.
- Bigner, S.H., M.R. Matthews, B.K. Rasheed, R.N. Wiltshire, H.S. Friedman, A.H. Friedman, T.T. Stenzel, D.M. Dawes, R.E. McLendon, and D.D. Bigner. 1999a. Molecular genetic aspects of oligodendroglomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* 155:375-86.
- Bigner, S.H., B.K. Rasheed, R. Wiltshire, and R.E. McLendon. 1999b. Morphologic and molecular genetic aspects of oligodendroglial neoplasms. *Neuro-oncol.* 1:52-60.
- Bissell, M.J., and M.A. Labarge. 2005. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell.* 7:17-23.
- Blagoev, B., I. Kratchmarova, S.E. Ong, M. Nielsen, L.J. Foster, and M. Mann. 2003. A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotechnol.* 21:315-8.
- Bolteus, A.J., and A. Bordey. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci.* 24:7623-31.
- Bonnet, D., and J.E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 3:730-7.
- Bork, P., and M. Sudol. 1994. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci.* 19:531-3.
- Bourguignon, L.Y., E. Gilad, K. Rothman, and K. Peyrollier. 2005. Hyaluronan-CD44 interaction with IQGAP1 promotes Cdc42 and ERK signaling, leading to actin binding, Elk-1/estrogen receptor transcriptional activation, and ovarian cancer progression. *J Biol Chem.* 280:11961-72.

- Braga, V.M., L.M. Machesky, A. Hall, and N.A. Hotchin. 1997. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 137:1421-31.
- Brat, D.J., W.F. Seiferheld, A. Perry, E.H. Hammond, K.J. Murray, A.R. Schulsinger, M.P. Mehta, and W.J. Curran. 2004. Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials. *Neuro-oncol.* 6:96-103.
- Bretscher, A. 1981. Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:6849-53.
- Briggs M.W., S.D.B. 2003. IQGAP1 as a signal integrator: Ca²⁺, calmodulin, cdc42 and cytoskeleton. *FEBS Lett.*:7-11.
- Briggs, M.W., Z. Li, and D.B. Sacks. 2002. IQGAP1-mediated stimulation of transcriptional co-activation by beta-catenin is modulated by calmodulin. *J Biol Chem.* 277:7453-65.
- Briggs, M.W., and D.B. Sacks. 2003. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* 4:571-4.
- Brill, S., S. Li, C.W. Lyman, D.M. Church, J.J. Wasmuth, L. Weissbach, A. Bernards, and A.J. Snijders. 1996. The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol Cell Biol.* 16:4869-78.
- Bronner-Fraser, M. 1993. Mechanisms of neural crest cell migration. *Bioessays.* 15:221-30.
- Brown, M.D., and D.B. Sacks. 2006. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol.* 16:242-9.
- Brownbridge, G.G., P.N. Lowe, K.J. Moore, R.H. Skinner, and M.R. Webb. 1993. Interaction of GTPase activating proteins (GAPs) with p21ras measured by a novel fluorescence anisotropy method. Essential role of Arg-903 of GAP in activation of GTP hydrolysis on p21ras. *J Biol Chem.* 268:10914-9.
- Bruce, W.R., and H. Van Der Gaag. 1963. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature.* 199:79-80.
- Bruses, J.L., and U. Rutishauser. 1998. Regulation of neural cell adhesion molecule polysialylation: evidence for nontranscriptional control and sensitivity to an intracellular pool of calcium. *J Cell Biol.* 140:1177-86.
- Bruses, J.L., and U. Rutishauser. 2001. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie.* 83:635-43.
- Brustle, O., and R.D. McKay. 1995. The neuroepithelial stem cell concept: implications for neuro-oncology. *J Neurooncol.* 24:57-9.
- Bullions, L.C., and A.J. Levine. 1998. The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr Opin Oncol.* 10:81-7.
- Burd, G.D., and F. Nottebohm. 1985. Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *J Comp Neurol.* 240:143-52.
- Cabrera, C.V., and M.C. Alonso. 1991. Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of Drosophila. *Embo J.* 10:2965-73.
- Cameron, H.A., and R.D. McKay. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 435:406-17.

- Cameron, H.A., C.S. Woolley, B.S. McEwen, and E. Gould. 1993. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*. 56:337-44.
- Cao, L., X. Jiao, D.S. Zuzga, Y. Liu, D.M. Fong, D. Young, and M.J. During. 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet*. 36:827-35.
- Carmeliet, P. 2003a. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 9:653-60.
- Carmeliet, P. 2003b. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet*. 4:710-20.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 438:932-6.
- Carmeliet, P., and M. Tessier-Lavigne. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature*. 436:193-200.
- Carson, M.J., R.R. Behringer, R.L. Brinster, and F.A. McMorris. 1993. Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron*. 10:729-40.
- Castella, P., J.A. Wagner, and M. Caudy. 1999. Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1. *J Neurosci Res*. 56:229-40.
- Cau, E., G. Gradwohl, S. Casarosa, R. Kageyama, and F. Guillemot. 2000. Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development*. 127:2323-32.
- Cayre, M., M. Bancila, I. Virard, A. Borges, and P. Durbec. 2006. Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*. 31:748-58.
- Cerione, R.A., and Y. Zheng. 1996. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*. 8:216-22.
- Chambers, C.B., Y. Peng, H. Nguyen, N. Gaiano, G. Fishell, and J.S. Nye. 2001. Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development*. 128:689-702.
- Chan, A.Y., S. Raft, M. Bailly, J.B. Wyckoff, J.E. Segall, and J.S. Condeelis. 1998. EGF stimulates an increase in actin nucleation and filament number at the leading edge of the lamellipod in mammary adenocarcinoma cells. *J Cell Sci*. 111 (Pt 2):199-211.
- Chan, D.C., M.T. Bedford, and P. Leder. 1996. Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *Embo J*. 15:1045-54.
- Charles, P., M.P. Hernandez, B. Stankoff, M.S. Aigrot, C. Colin, G. Rougon, B. Zalc, and C. Lubetzki. 2000. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:7585-90.
- Charles, P., R. Reynolds, D. Seilhean, G. Rougon, M.S. Aigrot, A. Niezgoda, B. Zalc, and C. Lubetzki. 2002. Re-expression of PSA-NCAM by demyelinated axons: an inhibitor of remyelination in multiple sclerosis? *Brain*. 125:1972-9.
- Chazal, G., P. Durbec, A. Jankovski, G. Rougon, and H. Cremer. 2000. Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci*. 20:1446-57.
- Chen, H., A. Thiagalingam, H. Chopra, M.W. Borges, J.N. Feder, B.D. Nelkin, S.B. Baylin, and D.W. Ball. 1997. Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly

- represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5355-60.
- Chen, H.I., and M. Sudol. 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7819-23.
- Cheney, R.E., and M.S. Mooseker. 1992. Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol.* 4:27-35.
- Cheney, R.E., M.K. O'Shea, J.E. Heuser, M.V. Coelho, J.S. Wolenski, E.M. Espreafico, P. Forscher, R.E. Larson, and M.S. Mooseker. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell.* 75:13-23.
- Chenn, A., and C.A. Walsh. 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science.* 297:365-9.
- Christie, B.R., and H.A. Cameron. 2006. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus.* 16:199-207.
- Chuang, T.H., K.M. Hahn, J.D. Lee, D.E. Danley, and G.M. Bokoch. 1997. The small GTPase Cdc42 initiates an apoptotic signaling pathway in Jurkat T lymphocytes. *Mol Biol Cell.* 8:1687-98.
- Clarke, M.F. 2004. Neurobiology: at the root of brain cancer. *Nature.* 432:281-2.
- Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl. 2006. Cancer Stem Cells--Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 66:9339-44.
- Cohnheim, V. 1875. Congenitales, quergestreiftes muskelsarkom der nieren. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 64:69.
- Conover, J.C., and R.L. Allen. 2002. The subventricular zone: new molecular and cellular developments. *Cell Mol Life Sci.* 59:2128-35.
- Conover, J.C., F. Doetsch, J.M. Garcia-Verdugo, N.W. Gale, G.D. Yancopoulos, and A. Alvarez-Buylla. 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci.* 3:1091-7.
- Cozzio, A., E. Passegue, P.M. Ayton, H. Karsunky, M.L. Cleary, and I.L. Weissman. 2003. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev.* 17:3029-35.
- Craig, C.G., V. Tropepe, C.M. Morshead, B.A. Reynolds, S. Weiss, and D. van der Kooy. 1996. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci.* 16:2649-58.
- Cremer, H., R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer, S. Scheff, and et al. 1994. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature.* 367:455-9.
- Cross, M.J., J. Dixelius, T. Matsumoto, and L. Claesson-Welsh. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 28:488-94.
- D'Ercole, A.J. 1993. Expression of insulin-like growth factor-I in transgenic mice. *Ann N Y Acad Sci.* 692:149-60.
- D'Ercole, A.J. 1996. Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 25:573-90.
- D'Ercole, A.J., P. Ye, A.S. Calikoglu, and G. Gutierrez-Ospina. 1996a. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol.* 13:227-55.

