

Université de Montréal

**Étude moléculaire de la fonction du gène *Bmi1* dans le
processus de sénescence du système nerveux**

par
Wassim Chatoo

Programme de biologie moléculaire, Université de Montréal
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biologie moléculaire

Mai, 2010

© Wassim Chatoo, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

Étude moléculaire de la fonction du gène Bmi1 dans le processus de sénescence du
système nerveux

Présentée par :
Wassim Chatoo

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Euridice Carmona, président-rapporteur
Dr Gilbert Bernier, directeur de recherche
Dre Adriana Di Polo, membre du jury
Dr Michel Tremblay, examinateur externe
Dre Manuela Santos, représentant du doyen de la FES

Résumé

Des études présentées dans cette thèse ont permis de démontrer que le gène du groupe *Polycomb* (*PcG*) *Bmi1* est essentiel à l'auto-renouvellement des progéniteurs rétiniens immatures et pour le développement rétinien après la naissance. Ce travail illustre chez l'embryon que *Bmi1* est hautement enrichie dans une sous-population de progéniteurs rétiniens exprimant le marqueur de surface SSEA-1 et différents marqueurs de cellules souches. À tous les stades de développement analysés, l'absence de *Bmi1* résulte en une diminution de la prolifération et de l'auto-renouvellement des progéniteurs immatures. Pour mieux comprendre la cascade moléculaire en absence de *Bmi1*, nous avons inactivé *p53* dans les colonies *Bmi1*^{-/-}. Cette inactivation a permis une restauration partielle du potentiel d'auto-renouvellement. De plus, en absence de *Bmi1*, la prolifération et la maintenance de la population de progéniteurs rétiniens immatures localisés dans le corps ciliaire sont aussi affectées après la naissance. *Bmi1* permet donc de distinguer les progéniteurs immatures de la population principale de progéniteurs, et est requis pour le développement normal de la rétine. Nous avons également démontré que l'oncogène *Bmi1* est requis dans les neurones pour empêcher l'apoptose et l'induction d'un programme de vieillissement prématuré, causé par une baisse des défenses anti-oxydantes. Nous avons observé dans les neurones *Bmi1*^{-/-} une augmentation des niveaux de p53, de la concentration des ROS et de la sensibilité aux agents neurotoxiques. Nous avons démontré ainsi que *Bmi1* contrôle les défenses anti-oxydantes dans les neurones en réprimant l'activité pro-oxydante de p53. Dans les neurones *Bmi1*^{-/-}, p53 provoque la répression des gènes anti-oxydants, induisant une augmentation des niveaux de ROS. Ces résultats démontrent pour la première fois que *Bmi1* joue un rôle critique dans la survie et le processus de vieillissement neuronal.

Mots-clés : Gène *Polycomb* *Bmi1*, progéniteurs rétiniens immatures, prolifération, auto-renouvellement, p53, défenses anti-oxydantes, neurones post-mitotiques, ROS

Abstract

The studies presented in this thesis establish that the *Polycomb Group (PcG)* gene *Bmi1* is required for the self-renewal of immature retinal progenitor cells (RPCs) and for postnatal retinal development. Work performed in mouse embryos reveals that *Bmi1* is highly enriched in a RPC subpopulation expressing the cell surface antigen SSEA-1 and different stem cell markers. Furthermore, at all developmental stages analysed, *Bmi1* deficiency resulted in reduced proliferation and self-renewal of immature RPCs. To better understand the molecular cascade leading to this phenotype, we inactivated *p53* in *Bmi1*-deficient colonies. *p53* inactivation partially restored RPCs self-renewal potential. Moreover, the proliferation and the postnatal maintenance of an immature RPC population located in the ciliary body was also impaired in absence of *Bmi1*. Thus, *Bmi1* distinguishes immature RPCs from the main RPC population and is required for normal retinal development. We have also shown that the oncogene *Bmi1* is required in neurons to prevent apoptosis and the induction of a premature aging-like program characterized by reduced antioxidant defenses. We observed in *Bmi1*-deficient neurons an increased p53 and ROS levels, and a hypersensitivity to neurotoxic agents. We demonstrated that *Bmi1* regulate antioxidant defenses in neurons by suppressing p53 pro-oxidant activity. In *Bmi1*^{-/-} neurons, p53 induces antioxidant genes repression, resulting in increased ROS levels. These findings reveal for the first time the major role of *Bmi1* on neuronal survival and aging.

Keywords : *Polycomb* gene *Bmi1*, RPCs, proliferation, self-renewal, p53, antioxidant defenses, post-mitotic neurons, ROS

Table des matières

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS ET MOTS CLÉS FRANÇAIS.....	iii
RÉSUMÉ EN ANGLAIS ET MOTS CLÉS ANGLAIS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS.....	xxi
CHAPITRE 1.....	1
INTRODUCTION: SECTION 1.....
Le système nerveux central	3
1.1.1 Formation du système nerveux central chez les mammifères	3
1.1.2 Développement de l'œil.....	5
1.1.3 Rôle de la famille p53 dans les neurones post-mitotiques.....	7
INTRODUCTION: SECTION 2.....
Les cellules souches neurales.....	15
1.2.1 Définition et caractéristique d'une cellule souche	15
1.2.2 Origine des cellules souches neurales.....	17
1.2.3 Maintien du potentiel de cellules souches neurales par différents facteurs.....	20
1.2.4 Cellules souches rétiniennes.....	23
INTRODUCTION: SECTION 3.....
Les gènes <i>Polycombs</i> : régulateurs épigénétiques	25
1.3.1 Définition et conservation lors de l'évolution	25
1.3.2 Groupes et membres des <i>PcG</i> chez la drosophile et les mammifères.....	28

1.3.3 Mécanismes d'action épigénétique des <i>PcG</i> pour maintenir la répression des gènes	31
1.3.4 Protéines interagissant avec les PcG.....	35
1.3.5 Les PcG sont impliqués dans différents processus cellulaires.....	36
1.3.6 Rôle des PcG dans le contrôle de la prolifération des cellules souches.....	37
1.3.7 Bmi1 : protéine PcG par excellence.....	40
1.3.8 Lien potentiel entre les PcG et le cancer.....	43

INTRODUCTION: SECTION 4.....

Sénescence et vieillissement46

1.4.1 La sénescence cellulaire : définition et caractéristique	46
1.4.2 Différentes sources d'induction de la sénescence.....	48
1.4.3 Rôle et régulation du locus <i>Ink4a/Arf/Ipk4b</i>	50
1.4.4 Contribution du locus <i>Ink4a/Arf</i> et de la sénescence au processus de vieillissement.....	54
1.4.5 L'impact de p53 sur le vieillissement.....	55

INTRODUCTION: SECTION 5.....

Le métabolisme oxydatif58

1.5.1 La théorie des radicaux libres dans le vieillissement cellulaire	58
1.5.2 La mitochondrie : génératrice principale des ROS dans la cellule.....	60
1.5.3 Rôle de p53 dans le métabolisme oxydatif	64
1.5.4 Les ROS : responsables de l'apparition des maladies neurodégénératives?....	66

INTRODUCTION: SECTION 6.....

Hypothèses et objectifs.....73

Références.....	77
-----------------	----

CHAPITRE 2.....123

<i>Bmi1</i> distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main progenitor cell population and is required for normal retinal development	123
Abstract.....	125
Introduction.....	126
Materials and Methods.....	127
Results.....	130
<i>Bmi1</i> is highly expressed in RPCs located in the peripheral retina.....	130
<i>Bmi1</i> is expressed at low levels in the main RPC population.....	132
A rare <i>Bmi1</i> ^{high} subpopulation is present within the SSEA-1 ⁺ RPC population....	
.....	133
<i>Bmi1</i> is required for the self-renewal of NE progenitors from the optic vesicle	
.....	133
<i>Bmi1</i> is required for the self-renewal of immature RPCs.....	136
<i>Bmi1</i> deficiency impairs the proliferation of a unique RPC population.....	137
<i>Bmi1</i> is required for the proliferation of progenitor cells from the ocular ciliary	
body.....	138
<i>Bmi1</i> is required for postnatal retinal development.....	139
Discussion.....	141
<i>Bmi1</i> expression level defines most immature RPCs	141
<i>Bmi1</i> dependency distinguishes immature RPC from the main RPC	
population.....	142
<i>Bmi1</i> is required for postnatal retinal development.....	143
<i>P53</i> controls immature retinal progenitors senescence.....	143
Acknowledgement	145
References.....	146

Figures legends.....	150
Supplementary materials.....	163
Supplementary figures legends.....	164

CHAPITRE 3.....	173
The Polycomb Group Gene <i>Bmi1</i> Regulates Antioxidant Defenses in Neurons by Repressing <i>p53</i> Pro-oxidant Activity.....	173
Abstract.....	175
Introduction.....	176
Materials and Methods.....	178
Results.....	185
<i>Bmi1</i> is expressed in ocular tissues and postmitotic neurons of the mature CNS.....	185
<i>Bmi1</i> deficiency results in a premature aging-like ocular phenotype.....	185
<i>Bmi1</i> gene dosage modulates lifespan.....	186
Loss of <i>Bmi1</i> results in activation of a <i>p53</i> -dependent apoptotic cascade in CNS neurons.....	187
<i>P53</i> inhibition can rescue <i>Bmi1</i> ^{-/-} MEFs senescence and proliferation phenotype.....	189
<i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons are hypersensitive to neurotoxic agents in a <i>p53</i> -dependent manner.....	190
<i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons are hypersensitive to a mitochondrial toxin.....	191
Identification of new <i>Bmi1</i> -regulated molecular pathways in neurons.....	191
Reduced antioxidant defenses in <i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons is linked to <i>p53</i> activity.....	192
<i>P53</i> is pro-oxidant in neurons and in the CNS in physiological conditions.....	195
Discussion.....	196
<i>Bmi1</i> and the <i>p19^{Arf}/p53</i> pathway	197
<i>P53</i> and CNS aging.....	197

<i>Bmi1, aging, and neurodegenerative diseases</i>	199
Acknowledgement	201
References.....	202
Figures legends	209
CHAPITRE 4	226
Discussion, Conclusion et perspectives	226
Le gène Polycomb <i>Bmi1</i> : un gène essentiel à la prolifération cellulaire	228
<i>Bmi1</i> : un outil moléculaire pour l'isolation des cellules souches rétiniennes / progéniteurs immatures.....	228
P53 est responsable de la sénescence des progéniteurs rétiniens immatures.....	231
<i>Bmi1</i> est requis pour le développement normal de la rétine après la naissance.....	232
Apparition d'un phénotype de vieillissement accéléré dans le SNC en absence de <i>Bmi1</i>	232
<i>Bmi1</i> est nécessaire à la survie des neurones en contrôlant les défenses anti-oxydantes	234
P53 et la régulation du stress oxydatif dans les neurones du SNC.....	238
<i>Bmi1</i> : lien entre le vieillissement et les maladies neurodégénératives.....	242
<i>Bmi1</i> : régulateur multifonctionnelle.....	245
Conclusion.....	247
Références.....	248
Annexe I	257

Liste des tableaux

Tableau I.I	Différents facteurs de transcription impliqués dans le développement rétinien	9
Tableau I.II	Membres des complexes PcG chez la Drosophile et l'homme.....	27
Tableau I.III	Implication des PcG dans différents types de cancers.....	45
Tableau I.IV	Différentes types d'espèces réactives d'oxygènes.....	59
Tableau Suppl II.I	Retinal sphere proliferation capacity decreases upon developmental maturation.....	172
Tableau III.I	List of genes whose expression is modulated in cultured <i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons.....	224
Tableau III.II	<i>P53</i> is pro-oxidant in the central nervous system.....	225

Liste des figures

Fig 1.1	Représentation schématique illustrant le développement de l'œil embryonnaire.....	6
Fig 1.2	Représentation schématique illustrant l'apparition des différents types cellulaires dans un ordre histogénétique définie lors du développement de la rétine.	8
Fig 1.3	Représentation schématique de la rétine adulte, illustrant les différentes couches cellulaires présentes.	11
Fig 1.4	Représentation schématique illustrant les deux modes de division d'une cellule souche; soit symétrique ou asymétrique.	16
Fig 1.5	Représentation schématique illustrant la formation des différents types cellulaires lors du développement dans le cerveau chez les mammifères....	18
Fig 1.6	Représentation schématique illustrant le recrutement des complexes PcG aux gènes cibles par les séquences régulatrices PRE.	32
Fig 1.7	Représentation schématique illustrant un exemple de mécanisme de répression induit par les PcG suite à leur liaison sur la chromatine.....	33
Fig 1.8	Schéma illustrant la répression du locus <i>Ink4a/Arf</i> par Bmi1 dans les cellules souches.	43

Fig 1.9	Représentation schématique illustrant l'induction des voies p19 ^{Arf} /p53 et p16/pRB par des signaux de sénescence.	51
Fig 1.10	Activateurs et répresseurs du locus <i>Ink4b-Arf-Ink4a</i> . Représentation schématique des trois gènes du locus.	53
Fig 1.11	Représentation schématique illustrant la chaîne de transport des électrons et le métabolisme oxydatif au niveau de la mitochondrie.	60
Fig 1.12	Représentation schématique illustrant le rôle de p53 dans la régulation du stress oxydatif.	66
Fig 2.1	<i>Bmi1</i> is expressed in embryonic retinal progenitors.....	156
Fig 2.2	SSEA-1 labels immature RPCs.	157
Fig 2.3	<i>Bmi1</i> is highly enriched in a SSEA-1 positive RPC subpopulation.....	158
Fig 2.4	<i>Bmi1</i> deficiency affects the self-renewal of NE progenitors from the mouse optic vesicle.	159
Fig 2.5	<i>P53</i> controls the senescence of <i>Bmi1</i> ^{-/-} NE progenitors.....	160
Fig 2.6	<i>Bmi1</i> is required for the proliferation of RPCs located in the distal retina.	161
Fig 2.7	<i>Bmi1</i> deficient mice show postnatal retardation growth of the retina.....	162
Suppl Fig 2.1	<i>Bmi1</i> is expressed in RPCs and in retinal neurons.....	167

Suppl Fig 2.2	<i>Bmi1</i> deficiency does not grossly affect retinal progenitor/stem cell identity.....	168
Suppl Fig 2.3	<i>Bmi1</i> deficiency affects immature RPCs proliferation and self-renewal...	169
Suppl Fig 2.4	e18.5 embryo frozen eye sections were labeled with antibodies against <i>Bmi1</i> and Ki67.	170
Suppl Fig 2.5	<i>Bmi1</i> is required for the postnatal maintenance of CB progenitors.....	171
Fig 3.1	<i>Bmi1</i> is expressed in post-mitotic neurons of the CNS.....	215
Fig 3.2	<i>Bmi1</i> deficiency results in an early aging-like phenotype in the eye.....	216
Fig 3.3	<i>Bmi1</i> modulates lifespan and neuronal apoptosis in the CNS.....	217
Fig 3.4	P53 expression level and activation state are enhanced in <i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons.....	218
Fig 3.5	Premature senescence and slow proliferation phenotypes of <i>Bmi1</i> ^{-/-} MEFs are p53-dependent.	219
Fig 3.6	<i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons are hypersensitive to neurotoxic agents.....	220
Fig 3.7	<i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons are hypersensitive to the mitochondrial toxin 3-NP.....	221
Fig 3.8	Antioxidant defenses are deficient in <i>Bmi1</i> ^{-/-} neurons.....	222
Fig 3.9	<i>P53</i> is pro-oxidant in cultured neurons and in the CNS.....	223

Fig 4.1	Modèle illustrant l'importance de Bmi1 dans les progéniteurs immatures à différents stades de développement.....	230
Fig 4.2	Modèle illustrant l'importance de Bmi1 dans le contrôle du métabolisme oxydatif via la répression de p53.....	236
Fig 4.3	Modèle illustrant la répression des gènes anti-oxydants dans les neurones par p53 en absence de Bmi1.....	238
Fig 4.4	Modèle illustrant le mécanisme moléculaire sur la fonction de p53 dans différents types cellulaires.....	241

Liste des sigles et abréviations

Abréviation	Signification
3-NP	3-nitropropionic acid
53-BP1	<i>53 binding protein</i>
γ -H2AX	Gamma-H2A phosphorylé
A β 1-42	β -amyloïde forme toxique
ALDH4	Aldéhyde déshydrogénase 4
AML	Leucémie myéloïde aigu
ANT-C	Antennapedia
A/P	Axe antéro-postérieur
APP	<i>Amyloid protein precursor</i>
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BLBP	<i>Brain lipid-binding protein</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BrdU	Bromodeoxy-Uridine
BX-C	Bithorax
CB	Corps ciliaire
CBE	Épithélium du corps ciliaire
CD133	Prominin-1
CDK	<i>Cyclin-dependent-kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent-kinase-inhibitors</i>
CEM	<i>Cryomatrix embedding medium</i>
CHIP	Immunoprécipitation de chromatine

CO	Cupule optique
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSN, NSC	Cellules souches neurales
DAB	2,4-diaminobutyric acid
DCFDA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DNMT	ADN méthyltransférase
DNp53	Forme tronquée de p53
DNp63	Forme tronquée de p63
DNp73	Forme tronquée de p73
EC ₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Esc	Extra sex comb
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADH	Flavin adenine dinucleotide
Fe ²⁺	Oxyde ferreux
Fe ³⁺	Oxyde ferrique
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GAF	GAGA factor
GCL	<i>Ganglion cell layer</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GPX	Glutathiones peroxidases
Grh	Grainyhead
GSE22	<i>Retrovirus expressing a dominant-negative form of p53</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférases
H1K26	Lysine 26 de l'histone 1
H2A	Histone 2A
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène

H3	Histone 3
H3K4me ³	Triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3
H3K9	Lysine 9 de l'histone 3
H3K27me ³	Triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3
H4	Histone 4
H4K20	Lysine 20 de l'histone 4
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HDAC	Histone déacétylase
Hi95	Sestrin 2
HMT	Histone méthyltransférase
HOM-C	Homeotic
Hox	Homeobox
HP1	<i>Like heterochromatin protein 1</i>
Htt	Huntingtin
IAP	Protéines inhibitrices d'apoptose
IHC	Immunohistochimie
INbl	<i>Inner neuroblastic layer</i>
INL	<i>Inner nuclear layer</i>
K-acet	<i>Acetylated lysine</i>
Lhx2	<i>LIM/homeobox protein 2</i>
LP	Placode cristalline
MA	Maladie d'Alzheimer
MDA	Malondialdehyde
Mdm2	<i>Mouse double minute 2</i>
Mdmx	<i>Mouse double minute X(4)</i>
MEFs	Fibroblastes embryonnaires de souris
MELFs	Fibroblastes embryonnaires de poumons de souris
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MH	Maladie d'Huntington

MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAC	N-acétyl-cystéine
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NE	Neuroépithéliales
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
Ngn2	Neurogenin 2
NPM	Nucleophosmin
NQO1	NADPH : quinone oxidoreductase
O ₂ ^{•-}	Anion superoxide
ONbl	<i>Outer neuroblastic layer</i>
ONL	<i>Outer nuclear layer</i>
OH•	Radical hydroxyle
Oxo ⁸ -dG	8-oxo-2'deoxyguanosine
OV	Vésicule optique
PA26	Sestrin 1
PAX	<i>Paired-box and homeobox</i>
Pc	Polycomb
PcG	Polycombs
PD	<i>Population doubling</i>
PE	Phyco-erythrin
PFA	Paraformaldehyde
PGC-1 α	<i>Proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α</i>
PGZ	Progéniteurs granulaires
Ph	Polyhomeotic
PH3	Phospho-histone 3
Pho	Pleihomeotique
PhoRC	<i>Pho repressive complex</i>
PIG3	<i>p53-inducible gene 3</i>

PRE	<i>Polycomb response element</i>
PRX	Peroxi-redoxines
Psc	Posterior sex comb
Psq	Pipsqueak
RGC	Cellules ganglionnaires rétiniens
RPC	<i>Retinal progenitor cells</i>
ROS	Espèces réactives d'oxygènes
RPE	Épithélium pigmenté rétinien
RS	Espèces réactives
RT-PCR	Real-time PCR
SA- β -gal	<i>Senescence-associated β-galactosidase</i>
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i>
Scm	Sex comb on midleg
SDF	<i>Senescence-associated DNA-damage foci</i>
SE	Ectoderme de surface
Sesn1, 2	Sestrins 1 et 2
SGZ	Zone sous-granulaire
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
Six3, 6	<i>Sine oculis homeobox 3 et 6</i>
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
Smo	<i>Smoothened</i>
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOD1, 2	Superoxyde dismutase 1 et 2
SSEA1	<i>Stage-specific embryonic antigen 1</i>
SVZ	Zone sous-ventriculaire
TAF	<i>TBP-associated factor</i>
TAp63	<i>p63 full length</i>
TAp73	<i>p73 full length</i>

TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substrate</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIGAR	<i>p53-induced glycolysis and apoptosis regulator</i>
TP53INP1	<i>Tumor protein 53-induced protein 1</i>
TrxG	Trithorax
YY1	Yin Yang 1
ZMC	Zone marginale ciliaire

À ma famille et mes amis

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de thèse, Dr Gilbert Bernier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ce travail n'aurait pas pu se faire sans son aide précieuse, sa patience, ses compétences et son professionnalisme. Ses encouragements, associés aux moyens matériels dont j'ai disposés, m'ont permis de mener à bien la recherche présentée dans cette thèse. C'est pourquoi je lui exprime ma plus grande gratitude.

Je remercie le Dr Mohamed Abdouh pour son amitié et contribution scientifique majeure à mon travail. Je le remercie d'avoir été patient à mon égard, d'avoir su me guider dans ce travail, d'avoir été présent chaque fois que j'en avais besoin. Enfin, je le remercie pour avoir toujours été disponible, dans les bons comme les mauvais moments. Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire (présents et passés) pour leur support, qui m'ont permis de passer un temps inoubliable au laboratoire et au centre de recherche. Je voudrais notamment remercier Nicolas Tétreault pour son soutien sans limite durant le temps passé au laboratoire.

Je remercie aussi le Dr Suzanne Véronneau-Troutman pour son engagement prioritaire à la formation de la relève. La création du fonds de bourse Suzanne Véronneau-Troutman m'a permis d'obtenir un financement pour me donner un support tout au long de mes études.

Finalement, je voudrais remercier tout spécialement mes parents et ma famille pour leur affection et support.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Le chapitre 1 est une revue de la littérature, divisé en 5 sections. La première section décrit le développement du système nerveux central. Cette section illustre aussi la fonction de la famille p53 dans le cerveau. La deuxième section définit les cellules souches neurales. La troisième section résume les caractéristiques et la fonction des gènes *Polycombs*. La quatrième section décrit les processus de sénescence et de vieillissement et leurs principaux effecteurs. La dernière section comprend une description du métabolisme oxydatif, et son implication dans le vieillissement cellulaire.v

1.1 Le système nerveux central

1.1.1 Formation du système nerveux central chez les mammifères

Lors du développement embryonnaire, on retrouve trois feuillets distincts ; l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. L'endoderme va donner naissance aux viscères. Le mésoderme permet la formation des os, du système musculaire squelettique et de la vasculature hématopoïétique. L'ectoderme est à l'origine du système nerveux et de la peau. Plusieurs familles de gènes permettent la régulation des étapes de développement des trois feuillets embryonnaires, tels que la famille des *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β), incluant les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP), *Nodal* et *Wnt* [1]. Après la gastrulation, la région dorsale de l'ectoderme va former le neuroectoderme. Cette portion de l'embryon est appelée la plaque neurale. Les cellules du mésoderme dorsal entourant la plaque neurale vont induire une invagination de celle-ci pour former le tube neural dans un processus appelé neurulation [2]. Le système nerveux central (SNC) complet se développe à partir de la paroi du tube neural. Par la suite, la région antérieure du tube neural se sépare en trois vésicules : le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Le prosencéphale se divise alors en deux régions appelées télencéphale (formant les hémisphères cérébraux, l'hippocampe et les lobes olfactifs) et le diencéphale (formant le thalamus, l'hypothalamus et la rétine) [3]. Le télencéphale se compose de plusieurs couches de cellules superposées. En effet, durant le développement embryonnaire jusqu'après la naissance, la région supérieure, appelée

néocortex (la matière grise), va se diviser en six couches stratifiées de cellules neuronales avec des fonctions, des types cellulaires et des connections synaptiques différentes [3]. La couche de neurones la plus rapprochée de la surface est séparée des méninges par une zone sans neurones, appelée la couche moléculaire (couche 1). Lors de la formation du cortex strié, les zones neuronales inférieures se différencient en premier, suivi des couches supérieures [2]. Cette différenciation neuronale débute durant l'embryogenèse, suivi d'une différenciation des astrocytes lors de la naissance. Les oligodendrocytes sont le dernier type cellulaire à apparaître.

Les neurones peuvent être classifiés dans le cortex de différentes façons, selon le nombre de neurites, la nature de leurs connections, la longueur des axones, le type de neurotransmetteurs, ou la conformation des dendrites. Par exemple, l'analyse de la conformation des dendrites permet de distinguer les neurones stellaires et les neurones pyramidaux. Les neurones stellaires avec une morphologie étoilée possèdent des embranchements plus courts, et sont tous présents dans une même région. Les neurones pyramidaux possèdent des projections plus longues, et permettent d'effectuer des connections synaptiques sur de longues distances [2]. À part les neurones, deux types de cellules gliales sont retrouvées ; soient les astrocytes et les oligodendrocytes. Les astrocytes représentent les fibroblastes du cerveau, et sont activés suite à des lésions cérébrales. Ils sont essentiels à la formation de la barrière hémato-encéphalique. Ils permettent aussi d'éliminer les déchets métaboliques produits par les neurones. Ceux-ci sont présents proche des jonctions synaptiques, empêchant la libération de neurotransmetteurs hors de la fente synaptique. Ces cellules permettent aussi la régulation de la concentration extracellulaire

d'ions pouvant interférer avec l'activité des neurones. Quant aux oligodendrocytes, ils permettent le recouvrement des axones par une couche membranaire, appelée gaine de myéline. Ces cellules sont présentes sur les axones des neurones.

1.1.2 Développement de l'œil

La première structure bien définie de l'œil embryonnaire est une ébauche de la vésicule optique (OV), appelée sulcus optique. Elle origine du tube neural, et est détectée au stade embryonnaire (e) 8.25. À ce stade, elle apparaît comme une invagination du diencephale, partie antérieure de la plaque neurale [4-6]. La OV va s'épandre et progresser vers l'ectoderme de surface (SE) (Figure 1). Au stade e9.5, le contact entre la OV et le SE de l'œil induit la transformation de l'ectoderme en placode cristallinienne (LP), suite à sa prolifération et son épaissement (Figure 1) [4, 7]. Ensuite, la LP induit l'invagination de la OV en cupule optique (CO) au stade e10.0, qui se referme et se sépare du SE [6]. La CO est connectée au diencephale par le *optic stalk*, et elle donnera naissance à la rétine neurale et au nerf optique (Figure 1). Le neuroépithélium environnant donne naissance à l'épithélium rétinien pigmenté (RPE), au *optic stalk* et à la gaine de myéline autour du nerf optique [6].

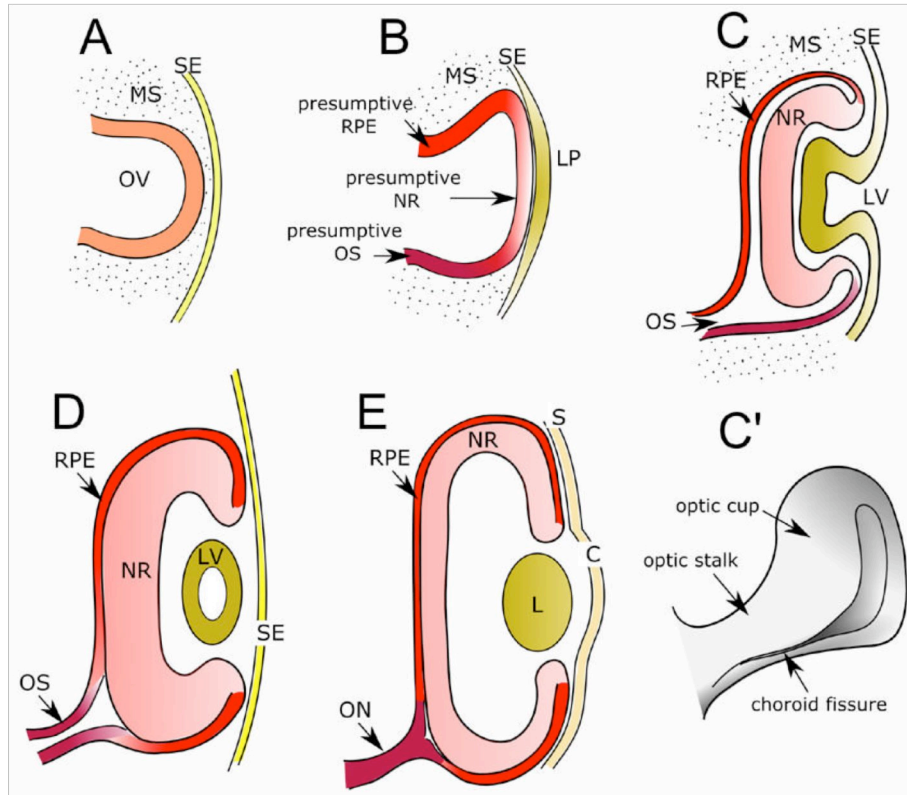


Figure 1 Représentation schématique illustrant le développement de l'œil embryonnaire. La vésicule optique va ultimement donner naissance à la rétine neurale. OV, vésicule optique; SE, ectoderme de surface; LP, placode cristalline; ON, nerf optique; RPE, épithélium rétinien pigmenté. Adapté de Adler R. et Canto-Soler M.V. (2007) *Dev Biol* 305 : 1-13

Ces processus de développement sont contrôlés par plusieurs morphogènes et facteurs de transcription, dont l'expression est régulée dans le temps et l'espace. Les molécules de signalisation impliquées dans le développement de l'œil sont Wnt, TGF β , BMPs, *Sonic Hedgehog* (Shh) et *Fibroblast growth factor* (FGF). Ces molécules apparaissent à différents stades de développement de l'œil [6, 8]. D'autre part, plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation du développement de l'œil. Le facteur *Rx* est exprimé dans la région antérieure du tube neural et est nécessaire pour l'invagination de la vésicule

optique, à la prolifération des cellules de la vésicule optique et à la différenciation cellulaire [9]. Aussi, *Pax6*, un membre de la famille des gènes *paired-box* et *homeobox* (PAX), est exprimé très tôt dans l'ectoderme neural avant la formation de la vésicule optique [9, 10]. Il est considéré comme un régulateur clé du développement de l'œil [10-13]. D'autres facteurs de transcription tel que *Six3*, *Lhx2*, *Six6* sont impliqués dans la spécification du champ visuel [14-18].

Durant la rétino-genèse, la différenciation cellulaire est initiée par la population de progéniteurs multipotents présents dans la couche interne de la cupule optique. Des études proposent que les progéniteurs passent plusieurs degrés de compétence durant lesquels seuls quelques types de cellules postmitotiques peuvent être générés [19]. Une autre théorie stipule que la diversification de la rétine serait effectuée par une production séquentielle et chronologique de plusieurs types cellulaires par les progéniteurs dans un ordre histogénétique défini [20]. De plus, la différenciation cellulaire au niveau de la rétine débute au centre et se poursuit vers la périphérie de la rétine [21]. À partir de e10.5, les progéniteurs rétiniens génèrent les neurones rétiniens dans un ordre conservé dans plusieurs espèces. Les cellules ganglionnaires, amacrines, photorécepteurs de type cône et horizontales se différencient dans les premiers stades. Ensuite, surviennent les neurones bipolaires, les photorécepteurs de type bâtonnets et ultimement les cellules gliales de Müller qui apparaissent après la naissance (Figure 2) [20, 22-24].

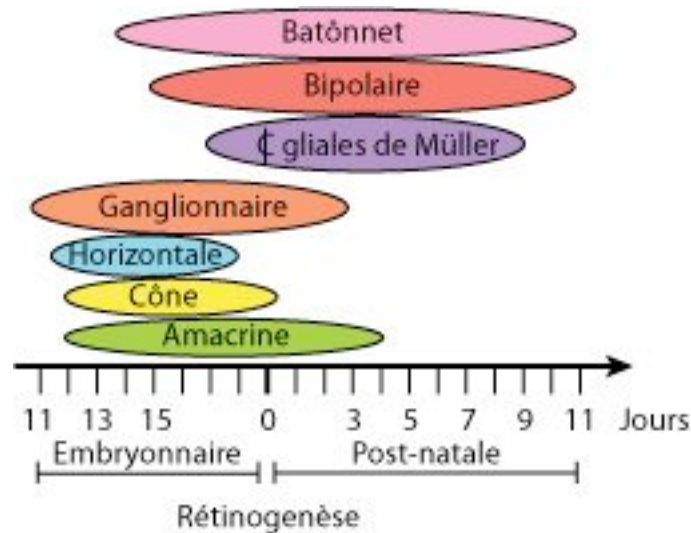


Figure 2 Représentation schématique illustrant l'apparition des différents types cellulaires dans un ordre histogénétique définie lors du développement de la rétine. Adapté de Marquardt T. et Gruss P. (2002) *Trends Neurosci* 25 : 32-8

La production successive de neurones différenciés est supportée par une expansion continue des progéniteurs rétiniens. Plusieurs facteurs sécrétés sont impliqués dans la différenciation des progéniteurs rétiniens. Un de ces facteurs, Shh, permet la progression de la différenciation en initiant d'abord celle des cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC) [25]. Des études de pertes de fonctions ont démontré que le développement rétinien est contrôlé par la combinaison de différents facteurs de transcription *basic helix-loop-helix* (bHLH) et homéobox (Tableau 1) [20, 26]. Par exemple, les gènes *Math5* et *Pax6* sont exprimés dans les progéniteurs des RGC et sont requis pour la formation de ces cellules [27, 28]. La coexpression de *NeuroD/Mash1* et de *Otx2/Crx* peut induire le développement des photorécepteurs [29]. Plus tard dans le développement, les progéniteurs exprimant *Mash1/Math3* avec *Chx10* se différencient en cellules bipolaires [30]. D'autres études démontrent que les répresseurs bHLH peuvent promouvoir la génération des cellules gliales

de Müller à partir des progéniteurs tardifs au dépend de la différenciation neurale [31]. Donc, les facteurs bHLH sont critiques pour la différenciation des différents types cellulaires rétiens à partir des progéniteurs.

Tableau I. Différents facteurs de transcription impliqués dans le développement rétinien

Gene	Group	Cell type
<i>pax6</i>	homeobox	ganglion amacrine horizontal
<i>six3</i>	homeobox	amacrine horizontal
<i>chx10</i>	homeobox	bipolar
<i>prox1</i>	homeobox	amacrine
<i>lim1</i>	homeobox	horizontal
<i>crx</i>	homeobox	cone/rod
<i>otx2</i>	homeobox	cone/rod
<i>rax</i>	homeobox	Müller
<i>math5</i>	bHLH	ganglion
<i>neuroD</i>	bHLH	amacrine cone/rod
<i>math3</i>	bHLH	amacrine bipolar horizontal
<i>mash1</i>	bHLH	bipolar cone/rod
<i>hes1</i>	bHLH	Müller
<i>hes5</i>	bHLH	Müller
<i>hesr2</i>	bHLH	Müller

La rétine adulte possède une structure laminaire (Figure 3). En effet, les couches cellulaires de la rétine sont divisées en plusieurs niveaux. Les segments externes des photorécepteurs sont directement attachés à l'épithélium pigmenté. Les photorécepteurs, de type cônes et bâtonnets, représentent la première couche de cellules. Les cônes possèdent un petit

segment externe, et servent à la vision diurne et à la discrimination des couleurs. Trois types de cônes sont retrouvés dans la rétine. D'autres part, les bâtonnets possèdent un plus long segment externe, qui est cylindrique. Ils sont plus nombreux que les cônes, et sont plus sensibles à la lumière; ils servent à la vision nocturne. Les bâtonnets sont retrouvés au niveau de la rétine périphérique contrairement aux cônes, plus présents au niveau de la rétine central. Lorsque la lumière traverse l'œil, le segment externe des photorécepteurs permet l'absorption de la lumière. Les photorécepteurs vont ensuite permettre sa conversion en potentiel nerveux [2].

La deuxième couche de cellules est la couche de cellules internes. Elle comprend les corps cellulaires des neurones bipolaires, amacrines et horizontales. Les cellules horizontales reçoivent le potentiel nerveux des photorécepteurs, et projettent leurs neurites pour transmettre le signal vers les cellules bipolaires environnantes. Les cellules amacrines reçoivent le signal nerveux des cellules bipolaires et vont activer la couche de cellules la plus interne. Celle-ci représente la couche de cellules ganglionnaires, contenant les corps cellulaires de ces cellules. Ces cellules projettent leurs axones vers le nerf optique, permettant la transmission du signal de la rétine vers la région visuelle du cerveau [2].