- D'Ercole, A.J., P. Ye, and G. Gutierrez-Ospina. 1996b. Use of transgenic mice for understanding the physiology of insulin-like growth factors. *Horm Res.* 45 Suppl 1:5-7.
- Dahlstrand, J., V.P. Collins, and U. Lendahl. 1992. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 52:5334-41.
- Dalerba, P., R.W. Cho, and M.F. Clarke. 2006. Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annu Rev Med.*
- Davies, A.M. 2000. Neurotrophins: more to NGF than just survival. *Curr Biol.* 10:R374-6.
- Dawson, N.S., D.C. Zawieja, M.H. Wu, and H.J. Granger. 2006. Signaling pathways mediating VEGF165-induced calcium transients and membrane depolarization in human endothelial cells. *Faseb J.* 20:991-3.
- Deisseroth, K., S. Singla, H. Toda, M. Monje, T.D. Palmer, and R.C. Malenka. 2004. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron.* 42:535-52.
- Dentremont, K.D., P. Ye, A.J. D'Ercole, and J.R. O'Kusky. 1999. Increased insulin-like growth factor-I (IGF-I) expression during early postnatal development differentially increases neuron number and growth in medullary nuclei of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 114:135-41.
- Diamantopoulos, G.S., F. Perez, H.V. Goodson, G. Batelier, R. Melki, T.E. Kreis, and J.E. Rickard. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J Cell Biol.* 144:99-112.
- DiCicco-Bloom, E., and I.B. Black. 1988. Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:4066-70.
- Dickinson, M.E., R. Krumlauf, and A.P. McMahon. 1994. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development.* 120:1453-71.
- Doetsch, F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 13:543-50.
- Doetsch, F., and A. Alvarez-Buylla. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:14895-900.
- Doetsch, F., I. Caille, D.A. Lim, J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1999a. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 97:703-16.
- Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17:5046-61.
- Doetsch, F., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1999b. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11619-24.
- Doetsch, F., L. Petreanu, I. Caille, J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron.* 36:1021-34.
- Doetsch, F., and C. Scharff. 2001. Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav Evol.* 58:306-22.
- Dolmetsch, R.E., R.S. Lewis, C.C. Goodnow, and J.I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 386:855-8.

- Dong, Z., J.S. Pang, M.H. Ng, W.S. Poon, L. Zhou, and H.K. Ng. 2004. Identification of two contiguous minimally deleted regions on chromosome 1p36.31-p36.32 in oligodendroglial tumours. *Br J Cancer*. 91:1105-11.
- Donnenberg, V.S., and A.D. Donnenberg. 2005. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*. 45:872-7.
- Dontu, G., M. Al-Hajj, W.M. Abdallah, M.F. Clarke, and M.S. Wicha. 2003. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 36 Suppl 1:59-72.
- Dore, S., S. Bastianetto, S. Kar, and R. Quirion. 1999a. Protective and rescuing abilities of IGF-I and some putative free radical scavengers against beta-amyloid-inducing toxicity in neurons. *Ann N Y Acad Sci*. 890:356-64.
- Dore, S., S. Kar, J.G. Chabot, and R. Quirion. 1999b. Impact of neonatal kainate treatment on hippocampal insulin-like growth factor receptors. *Neuroscience*. 91:1035-43.
- Dorsky, R.I., D.H. Rapaport, and W.A. Harris. 1995. Xotch inhibits cell differentiation in the Xenopus retina. *Neuron*. 14:487-96.
- Downward, J. 2001. The ins and outs of signalling. *Nature*. 411:759-62.
- Drago, J., M. Murphy, S.M. Carroll, R.P. Harvey, and P.F. Bartlett. 1991. Fibroblast growth factor-mediated proliferation of central nervous system precursors depends on endogenous production of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:2199-203.
- Durbec, P., and H. Cremer. 2001. Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Mol Neurobiol*. 24:53-64.
- Eichmann, A., F. Le Noble, M. Autiero, and P. Carmeliet. 2005. Guidance of vascular and neural network formation. *Curr Opin Neurobiol*. 15:108-15.
- Emsley, J.G., and T. Hagg. 2003. alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol*. 183:273-85.
- Emsley, J.G., B.D. Mitchell, G. Kempermann, and J.D. Macklis. 2005. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol*. 75:321-41.
- Eng, K., N.I. Naqvi, K.C. Wong, and M.K. Balasubramanian. 1998. Rng2p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the actomyosin ring and the spindle pole body. *Curr Biol*. 8:611-21.
- Epp, J.A., and J. Chant. 1997. An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. *Curr Biol*. 7:921-9.
- Erickson, J.W., R.A. Cerione, and M.J. Hart. 1997. Identification of an actin cytoskeletal complex that includes IQGAP and the Cdc42 GTPase. *J Biol Chem*. 272:24443-7.
- Eriksson, P.S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A.M. Alborn, C. Nordborg, D.A. Peterson, and F.H. Gage. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 4:1313-7.
- Etienne-Manneville, S. 2003. [Conservative molecular mechanisms controlling cell polarity]. *Med Sci (Paris)*. 19:1063-5.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*. 106:489-98.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-35.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*. 421:753-6.
- Faix, J., C. Clougherty, A. Konzok, U. Mintert, J. Murphy, R. Albrecht, B. Muhlbauer, and J. Kuhlmann. 1998. The IQGAP-related protein DGAP1 interacts with Rac

- and is involved in the modulation of the F-actin cytoskeleton and control of cell motility. *J Cell Sci.* 111 (Pt 20):3059-71.
- Faix, J., and W. Dittrich. 1996. DGAP1, a homologue of rasGTPase activating proteins that controls growth, cytokinesis, and development in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 394:251-7.
- Fallon, J., S. Reid, R. Kinyamu, I. Opole, R. Opole, J. Baratta, M. Korc, T.L. Endo, A. Duong, G. Nguyen, M. Karkehabadhi, D. Twardzik, S. Patel, and S. Loughlin. 2000. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:14686-91.
- Fallon, K.B., C.A. Palmer, K.A. Roth, L.B. Nabors, W. Wang, M. Carpenter, R. Banerjee, P. Forsyth, K. Rich, and A. Perry. 2004. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogiomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63:314-22.
- Filippov, V., G. Kronenberg, T. Pivneva, K. Reuter, B. Steiner, L.P. Wang, M. Yamaguchi, H. Kettenmann, and G. Kempermann. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 23:373-82.
- Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285:1182-6.
- Franceschini, I., S. Vitry, F. Padilla, P. Casanova, T.N. Tham, M. Fukuda, G. Rougon, P. Durbec, and M. Dubois-Dalcq. 2004. Migrating and myelinating potential of neural precursors engineered to overexpress PSA-NCAM. *Mol Cell Neurosci.* 27:151-62.
- Freije, W.A., F.E. Castro-Vargas, Z. Fang, S. Horvath, T. Cloughesy, L.M. Liau, P.S. Mischel, and S.F. Nelson. 2004. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res.* 64:6503-10.
- Fukata, M., and K. Kaibuchi. 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:887-97.
- Fukata, M., S. Kuroda, K. Fujii, T. Nakamura, I. Shoji, Y. Matsuura, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1997. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J Biol Chem.* 272:29579-83.
- Fukata, M., S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itoh, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1999a. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem.* 274:26044-50.
- Fukata, M., M. Nakagawa, and K. Kaibuchi. 2003. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol.* 15:590-7.
- Fukata, M., M. Nakagawa, S. Kuroda, and K. Kaibuchi. 1999b. Cell adhesion and Rho small GTPases. *J Cell Sci.* 112 (Pt 24):4491-500.
- Fukata, M., M. Nakagawa, S. Kuroda, and K. Kaibuchi. 2002a. Effects of Rho family GTPases on cell-cell adhesion. *Methods Mol Biol.* 189:121-8.
- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002b. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell.* 109:873-85.
- Fuller, C.E., and A. Perry. 2005. Molecular diagnostics in central nervous system tumors. *Adv Anat Pathol.* 12:180-94.
- Fuller, G.N., K.R. Hess, C.H. Rhee, W.K. Yung, R.A. Sawaya, J.M. Bruner, and W. Zhang. 2002. Molecular classification of human diffuse gliomas by

- multidimensional scaling analysis of gene expression profiles parallels morphology-based classification, correlates with survival, and reveals clinically-relevant novel glioma subsets. *Brain Pathol.* 12:108-16.
- Gage, F.H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science.* 287:1433-8.
- Gage, F.H., G. Kempermann, T.D. Palmer, D.A. Peterson, and J. Ray. 1998. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol.* 36:249-66.
- Gage, F.H., J. Ray, and L.J. Fisher. 1995. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 18:159-92.
- Gaiano, N., J.S. Nye, and G. Fishell. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron.* 26:395-404.
- Galileo, D.S., J. Majors, A.F. Horwitz, and J.R. Sanes. 1992. Retrovirally introduced antisense integrin RNA inhibits neuroblast migration in vivo. *Neuron.* 9:1117-31.
- Gallagher, H.C., K.J. Murphy, A.G. Foley, and C.M. Regan. 2001. Protein kinase C delta regulates neural cell adhesion molecule polysialylation state in the rat brain. *J Neurochem.* 77:425-34.
- Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco, and A. Vescovi. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 64:7011-21.
- Galvan, V., D.A. Greenberg, and K. Jin. 2006. The role of vascular endothelial growth factor in neurogenesis in adult brain. *Mini Rev Med Chem.* 6:667-9.
- Garber, K. 2002. Angiogenesis inhibitors suffer new setback. *Nat Biotechnol.* 20:1067-8.
- Garcia-Verdugo, J.M., F. Doetsch, H. Wichterle, D.A. Lim, and A. Alvarez-Buylla. 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol.* 36:234-48.
- Garcia-Verdugo, J.M., S. Ferron, N. Flames, L. Collado, E. Desfilis, and E. Font. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull.* 57:765-75.
- Garcia-Verdugo, J.M., S. Llahi, I. Ferrer, and C. Lopez-Garcia. 1989. Postnatal neurogenesis in the olfactory bulbs of a lizard. A tritiated thymidine autoradiographic study. *Neurosci Lett.* 98:247-52.
- Garcia, A.D., N.B. Doan, T. Imura, T.G. Bush, and M.V. Sofroniew. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 7:1233-41.
- Ghashghaei, H.T., J. Weber, L. Pevny, R. Schmid, M.H. Schwab, K.C. Lloyd, D.D. Eisenstat, C. Lai, and E.S. Anton. 2006. The role of neuregulin-ErbB4 interactions on the proliferation and organization of cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:1930-5.
- Goings, G.E., V. Sahni, and F.G. Szele. 2004. Migration patterns of subventricular zone cells in adult mice change after cerebral cortex injury. *Brain Res.* 996:213-26.
- Goldman, S.A., and F. Nottebohm. 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:2390-4.
- Goode, B.L., D.G. Drubin, and G. Barnes. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* 12:63-71.
- Gorlin, J.B., R. Yamin, S. Egan, M. Stewart, T.P. Stossel, D.J. Kwiatkowski, and J.H. Hartwig. 1990. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J Cell Biol.* 111:1089-105.
- Gottesman, M.M. 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med.* 53:615-27.