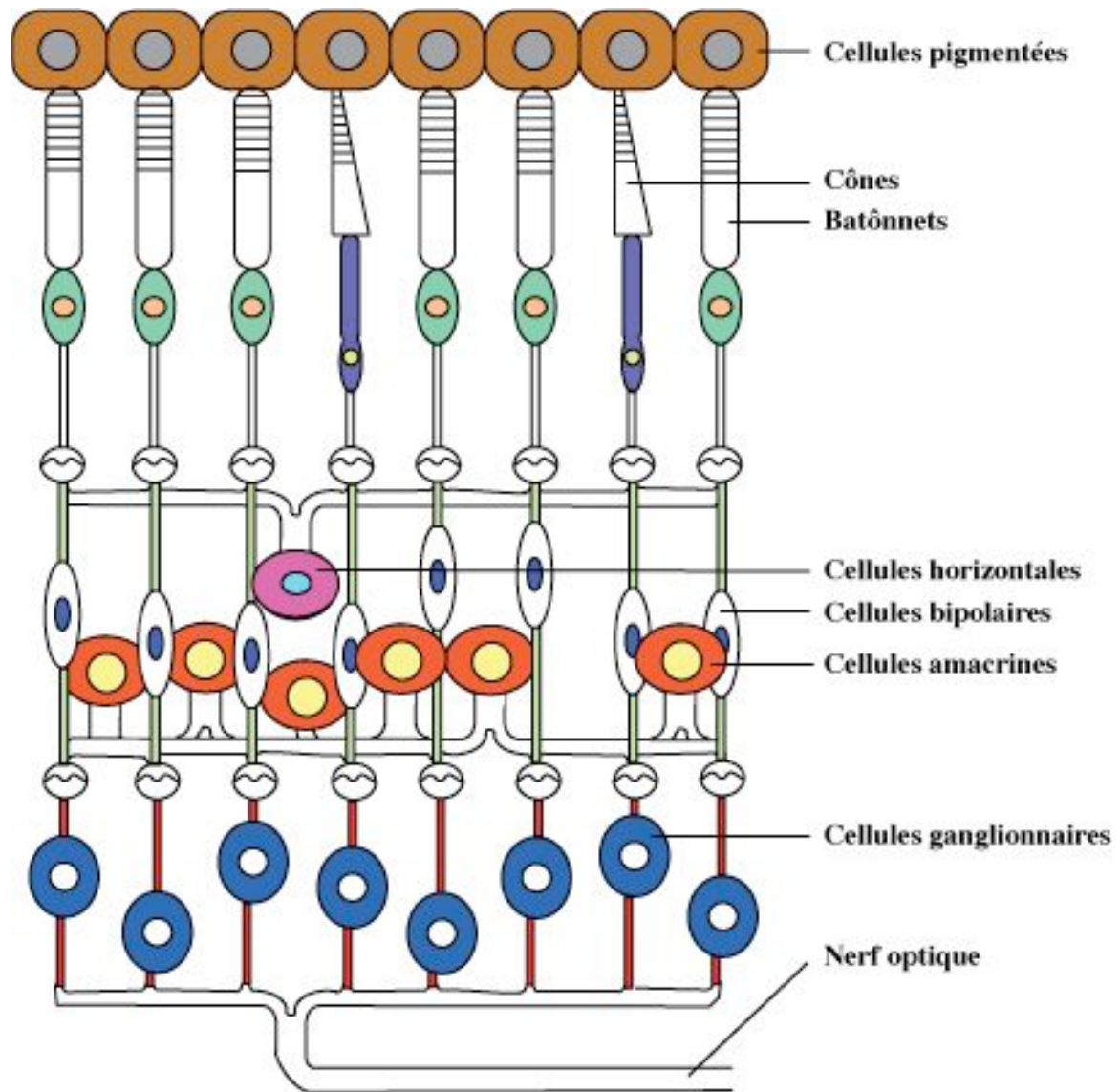


Figure 3 Représentation schématique de la rétine adulte, illustrant les différents types cellulaires présents. Adapté de Livesey F.J. et Cepko C.L. (2001) *Nat Rev Neurosci* 2 : 109-

1.1.3 Rôle de la famille p53 dans les neurones post-mitotiques

La protéine p53 joue un rôle critique dans la biologie de la cellule. Elle a été caractérisée comme une protéine suppresseur de tumeurs, protégeant la cellule contre le cancer. Le gène *p53* est souvent muté ou inactivé dans plusieurs types de cancer [32]. La protéine p53 agit principalement comme facteur de transcription, se liant à des éléments de réponse spécifiques à p53 sur le promoteur de nombreux gènes. Elle peut souvent agir comme activateur ou répresseur pour induire différents effets biologiques [33]. Le réseau p53 peut être activé via trois voies indépendantes. Premièrement, les dommages à l'ADN peuvent activer p53 via des protéines tel que ATM et Chk2. Deuxièmement, p53 peut être activée par des signaux de prolifération aberrante et la réentrée dans le cycle cellulaire, tel que l'expression d'oncogènes comme *Ras* et *Myc*. Troisièmement, il a été rapporté que plusieurs stimuli cytotoxiques ou stressés cellulaires peuvent activer p53 indépendamment d'ATM et Chk2 [34]. Une fois activé, p53 peut ensuite réguler différents processus cellulaires tel que l'apoptose, l'arrêt de la prolifération et la réparation de l'ADN, protégeant ainsi l'organisme contre la formation de tumeurs.

Durant l'induction de l'apoptose, p53 régule l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la régulation de la mort cellulaire via la mitochondrie. Elle active la transcription de gènes pro-apoptotiques comme *Apaf-1*, *PERP*, *Bax* et les protéines BH3, telles que *Noxa* et *Puma* [34, 35]. Elle réprime les gènes anti-apoptotiques comme *Bcl2* et les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) [36]. De récentes évidences indiquent qu'en réponse à un stress cellulaire, p53 est activée, permettant une augmentation des niveaux nucléaires de

celle-ci. p53 permet ensuite l'activation transcriptionnelle de Puma. Cette dernière va ensuite se lier aux gènes anti-apoptotiques *Bcl-xL*, et permet la libération cytosolique de p53. Une fois libérée, p53 active la protéine Bax, qui va perméabiliser la mitochondrie et ainsi permettre le relâchement du cytochrome c pour induire l'apoptose [37]. Cependant, une étude démontre que l'activité pro-apoptotique de p53 dans les neurones corticaux post-mitotiques ne dépend pas d'une action directe dans le cytosol ou la mitochondrie. L'apoptose est induite directement au niveau transcriptionnel par p53 via la protéine Puma [38].

Différents homologues de p53 ont été découverts dans le système nerveux. Les gènes *p63* et *p73* possèdent plusieurs isoformes dû à des épissages alternatifs de la portion C-terminal. Les isoformes entières de *p63* et *p73* (*TAp63* et *TAp73*) contiennent un domaine de transactivation, comme p53, et peuvent transactiver plusieurs gènes cibles de p53. Ils peuvent promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire et induire l'apoptose, via l'activation de *p21*, *Bax*, *Apaf-1*, *PUMA* et *14-3-3 σ* [34, 39, 40]. D'autres part, des isoformes tronqués à l'extrémité N-terminal de p63 et p73 (i.e. sans domaine de transactivation (Δ Np63 et Δ Np73)) agissent comme des dominants négatifs de la famille des protéines p53, et empêchent l'apoptose [41, 42]. Les souris mutantes pour *p63* et *p73* présentent des défauts de développement, et meurent à la naissance ou peu après [40, 42]. Plusieurs études ont démontré que les gènes *p53*, *TAp63* et *TAp73* jouent un rôle clé lors du développement dans le système nerveux central. En effet, ils permettent l'élimination des progéniteurs neuronaux et des neurones post-mitotiques mal différenciés et surnuméraires. p53 et TAp63 jouent aussi un rôle dans la mort des neurones sympathiques lors du développement [43-

45]. Cependant, la protéine issue de l'isoforme tronqué $\Delta Np73$ est une protéine anti-apoptotique, qui inhibe la mort des neurones sympathiques en bloquant l'activité de p53 [41, 42, 46]. $\Delta Np73$ est essentiel dans le développement du SNC et du système nerveux périphérique (SNP). Celle-ci joue un rôle durant la survie des neurones au cours du développement ainsi que dans le maintien des neurones adultes à long terme [47, 48].

1.2 Les cellules souches neurales

1.2.1 Définition et caractéristique d'une cellule souche

Deux caractéristiques essentielles définissent les cellules souches et les distinguent des autres types cellulaires. La première est qu'une cellule souche est une cellule non spécialisée qui se renouvelle pendant de longues périodes par division cellulaire. Cet auto-renouvellement permet à la cellule souche de se répliquer, tout en gardant son potentiel de développement et son potentiel de réplication [49]. La capacité d'auto-renouvellement permet l'expansion du compartiment à cellules souches en réponse à des signaux locaux ou systémiques, aboutissant une prolifération massive et la maintenance d'un pool de cellules non différenciées dans un organe ou un tissu [50]. La deuxième caractéristique est que, sous certaines conditions physiologiques et en réponse à certains stimuli, la cellule souche est capable de générer des progéniteurs aptes à se différencier en cellule spécialisée. Celle-ci possède donc un potentiel de différenciation [51]. Cette définition fut appliquée suite à la découverte des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la moelle osseuse. En effet, ces cellules permettent la reconstitution du compartiment hématopoïétique suite à une irradiation [52]. Ces études de transplantation sériées révèlent que moins de 1% des cellules de la moelle osseuse (soit les CSH) ont la capacité de reconstitution du compartiment hématopoïétique à long terme [53, 54].

Une cellule souche peut s'auto-renouveler grâce à deux modes de divisions : de manière symétrique ou asymétrique. Dans la division symétrique, la cellule souche peut donner

naissance à deux cellules souches identiques, permettant une augmentation du pool de cellules souches. La cellule souche peut aussi donner naissance à deux cellules progénitrices, provoquant une déplétion du pool. Dans la division asymétrique, une cellule souche donne naissance à une cellule fille identique à la cellule mère et un progéniteur destiné à la différenciation (Figure 4) [51].

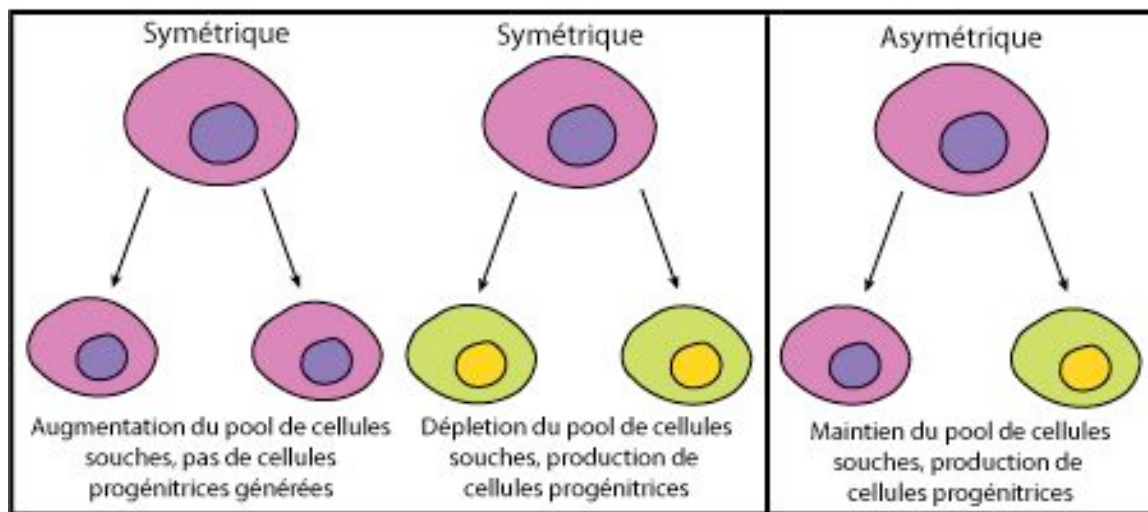


Figure 4 Représentation schématique illustrant les deux modes de division d'une cellule souche; soit symétrique ou asymétrique. Adapté de Molofsky A.V., Pardal R. et Morrison S.J. (2004) *Curr Opin Cell Biol* 16 : 700-7

Selon le stade de développement, les cellules souches acquièrent différents potentiels de différenciation. Un ovocyte fécondé par un spermatozoïde permet la formation du zygote, qui est totipotent. Une cellule totipotente est une cellule capable de former à elle seule un embryon [55]. Les cellules provenant de la masse interne du blastocyste sont appelées cellules souches pluripotentes étant donné leur capacité de générer tous les feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme), sauf le trophoblaste extra-embryonnaire [55]. Certaines cellules sont dites multipotentes, car elles peuvent produire

différents types cellulaires généralement dans un même organe; c'est le cas des CSH et des cellules souches neurales (CSN). Ces cellules souches dites somatiques sont présentes aux stades embryonnaires et adultes. Au stade adulte, ces cellules servent à réparer les tissus lésés, malades ou vieillissants, et ainsi maintenir l'homéostasie des tissus. D'autres types de cellules souches sont considérés comme unipotents, car ils ne produisent qu'un seul type cellulaire.

1.2.2 Origine des cellules souches neurales

Dans le système nerveux central des mammifères, avant la neurogenèse, la plaque neural et le tube neural sont formés d'une simple couche de cellules neuroépithéliales (NE), formant le neuroépithélium. Ces cellules expriment des protéines transmembranaires, tel que Prominin-1 (CD133) [51, 56]. Avec la formation de neurones, le neuroépithélium se transforme en tissu avec plusieurs couches stratifiées. Dans le télencéphale embryonnaire, les cellules NE vont donner naissance à la glie radiale. Elle représente la population de progéniteurs primitifs donnant ultimement naissance aux cellules souches adultes. Lors du développement embryonnaire, les cellules de la glie radiale de la zone ventriculaire vont se différencier en progéniteurs intermédiaires, et générer un nombre limité de neurones et d'astrocytes (exprimant notamment BLBP) (Figure 5). De plus, les cellules NE ou de la glie radiale peuvent directement générer des neurones, ou produire des progéniteurs intermédiaires, qui vont ensuite se différencier [51, 56, 57]. Les CSN, stimulées par le FGF, commencent à apparaître *in vivo* au jour embryonnaire 8.5 chez la souris [58, 59]. Au cours

du développement, le FGF va stimuler l'expression du récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGF). La population de CSN devient alors sensible à l'EGF. Cette population apparaît entre les jours embryonnaires 11 et 13 [60].

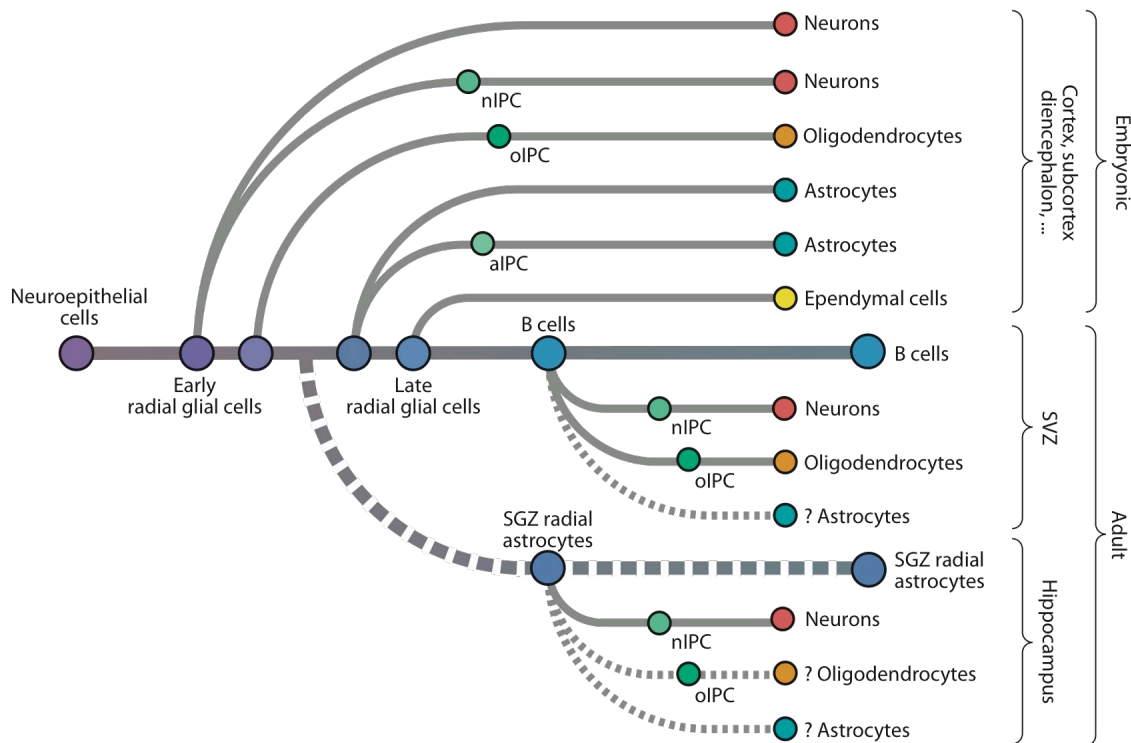


Figure 5 Représentation schématique illustrant la formation des différents types cellulaires lors du développement dans le cerveau chez les mammifères. Tiré de Kriegstein A. et Alvarez-Buylla A. (2009) *Annu Rev Neurosci* 32 : 149-84

L'existence des CSN multipotentes dans le cerveau de mammifères adultes fut démontrée par l'étude de Reynolds *et al* [61]. Dans cette étude, des cellules prélevées dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) possédaient des propriétés de cellules souches *in vitro* (multipotence et auto-renouvellement). Les CSN sont présentes dans le cerveau en développement et persistent dans certaines régions du cerveau après la naissance. Ces

cellules sont ensuite maintenues au stade adulte, dans deux niches différentes : la SVZ au niveau des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire (SGZ) au niveau de l'hippocampe [62]. Dans la SVZ, trois populations de cellules, incluant les CSN adultes, se retrouvent de manière adjacente à la paroi du ventricule latérale. Les CSN, appelées cellules B, restent quiescentes et expriment des marqueurs de la glie radiale ainsi que le marqueur des astrocytes (GFAP). Ces cellules vont donner naissance aux cellules amplificatrices transitoires (cellules C) ayant un cycle de division plus rapide et qui n'expriment pas la GFAP. La troisième population de cellules représente les neuroblastes, qui vont migrer via la voie de migration rostrale (*rostral migratory stream*) jusqu'au bulbe olfactif. Les neuroblastes vont ensuite donner naissance à des interneurons essentiels au maintien du bulbe olfactif [62, 63]. La SGZ de l'hippocampe contient deux types de CSN, qui expriment le marqueur *Sox2* [64, 65]. Le premier type de SCN exprime aussi GFAP et est quiescent. Le deuxième type se divise plus fréquemment, et n'exprime pas GFAP. Ces cellules vont donner naissance à des neuroblastes, qui migrent vers la couche de cellule granulaire adjacente pour former des neurones [64, 65].

Les CSN furent isolées initialement par la mise en culture de la zone periventriculaire et les tissus environnants [61]. En effet, les CSN peuvent être cultivées en monocouche ou en suspension sous forme de colonies flottantes, appelées neurosphères [66]. La culture de neurosphères représente depuis, la méthode la plus populaire pour isoler les CSN. Dans cette technique, les cellules isolées de façon mécanique et enzymatique sont placées dans un environnement en suspension en présence de mitogènes, tel que le FGF et le EGF. Après quelques jours, les cellules souches génèrent de manière clonale des neurosphères. La

dissociation clonale de chaque sphère permet la génération de plusieurs neurosphères secondaires. D'autre part, les neurosphères placées dans un environnement propice peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires neurales, démontrant la multipotence des colonies [67]. Cependant, la culture *in vitro* de neurosphères ne permet pas d'indiquer si chaque sphère résulte de la prolifération d'une CSN [68, 69]. En effet, certaines études démontrent que les cellules générant des neurosphères en culture peuvent représenter aussi bien des CSN que des progéniteurs; les conditions de culture peuvent aussi favoriser la prolifération des progéniteurs. La discrimination des CSN et des progéniteurs doit être effectuée selon la taille des colonies formées, le nombre de passage et la multipotence de ces colonies [68].

1.2.3 Maintien du potentiel de cellules souches neurales par différents facteurs

Plusieurs voies sont responsables de la régulation de l'auto-renouvellement des CSN chez les mammifères. La voie Wnt canonique promeut l'identité des cellules neuroépithéliales et de la glie radiale. En effet, la diminution des niveaux du ligand Wnt ou de β -caténine provoque une réduction des cellules NE/glie radiales et favorisent la différenciation neuronale [70, 71]. L'augmentation de la voie Wnt va promouvoir l'expansion du pool des CSN, même durant la neurogenèse post-natale [72]. Cette voie peut aussi permettre la prolifération des progéniteurs neuraux plus différenciés [73]. En outre, les composés de la voie de signalisation Notch sont exprimés dans les cellules souches NE et la glie radiale, ainsi que dans les CSN adultes [74, 75]. Des mutations dans les composants de la voie

Notch, tel que le ligand Dll1, le récepteur Notch1, l'effecteur RBPJK ou les facteurs de transcription Hes, provoquent une déplétion des cellules souches de la glie radiale, une neurogenèse prématurée chez l'embryon, ainsi qu'une déplétion des CSN chez l'adulte [74, 76, 77]. De plus, les cellules souches de la glie radiale mutantes pour Dll1, Notch1, RBPJK, Hes1 et Hes 5 présentent un potentiel de prolifération et d'auto-renouvellement réduits [78-80]. Ainsi, la voie de signalisation Notch est requise pour la maintenance des cellules souches au stade embryonnaire et adulte. D'autres part, les composantes de la voie Shh, incluant le ligand Shh, la protéine transmembranaire Smoothed (Smo) et les effecteurs Gli2/3, sont exprimées dans le neuroépithélium chez l'embryon et dans les différentes régions qui sont le siège de la neurogenèse chez l'adulte. En effet, des études démontrent que cette voie est nécessaire pour la maintenance des CSN embryonnaires et post-natales [81, 82]. D'autres gènes sont aussi requis pour le maintien des CSN, tel que le groupe de gène *Polycomb* qui est essentiel à la régulation épigénétique de la biologie des cellules souches. Ces gènes répriment la transcription en régulant la structure de la chromatine [49]. La fonction des Polycombs dans la prolifération des cellules souches sera discutée plus loin. De son côté, la famille des facteurs de transcription SoxB1 (Sox1,2,3), appelée *High mobility group DNA binding protein*, joue un rôle dans le maintien de l'état non-différencié de certains types de cellules souches. Ces protéines sont exprimées dans les CSN embryonnaires et adultes. À titre d'exemple, une réduction du niveau de SoxB1 provoque une différenciation neuronale précoce et la déplétion du pool des progéniteurs [83, 84]. Le gène *Sox2* est exprimé dans les cellules ES et dans les CSN embryonnaires, et est nécessaire pour la maintenance de ces cellules [85, 86]. De plus, la surexpression de *Sox2* inhibe la différenciation neuronale des CSN et leurs permet de garder leurs états

indifférenciées [86]. Ces facteurs de transcription empêchent la différenciation neuronale en bloquant la fonction des gènes proneuraux *Mash1*, et *Neurogenin1* et 2 [87, 88]. Les gènes *Musashi 1* et 2 représentent d'autres marqueurs des CSN. Ils expriment des protéines de liaison à l'ARN, qui sont exprimées dans les cellules NE dans la zone ventriculaire chez l'embryon et l'adulte [89, 90]. Des études récentes ont réussi l'isolement de CSN et leur identification par FACS en utilisant des marqueurs de surface, tel que *Stage-specific embryonic antigen 1* (SSEA1/LexA) et Prominin-1/CD133 [91]. SSEA1 est une protéine exprimée par les cellules ES, et les cellules de la SVZ. Des analyses par FACS démontrent que 4% des cellules sont positifs pour SSEA1 dans la SVZ. Dans cette sous-population purifiée par FACS, on retrouve les cellules souches de la SVZ [91]. Une autre étude démontre que le marqueur Prominin-1 peut être utilisé pour identifier et isoler les CSN murines et humaines dans le cerveau en développement ou adulte [92]. Il est co-exprimé avec des marqueurs de cellules souches tel que *Sox1-2*, *Musashi* et *Nestin*. De plus, les cellules capables de générer des neurosphères avec des capacités de multipotence et d'auto-renouvellement se retrouvent dans la fraction Prominin-1 positive [91]. Cependant, ces marqueurs peuvent être présents sur plusieurs autres types cellulaires [92, 93].

1.2.4 Cellules souches rétiniennes

Plusieurs études ont démontré que les différents types cellulaires de la rétine dérivent d'une population unique de progéniteurs multipotents, qui pourraient être similaires aux cellules NE dans le télencéphale embryonnaire [94, 95]. L'étude de Duparc *et al* démontre que la vésicule optique possède une population de progéniteurs NE immatures avec des caractéristiques de cellules souches *in vitro* [96]. Ces cellules démontrent un haut potentiel de prolifération à long terme, une capacité de multipotence (généralisant tous les types cellulaires de la rétine) et exprimant des marqueurs de cellules NE et de cellules rétiniennes [96]. Comme c'est le cas de la SVZ dans le SNC en développement, la rétine en développement contient deux types de progéniteurs [45]. La première consisterait en des progéniteurs immatures avec des caractéristiques de cellules souches. Elles sont localisées dans zone marginale ciliaire (ZMC) en périphérie de la rétine. La deuxième représenterait des progéniteurs plus différenciés et est localisée dans la rétine centrale. Cette dernière population est capable d'effectuer un nombre limité de divisions cellulaires et de donner naissance aux cellules neuronales et gliales [97]. Une étude récente démontre que dans la rétine en développement, l'utilisation du marqueur SSEA1 permet de distinguer ces deux populations de progéniteurs [97]. SSEA1 est exprimé dans les progéniteurs immatures localisés dans la ZMC au niveau de la rétine périphérique. Cependant, les progéniteurs Ki67+ présents au niveau de la rétine central n'expriment pas SSEA1 [98]. Une autre étude démontre l'existence de deux populations distinctes de progéniteurs rétiniens en fonction de leur dépendance pour Pax6 [99]. Les progéniteurs immatures expriment aussi d'autres

facteurs de transcription, tels que *Rx1*, *Six3*, *Six6* et *Lhx2* durant la rétino-genèse [100-102]. Ces gènes sont requis pour conférer et maintenir l'identité des progéniteurs rétiniens [45].

Lors des stades plus avancés du développement chez les amphibiens et le poisson, la rétine croît grâce à des vagues de prolifération des progéniteurs localisées dans la ZMC, et de différenciation margino-centrales [103]. Chez les vertébrés supérieurs, les progéniteurs immatures se retrouvent aussi dans la ZMC, mais sont dépourvus de pouvoirs de régénération au stade adulte. Certaines évidences ont démontré que ces progéniteurs immatures se retrouvent au niveau du corps ciliaire dans la rétine adulte chez les mammifères [104-106]. Des molécules intrinsèques et extrinsèques permettent le maintien de ces cellules à la périphérie de la rétine adulte [107]. La voie de signalisation Wnt a été proposée pour agir comme facteur extrinsèque dans la rétine aviaire et garder les progéniteurs immatures dans la marge de la rétine [108, 109]. Dans la rétine adulte, un autre type cellulaire peut aussi agir comme cellules souches rétiniennes. En effet, les cellules gliales de Müller représentent la glie radiale de la rétine et sont requises pour le maintien de la structure rétinienne [110]. Celles-ci peuvent proliférer après un dommage et exprimer des marqueurs rétiniens [111]. Dans la rétine de poisson, les cellules gliales de Müller peuvent proliférer à faible fréquence dans la rétine intacte. De plus, ces cellules peuvent générer des progéniteurs au stade post-embryonnaire, qui sont capables de générer des photorécepteurs suite à la perte de neurones [112].

1.3 Les gènes *Polycombs* : régulateurs épigénétiques

1.3.1 Définition et conservation lors de l'évolution

Le contrôle de l'identité cellulaire durant le développement est régit en grande partie grâce à l'expression unique des gènes homéotiques (*HOM-C* chez la Drosophile et *Hox* chez la souris). Cette identité cellulaire est assurée par l'expression temporelle et spatiale de ces gènes sur l'axe antéro-postérieur (A/P) chez l'embryon, permettant la segmentation et l'identité axiale. L'expression de ces gènes est effectuée en fonction de leurs positions chromosomiques (3' vers 5'). Chez la Drosophile, ces facteurs de transcription à homéodomaine sont regroupés en complexes Bithorax (BX-C) et Antennapedia (ANT-C) [113]. Des mutations dans ces gènes causent des anomalies développementales dans la segmentation A/P [114]. Deux groupes de gènes, les *Polycombs* (PcG) et les *Trithorax* (TrxG), ont été découverts chez la Drosophile agissant respectivement comme répresseurs et activateurs des gènes *HOM-C* [115-117]. Ces gènes sont requis pour le maintien de l'état d'expression des gènes *HOM-C*, suite à la disparition des régulateurs de transcriptions initiaux. Des mutations dans les *TrxG* ou *PcG* provoquent un déplacement anormal de l'expression des gènes *HOM-C* altérant l'identité cellulaire lors de la segmentation [118, 119].

Les PcG régulent l'expression génétique en formant de larges complexes multimériques de 2-5 MDa à certains sites chromosomiques spécifiques (Tableau II) [120, 121]. Durant les années 1980, la recherche sur les PcG était basée sur les interactions génétiques chez la

Drosophile. Cependant, l'identité de la plupart des PcG restait inconnue, Au début des années 1990, les premiers composants des complexes PcG furent identifiés avec notamment *Pc* (Polycomb), *Ph* (Polyhomeotic) et *Psc* (Posterior sex combs). Il fut démontré que ces trois protéines PcG interagissaient ensemble et faisaient partie d'un large complexe multimérique [122-124]. Pour la plupart des gènes *PcG* de la Drosophile, leurs fonctions semblent être conservées lors de l'évolution. La protéine M33, un homologue murin de la protéine *Pc* chez la Drosophile, représente un exemple parfait. Celle-ci peut largement restaurer le phénotype des mouches mutées pour *Pc* lorsqu'introduite dans leur génome [124]. Les gènes PcG chez les mammifères ne possèdent pas la même homologie de séquence que la Drosophile. Cependant, leur classification est basée principalement sur les domaines conservés lors de l'évolution (Tableau II). Ils représentent des analogues fonctionnels des gènes *PcG* de la Drosophile.

L'expression des gènes *Hox* est dérégulée par à l'absence de répression par les *PcG*, causant un changement dans l'identité de certains segments de l'embryon. Les souris homozygotes mutantes pour un gène des *PcG* (*Bmi1*, *Mel-18*, *M33*, *Ring1B*, *Mph1/Rae28*) présentent des transformations homéotiques du squelette axial qui sont associées à une expression ectopique des gènes *Hox* [125, 126]. En l'occurrence, les souris *Bmi1*^{-/-} et *Mel-18*^{-/-} démontrent une transformation postérieure du squelette corrélée avec un *shift* antérieur ou rostral de l'expression de certains *Hox* (*Hoxc5* et *Hoxc8*) [127, 128]. De plus, des souris transgéniques surexprimant *Bmi1* montrent une transformation antérieure du squelette axial de manière dose-dépendant, ainsi qu'un *shift* caudal de la région d'expression antérieur des gènes *Hoxc5* et *Hoxc8* [129]. Chez les mammifères, la présence de plusieurs homologues

pour chaque PcG de *Drosophila* explique les phénotypes moins pénétrants des souris mutantes pour chaque gène (Tableau II). Cependant, une redondance fonctionnelle des PcG chez les mammifères pourrait expliquer ce phénomène. De plus, tous les gènes *HOM-C* sont affectés chez les mouches mutantes pour les PcG, contrairement aux souris, où quelques gènes *Hox* sont dérégulés pour une mutation *PcG* [130, 131]. Les niveaux d'expression des *PcG* chez les mammifères varient selon le type cellulaire ou les tissus. Cela suggère que la composition des complexes *PcG* chez les mammifères varie entre les différents types cellulaires ou les différents tissus [132, 133]. Même si l'absence de PcG chez les mammifères cause des anomalies squelettiques et des défauts hématopoïétiques, d'autres problèmes spécifiques ont été observés chez ces mutants. Les souris *Bmi1*^{-/-} ont des défauts au niveau du cervelet, les souris *Mel-18*^{-/-} montrent une atrophie des muscles lisses, et les souris *Mph*^{-/-} ont un défaut au niveau de la crête neurale [127, 128, 134].

Tableau II. Membres des complexes PcG chez la *Drosophila* et l'Homme

PcG paralogs in <i>Drosophila</i> and Humans				
<i>Drosophila</i> paralogs	Human paralogs	Complex	Protein domains	Biochemical activity
PC	HPC1 HPC2 HPC3	PRC1	Chromodomain	Binds to H3K27me3
PHD PHP	HPH1 HPH2 HPH3	PRC1	SAM	?
PSC SU(Z)2 dRING	BMI1 MEL18 RING1B RING1A	PRC1	RING	Co-factor for dRING E3 ubiquitin ligase for H2AK119
SCM	SCMH1 SCMH2	PRC1?	SAM, MBT, Zn-finger	?
E(Z) ESC ESCL SU(Z)12 PCL PHO PHOL CG16975 (dSFMBT)	EZH2 EZH1 Eed SUZ12 PHF1 YY1 YY2 SFMBT1	PRC2	SET WD40	Methylation of H3K9, H3K27 Co-factor for E(Z)
		PRC2	PHD, Tudor Zn-finger	?
		PhoRC		DNA binding
		PhoRC	MBT, SAM	Binds to monomethyl and dimethyl H3K9, H4K20

1.3.2 Groupes et membres des *PcG* chez la drosophile et les mammifères

Les évidences montrant l'existence de larges complexes multimériques des protéines PcG ont été obtenues à partir d'essais d'immunoprécipitation, de doubles hybrides (*yeast two-hybrid*) et d'expériences de fractionnement chez la Drosophile et chez les mammifères [120, 121, 135, 136]. Au moins deux types distincts de complexes PcG (PRC2 et PRC1), avec des propriétés et fonctions différentes, ont été isolés chez la Drosophile et les mammifères (Tableau II) [115-117, 123, 137, 138]. Chez la Drosophile, un troisième complexe, le complexe répressif Pho (PhoRC), a aussi été caractérisé [116, 138]. Les trois complexes contiennent plusieurs sous-unités codées par les gènes *PcG* qui sont essentiels à la répression des gènes *Hox*. Le noyau du complexe PRC2 chez la Drosophile, d'approximativement 600-kDa, contient trois protéines PcG : E(z) (*Enhancer of zeste*), Su(z) 12 (*Suppressor of zeste 12*) et Esc (*Extra sex combs*), ainsi que la protéine Nurf55. Cette dernière est une protéine de liaison des histones, qui est aussi associée au facteur d'assemblage de la chromatine CAF1 et à d'autres complexes d'assemblages de la chromatine [139, 140]. La sous-unité non-catalytique Su(z) est essentielle pour la liaison au nucléosome, tandis que Esc est cruciale pour augmenter l'efficacité de l'activité de E(z) dans le complexe [141, 142]. Le complexe PRC2 possède une fonction d'histone méthyltransférase (HMTase) [115-117]. En effet, E(z), l'unité catalytique du complexe, permet la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me³) [143]. Cependant, cette protéine ne possède aucune activité lorsqu'elle se retrouve seule [144, 145]. *In vivo*, la triméthylation de H3K27 est une caractéristique des gènes cibles des *PcG*. E(z) est aussi responsable de la mono- et la diméthylation de H3K27 sur plus de 50% du génome chez la

Drosophile [146]. Si la triméthylation de H3K27 est reconnue spécifiquement par le chromodomaine de la protéine Pc, le rôle des mono- et diméthylation reste inconnu. La perte de E(z) ou Esc peut provoquer une diminution de la mono-, la di- et la triméthylation, indiquant que seules ces protéines possèdent une activité K27 méthyltransférase. Chez l'Homme, le complexe PRC2 a été purifié dans les cellules HeLa et contient les protéines Eed, Ezh2, Su(Z)12 et RbAp46/RbAp48 [143, 147]. Comme chez tous les mammifères, la perte de Ezh2 (homologue de E(z)) élimine seulement la di- et la triméthylation, démontrant que la monométhylation peut être effectuée par un autre complexe. Cependant, la protéine Eed est absolument requise, car la perte de celle-ci empêche les trois formes de méthylation [148-150]. *In vitro*, le complexe PRC2 peut aussi méthyler H3K9 [144, 148]. Chez la Drosophile, un complexe PRC2 contenant la protéine Sir2, histone déacétylase NAD⁺-dépendante, a aussi été isolé dans les stades de développement plus tardifs [151]. Chez les mammifères, des complexes PRC2, PRC3 et PRC4 ont été biochimiquement caractérisés. Ceux-ci diffèrent entre eux par la présence de différents isoformes de Eed (homologue de Esc) [152, 153]. En présence de l'histone H1, PRC2 permet la méthylation de H1K26. Le groupe PRC4, lui s'accumule lorsque Ezh2 est surexprimé en culture. Ce complexe contient un isoforme de Eed retrouvé uniquement dans les cellules ES, ainsi que la protéine Sirt1, homologue de Sir2 [117].