- Gottesman, M.M., T. Fojo, and S.E. Bates. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2:48-58.
- Gottlieb, D.I. 2002. Large-scale sources of neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 25:381-407.
- Gotz, M. 2003. Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist.* 9:379-97.
- Gotz, M., E. Hartfuss, and P. Malatesta. 2002. Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull.* 57:777-88.
- Gould, E., A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves, and T.J. Shors. 1999a. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* 2:260-5.
- Gould, E., B.S. McEwen, P. Tanapat, L.A. Galea, and E. Fuchs. 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 17:2492-8.
- Gould, E., A.J. Reeves, M. Fallah, P. Tanapat, C.G. Gross, and E. Fuchs. 1999b. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:5263-7.
- Gould, E., P. Tanapat, N.B. Hastings, and T.J. Shors. 1999c. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci.* 3:186-192.
- Gratzner, H.G. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 218:474-5.
- Gregg, C., and S. Weiss. 2003. Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 23:11587-601.
- Gritti, A., L. Bonfanti, F. Doetsch, I. Caille, A. Alvarez-Buylla, D.A. Lim, R. Galli, J.M. Verdugo, D.G. Herrera, and A.L. Vescovi. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci.* 22:437-45.
- Gritti, A., P. Frolichsthal-Schoeller, R. Galli, E.A. Parati, L. Cova, S.F. Pagano, C.R. Bjornson, and A.L. Vescovi. 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci.* 19:3287-97.
- Gritti, A., E.A. Parati, L. Cova, P. Frolichsthal, R. Galli, E. Wanke, L. Faravelli, D.J. Morassutti, F. Roisen, D.D. Nickel, and A.L. Vescovi. 1996. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci.* 16:1091-100.
- Gross, R.E., M.F. Mehler, P.C. Mabie, Z. Zang, L. Santschi, and J.A. Kessler. 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron.* 17:595-606.
- Guan, Y., B. Gerhard, and D.E. Hogge. 2003. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 101:3142-9.
- Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84:345-57.
- Gundersen, G.G. 2002. Microtubule capture: IQGAP and CLIP-170 expand the repertoire. *Curr Biol.* 12:R645-7.
- Gundersen, G.G., E.R. Gomes, and Y. Wen. 2004. Cortical control of microtubule stability and polarization. *Curr Opin Cell Biol.* 16:106-12.

- Hack, I., M. Bancila, K. Loulier, P. Carroll, and H. Cremer. 2002. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci.* 5:939-45.
- Hack, M.A., A. Saghatelyan, A. de Chevigny, A. Pfeifer, R. Ashery-Padan, P.M. Lledo, and M. Gotz. 2005. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci.* 8:865-72.
- Hack, M.A., M. Sugimori, C. Lundberg, M. Nakafuku, and M. Gotz. 2004. Regionalization and fate specification in neurospheres: the role of Olig2 and Pax6. *Mol Cell Neurosci.* 25:664-78.
- Hanahan, D., and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86:353-64.
- Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Hart, M.J., M.G. Callow, B. Souza, and P. Polakis. 1996. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *Embo J.* 15:2997-3005.
- Hartwig, J.H., and D.J. Kwiatkowski. 1991. Actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 3:87-97.
- He, T.C., A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 281:1509-12.
- Heins, N., P. Malatesta, F. Cecconi, M. Nakafuku, K.L. Tucker, M.A. Hack, P. Chapouton, Y.A. Barde, and M. Gotz. 2002. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci.* 5:308-15.
- Hemmati, H.D., I. Nakano, J.A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D.H. Geschwind, M. Bronner-Fraser, and H.I. Kornblum. 2003. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15178-83.
- Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman. 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* 81:1159-70.
- Hirabayashi, Y., Y. Itoh, H. Tabata, K. Nakajima, T. Akiyama, N. Masuyama, and Y. Gotoh. 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development.* 131:2791-801.
- Hirschmann-Jax, C., A.E. Foster, G.G. Wulf, M.A. Goodell, and M.K. Brenner. 2005. A distinct "side population" of cells in human tumor cells: implications for tumor biology and therapy. *Cell Cycle.* 4:203-5.
- Hirschmann-Jax, C., A.E. Foster, G.G. Wulf, J.G. Nuchtern, T.W. Jax, U. Gobel, M.A. Goodell, and M.K. Brenner. 2004. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:14228-33.
- Ho, Y.D., J.L. Joyal, Z. Li, and D.B. Sacks. 1999. IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and Cdc42 signaling. *J Biol Chem.* 274:464-70.
- Hoang-Xuan, K., L. Aguirre-Cruz, K. Mokhtari, Y. Marie, and M. Sanson. 2002. OLIG-1 and 2 gene expression and oligodendroglial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 28:89-94.
- Holland, E.C., J. Celestino, C. Dai, L. Schaefer, R.E. Sawaya, and G.N. Fuller. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet.* 25:55-7.
- Holland, E.C., and H.E. Varmus. 1998. Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1218-23.

- Hollmann, M., and S. Heinemann. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 17:31-108.
- Holmberg, J., A. Armulik, K.A. Senti, K. Edoff, K. Spalding, S. Momma, R. Cassidy, J.G. Flanagan, and J. Frisen. 2005. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* 19:462-71.
- Holyoake, T., X. Jiang, C. Eaves, and A. Eaves. 1999. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 94:2056-64.
- Houdusse, A., and C. Cohen. 1995. Target sequence recognition by the calmodulin superfamily: implications from light chain binding to the regulatory domain of scallop myosin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10644-7.
- Hsieh, J., J.B. Aimone, B.K. Kaspar, T. Kuwabara, K. Nakashima, and F.H. Gage. 2004. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J Cell Biol.* 164:111-22.
- Hsu, S.C., J. Galceran, and R. Grosschedl. 1998. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol.* 18:4807-18.
- Hu, H. 1999. Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron.* 23:703-11.
- Hu, H., and U. Rutishauser. 1996. A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron.* 16:933-40.
- Hu, H., H. Tomasiewicz, T. Magnuson, and U. Rutishauser. 1996. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron.* 16:735-43.
- Huang, H., Y. Okamoto, H. Yokoo, F.L. Heppner, A. Vital, M. Fevre-Montange, A. Jouvet, Y. Yonekawa, E.N. Lazaridis, P. Kleihues, and H. Ohgaki. 2004. Gene expression profiling and subgroup identification of oligodendrogiomas. *Oncogene.* 23:6012-22.
- Huelsken, J., and J. Behrens. 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 115:3977-8.
- Huntly, B.J., H. Shigematsu, K. Deguchi, B.H. Lee, S. Mizuno, N. Duclos, R. Rowan, S. Amaral, D. Curley, I.R. Williams, K. Akashi, and D.G. Gilliland. 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell.* 6:587-96.
- Ichimura, K., H. Ohgaki, P. Kleihues, and V.P. Collins. 2004. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol.* 70:137-60.
- Ignatova, T.N., V.G. Kukekov, E.D. Laywell, O.N. Suslov, F.D. Vrionis, and D.A. Steindler. 2002. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia.* 39:193-206.
- Ikeya, M., S.M. Lee, J.E. Johnson, A.P. McMahon, and S. Takada. 1997. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature.* 389:966-70.
- Imura, T., H.I. Kornblum, and M.V. Sofroniew. 2003. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci.* 23:2824-32.
- Irvin, D.K., I. Nakano, A. Paucar, and H.I. Kornblum. 2004. Patterns of Jagged1, Jagged2, Delta-like 1 and Delta-like 3 expression during late embryonic and postnatal brain development suggest multiple functional roles in progenitors and differentiated cells. *J Neurosci Res.* 75:330-43.
- Irvin, D.K., S.D. Zurcher, T. Nguyen, G. Weinmaster, and H.I. Kornblum. 2001. Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional

- roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol.* 436:167-81.
- Jackson, E.L., J.M. Garcia-Verdugo, S. Gil-Perotin, M. Roy, A. Quinones-Hinojosa, S. VandenBerg, and A. Alvarez-Buylla. 2006. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron.* 51:187-99.
- Jacques, T.S., J.B. Relvas, S. Nishimura, R. Pytela, G.M. Edwards, C.H. Streuli, and C. ffrench-Constant. 1998. Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins. *Development.* 125:3167-77.
- Jamieson, C.H., L.E. Ailles, S.J. Dylla, M. Muijtjens, C. Jones, J.L. Zehnder, J. Gotlib, K. Li, M.G. Manz, A. Keating, C.L. Sawyers, and I.L. Weissman. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med.* 351:657-67.
- Jessell, T.M., and J.R. Sanes. 2000. Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol.* 10:599-611.
- Jin, K., Y. Zhu, Y. Sun, X.O. Mao, L. Xie, and D.A. Greenberg. 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11946-50.
- Johansson, C.B., S. Momma, D.L. Clarke, M. Risling, U. Lendahl, and J. Frisen. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 96:25-34.
- Johnson, D.I. 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:54-105.
- Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble. 2006. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 355:1253-61.
- Joyal, J.L., R.S. Annan, Y.D. Ho, M.E. Huddleston, S.A. Carr, M.J. Hart, and D.B. Sacks. 1997. Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J Biol Chem.* 272:15419-25.
- Joyce, J.A. 2005. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 7:513-20.
- Kageyama, R., and T. Ohtsuka. 1999. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res.* 9:179-88.
- Kaplan, M.S., and D.H. Bell. 1983. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Exp Brain Res.* 52:1-5.
- Kaplan, M.S., and D.H. Bell. 1984. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci.* 4:1429-41.
- Kaplan, M.S., and J.W. Hinds. 1977. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* 197:1092-4.
- Kaplan, M.S., N.A. McNelly, and J.W. Hinds. 1985. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 239:117-25.
- Kempermann, G., E.P. Brandon, and F.H. Gage. 1998a. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol.* 8:939-42.
- Kempermann, G., and F.H. Gage. 1999. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus.* 9:321-32.
- Kempermann, G., and F.H. Gage. 2000. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp.* 231:220-35; discussion 235-41, 302-6.

- Kempermann, G., and F.H. Gage. 2002. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci.* 16:129-36.
- Kempermann, G., S. Jessberger, B. Steiner, and G. Kronenberg. 2004a. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 27:447-52.
- Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage. 1997a. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10409-14.
- Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage. 1997b. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 386:493-5.
- Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage. 1998b. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci.* 18:3206-12.
- Kempermann, G., L. Wiskott, and F.H. Gage. 2004b. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 14:186-91.
- Kholmansikh, S.S., H.B. Koeller, A. Wynshaw-Boris, T. Gomez, P.C. Letourneau, and M.E. Ross. 2006. Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nat Neurosci.* 9:50-7.
- Kirschenbaum, B., F. Doetsch, C. Lois, and A. Alvarez-Buylla. 1999. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci.* 19:2171-80.
- Kitange, G.J., J.S. Smith, and R.B. Jenkins. 2001. Genetic alterations and chemotherapeutic response in human diffuse gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* 1:595-605.
- Kleihues, P., and L.H. Sabin. 2000. World Health Organization classification of tumors. *Cancer.* 88:2887.
- Kodama, A., K. Takaishi, K. Nakano, H. Nishioka, and Y. Takai. 1999. Involvement of Cdc42 small G protein in cell-cell adhesion, migration and morphology of MDCK cells. *Oncogene.* 18:3996-4006.
- Kolch, W. 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351 Pt 2:289-305.
- Kondo, M., A.J. Wagers, M.G. Manz, S.S. Prohaska, D.C. Scherer, G.F. Beilhack, J.A. Shizuru, and I.L. Weissman. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol.* 21:759-806.
- Kondo, T. 2006. Brain cancer stem-like cells. *Eur J Cancer.* 42:1237-42.
- Kondo, T., T. Setoguchi, and T. Taga. 2004. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:781-6.
- Koos, W.T., and A. Horaczek. 1985. Statistics of intracranial midline tumors in children. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 35:1-5.
- Koschny, R., T. Koschny, U.G. Froster, W. Krupp, and M.A. Zuber. 2002. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genet Cytogenet.* 135:147-59.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best, and L. Lim. 1995. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 15:1942-52.
- Kriegstein, A.R., and M. Gotz. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia.* 43:37-43.
- Krivtsov, A.V., D. Twomey, Z. Feng, M.C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J.E. Levine, J. Wang, W.C. Hahn, D.G. Gilliland, T.R. Golub, and S.A. Armstrong. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature.* 442:818-22.

- Kroschewski, R., A. Hall, and I. Mellman. 1999. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol.* 1:8-13.
- Kuhn, H.G., J. Winkler, G. Kempermann, L.J. Thal, and F.H. Gage. 1997. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci.* 17:5820-9.
- Kukekov, V.G., E.D. Laywell, O. Suslov, K. Davies, B. Scheffler, L.B. Thomas, T.F. O'Brien, M. Kusakabe, and D.A. Steindler. 1999. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol.* 156:333-44.
- Kuroda, S., M. Fukata, K. Fujii, T. Nakamura, I. Izawa, and K. Kaibuchi. 1997. Regulation of cell-cell adhesion of MDCK cells by Cdc42 and Rac1 small GTPases. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:430-5.
- Kuroda, S., M. Fukata, K. Kobayashi, M. Nakafuku, N. Nomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem.* 271:23363-7.
- Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, K. Fujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, and K. Kaibuchi. 1998. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science.* 281:832-5.
- Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, and K. Kaibuchi. 1999. Cdc42, Rac1, and their effector IQGAP1 as molecular switches for cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 262:1-6.
- Lai, K., B.K. Kaspar, F.H. Gage, and D.V. Schaffer. 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci.* 6:21-7.
- Lantos, P.L. 1986. Development of nitrosourea-induced brain tumours--with a special note on changes occurring during latency. *Food Chem Toxicol.* 24:121-7.
- Lantos, P.L., and D.J. Cox. 1976. The origin of experimental brain tumours: a sequential study. *Experientia.* 32:1467-8.
- Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, and J.E. Dick. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 367:645-8.
- Lardelli, M., R. Williams, T. Mitsiadis, and U. Lendahl. 1996. Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. *Mech Dev.* 59:177-90.
- Law, M.E., K.L. Templeton, G. Kitange, J. Smith, A. Misra, B.G. Feuerstein, and R.B. Jenkins. 2005. Molecular cytogenetic analysis of chromosomes 1 and 19 in glioma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 160:1-14.
- Le Bras, B., M.J. Barallobre, J. Homman-Ludiye, A. Ny, S. Wyns, T. Tammela, P. Haiko, M.J. Karkkainen, L. Yuan, M.P. Muriel, E. Chatzopoulou, C. Breant, B. Zalc, P. Carmeliet, K. Alitalo, A. Eichmann, and J.L. Thomas. 2006. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci.* 9:340-8.
- Learish, R.D., M.D. Bruss, and M. Haak-Frendscho. 2000. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks proliferation of neural progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 122:97-109.
- Lee, S.M., S. Tole, E. Grove, and A.P. McMahon. 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development.* 127:457-67.

- Lesniak, M.A., J.M. Hill, W. Kiess, M. Rojeski, C.B. Pert, and J. Roth. 1988. Receptors for insulin-like growth factors I and II: autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. *Endocrinology*. 123:2089-99.
- Levitt, P., and P. Rakic. 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol*. 193:815-40.
- Lewis, P.F., and M. Emerman. 1994. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol*. 68:510-6.
- Li, L., and W.B. Neaves. 2006. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*. 66:4553-7.
- Li, Q., M.C. Ford, E.B. Lavik, and J.A. Madri. 2006. Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: An in vitro study. *J Neurosci Res*.
- Li, S., Q. Wang, A. Chakladar, R.T. Bronson, and A. Bernards. 2000. Gastric hyperplasia in mice lacking the putative Cdc42 effector IQGAP1. *Mol Cell Biol*. 20:697-701.
- Li, Z., S.H. Kim, J.M. Higgins, M.B. Brenner, and D.B. Sacks. 1999. IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. *J Biol Chem*. 274:37885-92.
- Li, Z., D.E. McNulty, K.J. Marler, L. Lim, C. Hall, R.S. Annan, and D.B. Sacks. 2005. IQGAP1 promotes neurite outgrowth in a phosphorylation-dependent manner. *J Biol Chem*. 280:13871-8.
- Li, Z., and D.B. Sacks. 2003. Elucidation of the interaction of calmodulin with the IQ motifs of IQGAP1. *J Biol Chem*. 278:4347-52.
- Lie, D.C., S.A. Colamarino, H.J. Song, L. Desire, H. Mira, A. Consiglio, E.S. Lein, S. Jessberger, H. Lansford, A.R. Dearie, and F.H. Gage. 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. 437:1370-5.
- Lim, D.A., and A. Alvarez-Buylla. 1999. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:7526-31.
- Lim, D.A., A.D. Tramontin, J.M. Trevejo, D.G. Herrera, J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*. 28:713-26.
- Lindsell, C.E., C.J. Shawber, J. Boulter, and G. Weinmaster. 1995. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell*. 80:909-17.
- Lippincott, J., and R. Li. 1998. Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J Cell Biol*. 140:355-66.
- Liu, G., and Y. Rao. 2003. Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 23:6651-9.
- Lois, C., and A. Alvarez-Buylla. 1993. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2074-7.
- Lois, C., and A. Alvarez-Buylla. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 264:1145-8.
- Lois, C., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science*. 271:978-81.
- Lopez-Garcia, C., A. Molowny, J.M. Garcia-Verdugo, and I. Ferrer. 1988. Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. *Brain Res*. 471:167-74.