Chez la Drosophile, le complexe PRC1 (de 3-MDa) est composé d'un noyau de quatre protéines, soit Pc, Psc, Ph et dRing (Tableau II) [138, 149]. La protéine *Sex comb on midleg* (Scm) est aussi retrouvée bien qu'en plus petite quantité. Plusieurs autres protéines ont aussi été co-purifiées avec les protéines composant le noyau du PRC1, incluant Pipsqueak

(Psq), Zeste, *TBP (TATA-box binding protein)-associated factors* TAFII250, TAFII110, TAFII85, TAFII62, ainsi que des éléments d'autres complexes multiprotéiques tel que Mi2, Sin3A, SMRTER [154, 155]. Le complexe PRC1 a été isolé à partir des cellules HeLa, confirmant que les quatre protéines du PRC1 retrouvées chez la Drosophile sont aussi présentes chez les mammifères [156]. Chez la souris et l'Homme, plusieurs protéines du PRC1 (de 1-MDa) possèdent des homologues avec des fonctions alternatifs sur différents gènes cibles ou dans différents tissus. Plusieurs protéines ont été purifiées, incluant Hpc1, Hpc2, Hpc3, Hph1, Hph2, Hph3, Ring1A, Ring1B, Bmi1 et Mel-18 [117, 121, 131]. Une deuxième modification d'histone effectuée par les complexes *PcG* est l'ubiquitylation de l'histone H2A sur la lysine 119. Celle-ci est effectuée par la fonction E3 ubiquitin ligase de la protéine dRing (Ring1A ou Ring1B chez les mammifères) [149, 157]. La présence de Bmi1 (protéine avec un domaine RING) augmente l'activité catalytique de Ring1A et Ring1B [158-160]. Une mutation dans Ring1B cause une perte de l'ubiquitylation de H2A, et aussi une perte de l'activité de répression même en présence de la triméthylation H3K27 [160, 161].

Récemment, un troisième complexe *PcG*, appelée *Pho repressive complex (PhoRC)*, impliqué dans la répression des gènes *HOM-C* a été identifié [123, 162]. Ce complexe comprend la protéine de liaison à l'ADN Pleiohomeotique (Pho) et la protéine dSfmbt. Ce complexe est complètement distinct de PRC1 et PRC2 d'un point de vue biochimique (en étant le seul pouvant se lier directement à l'ADN), même si ceux-ci interagissent ensemble chez la Drosophile et les mammifères [156, 163]. L'homologue de Pho chez les mammifères est la protéine Yin-Yang 1 (YY1). Une étude a démontré que Pho peut

s'associer avec le complexe de remodelage INO80 [162]. Les répétitions MBT retrouvées sur la protéine dSfmbt se lient de manière sélective aux histones H3 et H4 monométhylées ou diméthylés (H3K9 ou H4K20) [162]. Ce complexe combine ainsi une activité de liaison à l'ADN séquence-spécifique (par Pho) à une activité de liaison aux histones méthylés (par dSfmbt).

1.3.3 Mécanismes d'action épigénétique des *PcG* pour maintenir la répression des gènes

Plusieurs études chez la drosophile ont démontré que le recrutement des PcG au niveau des gènes cibles se faisait par des séquences régulatrices en *cis*, soit plusieurs centaines de paires de bases, appelées *Polycomb Response Elements* (PRE). Les PRE servent de plateformes de recrutement pour les trois complexes de PcG et permettent la répression induite par ceux-ci sur les gènes cibles (Figure 6). Des analyses d'immunoprécipitation sur des cellules en culture et chez des embryons de Drosophile montrent que Pc et les autres sous-unités de PRC1 sont hautement enrichies sur les PRE [115-117]. Ce recrutement nécessite des protéines de liaison à l'ADN, qui interagissent directement avec elle, et facilitent la liaison des PcG (Figure 6). Le complexe PhoRC peut agir comme recruteur des complexes PRC2 et PRC1 aux PRE. En effet, Pho peut se lier sur différents PRE [162]. De plus, des mutations dans les séquences de liaison de Pho sur les PRE empêchent grandement leur capacité de répression.

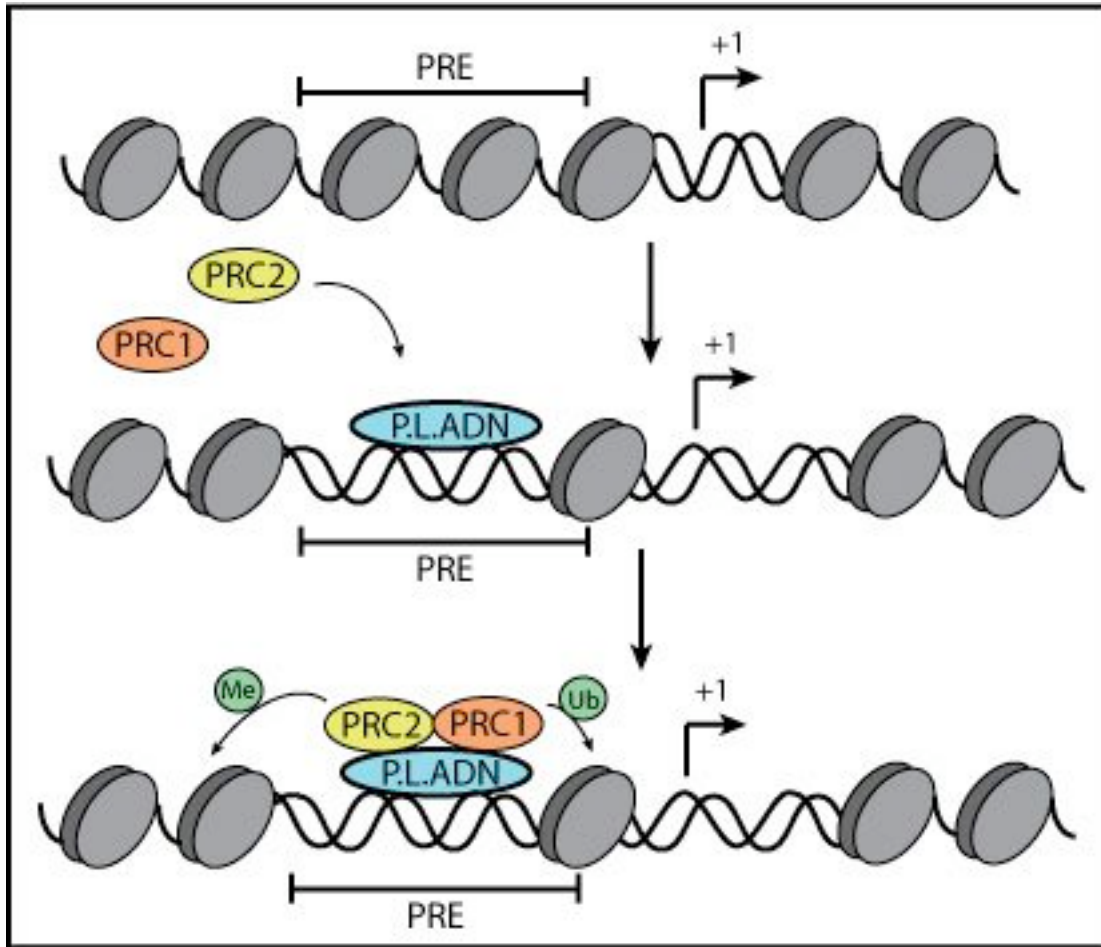


Figure 6 Représentation schématique illustrant le recrutement des complexes PcG (PRC2 et PRC1) aux gènes cibles par les séquences régulatrices PRE. Ce recrutement est facilité par des protéines de liaison à l'ADN (P.L.ADN). Adapté de Schuettengruber B. et al (2007) *Cell* 128 : 735-45

D'autres protéines de liaison à l'ADN chez la Drosophile pouvant interagir avec les PcG ont été découvertes; Zeste, GAGA factor (GAF), Psq, DSP-1, Grainyhead (Grh), et des membres de la famille Sp1/KLF [116, 117]. Pour plusieurs de ces gènes, les mutations homozygotes n'engendrent aucun phénotype similaire aux mutations des *PcG*. La fonction de ces protéines reste encore énigmatique. En l'occurrence, les mutants homozygotes pour *Zeste* ou *Dsp1* sont viables et fertiles, mais ne montrent aucune dérégulation dans

l'expression des gènes *HOM-C* [164, 165]. Chez les vertébrés, le recrutement des PcG est mal caractérisé [149]. En effet, les facteurs de liaison à l'ADN impliqués dans le recrutement des PcG, soit GAF, Psq et Zeste ne sont pas conservés chez les vertébrés. Des petits ARNs ou la machinerie des ARNi pourraient être impliqués dans le recrutement des PcG [166]. Aussi, une séquence PRE, dite PRE-*kr*, recrute les complexes PRC1 et PRC2 dans les cellules F9 de souris et permet la répression de l'expression des gènes cibles [167].

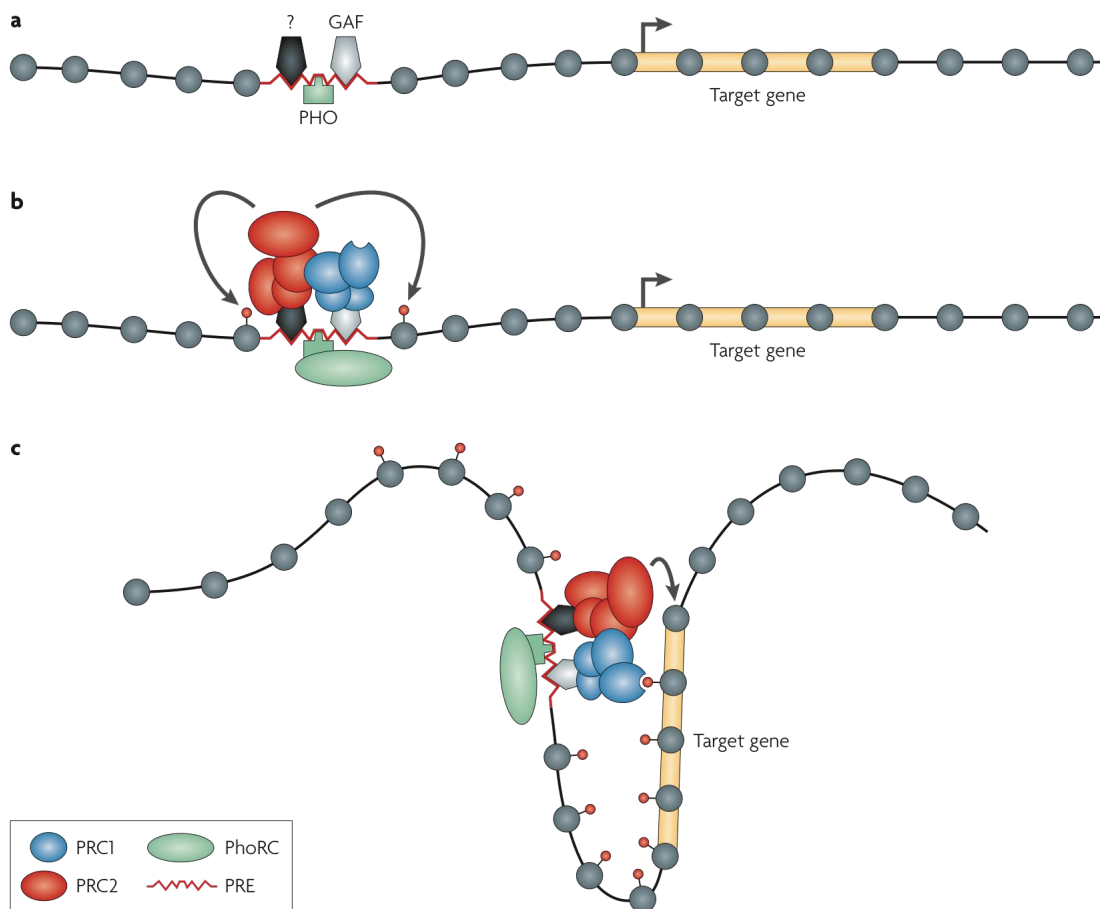


Figure 7 Représentation schématique illustrant un exemple de mécanisme de répression induit par les PcG suite à leur liaison sur la chromatine. Après leur recrutement, les PcG provoquent la méthylation de H3K27 sur les PRE et les régions environnantes. Tiré de Schwartz Y.B. et Pirota V. (2007) *Nat Rev Genet* 8 : 9-22

Plusieurs mécanismes épigénétiques de répression des gènes par les PcG ont été élaborés. Le mécanisme le plus accepté débute par la liaison des protéines Pho et GAF sur les séquences PRE dans une région sans nucléosome (Figure 7) [168]. Le recrutement de PRC2 et PRC1 va permettre la méthylation de H3K27 et la monoubiquitination de H2A sur les régions (avec nucléosome) flanquant les PRE. Étant proche du promoteur, ces modifications d'histones vont interférer avec les complexes de remodelages de la chromatine, tel le complexe ATP-dépendant SWI/SNF et le recrutement de la PolIII (figure 7). La présence des complexes PcG proche du promoteur va ainsi empêcher le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Dans certains cas, où les PRE sont éloignés du promoteur, l'ADN couplé aux complexes PcG forme une boucle et ainsi entre en contact avec des nucléosomes plus éloignés pour provoquer la répression sur une plus grande distance (figure 7) [149, 169]. Ces interactions permettent de disperser la méthylation des histones sur de grandes régions loin des PRE. Un autre mécanisme de répression par les PcG serait la compaction de la chromatine au niveau des gènes cibles, empêchant ainsi l'accès à l'ADN des facteurs de transcription. En effet, le noyau du PRC1 pourrait induire la compaction d'un groupe de nucléosome, suggérant un mode de répression [170]. Cependant, des preuves *in vivo* de ce mécanisme n'ont pas été rapportés.

Une caractéristique de la marque H3K27me³ est qu'elle est distribuée sur de larges domaines chromosomiques (plusieurs centaines de paires de base). Ainsi, suite à la dissociation des PcG de leurs cibles durant la réplication de l'ADN ou la mitose, ceux-ci peuvent accéder rapidement à la chromatine initialement réprimée, via des interactions spécifiques avec les séquences PRE sur l'ADN et la marque H3K27me³ [116, 171, 172].

Cet événement représente la base de la transmission épigénétique par les PcG durant la division cellulaire.

Le complexe PRC2 est conservé chez tous les eucaryotes (déjà mentionné plus haut), incluant les organismes n'ayant pas de complexe PRC1. Chez les plantes, un homologue de *E(z)* est responsable de la distribution de la marque H3K27me³ sur de larges séquences de part et d'autres des gènes cibles, permettant leur répression [173]. Le mécanisme de répression demeure inconnu. Cependant, une possibilité serait que la fonction du PRC1 soit remplacée par d'autres facteurs. La protéine *Like heterochromatin protein 1* (HP1) constitue un bon exemple. Celle-ci est requise pour maintenir la répression épigénétique [174]. Chez les mammifères, les complexes PRC1, PRC2 et la méthylation H3K27 ont toutes été trouvées sur les gènes cibles. Cependant, dans tous les cas, ces protéines se lient sur des régions plus larges comparées à ce qui se passe chez la *Drosophile* [175, 176]. De plus, plus de 90% des PcG chez les mammifères sont localisés proche des promoteurs des gènes.

1.3.4 Protéines interagissant avec les PcG

Dans les cellules des mammifères, la répression induite par les *PcG* est associée à la méthylation de l'ADN. Celle-ci est requise pour stabiliser la répression des gènes cibles des PcG. EZH2 peut recruter directement les ADN méthyltransférases (DNMT) au niveau des gènes cibles [177, 178]. Les deux protéines agissent ensuite en synergie pour recruter Bmi1

aux corps PcG (*PcG bodies*) [179]. La répression de l'expression génique est aussi causée par une association des PcG avec les histones désacétylases (HDAC). La désacétylation des lysines sur les terminaisons N-terminal des histones H3 et H4 est souvent liée à la répression par les PcG. Certaines études ont démontré l'association de Esc-E(z) de la *Drosophile* et du complexe EED/EZH2 des mammifères avec les HDAC [148, 180, 181]. D'autres études ont montré que le PRC2 contenait l'homologue des HDAC, soit RDP3, et la protéine de liaison des histones, Nurf55. RDP3 serait requise pour induire le *silencing* par les PcG en colocalisant avec Esc et E(z) sur les PRE [181].

1.3.5 Les PcG sont impliqués dans l'inactivation du chromosome X

Chez les mammifères, l'inactivation du chromosome X chez la femelle durant la vie embryonnaire est un processus aléatoire. Elle résulte de la répression de la transcription des gènes d'un des deux chromosomes X [182]. Chez les marsupiaux et les tissus extraembryonnaires murins, l'inactivation du chromosome X est « *imprimé* », processus dans lequel le chromosome X paternel est inactivé de façon préférentielle tandis que le X maternel reste actif. Les PcG semblent être impliqués dans l'inactivation du chromosome X de la femelle. En effet, des études ont démontré que dans les souris *Eed*^{-/-}, le chromosome X paternel, normalement inactivé, resterait actif. Cela suggère que la protéine Eed et le complexe PRC2 serait essentiel à la répression du chromosome en entier [183]. Une autre étude a démontré que les protéines Eed et Ezh2 sont associées avec le chromosome X inactif [184]. L'association de ces protéines se fait aussi sur le chromosome X inactivé de

façon aléatoire dans les cellules ES suite à un recrutement par la protéine Xist [185, 186]. Cependant, cette interaction est transitoire, et coïncide avec l'établissement de la méthylation H3K27 (autre marque de l'inactivation du chromosome X). Dans les cellules *eed*^{-/-}, aucune méthylation de H3K27 n'a été observée sur le chromosome X [185].

1.3.6 Rôle des PcG dans le contrôle de la prolifération des cellules souches

La plupart des voies impliquées dans le développement sont réprimées dans les cellules souches embryonnaires (ES). Des études ont révélé que les PcG et la triméthylation H3K27 sont présents sur les gènes impliqués dans le développement afin d'empêcher leur expression. Les PcG sont notamment impliqués dans la répression de gènes dans les cellules ES pour maintenir leur pluripotence [175, 176]. Des mutations dans *Ezh2* empêchent l'établissement de cellules ES, tandis que les cellules ES mutantes pour *Eed* sont viables mais avec un taux élevé de différenciation spontanée [175, 187]. Parmi les cibles réprimées par les PcG, on retrouve les facteurs de transcription à homéodomaine de la famille des gènes *Dlx*, *Irx*, *Lhx* et *Pax* qui régulent les étapes de développement précoce lors de la neurogenèse, l'hématopoïèse et le développement axial [188]. De même, les membres de la famille des gènes *Fox*, *Sox*, *Gata* et *Tbx*, impliqués dans une multitude de processus développementaux, sont réprimés par les PcG [189, 190].

Plusieurs gènes inhibés par les facteurs de transcription nécessaire à la pluripotence et à l'auto-renouvellement (*Oct4*, *Sox2* et *Nanog*) sont aussi réprimés en partie par les PcG dans

les cellules ES. Ceci indique que les PcG sont recrutés et collaborent avec ces facteurs de transcription pour maintenir un état de répression des gènes de différenciation [176, 191]. Cette hypothèse est supportée par une étude qui démontre que la déficience (knock-down) en *Oct4* résulte en la perte de Suz12 (du complexe PRC2) de certains promoteurs spécifiques [192]. Dans les cellules ES, les complexes PcG pourraient fonctionner en maintenant le programme de répression de gènes établis initialement par *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* [115]. Des études ont aussi démontré que les régions de la chromatine où l'on retrouve les PcG affichent un état appelé « bivalent ». Dans ces régions, les marques d'histones réprimés, H3K27me³, et activés, H3K4me³, (catalysé par le complexe activateur TrxG) sont présentes de manière simultanée, permettant aux gènes cibles d'être réactivés suite à un signal de différenciation [191].

Les protéines PcG jouent aussi un rôle clé dans la maintenance des populations de cellules souches adultes. Plusieurs PcG ont été impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement des cellules souches, mais leurs effets diffèrent énormément. L'auto-renouvellement des CSH fœtales augmente chez la souris mutante pour *Mel-18* probablement à une augmentation de l'expression de *Hoxb4* (facteur favorisant l'auto-renouvellement des CSH) [193-195]. La surexpression de *Ezh2* empêche la déplétion des CSH [196]. Les gènes *Bmi1* et *Rae28* sont très fortement exprimés dans les CSH. Chez la souris *Rae28*^{-/-}, l'auto-renouvellement des CSH fœtales est diminué indépendamment de l'expression de *HoxB4* [197]. En outre, le gène *Bmi1* est nécessaire à l'auto-renouvellement et la maintenance des CSH adultes ainsi que ceux des CSN du SNC et SNP [198-200]. Cependant, *Bmi1* est moins requis pour la génération des progéniteurs de certains types

cellulaires. Des transplantations de cellules de foie fœtales *Bmi1*^{-/-} résultent en une seule reconstruction transitoire du compartiment hématopoïétique. Cette expérience suggère que les CSH de foies fœtales *Bmi1*^{-/-} ne génèrent pas de CSH suite à la transplantation, mais donnent naissance à des progéniteurs multipotents pouvant supporter l'hématopoïèse pendant 4 à 8 semaines [198, 201]. D'autres part, la diminution de l'auto-renouvellement des CSN du télencéphale et du système nerveux périphérique (cellules souches de la crête neurale) de souris *Bmi1*^{-/-} provoque leurs déplétions *in vivo* chez la souris adulte. Cependant, l'absence de *Bmi1* n'affecte pas la survie ou la différenciation des CSN ou la prolifération des progéniteurs neuraux de l'intestin ou du cerveau antérieur [200]. En outre, les progéniteurs granulaires (PGC) du cervelet (population de cellules essentielle à la formation du cervelet) sont aussi affectés chez la souris *Bmi1*^{-/-} [202]. En effet, durant le développement du cervelet, l'expression de *Bmi1* est contrôlée par le facteur extrinsèque *Shh*, un morphogène produit par les cellules de Purkinje et impliqué dans le développement. L'induction de *Bmi1* par la voie *Shh* est requise pour la prolifération des PGC. Cette interaction a été confirmée au niveau des cellules souches des glandes mammaires [203]. Des analyses de surexpression dans les cellules souches ont aussi confirmé le rôle central de *Bmi1* dans l'auto-renouvellement. La surexpression de *Bmi1* permet d'augmenter l'auto-renouvellement des CSH *in vitro* et *in vivo*, et la prolifération et l'auto-renouvellement des CSN *in vitro* [199, 204]. Cependant, la surexpression de *Bmi1* *in vivo* dans une souris transgénique a peu d'effet sur la fréquence des cellules souches dans le système nerveux central et de la prolifération dans la zone subventriculaire [204]. Comme *Bmi1*, le gène *Rae28* est essentiel à l'auto-renouvellement des CSH et est fortement

exprimé dans les cellules ES, mais aucune étude n'a démontrée son implication dans le contrôle de la biologie des CSN [202, 205].

1.3.7 Bmi1 : protéine PcG par excellence

Le premier membre identifié de la famille PcG est le gène *B-cell specific Moloney murine leukaemia virus integration I (Bmi1)*, qui a été initialement trouvé comme un oncogène coopérant avec *C-myc* dans un modèle murin de lymphome [206]. C'est l'homologue chez la Drosophile de la protéine Psc [207]. Ce gène code pour une protéine nucléaire de 324 A.A. (45-kDa), exprimée dans les cellules ES, le placenta, le thymus, le cœur, les testicules et le cerveau [208]. Elle contient un domaine Ring, responsable de l'efficacité de l'ubiquitylation de H2A par Ring1A ou B, un domaine hélice boucle hélice, et un domaine riche en sérine/proline [209].

Il est rapporté que la protéine Bmi1 est phosphorylée de manière différentielle lors des phases du cycle cellulaire. Sa phosphorylation vers la fin de la phase S entraîne sa dissipation de sa liaison à la chromatine [210]. Cependant, au début de la phase G1, Bmi1 hypophosphorylé reste associé à la chromatine. Des analyses d'interactions en doubles hybrides et de co-immunoprécipitation ont démontré que la protéine MAPKAP kinase 3 (3pK), en aval des voies de signalisation ERK et p38, est responsable de la phosphorylation de Bmi1. Ceci engendre sa dissociation de la chromatine [211].

Les souris *Bmi1*^{-/-} ont une taille et une apparence normale à la naissance. Cependant, celles-ci souffrent d'un retard de croissance, et d'infections pulmonaires et du tractus intestinal [128]. Ces souris meurent très jeunes; à environ 30 jours post-natales. Elles souffrent aussi d'anomalies squelettiques, et des systèmes neurales et hématopoïétiques. En l'occurrence, elles montrent une hypoplasie sévère du thymus et de la rate ainsi qu'une diminution importante des CSH dans la moelle osseuse [128, 198]. Aussi, elles développent des symptômes neurologiques incluant l'ataxie et des tremblements [128]. Les analyses histopathologiques révèlent une architecture normale du cerveau, bien que sa taille soit réduite. Cette réduction est plus sévère au niveau du cervelet, où une diminution des couches granulaires et moléculaires est prononcée [212].

Plusieurs analyses ont été effectuées pour trouver les gènes cibles réprimés par les PcG pour le contrôle de la prolifération et l'auto-renouvellement dans les cellules souches. *Bmi1* est un régulateur négatif du locus suppresseur de tumeurs *Ink4a/Arf/Ink4b* dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) [212-215]. Ce locus code pour les protéines régulatrices du cycle cellulaire et suppresseurs de tumeurs *p16^{Ink4a}*, *p19^{Arf}* (*p14^{ARF}*) et *p15^{Ink4b}*. Dans les cellules souches normales, *p16^{Ink4a}* et *p19^{Arf}* sont réprimés par *Bmi1* (Figure 8) [214, 216, 217]. Comme pour les fibroblastes, l'expression de *p16^{Ink4a}* et *p19^{Arf}* est augmentée au niveau des CSH et CSN [198, 200]. La délétion du locus *Ink4a/Arf* chez la souris *Bmi1*^{-/-} permet de récupérer la prolifération normale des MEF en culture et de renverser partiellement les défauts de développement du cervelet [212]. De plus, l'expression de *p16^{Ink4a}* est élevée dans les CSN *Bmi1*^{-/-}, et la délétion de *Ink4a* permet de récupérer partiellement l'auto-renouvellement des cellules souches en culture [200]. De la

même manière, les animaux doublement mutants pour *Bmi1;Ink4a/Arf* démontrent un renversement presque complet des défauts des CSN du système nerveux central et périphérique, mais avec un renversement partiel du développement du cervelet [218, 219]. Malgré le renversement du phénotype des cellules souches chez ces souris doublement mutantes, les délétions de *Ink4a* et de *Arf* n'améliorent pas la durée de vie et la croissance des souris, ni le développement du cervelet [218, 219]. Ces observations suggèrent que des voies additionnelles peuvent agir en aval de *Bmi1* pour le contrôle du développement et du maintien des cellules souches.

D'autres protéines PcG contrôlent la prolifération cellulaire en régulant le locus *Ink4a/Arf*, celles-ci inclus *Mel-18*, *Cbx2*, *Cbx7*, *Cbx8*, *PHC2* et *Ring1B* [212, 220-222]. Les souris mutantes pour ces gènes ont des défauts d'hématopoïèse, ou de prolifération des MEFs [213]. Cependant, d'autres PcG contrôlent la progression du cycle cellulaire de façon indépendante de *Ink4a/Arf*, c'est le cas de *Ezh2*, *Eed* et *Rae-28* [197, 223].

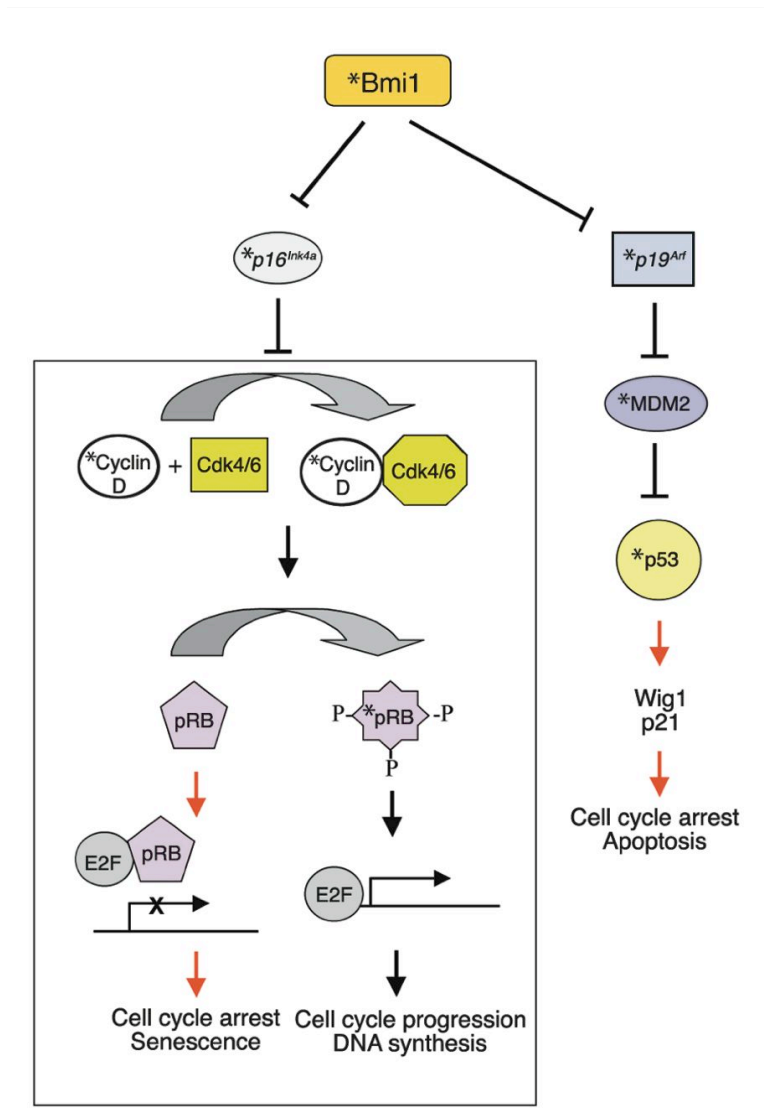


Figure 8 Schéma illustrant la répression du locus *Ink4a/Arf* par Bmi1 dans les cellules souches. Tiré de l'article Park K.I. et al (2004) *J Clin Invest* 113 : 175-9

1.3.8 Lien potentiel entre les PcG et le cancer

Le lien entre les PcG et le cancer fait suite à la découverte de *Bmi1* comme proto-oncogène coopérant avec *Myc* dans les lymphomes B et T [129, 206, 208, 224]. Cette interaction a été

établie dans des études qui ont montré que *Bmi1* inhibe l'apoptose induite par C-Myc en réprimant le locus *Ink4a/Arf* [212]. Ce locus est fréquemment la cible des mutations, des délétions et de la répression épigénétique dans plusieurs tumeurs chez l'homme [217]. *Bmi1* représente la protéine PcG la plus souvent associée au développement néoplasique. En l'occurrence, il est requis à l'auto-renouvellement des cellules souches leucémiques. Celles-ci représentent la seule fraction cellulaire de la tumeur initiale capable d'induire des leucémies chez le receveur [201]. De plus, en utilisant un modèle murin de leucémie myéloïde aiguë (AML), Lessard *et al* ont démontré que les cellules leucémiques n'exprimant pas *Bmi1* sont capables de générer l'AML chez l'hôte [201]. Néanmoins, ces cellules prolifèrent moins et sont incapables de générer des leucémies secondaires suite à leur greffe chez d'autres souris. L'implication de BMI1 dans la prolifération des cellules souches cancéreuses fut renforcée par des études sur les cancers colorectaux, du foie, des poumons, du sein et du cerveau [225-233]. En effet, *BMI1* est surexprimé dans les cellules souches mammaires malignes humaines, de cancer de poumons et de tumeurs cérébrales [203, 225, 230, 234, 235]. Plusieurs autres protéines PcG sont liées à la tumorigenèse (Tableau III). Des études ont montré que *SUZ12* est surexprimé dans les cancers du colon et du sein [236]. Le gène *EZH2* est aussi induit dans plusieurs tumeurs humaines, dont plusieurs types de lymphomes, de cancer de la prostate, sein et du cerveau [223, 233, 237, 238]. *EZH2* serait impliqué dans l'adhésion cellulaire et la migration, contribuant à la capacité métastatique des cellules cancéreuses. La surexpression de *EZH2*, dans les stades avancés du cancer de la prostate, est corrélée avec l'accumulation du complexe PRC4, contenant l'histone déacétylase SIRT1 [153]. De plus, le knockdown de *EZH2* dans les lignées cancéreuses de la prostate et de glioblastome causent une inhibition de la croissance

cellulaire [233, 238]. *In vitro*, *EZH2* peut agir comme oncogène et peut être induit par les facteurs de transcription E2F [223]. Des études ont démontré que les facteurs de transcription oncogéniques PML/RARA et PLZF/RARA permettent le recrutement ectopique du PRC2 et PRC1, et ceux-ci jouent un rôle important dans le développement de la leucémie promyélocyte aigue [239, 240]. Un autre composé du PRC2, *SUZ12*, est surexprimé dans le cancer du colon et du sein [236].

Tableau III. Implication des PcG dans différents types de cancers

Protein	Cancer type
EZH2	B-cell non-Hodgkin lymphoma
	Bladder
	Breast
	Colon
	Hodgkin lymphoma
	Liver
	Mantle cell lymphoma
	Melanoma
	Prostate
SUZ12	Breast
	Colon
	Liver
BMI1	B-cell non-Hodgkin lymphoma
	Leukaemia
	Mantle cell lymphoma
	Medulloblastoma
	Neuroblastoma
	Non-small cell lung cancer
PCL3	Colon
	Skin
	Lung
	Rectal
	Cervical
	Uterus
	Liver
RAE28	Acute lymphoblastic leukaemia

1.4 Sénescence et vieillissement

1.4.1 La sénescence cellulaire : définition et caractéristique

La sénescence est définie comme une sortie irréversible du cycle cellulaire. La sénescence cellulaire a été originellement montrée dans des fibroblastes en culture [241]. Ces cellules entraient dans un état d'arrêt de croissance irréversible après plusieurs passages *in vitro*. Étant un mécanisme de suppression de tumeur, la sénescence est bénéfique, car elle protège l'organisme contre le cancer. D'autres part, la sénescence récapitule le processus de vieillissement des cellules *in vivo*. Dans ce sens, elle est délétère, car elle contribue à la diminution du renouvellement tissulaire [242]. En effet, la sénescence peut contribuer au vieillissement par l'accumulation de cellules somatiques sénescents dans les tissus, et peut aussi limiter le potentiel de régénération des cellules souches [243]. Les cellules mitotiques, comprenant toutes les cellules aptes à proliférer, sont susceptibles d'entrer en sénescence cellulaire lorsqu'elles sont affectées par des stimuli ayant le potentiel de causer le cancer. En revanche, les cellules post-mitotiques n'entrent pas en sénescence comme celle-ci est définie [242]. Étant sortie de façon irréversible du cycle cellulaire, les cellules post-mitotiques sénescents peuvent aussi démontrer des altérations liées à la sénescence.

Les cellules sénescents sont caractérisées par un arrêt de croissance, une résistance à l'apoptose, une altération de l'expression génique et l'apparition de marqueurs de sénescence [242]. La première caractéristique d'une cellule sénescence est un arrêt de croissance, tout en étant métaboliquement active [244, 245]. Celle-ci ne peut entreprendre

la réplication de l'ADN, et cet arrêt de croissance semble être permanent, contrairement aux cellules quiescentes. La deuxième caractéristique d'une cellule sénescence est sa résistance à l'apoptose. En effet, plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes humains acquièrent une résistance à certains signaux apoptotiques lorsqu'ils entrent en sénescence [246]. Cependant, les mécanismes par lesquels ces cellules résistent à l'apoptose sont encore faiblement connus. Dans certains cas, la protéine p53 active préférentiellement des gènes d'arrêt de la prolifération, plutôt que des gènes apoptotiques [247]. La troisième caractéristique représente une altération dans l'expression de gènes, incluant la répression ou l'activation de régulateurs du cycle cellulaire [248, 249]. Deux inhibiteurs souvent exprimés sont les *cyclin-dependent-kinase-inhibitors* (CDKI) *p16* et *p21* [250, 251]. La protéine p21 peut être induite directement par p53 [247]. Les deux CDKI permettent le maintien de pRB dans un état hypophosphorylé et actif empêchant la progression du cycle cellulaire [252]. Dans certaines cellules sénescences, les gènes cibles de E2F sont réprimés par une réorganisation de la chromatine médiée par pRB en foci d'hétérochromatine (*senescence-associated heterochromatine foci* (SAHF)) [253]. Les cellules sénescences répriment aussi l'expression de gènes facilitant la progression du cycle cellulaire, tel que c-Fos, cyclin A, cyclin B et PCNA [253, 254]. La quatrième caractéristique consiste en l'apparition de marqueurs de sénescence. Plusieurs de ces marqueurs permettent d'identifier les cellules en sénescence en culture et *in vivo*. Les cellules en sénescences présentes une activité β -galactosidase à pH acide (pH 6.0), appelée *senescence-associated β -galactosidase* (SA- β -gal) [255]. Cette activité est due à la β -galactosidase lysosomal, suite à l'augmentation de la biogenèse des lysosomes caractéristique des cellules sénescences [256]. Certaines cellules sénescences peuvent être identifiées par les SAHF et

les foci de dommages à l'ADN (*senescence-associated DNA-damage-foci* (SDF)). Les SAHF peuvent être détectés par des marqueurs liant l'ADN, tel que le DAPI, et par des protéines (tel que HP1). Les SDF contiennent des protéines associées aux dommages à l'ADN, comme l'histone H2AX phosphorylée (γ -H2AX) et 53-BP1 [257, 258].