- Lopez-Garcia, C., A. Molowny, F.J. Martinez-Guijarro, J.M. Blasco-Ibanez, J.A. Luis de la Iglesia, A. Bernabeu, and J.M. Garcia-Verdugo. 1992. Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. *Histol Histopathol.* 7:725-46.
- Lopez-Garcia, C., P.L. Tineo, and J. Del Corral. 1984. Increase of the neuron number in some cerebral cortical areas of a lizard, *Podarcis hispanica*, (Steind., 1870), during postnatal periods of life. *J Hirnforsch.* 25:255-9.
- Louissaint, A., Jr., S. Rao, C. Leventhal, and S.A. Goldman. 2002. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron.* 34:945-60.
- Loureiro, J., and M. Peifer. 1998. Roles of Armadillo, a *Drosophila* catenin, during central nervous system development. *Curr Biol.* 8:622-32.
- Lowenberg, B., and P. Sonneveld. 1998. Resistance to chemotherapy in acute leukemia. *Curr Opin Oncol.* 10:31-5.
- Lu, Q.R., J.K. Park, E. Noll, J.A. Chan, J. Alberta, D. Yuk, M.G. Alzamora, D.N. Louis, C.D. Stiles, D.H. Rowitch, and P.M. Black. 2001. Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10851-6.
- Luo, L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 1:173-80.
- Luskin, M.B. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* 11:173-89.
- Luzzati, F., P. Peretto, P. Aimar, G. Ponti, A. Fasolo, and L. Bonfanti. 2003. Glia-independent chains of neuroblasts through the subcortical parenchyma of the adult rabbit brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13036-41.
- Lyden, D., K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, W. Marks, L. Witte, Y. Wu, D. Hicklin, Z. Zhu, N.R. Hackett, R.G. Crystal, M.A. Moore, K.A. Hajjar, K. Manova, R. Benezra, and S. Rafii. 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 7:1194-201.
- Ma, D.K., G.L. Ming, and H. Song. 2005. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 15:514-20.
- Machesky, L.M. 1998. Cytokinesis: IQGAPs find a function. *Curr Biol.* 8:R202-5.
- Machold, R., S. Hayashi, M. Rutlin, M.D. Muzumdar, S. Nery, J.G. Corbin, A. Gritli-Linde, T. Dellovade, J.A. Porter, L.L. Rubin, H. Dudek, A.P. McMahon, and G. Fishell. 2003. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron.* 39:937-50.
- Malatesta, P., M.A. Hack, E. Hartfuss, H. Kettenmann, W. Klinkert, F. Kirchhoff, and M. Gotz. 2003. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron.* 37:751-64.
- Marhaba, R., and M. Zoller. 2004. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol.* 35:211-31.
- Marie, Y., M. Sanson, K. Mokhtari, P. Leuraud, M. Kujas, J.Y. Delattre, J. Poirier, B. Zalc, and K. Hoang-Xuan. 2001. OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. *Lancet.* 358:298-300.
- Marin, O., A.S. Plump, N. Flames, C. Sanchez-Camacho, M. Tessier-Lavigne, and J.L. Rubenstein. 2003. Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development.* 130:1889-901.

- Marks, J.L., M.G. King, and D.G. Baskin. 1991a. Localization of insulin and type 1 IGF receptors in rat brain by in vitro autoradiography and in situ hybridization. *Adv Exp Med Biol.* 293:459-70.
- Marks, J.L., D. Porte, Jr., and D.G. Baskin. 1991b. Localization of type I insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by in situ hybridization. *Mol Endocrinol.* 5:1158-68.
- Massari, M.E., and C. Murre. 2000. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 20:429-40.
- Mataraza, J.M., M.W. Briggs, Z. Li, A. Entwistle, A.J. Ridley, and D.B. Sacks. 2003. IQGAP1 promotes cell motility and invasion. *J Biol Chem.* 278:41237-45.
- Mateer, S.C., A.E. McDaniel, V. Nicolas, G.M. Habermacher, M.J. Lin, D.A. Cromer, M.E. King, and G.S. Bloom. 2002. The mechanism for regulation of the F-actin binding activity of IQGAP1 by calcium/calmodulin. *J Biol Chem.* 277:12324-33.
- Matsudaira, P. 1991. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem Sci.* 16:87-92.
- Maurer, M.H., W.K. Tripps, R.E. Feldmann, Jr., and W. Kuschinsky. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci Lett.* 344:165-8.
- Mbele, G.O., J.C. Deloulme, B.J. Gentil, C. Delphin, M. Ferro, J. Garin, M. Takahashi, and J. Baudier. 2002. The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *J Biol Chem.* 277:49998-50007.
- McCallum, S.J., W.J. Wu, and R.A. Cerione. 1996. Identification of a putative effector for Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding partner with similarity to IQGAP2. *J Biol Chem.* 271:21732-7.
- McConkey, D.J., and S. Orrenius. 1996. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells.* 14:619-31.
- McLendon, R.E., J.E. Herndon, 2nd, B. West, D. Reardon, R. Wilshire, B.K. Rasheed, J. Quinn, H.S. Friedman, A.H. Friedman, and D.D. Bigner. 2005. Survival analysis of presumptive prognostic markers among oligodendrogiomas. *Cancer.* 104:1693-9.
- McMahon, A.P., B.J. Gavin, B. Parr, A. Bradley, and J.A. McMahon. 1992. The Wnt family of cell signalling molecules in postimplantation development of the mouse. *Ciba Found Symp.* 165:199-212; discussion 212-8.
- Menn, B., J.M. Garcia-Verdugo, C. Yaschine, O. Gonzalez-Perez, D. Rowitch, and A. Alvarez-Buylla. 2006. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci.* 26:7907-18.
- Mercier, F., J.T. Kitasako, and G.I. Hatton. 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol.* 451:170-88.
- Merkle, F.T., A.D. Tramontin, J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17528-32.
- Messier, B., C.P. Leblond, and I. Smart. 1958. Presence of DNA synthesis and mitosis in the brain of young adult mice. *Exp Cell Res.* 14:224-6.
- Meyer, R.K., and U. Aebi. 1990. Bundling of actin filaments by alpha-actinin depends on its molecular length. *J Cell Biol.* 110:2013-24.

- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000a. Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol.* 148:505-18.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000b. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol.* 10:865-8.
- Ming, G.L., and H. Song. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 28:223-50.
- Mischel, P.S., T.F. Cloughesy, and S.F. Nelson. 2004. DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. *Nat Rev Neurosci.* 5:782-92.
- Morshead, C.M., and D. van der Kooy. 1992. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci.* 12:249-56.
- Mukouyama, Y.S., H.P. Gerber, N. Ferrara, C. Gu, and D.J. Anderson. 2005. Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development.* 132:941-52.
- Mukouyama, Y.S., D. Shin, S. Britsch, M. Taniguchi, and D.J. Anderson. 2002. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell.* 109:693-705.
- Muroyama, Y., H. Kondoh, and S. Takada. 2004. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:915-21.
- Nabeshima, K., Y. Shimao, T. Inoue, and M. Koono. 2002. Immunohistochemical analysis of IQGAP1 expression in human colorectal carcinomas: its overexpression in carcinomas and association with invasion fronts. *Cancer Lett.* 176:101-9.
- Nataf, F., M.L. Tucker, P. Varlet, M. Koziak, F. Beuvon, C. Daumas-Duport, and F.X. Roux. 2005. [Oligodendroglomas: historical background of classifications]. *Neurochirurgie.* 51:219-27.
- Nathke, I. 2004. APC at a glance. *J Cell Sci.* 117:4873-5.
- Nedergaard, M., B. Ransom, and S.A. Goldman. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26:523-30.
- Ng, K.L., J.D. Li, M.Y. Cheng, F.M. Leslie, A.G. Lee, and Q.Y. Zhou. 2005. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science.* 308:1923-7.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., and A. Chedotal. 2002. Role of Slit proteins in the vertebrate brain. *J Physiol Paris.* 96:91-8.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., N. Picard-Riera, M. Tessier-Lavigne, A. Baron-Van Evercooren, C. Sotelo, and A. Chedotal. 2004. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci.* 24:1497-506.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T., A.S. Plump, M. Tessier-Lavigne, and A. Chedotal. 2002. Slit1 and slit2 proteins control the development of the lateral olfactory tract. *J Neurosci.* 22:5473-80.
- Nguyen Ba-Charvet, K.T., K. Brose, V. Marillat, T. Kidd, C.S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, C. Sotelo, and A. Chedotal. 1999. Slit2-Mediated chemorepulsion and collapse of developing forebrain axons. *Neuron.* 22:463-73.
- Nguyen, L., B. Malgrange, I. Breuskin, L. Bettendorff, G. Moonen, S. Belachew, and J.M. Rigo. 2003. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci.* 23:3278-94.

- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995a. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* 23:456-9.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995b. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 144:1235-44.
- Noritake, J., M. Fukata, K. Sato, M. Nakagawa, T. Watanabe, N. Izumi, S. Wang, Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 2004. Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell.* 15:1065-76.
- Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci.* 118:2085-92.
- Nottebohm, F. 1989. From bird song to neurogenesis. *Sci Am.* 260:74-9.
- Nuriya, M., S. Oh, and R.L. Huganir. 2005. Phosphorylation-dependent interactions of alpha-Actinin-1/IQGAP1 with the AMPA receptor subunit GluR4. *J Neurochem.* 95:544-52.
- Nye, J.S., R. Kopan, and R. Axel. 1994. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development.* 120:2421-30.
- Nyfeler, Y., R.D. Kirch, N. Mantei, D.P. Leone, F. Radtke, U. Suter, and V. Taylor. 2005. Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal. *Embo J.* 24:3504-15.
- O'Kusky, J.R., P. Ye, and A.J. D'Ercole. 2000. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci.* 20:8435-42.
- O'Neil, K.T., and W.F. DeGrado. 1990. How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem Sci.* 15:59-64.
- Ohgaki, H. 2005. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology.* 25:1-7.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues. 2004. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64:6892-9.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. 2005a. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 109:93-108.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. 2005b. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:479-89.
- Ohlstein, B., T. Kai, E. Decotto, and A. Spradling. 2004. The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol.* 16:693-9.
- Okamoto, Y., P.L. Di Patre, C. Burkhard, S. Horstmann, B. Jourde, M. Fahey, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, M.G. Yasargil, Y. Yonekawa, U.M. Lutolf, P. Kleihues, and H. Ohgaki. 2004. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogiomas. *Acta Neuropathol (Berl).* 108:49-56.
- Oliver, T.G., and R.J. Wechsler-Reya. 2004. Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron.* 42:885-8.
- Olson, M.F., A. Ashworth, and A. Hall. 1995. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science.* 269:1270-2.