1.4.2 Différentes sources d'induction de la sénescence

La sénescence peut être causée par plusieurs facteurs, notamment la réduction des télomères, et par différents stress comme des dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes ainsi qu'une altération de la structure de la chromatine. Les télomères représentent des éléments d'ADN répétitifs, qui se retrouvent à la fin des chromosomes linéaires pour les protéger de la dégradation et de la recombinaison [242, 243]. Due à l'incapacité de la machinerie transcriptionnelle à copier la fin des chromosomes, les télomères raccourcissent progressivement après chaque division cellulaire [259]. La diminution des télomères est perçue comme un dommage à l'ADN (lésion double brin), provoquant l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN [260]. Le dommage est reconnu par la protéine ATM, 53BP1 et MDC1, provoquant la phosphorylation de H2AX aux sites de dommages. Les protéines de liaison des télomères TRF1 et TRF2 sont ensuite recrutées, suivies de Chk1 et Chk2, induisant l'activation de p53 et la sénescence [257, 261, 262]. La sénescence causée par la réduction des télomères peut agir comme mécanisme suppresseur de tumeur dans les cellules surexprimant un oncogène. En effet, la réduction des télomères pourrait diminuer l'incidence de cancer [263]. Les dommages à l'ADN, tel

que les lésions doubles brins, provoquent une entrée en sénescence de plusieurs types cellulaires [264, 265]. La présence de dommages à l'ADN va induire l'activation de p53, accompagnée de l'expression de p21. Cependant, dans certaines cellules, p16 représente une deuxième barrière à la croissance cellulaire en présence d'ADN endommagé ou de télomères dysfonctionnels [266, 267]. Des études ont rapporté que les cellules peuvent entrer en sénescence suite à l'activation d'oncogènes. C'est le cas de la forme oncogénique de la protéine RAS, un effecteur de signaux mitogéniques, une fois exprimée dans des fibroblastes humains normaux [244]. D'autres membres de la voie de signalisation de RAS, tel que RAF, MEK et BRAF, ainsi que des protéines nucléaires pro-prolifération (E2F1) causent la sénescence lorsque surexprimés ou exprimés sous des formes oncogéniques [268-271]. Ces mécanismes d'entrée en sénescence représentent un système de défense contre la transformation oncogénique [242]. L'activation d'oncogènes peut induire l'expression de *p16* (par RAS), de SAHF et produire des dommages à l'ADN [272, 273]. Les oncogènes vont ultimement provoquer l'activation de p53 en permettant sa phosphorylation [274]. En l'occurrence, PRAK, un effecteur en aval de la voie MAPK, est requis pour phosphoryler p53 suite à la surexpression de *RAS* [275]. D'autres part, la perturbation de la chromatine peut aussi être une cause de sénescence cellulaire. En effet, l'inhibition des HDACs dans les fibroblastes humains induit l'activation de *p21* et *p16*, provoquant un arrêt de la croissance via pRB. Dans les cellules de souris, la voie p53 est responsable de la sénescence provoquée par l'inhibition des HDACs [276]. Les radicaux libres peuvent aussi induire la sénescence dans plusieurs systèmes *in vivo* et *in vitro* [277]. Ils permettent l'activation de *p16*, et leurs niveaux restent élevés par une boucle d'activation indépendante de p16 [277, 278].

1.4.3 Rôle et régulation du locus *Ink4a/Arf/Ink4b*

Le locus *Ink4a/Arf/Ink4b*, codant pour les gènes suppresseurs de tumeurs *p16^{Ink4a}*, *p19^{Arf}* et *p15^{Ink4b}*, est délété dans plusieurs types de cancers, incluant les mélanomes, les glioblastomes, certaines leucémies, et les carcinomes [279, 280]. Les protéines p16 et p19 sont codées dans des cadres de lecture différents, avec un promoteur et un premier exon non-identiques. Cependant, ceux-ci possèdent des exons 2 et 3 similaires. Ces deux protéines ne sont pas des isoformes, et ne partagent aucune homologie dans leur séquence d'acides aminés [281]. Le gène *p15^{Ink4b}* possède un cadre de lecture distinct de *p16* et *p19*, avec une fonction similaire à p16. Chez les mammifères, le gène *p16^{Ink4a}* inhibe la liaison de la cyclin D aux cyclin-dépendant kinases 4 et 6 (Cdk4/6), en se liant directement aux CDK. Cela résulte en une hyperphosphorylation de pRB, menant à l'inhibition de E2F, à l'arrêt du cycle cellulaire et à la sénescence. D'autre part, en absence de *p19^{ARF}*, p53 subit une dégradation protéosomale par la E3 ubiquitin ligase Mdm2 (Mouse double minute 2) [6, 282]. En effet, la protéine p19^{Arf} séquestre et inhibe Mdm2, permettant la stabilisation de p53 et menant la cellule vers l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Figure 9) [283, 284]. En plus de son rôle dans la stabilisation de p53, *p19^{Arf}* régule plusieurs autres fonctions. Lorsque surexprimé, *p19* peut induire un arrêt de la croissance dans les cellules *p53^{-/-}*, suggérant des fonctions indépendantes de p53 [283, 285]. De plus, p19 peut contribuer à la régression vasculaire dans le développement de l'œil, de façon p53 indépendante [286]. Des interactions de p19 avec E2F1, Mdmx, HIF-1, Topoisomérase-1, Myc et Nucleophosmin (NPM) ont été rapportées [250, 287-289]. L'interaction entre p19 et NPM a été la mieux caractérisée [290]. NPM est une protéine faisant la navette entre le

noyau et le cytoplasme, et est impliquée dans plusieurs processus cellulaires incluant la biogenèse des ribosomes et la duplication du centrosome. L'interaction entre p19 et NPM permet de moduler la stabilité de p19. Cette liaison permet aussi de séquestrer p19 dans le nucléole, empêchant sa liaison avec MDM2. De plus, l'interaction de p19 avec NPM diminue la synthèse des ARN ribosomiaux [250, 291]. Cela suggère que *p19^{Arf}* peut réguler la prolifération via p53 et NPM.

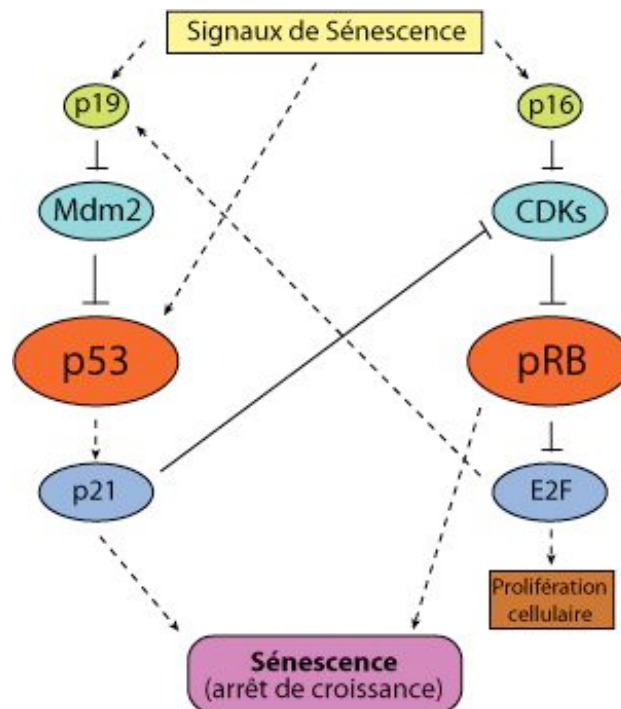


Figure 9 Représentation schématique illustrant l'induction des voies *p19^{Arf}/p53* et *p16/pRB* par des signaux de sénescence. Ces deux voies vont ultimement provoquer un arrêt de la croissance et la sénescence. Adapté de Campisi J. et d'Adda di Fagagna F. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 : 729-40

Les protéines p16 et p19 sont normalement exprimées à de très faibles niveaux dans les cellules en culture et dans les tissus de jeunes organismes [212, 214]. Leur expression est induite suite la surexpression d'oncogène, le dysfonctionnement des télomères, aux dommages à l'ADN causés par les UV, et par les radicaux libres et les radiations ionisantes [244, 280]. L'arrêt de croissance observé lors de la sénescence peut être établi et maintenu via les voies p19/p53 et/ou p16/pRB (Figure 9). Ces voies peuvent bloquer le cycle cellulaire de manière indépendante ou en interagissant entre elles. L'implication de ces voies dépend aussi du type cellulaire et de l'espèce. En effet, dans les MEFs, la sénescence est régie par la voie p19/p53, tandis que la voie p16/pRB est plus déterminante dans les lymphocytes, macrophages et astrocytes chez la souris [291]. De plus, la voie pRB est plus importante chez l'humain, contrairement à la voie p53 qui est plus sollicitée chez la souris [242]. Plusieurs régulateurs positifs et négatifs de l'expression du locus *Ink4a/Arf* ont été avancés (Figure 10). Parmi les activateurs, plusieurs oncogènes ont été mis en évidence; tel que *RAS*, *RAF* et *p38* [213]. L'oncogène et facteur de transcription *MYC* peut se lier directement sur le promoteur et le premier intron de *p16^{Ink4a}*, provoquant son expression dans les cellules humaines [292, 293]. D'autres part, *MYC* peut coopérer avec *Bmi1* dans l'induction de lymphomes [206]. Cette coopération provient du fait que *MYC* est un activateur de *p19* et permet un arrêt de la croissance p53-dépendante, contrairement à *Bmi1*, qui réprime *p19* [212, 294]. Le facteur de transcription E2F est un activateur de *p19*, qui permet de faire le lien entre la voie pRB et p53 (Figure 9) [295, 296]. En effet, des analyses par immunoprécipitation de chromatine (CHIP) démontrent un effet direct de E2F sur le promoteur de *p19* [297, 298]. En revanche, plusieurs régulateurs négatifs du locus *Ink4a/Arf* ont été révélés, grâce à leurs capacités à interférer avec les activateurs potentiels.

Les protéines ID, tel que ID1, peuvent réprimer *p16* en empêchant son activation par les protéines ETS ou la protéine BHLH Tal1 [272, 299]. Parmi les autres inhibiteurs du locus *Ink4a/Arf*, on retrouve des protéines tel que ATM, c-Jun, EGR1, Tbx2 [300, 301]. Un des répresseurs les plus importants de *p19* est la protéine p53. Une fois stabilisée, p53 induit une répression de *p19* [302]. Une étude a démontré la présence d'une origine de réplication proche du promoteur du locus *Ink4a/Arf*. De plus, celle-ci peut induire la répression du locus via la protéine CDC6. Gonzalez *et al* ont montré que la surexpression de *CDC6* est associée à une diminution de l'expression du locus, suite au recrutement de HDAC à l'origine de la réplication [303].

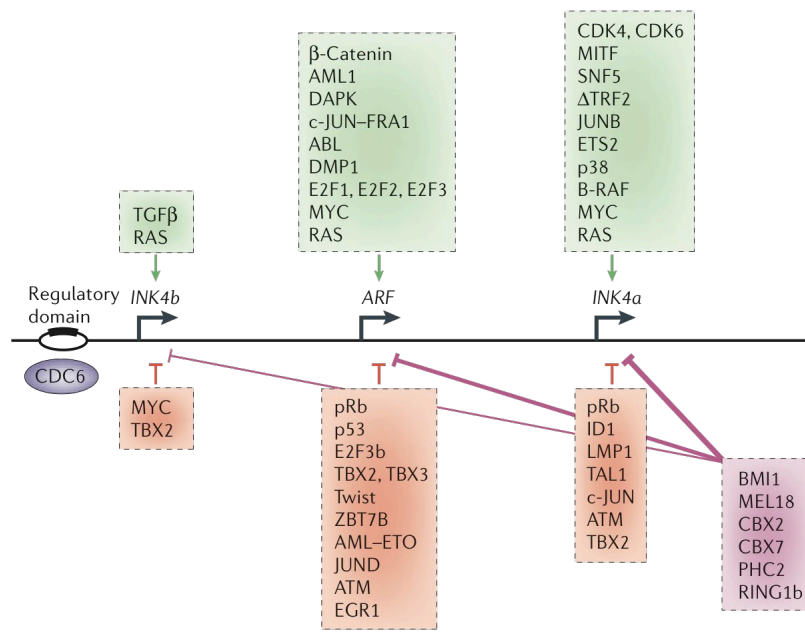


Figure 10 Activateurs et répresseurs du locus *Ink4b-Arf-Ink4a*. Représentation schématique des trois gènes du locus. Les facteurs permettant l'activation de l'expression sont répertoriés en haut de chaque gène, tandis que ceux impliqués dans la répression sont répertoriés en bas. Tiré de Gil J. et Peters G. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 : 667-77

1.4.4 Contribution du locus *Ink4a/Arf* et de la sénescence au processus de vieillissement

Le locus *Ink4A/Arf* est considéré comme un biomarqueur moléculaire du vieillissement. Des études ont démontré que ce locus est exprimé à de faibles niveaux dans la plupart des tissus de jeunes organismes. En revanche, une dérepression du locus est observée avec l'âge dans la majorité des tissus chez la souris [304]. Des études effectuées chez l'Homme ont aussi rapporté une augmentation des niveaux de p16 dans le rein et la peau lors du vieillissement [305, 306]. Les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation de l'expression du locus *Ink4A/Arf* durant le vieillissement sont encore très mal caractérisés. Néanmoins des protéines candidates ont été décrites. En l'occurrence, les niveaux d'expression du facteur *Ets1*, un régulateur positif de *p16*, augmentent durant le vieillissement [304]. Aussi, l'expression de *Bmi1*, répresseur du locus *Ink4a/Arf* diminue avec l'âge dans la peau chez l'homme [306]. De plus, la régulation épigénétique par les PcG est responsable de la faible expression de *p16* et *p19* dans les tissus de jeunes organismes [214]. Les effets pro-vieillessements de *p16* sont dus à l'accumulation de cellules sénescentes et à la diminution des fonctions régénératrices des cellules souches dans les tissus [243, 280]. En outre, l'augmentation de l'expression de *p16* est associée avec la diminution de la prolifération des cellules souches adultes et de la régénération des îlots pancréatiques, du système hématopoïétique, et des progéniteurs neurales [200, 304, 307]. De plus, les souris mutantes pour *p16* ont un potentiel de régénération plus élevé dans ces trois types cellulaires. Ces résultats démontrent que p16 contribue au déclin de la régénération des tissus lors du vieillissement chez les mammifères. Cependant, une autre

étude montre que des souris avec un allèle supplémentaire du locus *Ink4a/Arf/Ink4b* ont une durée de vie normale, sans signe de vieillissement accéléré. Ces souris ont la particularité de n'exprimer que très faiblement les gènes *p16*, *Arf* et *p15*, et d'avoir une incidence de cancer 3 fois plus faible comparativement aux souris sauvages [308]. Les travaux effectués sur ces souris suggèrent la possibilité que le lien entre la suppression de tumeur et la longévité reste très minime.

La sénescence peut donc contribuer au vieillissement par deux mécanismes. Premièrement, l'accumulation de cellules sénescents dans les tissus pourrait atteindre un niveau qui peut affecter le fonctionnement normal des tissus. Deuxièmement, la sénescence pourrait limiter le potentiel de régénération par les cellules souches adultes. Ainsi, le vieillissement, pourrait résulter d'un côté de l'accumulation de cellules sénescents et de l'autre, d'une diminution du potentiel régénératif par les cellules souches [243, 280].

1.4.5 L'impact de p53 sur le vieillissement

La fonction du gène suppresseur de tumeur *p53* dans l'induction de l'arrêt de la croissance et l'apoptose est assez bien documentée. *p53* est activé suite à différents types de stress, tel que les dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes, l'hypoxie et l'absence de nutriments. Cette protéine est régulée, entre autres par des modifications post-traductionnelles et des interactions protéine-protéine. Plusieurs évidences ont montré l'implication de *p53* dans le processus de vieillissement. Deux modèles montrent l'activité pro-vieillescence de *p53*; (i)

un modèle murin exprimant une forme active tronquée de p53, avec une absence des domaines de transactivation et de liaison à l'ADN, et (ii) une souris transgénique surexprimant le petit isoforme de 44-kD de p53 [309, 310]. Dans les deux modèles, un phénotype de vieillissement accéléré est observé, du à une activation permanente et non-contrôlée de p53. L'étude de Bauer *et al* démontre que l'expression d'un dominant négatif de p53 seulement dans les neurones adultes chez la drosophile permet d'augmenter la durée de vie [311]. D'autres études illustrent aussi l'activité pro-vieillessement de p53. Chez la souris *BRCA1*^{-/-}, le haut taux de dommages à l'ADN provoque un vieillissement prématuré de manière dépendante de p53 [312]. Aussi la souris *Zmpste24*^{-/-}, ayant un défaut dans l'enveloppe nucléaire, souffre de vieillissement accéléré via l'activation de p53 [313]. Dans les deux cas, les deux phénotypes sont renversés en absence de p53. D'autres part, certaines évidences suggèrent que p63 peut activer un programme de sénescence et induire un vieillissement accéléré [314]. Dans cette étude, les deux modèles de souris déficientes pour p63 utilisés montrent une augmentation de la sénescence cellulaire, avec les marqueurs SA-βgal et p16^{Ink4a}, et une durée de vie limitée [314]. L'isoforme dominant négatif de p63 (DNp63α) lorsque surexprimé peut réguler négativement Sirt1 et ainsi induire un phénotype de vieillissement prématuré chez la souris [315]. En revanche, d'autres travaux ont montré une activité anti-vieillessement due à la protéine p53. Des modèles de souris avec une légère augmentation de l'activité de p53 ne démontrent pas de vieillissement accéléré, et les souris avec une copie supplémentaire du gène *p53* démontrent une meilleure protection contre le cancer, avec une durée de vie et un état physiologique normal [316]. Un autre modèle de souris ayant une copie supplémentaire du locus *Ink4a/Arf* démontre une meilleure protection contre le cancer, mais sans être affecté par un vieillissement accéléré

[308]. L'ajout d'une copie de *p53* et de *p19^{Arf}* diminue la quantité de dommages oxydatifs chez les souris âgées, provoque une diminution de l'incidence de cancer et induit une augmentation de la durée de vie médiane [317]. Ces observations suggèrent que le rôle principal de *p53* est d'éliminer les cellules endommagées par l'induction de l'apoptose ou de les empêcher de proliférer via l'induction de la sénescence. Ceci illustre l'effet anti-vieillesse de *p53*. Cependant, la présence de dommages excessifs ou l'activité non-contrôlée de *p53* est délétère, car l'élimination excessive des cellules par *p53* provoque un épuisement de la régénération des tissus avec l'âge [243, 318].