- Ono, K., H. Tomasiewicz, T. Magnuson, and U. Rutishauser. 1994. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron*. 13:595-609.
- Osman, M.A., and R.A. Cerione. 1998. Iqg1p, a yeast homologue of the mammalian IQGAPs, mediates cdc42p effects on the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 142:443-55.
- Overstreet, L.S., S.T. Hentges, V.F. Bumaschny, F.S. de Souza, J.L. Smart, A.M. Santangelo, M.J. Low, G.L. Westbrook, and M. Rubinstein. 2004. A transgenic marker for newly born granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci*. 24:3251-9.
- Ozawa, M., H. Baribault, and R. Kemler. 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *Embo J*. 8:1711-7.
- Palma, V., D.A. Lim, N. Dahmane, P. Sanchez, T.C. Brionne, C.D. Herzberg, Y. Gitton, A. Carleton, A. Alvarez-Buylla, and A. Ruiz i Altaba. 2005. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*. 132:335-44.
- Palma, V., and A. Ruiz i Altaba. 2004. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*. 131:337-45.
- Palmer, T.D. 2002. Adult neurogenesis and the vascular Nietzsche. *Neuron*. 34:856-8.
- Palmer, T.D., J. Takahashi, and F.H. Gage. 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 8:389-404.
- Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 425:479-94.
- Papetti, M., and Herman, I.M. 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*:C947-C970.
- Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison. 2003. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 3:895-902.
- Parent, J.M., and D.H. Lowenstein. 2002. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res*. 135:121-31.
- Parent, J.M., V.V. Valentin, and D.H. Lowenstein. 2002. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway. *J Neurosci*. 22:3174-88.
- Parras, C.M., R. Galli, O. Britz, S. Soares, C. Galichet, J. Battiste, J.E. Johnson, M. Nakafuku, A. Vescovi, and F. Guillemot. 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *Embo J*. 23:4495-505.
- Peifer, M., and P. Polakis. 2000. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science*. 287:1606-9.
- Peretto, P., C. Giachino, P. Aimar, A. Fasolo, and L. Bonfanti. 2005. Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol*. 487:407-27.
- Peretto, P., A. Merighi, A. Fasolo, and L. Bonfanti. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull*. 42:9-21.
- Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*. 96:517-27.
- Perry, J.R. 2001. Oligodendrogiomas: clinical and genetic correlations. *Curr Opin Neurol*. 14:705-10.
- Philippon, J. 2004. Tumeurs Cérébrales - Du diagnostic au traitement.

- Phillips-Mason, P.J., T.J. Gates, D.L. Major, D.B. Sacks, and S.M. Brady-Kalnay. 2006. The receptor protein-tyrosine phosphatase PTPmu interacts with IQGAP1. *J Biol Chem.* 281:4903-10.
- Pietras, K., T. Sjöblom, K. Rubin, C.H. Heldin, and A. Ostman. 2003. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell.* 3:439-43.
- Polakis, P. 1999. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev.* 9:15-21.
- Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14:1837-51.
- Polakis, P., M. Hart, and B. Rubinfeld. 1999. Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol.* 470:23-32.
- Polyak, K., and W.C. Hahn. 2006. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med.* 12:296-300.
- Privat, A. 1977. The ependyma and subependymal layer of the young rat: a new contribution with freeze-fracture. *Neuroscience.* 2:447-57.
- Privat, A., and C.P. Leblond. 1972. The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *J Comp Neurol.* 146:277-302.
- Qiu, R.G., J. Chen, D. Kirn, F. McCormick, and M. Symons. 1995a. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature.* 374:457-9.
- Qiu, R.G., J. Chen, F. McCormick, and M. Symons. 1995b. A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:11781-5.
- Raaijmakers, M.H., E.P. de Grouw, L.H. Heuver, B.A. van der Reijden, J.H. Jansen, R.J. Schepers, G.L. Scheffer, T.J. de Witte, and R.A. Raymakers. 2005. Breast cancer resistance protein in drug resistance of primitive CD34+38- cells in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 11:2436-44.
- Rafii, S., B. Heissig, and K. Hattori. 2002a. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther.* 9:631-41.
- Rafii, S., D. Lyden, R. Benezra, K. Hattori, and B. Heissig. 2002b. Vascular and hematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer.* 2:826-35.
- Raghavan, R., J. Balani, A. Perry, L. Margraf, M.B. Vono, D.X. Cai, R.E. Wyatt, E.J. Rushing, D.C. Bowers, L.S. Hynan, and C.L. White, 3rd. 2003. Pediatric oligodendroglomas: a study of molecular alterations on 1p and 19q using fluorescence in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol.* 62:530-7.
- Rakic, P. 2003. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia.* 43:19-32.
- Ramirez-Castillejo, C., F. Sanchez-Sanchez, C. Andreu-Agullo, S.R. Ferron, J.D. Aroca-Aguilar, P. Sanchez, H. Mira, J. Escribano, and I. Farinas. 2006. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci.* 9:331-9.
- Rao, R.D., and C.D. James. 2004. Altered molecular pathways in gliomas: an overview of clinically relevant issues. *Semin Oncol.* 31:595-604.
- Reszka, A.A., J.C. Bulinski, E.G. Krebs, and E.H. Fischer. 1997. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 2 regulates cytoskeletal organization and chemotaxis via catalytic and microtubule-specific interactions. *Mol Biol Cell.* 8:1219-32.
- Reya, T., and H. Clevers. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 434:843-50.
- Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke, and I.L. Weissman. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414:105-11.

- Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci.* 12:4565-74.
- Reynolds, B.A., and S. Weiss. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol.* 175:1-13.
- Ricard, J., J. Salinas, L. Garcia, and D.J. Liebl. 2006. EphrinB3 regulates cell proliferation and survival in adult neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 31:713-22.
- Rich, J.N., C. Hans, B. Jones, E.S. Iversen, R.E. McLendon, B.K. Rasheed, A. Dobra, H.K. Dressman, D.D. Bigner, J.R. Nevins, and M. West. 2005. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res.* 65:4051-8.
- Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1991. Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem.* 266:17597-605.
- Rickman, D.S., M.P. Bobek, D.E. Misek, R. Kuick, M. Blaivas, D.M. Kurnit, J. Taylor, and S.M. Hanash. 2001. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.* 61:6885-91.
- Ridley, A.J. 1995. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* 5:24-30.
- Rietze, R.L., H. Valcanis, G.F. Brooker, T. Thomas, A.K. Voss, and P.F. Bartlett. 2001. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature.* 412:736-9.
- Rio, C., H.I. Rieff, P. Qi, T.S. Khurana, and G. Corfas. 1997. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron.* 19:39-50.
- Rorke, L.B., J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, R.A. Zimmerman, L.N. Sutton, J.A. Biegel, J.W. Goldwein, and R.J. Packer. 1997. Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Brain Pathol.* 7:765-84.
- Ross, S.E., M.E. Greenberg, and C.D. Stiles. 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron.* 39:13-25.
- Roy, M., Z. Li, and D.B. Sacks. 2004. IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J Biol Chem.* 279:17329-37.
- Roy, M., Z. Li, and D.B. Sacks. 2005. IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol Cell Biol.* 25:7940-52.
- Ruiz-Velasco, R., C.C. Lanning, and C.L. Williams. 2002. The activation of Rac1 by M3 muscarinic acetylcholine receptors involves the translocation of Rac1 and IQGAP1 to cell junctions and changes in the composition of protein complexes containing Rac1, IQGAP1, and actin. *J Biol Chem.* 277:33081-91.
- Saghatelyan, A., A. de Chevigny, M. Schachner, and P.M. Lledo. 2004. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 7:347-56.
- Sahai, E., and C.J. Marshall. 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2:133-42.
- Sallinen, P.K., S.L. Sallinen, P.T. Helen, I.S. Rantala, E. Rautiainen, H.J. Helin, H. Kalimo, and H.K. Haapasalo. 2000a. Grading of diffusely infiltrating astrocytomas by quantitative histopathology, cell proliferation and image cytometric DNA analysis. Comparison of 133 tumours in the context of the WHO 1979 and WHO 1993 grading schemes. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 26:319-31.
- Sallinen, S.L., P.K. Sallinen, H.K. Haapasalo, H.J. Helin, P.T. Helen, P. Schraml, O.P. Kallioniemi, and J. Kononen. 2000b. Identification of differentially expressed

- genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res.* 60:6617-22.
- Salsbury, A.J. 1975. The significance of the circulating cancer cell. *Cancer Treat Rev.* 2:55-72.
- Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, and M.S. Berger. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 353:811-22.
- Sanson, M., L. Aguirre-Cruz, S. Cartalat-Carel, and K. Hoang-Xuan. 2003. Oligodendrogiomas: an update on basic and clinical research. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 3:223-8.
- Sanson, M., P. Leuraud, Y. Marie, J.Y. Delattre, and K. Hoang-Xuan. 2002. Preferential loss of paternal 19q, but not 1p, alleles in oligodendrogiomas. *Ann Neurol.* 52:105-7.
- Sanson, M., J. Thillet, and K. Hoang-Xuan. 2004. Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol.* 16:607-13.
- Schaeffer, H.J., and M.J. Weber. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol.* 19:2435-44.
- Schanzer, A., F.P. Wachs, D. Wilhelm, T. Acker, C. Cooper-Kuhn, H. Beck, J. Winkler, L. Aigner, K.H. Plate, and H.G. Kuhn. 2004. Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol.* 14:237-48.
- Scheffzek, K., M.R. Ahmadian, L. Wiesmuller, W. Kabsch, P. Stege, F. Schmitz, and A. Wittinghofer. 1998. Structural analysis of the GAP-related domain from neurofibromin and its implications. *Embo J.* 17:4313-27.
- Schmid, R.S., B. McGrath, B.E. Berechid, B. Boyles, M. Marchionni, N. Sestan, and E.S. Anton. 2003. Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:4251-6.
- Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 4:7-25.
- Schuylar, S.C., and D. Pellman. 2001. Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell.* 105:421-4.
- Schwamborn, J.C., and A.W. Puschel. 2004. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci.* 7:923-9.
- Seri, B., J.M. Garcia-Verdugo, L. Collado-Morente, B.S. McEwen, and A. Alvarez-Buylla. 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 478:359-78.
- Seri, B., J.M. Garcia-Verdugo, B.S. McEwen, and A. Alvarez-Buylla. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 21:7153-60.
- Shafer, S.H., H.L. Puhl, S.H. Phelps, and C.L. Williams. 1999. Activation of transfected M1 or M3 muscarinic acetylcholine receptors induces cell-cell adhesion of Chinese hamster ovary cells expressing endogenous cadherins. *Exp Cell Res.* 248:148-59.
- Shannon, K.B., and R. Li. 1999. The multiple roles of Cyk1p in the assembly and function of the actomyosin ring in budding yeast. *Mol Biol Cell.* 10:283-96.
- Shen, Q., S.K. Goderie, L. Jin, N. Karanth, Y. Sun, N. Abramova, P. Vincent, K. Pumiglia, and S. Temple. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 304:1338-40.

- Shizuru, J.A., R.S. Negrin, and I.L. Weissman. 2005. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med.* 56:509-38.
- Shors, T.J., G. Miesegaes, A. Beylin, M. Zhao, T. Rydel, and E. Gould. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 410:372-6.
- Shoshan, Y., A. Nishiyama, A. Chang, S. Mork, G.H. Barnett, J.K. Cowell, B.D. Trapp, and S.M. Staugaitis. 1999. Expression of oligodendrocyte progenitor cell antigens by gliomas: implications for the histogenesis of brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10361-6.
- Shou, J., P.C. Rim, and A.L. Calof. 1999. BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat Neurosci.* 2:339-45.
- Sidman, R.L., I.L. Miale, and N. Feder. 1959. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp Neurol.* 1:322-33.
- Silverman, W.F., J.M. Krum, N. Mani, and J.M. Rosenstein. 1999. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience.* 90:1529-41.
- Singh, S.K., I.D. Clarke, T. Hide, and P.B. Dirks. 2004a. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene.* 23:7267-73.
- Singh, S.K., I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, and P.B. Dirks. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63:5821-8.
- Singh, S.K., C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks. 2004b. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 432:396-401.
- Smith, J.S., B. Alderete, Y. Minn, T.J. Borell, A. Perry, G. Mohapatra, S.M. Hosek, D. Kimmel, J. O'Fallon, A. Yates, B.G. Feuerstein, P.C. Burger, B.W. Scheithauer, and R.B. Jenkins. 1999. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene.* 18:4144-52.
- Sokol, S.Y., Z. Li, and D.B. Sacks. 2001. The effect of IQGAP1 on Xenopus embryonic ectoderm requires Cdc42. *J Biol Chem.* 276:48425-30.
- Song, H., C.F. Stevens, and F.H. Gage. 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 417:39-44.
- Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai. 2001. Stem cells find their niche. *Nature.* 414:98-104.
- Stanfield, B.B., and J.E. Trice. 1988. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res.* 72:399-406.
- Steele, F.R., G.J. Chader, L.V. Johnson, and J. Tombran-Tink. 1993. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:1526-30.
- Stowers, L., D. Yelon, L.J. Berg, and J. Chant. 1995. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5027-31.
- Stump, G., A. Durrer, A.L. Klein, S. Lutolf, U. Suter, and V. Taylor. 2002. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mech Dev.* 114:153-9.
- Sudol, M., P. Bork, A. Einbond, K. Kastury, T. Druck, M. Negrini, K. Huebner, and D. Lehman. 1995a. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated

- protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem.* 270:14733-41.
- Sudol, M., H.I. Chen, C. Bougeret, A. Einbond, and P. Bork. 1995b. Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett.* 369:67-71.
- Sugimoto, N., I. Imoto, Y. Fukuda, N. Kurihara, S. Kuroda, A. Tanigami, K. Kaibuchi, R. Kamiyama, and J. Inazawa. 2001. IQGAP1, a negative regulator of cell-cell adhesion, is upregulated by gene amplification at 15q26 in gastric cancer cell lines HSC39 and 40A. *J Hum Genet.* 46:21-5.
- Sun, Y., K. Jin, J.T. Childs, L. Xie, X.O. Mao, and D.A. Greenberg. 2006. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol.* 289:329-35.
- Sutton, L.N., P. Phillips, and B. Lange. 1992. Midline supratentorial tumors. *Neurosurg Clin N Am.* 3:821-37.
- Swart-Mataraza, J.M., Z. Li, and D.B. Sacks. 2002. IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. *J Biol Chem.* 277:24753-63.
- Taipale, J., and P.A. Beachy. 2001. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* 411:349-54.
- Takai, Y., T. Sasaki, K. Tanaka, and H. Nakanishi. 1995. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 20:227-31.
- Takaishi, K., T. Sasaki, H. Kotani, H. Nishioka, and Y. Takai. 1997. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol.* 139:1047-59.
- Takemoto, H., Y. Doki, H. Shiozaki, H. Imamura, T. Utsunomiya, H. Miyata, M. Yano, M. Inoue, Y. Fujiwara, and M. Monden. 2001. Localization of IQGAP1 is inversely correlated with intercellular adhesion mediated by e-cadherin in gastric cancers. *Int J Cancer.* 91:783-8.
- Taylor, M.D., H. Poppleton, C. Fuller, X. Su, Y. Liu, P. Jensen, S. Magdaleno, J. Dalton, C. Calabrese, J. Board, T. Macdonald, J. Rutka, A. Guha, A. Gajjar, T. Curran, and R.J. Gilbertson. 2005. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell.* 8:323-35.
- Tepass, U., K. Truong, D. Godt, M. Ikura, and M. Peifer. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:91-100.
- Tetsu, O., and F. McCormick. 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature.* 398:422-6.
- Tews, B., J. Felsberg, C. Hartmann, A. Kunitz, M. Hahn, G. Toedt, K. Neben, L. Hummerich, A. von Deimling, G. Reifenberger, and P. Lichter. 2006. Identification of novel oligodendrogloma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. *Int J Cancer.* 119:792-800.
- Till, J.E. 1982. Stem cells in differentiation and neoplasia. *J Cell Physiol Suppl.* 1:3-11.
- Tohyama, T., V.M. Lee, L.B. Rorke, M. Marvin, R.D. McKay, and J.Q. Trojanowski. 1992. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest.* 66:303-13.
- Tomasiewicz, H., K. Ono, D. Yee, C. Thompson, C. Goridis, U. Rutishauser, and T. Magnuson. 1993. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron.* 11:1163-74.
- Tombran-Tink, J., G.G. Chader, and L.V. Johnson. 1991. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res.* 53:411-4.

- Torres-Aleman, I. 1999. Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. *Horm Metab Res.* 31:114-9.
- Tramontin, A.D., J.M. Garcia-Verdugo, D.A. Lim, and A. Alvarez-Buylla. 2003. Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cereb Cortex.* 13:580-7.
- Tropepe, V., C.G. Craig, C.M. Morshead, and D. van der Kooy. 1997. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci.* 17:7850-9.
- Tsukita, S., S. Tsukita, A. Nagafuchi, and S. Yonemura. 1992. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol.* 4:834-9.
- Uchida, N., D.W. Buck, D. He, M.J. Reitsma, M. Masek, T.V. Phan, A.S. Tsukamoto, F.H. Gage, and I.L. Weissman. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:14720-5.
- Venturelli, C.R., S. Kuznetsov, L.M. Salgado, and T.C. Bosch. 2000. An IQGAP-related gene is activated during tentacle formation in the simple metazoan Hydra. *Dev Genes Evol.* 210:458-63.
- Vescovi, A.L., R. Galli, and B.A. Reynolds. 2006. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer.* 6:425-36.
- Vescovi, A.L., B.A. Reynolds, D.D. Fraser, and S. Weiss. 1993. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron.* 11:951-66.
- Vick, N.A., M.J. Lin, and D.D. Bigner. 1977. The role of the subependymal plate in glial tumorigenesis. *Acta Neuropathol (Berl).* 40:63-71.
- Voigt, T. 1989. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol.* 289:74-88.
- Walker, C., D.G. du Plessis, D. Fildes, B. Haylock, D. Husband, M.D. Jenkinson, K.A. Joyce, J. Broome, K. Kopitski, J. Prosser, T. Smith, S. Vinjamuri, and P.C. Warnke. 2004. Correlation of molecular genetics with molecular and morphological imaging in gliomas with an oligodendroglial component. *Clin Cancer Res.* 10:7182-91.
- Walker, C., D.G. du Plessis, K.A. Joyce, D. Fildes, A. Gee, B. Haylock, D. Husband, T. Smith, J. Broome, and P.C. Warnke. 2005. Molecular pathology and clinical characteristics of oligodendroglial neoplasms. *Ann Neurol.* 57:855-65.
- Wang, D.D., D.D. Krueger, and A. Bordey. 2003. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABA_A receptor activation. *J Physiol.* 550:785-800.
- Wang, J.C., and J.E. Dick. 2005. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 15:494-501.
- Warner, J.K., J.C. Wang, K.J. Hope, L. Jin, and J.E. Dick. 2004. Concepts of human leukemic development. *Oncogene.* 23:7164-77.
- Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama, and K. Kaibuchi. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell.* 7:871-83.
- Watson, G.A., R.P. Kadota, and J.H. Wisoff. 2001. Multidisciplinary management of pediatric low-grade gliomas. *Semin Radiat Oncol.* 11:152-62.
- Wechsler-Reya, R., and M.P. Scott. 2001. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci.* 24:385-428.

- Wechsler-Reya, R.J. 2003. Analysis of gene expression in the normal and malignant cerebellum. *Recent Prog Horm Res.* 58:227-48.
- Weinstein, B.E. 1996. Treatment efficacy: hearing aids in the management of hearing loss in adults. *J Speech Hear Res.* 39:S37-45.
- Weinstein, B.M. 2005. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell.* 120:299-302.
- Weiss, S., B.A. Reynolds, A.L. Vescovi, C. Morshead, C.G. Craig, and D. van der Kooy. 1996. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci.* 19:387-93.
- Weissbach, L., J. Settleman, M.F. Kalady, A.J. Snijders, A.E. Murthy, Y.X. Yan, and A. Bernards. 1994. Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *J Biol Chem.* 269:20517-21.
- Wichterle, H., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. 1997. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron.* 18:779-91.
- Willert, K., and R. Nusse. 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 8:95-102.
- Wilson, P.A., and A. Hemmati-Brivanlou. 1997. Vertebrate neural induction: inducers, inhibitors, and a new synthesis. *Neuron.* 18:699-710.
- Winder, S.J., M.P. Walsh, C. Vasulka, and J.D. Johnson. 1993. Calponin-calmodulin interaction: properties and effects on smooth and skeletal muscle actin binding and actomyosin ATPases. *Biochemistry.* 32:13327-33.
- Wong, K., X.R. Ren, Y.Z. Huang, Y. Xie, G. Liu, H. Saito, H. Tang, L. Wen, S.M. Brady-Kalnay, L. Mei, J.Y. Wu, W.C. Xiong, and Y. Rao. 2001. Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell.* 107:209-21.
- Wu, W., K. Wong, J. Chen, Z. Jiang, S. Dupuis, J.Y. Wu, and Y. Rao. 1999. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature.* 400:331-6.
- Wulf, G.G., R.Y. Wang, I. Kuehnle, D. Weidner, F. Marini, M.K. Brenner, M. Andreeff, and M.A. Goodell. 2001. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood.* 98:1166-73.
- Wurmser, A.E., T.D. Palmer, and F.H. Gage. 2004. Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science.* 304:1253-5.
- Wylie, P.G., R.A. Challiss, and J.L. Blank. 1999. Regulation of extracellular-signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase by G-protein-linked muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem J.* 338 (Pt 3):619-28.
- Wynshaw-Boris, A., and M.J. Gambello. 2001. LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev.* 15:639-51.
- Yagi, T., and M. Takeichi. 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 14:1169-80.
- Yamaguchi, M., H. Saito, M. Suzuki, and K. Mori. 2000. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport.* 11:1991-6.
- Yamaoka-Tojo, M., T. Tojo, H.W. Kim, L. Hilenski, N.A. Patrushev, L. Zhang, T. Fukai, and M. Ushio-Fukai. 2006. IQGAP1 mediates VE-cadherin-based cell-cell contacts and VEGF signaling at adherence junctions linked to angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1991-7.
- Yamaoka-Tojo, M., M. Ushio-Fukai, L. Hilenski, S.I. Dikalov, Y.E. Chen, T. Tojo, T. Fukai, M. Fujimoto, N.A. Patrushev, N. Wang, C.D. Kontos, G.S. Bloom, and R.W. Alexander. 2004. IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor

- receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res.* 95:276-83.
- Ye, P., Y. Xing, Z. Dai, and A.J. D'Ercole. 1996. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res Dev Brain Res.* 95:44-54.
- Yeh, S.A., T.C. Lee, H.J. Chen, C.C. Lui, L.M. Sun, C.J. Wang, and E.Y. Huang. 2002. Treatment outcomes and prognostic factors of patients with supratentorial low-grade oligodendrogloma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 54:1405-9.
- Young, C.S., M. Kitamura, S. Hardy, and J. Kitajewski. 1998. Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 18:2474-85.
- Yuan, X., J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschsmann-Hogiu, D.L. Farkas, K.L. Black, and J.S. Yu. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 23:9392-400.
- Zhang, B., Z.X. Wang, and Y. Zheng. 1997. Characterization of the interactions between the small GTPase Cdc42 and its GTPase-activating proteins and putative effectors. Comparison of kinetic properties of Cdc42 binding to the Cdc42-interactive domains. *J Biol Chem.* 272:21999-2007.
- Zhang, H., L. Vutskits, V. Calaora, P. Durbec, and J.Z. Kiss. 2004. A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci.* 117:93-103.
- Zhang, H., L. Vutskits, M.S. Pepper, and J.Z. Kiss. 2003. VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors. *J Cell Biol.* 163:1375-84.
- Zhang, M., and J.M. Rosen. 2006. Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 16:60-4.
- Zhu, Y., H. Li, L. Zhou, J.Y. Wu, and Y. Rao. 1999. Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex. *Neuron.* 23:473-85.

Etude de la protéine IQGAP1 dans un contexte physiologique de la neurogenèse adulte et dans un contexte pathologique de tumeurs cérébrales

Laurent BALENCI

Résumé

Les cellules souches/progénitrices sont douées d'une forte plasticité cellulaire qui leur permet de développer, de maintenir et de régénérer organes ou tissus dans lesquels elles résident. Ces processus requièrent l'intégration de signaux moléculaires et environnementaux qui influencent leur comportement et leur devenir. La perturbation de l'un de ces mécanismes régulateurs aboutit à une perte de contrôle des cellules souches/progénitrices pouvant entraîner le développement de pathologies cancéreuses. De ce fait, la connaissance des éléments cellulaires et moléculaires régulant la biologie des cellules souches/progénitrices est nécessaire pour l'emploi éventuel de ces cellules en médecine régénérative et pour une avancée dans les traitements anti-cancéreux.

La protéine IQGAP1, que nous avons étudiée dans le cerveau dans un contexte physiologique et pathologique, s'est révélée être un nouveau marqueur de cellules souches/progénitrices normales et tumorales. A travers une étude comparative de souris sauvages et *iqgap1-/-*, nous avons analysé les propriétés et le comportement *in vivo* comme *in vitro* des cellules souches/progénitrices neurales. Nous avons démontré qu'IQGAP1 joue un rôle dans la neurogenèse adulte en régulant la migration des cellules progénitrices neurales en réponse au VEGF, facteur pléiotropique intervenant notamment dans la neurogenèse et l'angiogenèse tumorale. D'autre part, dans un contexte tumoral de gliomes humains et chimio-induits chez le rat, la caractérisation de cette protéine dans des cellules souches/progénitrices tumorales au sein de tumeurs malignes a permis d'attribuer un rôle putatif à la protéine IQGAP1 dans l'expansion tumorale par la dissémination de ces cellules cancéreuses. L'identification et la caractérisation de tous les mécanismes environnementaux régulant la motilité et la migration des précurseurs neuraux normaux pourraient s'avérer utile pour la compréhension des mécanismes d'invasion tumorale et pour le développement de thérapies anti-cancéreuses plus efficaces.

Mots clés: cellules souches/progénitrices neurales normales et tumorales, niches, neurogenèse adulte, IQGAP1, migration, gliomes, invasion

Abstract

Stem/progenitor cells possess a high cellular plasticity which allows them to develop, maintain and regenerate the organ or tissue inside which they reside. These processes require the integration of molecular and environmental signals which impact on their behaviour and their fate. Alteration in one of these regulatory mechanisms leads to a loss of stem/progenitor control and could give rise to the development of cancers. Therefore, a deeper understanding of molecular and cellular elements regulating stem/progenitor cell biology is necessary to use them in regenerative medicine and to progress in cancer treatments. Our studies reveal that, in the brain, in physiological and pathological contexts the protein IQGAP1 is a new relevant marker of normal and tumour stem/progenitor cells. Through a comparative study between wild-type and *iqgap1-/-* mice, we analysed the *in vivo* as *in vitro* neural stem/progenitor cells properties and behaviour. We concluded that IQGAP1 plays a role in adult neurogenesis by regulating VEGF-dependent neural progenitor chemokinesis. On the other hand, in human and in rat-induced malignant glioma IQGAP1 identifies a tumour cell subpopulation with stem-like cell features that are able to reform a tumour. We suggest a putative role for IQGAP1 in tumour expansion through dissemination of these cancer cells. Identification and characterisation of environmental processes which regulate motility and migration of neural precursors could help to improve our understanding of tumour invasion and to develop more effective anti-cancerous therapies.

Key words: normal and tumoral neural stem/progenitor cells, niches, adult neurogenesis, IQGAP1, migration, glioma, invasion