1.5 Le métabolisme oxydatif

1.5.1 La théorie des radicaux libres dans le vieillissement cellulaire

La théorie impliquant les radicaux libres dans le processus du vieillissement stipule que la production intracellulaire de ces métabolites est le déterminant majeur de la durée de vie [319]. Cette théorie élaborée par Harman en 1956 est encore acceptée de nos jours. La balance entre la production des différentes espèces réactives (RS) et les défenses anti-oxydantes serait critique pour déterminer le taux d'accumulation de dommages oxydatifs cellulaires, et ainsi de la durée de vie [319]. De plus, cette théorie stipule que la durée de vie pourrait être plus longue en augmentant les défenses anti-oxydantes. D'un point de vue physiologique, les RS participent directement à la défense de l'hôte contre les agents infectieux, et à la coordination de la réponse inflammatoire [320]. Les plus communs sont les espèces réactives d'oxygènes (ROS), qui regroupent les radicaux d'oxygène et des agents appelés non-radicaux (Tableau IV). Les agents non-radicaux, tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxy-nitrite, sont des agents oxydants qui peuvent être facilement convertis en radicaux d'oxygènes. Les radicaux libres peuvent être des agents réducteurs (donneurs d'électrons) ou des agents oxydants (accepteurs d'électrons d'agents non-radicaux) [321]. L'anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$) représente un des ROS les plus connus, et est produit *in vivo* de plusieurs façons. Cependant, la source majeure est la chaîne de transport des électrons dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie [322, 323]. Comme l'oxygène est accepteur d'électrons, celui-ci peut générer l'anion superoxide. Le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) est un des agents oxydants les plus réactifs. Il peut être produit *in*

vivo par la réaction de Fenton, où le contact entre l'oxyde ferreux (Fe^{2+}) et le peroxyde d'hydrogène produit l'oxyde ferrique (Fe^{3+}) et le radical hydroxyle. Le radical hydroxyle peut interagir avec différentes bases produisant les nombreux dommages oxydatifs à l'ADN [324, 325]. Celui-ci peut oxyder les chaînes des acides gras polyinsaturés au niveau de la membrane plasmique. Cette réaction va provoquer ultimement la peroxydation des lipides, menant à une diminution de la fluidité membranaire, une augmentation de la perméabilité à différents molécules passant normalement seulement par les canaux, et un dommage aux protéines membranaires, inactivant les récepteurs, enzymes et canaux à ions [321]. L'oxydation continue des chaînes d'acide gras peut aussi produire des aldéhydes, ce qui engendre une diminution de l'intégrité membranaire des organelles. Un exemple serait la libération des enzymes hydrolytiques dans la cellule suite à la rupture de la membrane des lysosomes [326].

Tableau IV. Différentes types d'espèces réactives d'oxygènes

Free radicals	Non-radicals
ROS	ROS
Superoxide, $\text{O}_2^{\bullet-}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, OH^\bullet	Hypobromous acid, HOBr^\bullet
Hydroperoxyl, HO_2^\bullet (protonated superoxide)	Hypochlorous acid, HOCl^\dagger
Carbonate, $\text{CO}_3^{\bullet-}$	Ozone, $\text{O}_3^{\bullet\ddagger}$
Peroxyl, RO_2^\bullet	Singlet $\text{O}_2^1\Delta_g$
Alkoxy, RO^\bullet	Organic peroxides, ROOH
Carbon dioxide radical, $\text{CO}_2^{\bullet-}$	Peroxynitrite, $\text{ONOO}^- \ddagger$
Singlet $\text{O}_2^1\Sigma_g^+$	Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^- \ddagger$
	Peroxynitrous acid, $\text{ONOOH} \ddagger$
	Peroxomonocarbonate, HOOCO_2^-
	Nitrosoperoxy carbonate, ONOOCO_2^-

1.5.2 La mitochondrie : génératrice principale des ROS dans la cellule

Les ROS peuvent être produites dans plusieurs compartiments et leur production est catalysée par plusieurs enzymes dans la cellule. Parmi elles, on retrouve les protéines dans la membrane plasmique, telles que les NADPH oxydases, les cyclooxygénases (types d'enzymes cytosoliques), ainsi que les peroxisomes dans le métabolisme des lipides [327]. Cependant, la majorité des ROS ($\approx 90\%$) intracellulaires sont générées par la mitochondrie. À plusieurs endroits au niveau de la chaîne de transport mitochondrial, des électrons provenant du NADH ou du FADH peuvent réagir avec l'oxygène ou d'autres accepteurs d'électrons et générer ainsi des ROS [328].

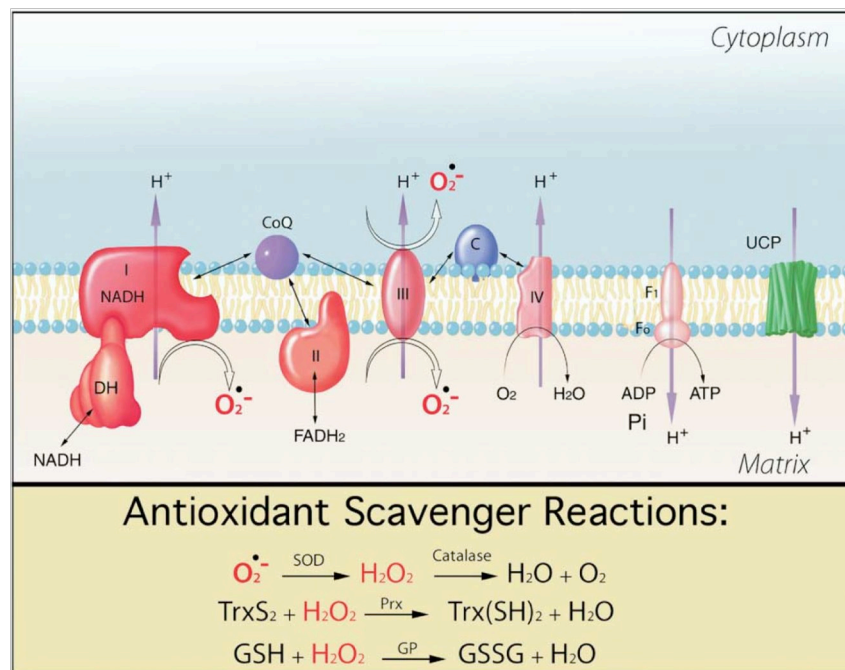


Figure 11 Représentation schématique illustrant la chaîne de transport des électrons et le métabolisme oxydatif au niveau de la mitochondrie. Un réseau de défenses anti-oxydantes a la capacité de balancer et d'éliminer les ROS générées par la mitochondrie. Adapté de Balaban RS. (2005) *Cell* 120 : 483-95

Dans la chaîne de transport des électrons, le complexe I transfère les électrons du NADH au coenzyme Q, un transporteur mobile d'électrons. Une fois que le NAD^+ est oxydé, le coenzyme Q réduit diffuse dans la membrane interne de la mitochondrie. Le complexe II peut aussi transférer ses électrons du FADH_2 au coenzyme Q. Dans le complexe III, le coenzyme Q réduit cède ses électrons au cytochrome C (autre transporteur mobile d'électrons associé de façon transitoire à la membrane interne pour accepter les électrons et migrer vers le complexe IV) par le cycle de l'ubiquinone. Le complexe IV reçoit ensuite les électrons du cytochrome C et permet la réduction de l'oxygène pour former une molécule d'eau (H_2O) (Figure 11). Durant le transport des électrons, le passage des protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire génère un gradient de protons. Celui-ci représente une très grande quantité d'énergie potentielle. Le retour des protons vers la matrice permet l'utilisation de ce potentiel membranaire pour la synthèse de l'ATP. Le flux de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice provoque l'activation du complexe ATP synthase, permettant la production d'ATP dans la matrice [329].

Les deux sites majeurs pour la génération de ROS dans la mitochondrie sont les complexes I et III. Cependant, peu d'évidences supportent la formation de ROS à partir du complexe II [330-332]. Les mitochondries contiennent plusieurs autres transporteurs d'électrons capables aussi de produire des ROS. Dans les mitochondries intactes et fonctionnelles, un réseau de défenses anti-oxydantes a la capacité de balancer et d'éliminer les ROS générées, permettant une faible production nette de ROS. En effet, plusieurs gènes anti-oxydants ont été caractérisés. Les enzymes anti-oxydantes les plus connus sont les

superoxydes dismutases (SOD) qui permettent d'éliminer les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène [333, 334]. Deux types de SOD ont été caractérisés; la MnSOD (Sod2) présente dans la matrice mitochondriale et la CuZnSOD (Sod1) dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et dans le reste de la cellule [321, 323]. L'action des SOD est couplée avec l'activité d'une autre enzyme capable d'éliminer le H_2O_2 , soit la catalase. Plusieurs études ont démontré que la catalase est essentielle à la détoxification du H_2O_2 , cependant elle n'est pas présente dans les mitochondries au niveau des neurones. Elle se retrouve principalement dans les peroxysomes, et n'a pas accès au H_2O_2 produit dans la mitochondrie [322]. D'autres part, les glutathiones peroxydases (GPX) sont des enzymes capables de détoxifier le H_2O_2 en association avec l'oxydation du glutathion (GSH) (une molécule anti-oxydante présente dans la mitochondrie) [335]. En outre, les peroxiredoxines (PRX), appartenant à la famille des peroxidases, représentent les plus importantes enzymes impliquées dans l'élimination du H_2O_2 [336, 337]. Les anions superoxydes non-éliminées par les SOD peuvent être détoxifier par le cytochrome C [338].

Plusieurs autres protéines anti-oxydantes existent et sont requises pour maintenir un niveau basal des ROS intracellulaires. Le facteur de transcription Nrf2 permet de contrôler une multitude de défenses cellulaires, où plusieurs voies anti-oxydantes ou de détoxification sont activées dans les neurones [339]. Normalement, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par une protéine de régulation liée à l'actine, soit Keap1 [340]. L'augmentation de la concentration intracellulaire des ROS provoque un changement de conformation de Keap1, libérant Nrf2. Celle-ci est par la suite transloquée au noyau, où elle va permettre l'activation des gènes de détoxification de classe 2, impliquées dans l'élimination des ROS

[341-343]. Parmi ces gènes, on retrouve les gènes impliqués dans la génération et le métabolisme du GSH, le gène *NADPH : quinone oxidoreductase (NQO1)*, les gènes *glutathion S-transférases (GST)*, le gène *x-CT* impliqué dans le système de transport d'échange cystéine/glutamate, et les *GPX* [344-348]. L'expression de ces gènes est régulée par l'interaction de Nrf2 avec les éléments présents en cis sur leur promoteur, appelés *antioxidant response element (ARE)* [349]. Des études ont démontré que des cellules mutantes pour *Nrf2* subissent plus de stress oxydatif du à une augmentation des niveaux de ROS. De plus dans ces cellules, l'expression des gènes anti-oxydants est fortement réprimée [350, 351]. D'autres études ont montré que les neurones et les astrocytes mutantes pour *Nrf2* en culture sont plus sensibles à des inhibiteurs de la chaîne de transport des électrons, tel que le MPTP, la roténone (complexe I) et le 3-NP (complexe II) [339, 351, 352]. Le gène *PPary coactivator 1α (PGC-1α)*, impliqué dans la stimulation de la biogénèse mitochondriale et la respiration, est un coactivateur transcriptionnel [353, 354]. L'activation de la biogénèse mitochondriale par PGC-1α résulte de la coactivation de Nrf1 et Nrf2 [354]. Des études ont démontré que PGC-1α est requis pour l'induction de plusieurs enzymes anti-oxydantes, tel que GPX1 et Sod2, suite à un dommage oxydatif. De plus, les neurones de souris mutantes pour *PGC-1α* sont plus sensibles aux effets du MPTP [355].

1.5.3 Rôle de p53 dans le métabolisme oxydatif

Les ROS sont des activateurs de p53. En effet, les dommages à l'ADN peuvent activer p53 directement ou indirectement, via l'activation d'autres voies de signalisation activées par les ROS, tel que les MAPK [356-358]. Les ROS ne sont pas seulement générées suite à des stimuli exogènes. Elles peuvent aussi être produites par le métabolisme aérobie ou comme second messenger dans plusieurs voies de signalisation cellulaire [358]. De plus, les ROS peuvent aussi être générés en aval de p53 par la transcription de gènes, régulant l'état redox de la cellule ou contribuant directement à l'apoptose p53-dépendante, tel que *Bax* et *PUMA*. Cependant, de nombreuses études ont montré que p53 a des propriétés anti-oxydantes. Cette fonction de p53 pourrait représenter un composé important de son activité anti-tumorale, permettant une diminution des altérations génétiques causées par les radicaux libres. De plus, cela promeut la survie cellulaire et la réparation de dommages suite à des stress mineurs [358]. p53 induit l'activation de plusieurs gènes anti-oxydants, tel que *GPX*, *Sod2*, l'aldéhyde déshydrogénase 4 (*ALDH4*), les *Sestrins 1* et *2* (*Sesn1* et *2*), et *p53-induced glycolysis and apoptosis regulator* (*TIGAR*) [358-360]. L'activation de *TIGAR* par p53, impliqué dans la voie de la glycolyse, permet la génération de NADPH, utilisée dans les voies de détoxification anti-oxydantes [360]. Deux gènes, *PA26* (*Sesn1*) et *Hi95* (*Sesn2*), ont été identifiés suite à une augmentation de leur expression de manière p53-dépendante suite à des dommages à l'ADN [361, 362]. Il a été démontré que les *Sestrins* sont impliquées dans la régénération des peroxiredoxines, impliquées dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène [336]. Une autre cible de p53 permettant d'exprimer sa fonction anti-oxydante est la protéine *Tumor protein 53-induced nuclear*

protein 1 (TP53INP1) [363]. En effet, les MEFs de souris *TP53INP1*^{-/-} accumulent les ROS intracellulaires, tandis que la surexpression de *TP53INP1* dans les MEFs *p53*^{-/-} permet de restaurer les niveaux physiologiques de ROS [363]. L'étude de Sablina *et al* démontre que en absence de stress ou en présence de peu de stress, les faibles niveaux de p53 permettent l'expression de plusieurs gènes anti-oxydants (*Sesn* et *GPX*). Ceci induit la diminution des ROS et permet de protéger la cellule contre les dommages à l'ADN. Malgré ses activités anti-oxydantes, le rôle de p53 dans la régulation du stress oxydatif est complexe et p53 peut aussi démontrer certains effets pro-oxydants. En effet, une plus forte activation de p53 après un stress intense et prolongé provoque une activation des gènes pro-oxydants (*BAX*, *PIG3*, *PUMA*, *proline oxydase*, *p66*^{SHC}), menant à une augmentation des niveaux de ROS et à l'apoptose (Figure 12) [364-368]. La protéine *p66*^{SHC} activée par p53 interagit avec la chaîne de transport des électrons pour promouvoir la génération de ROS [368]. De plus, p53 peut inhiber ou moduler l'expression de gènes anti-oxydants, tel que *Sod2*, *ALDH4*, *GPX1* et *NRF2*, provoquant une augmentation des niveaux de ROS [348, 359, 369-371].

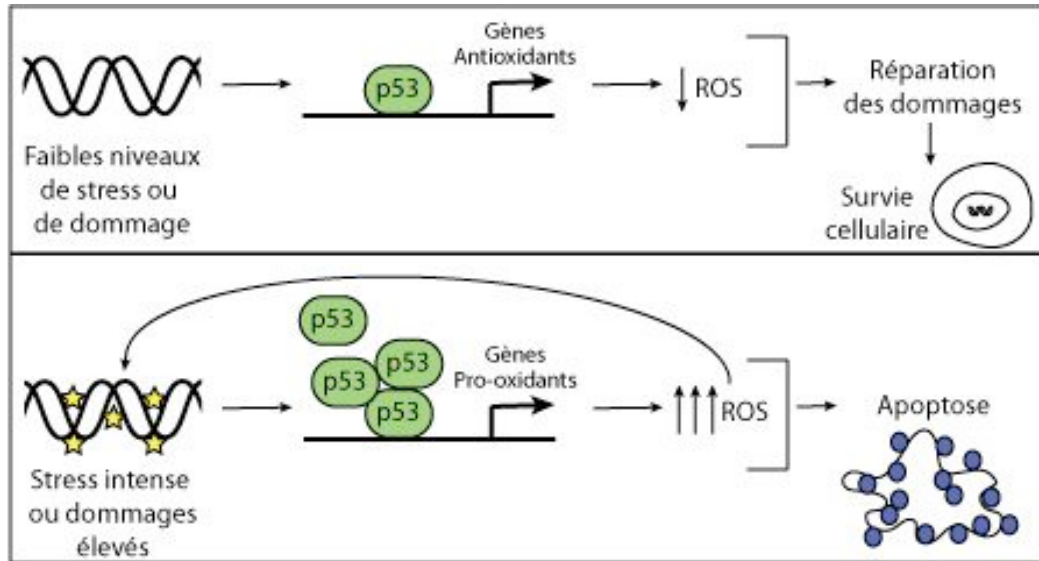


Figure 12 Représentation schématique illustrant le rôle de p53 dans la régulation du stress oxydatif. (a) En absence de stress ou lors d'un faible stress, les faibles niveaux de p53 permettent l'activation des gènes anti-oxydants, provoquant une diminution des ROS. (b) En cas de stress intense et prolongé, les niveaux élevés de p53 permettent l'activation de gènes pro-oxydants, provoquant une augmentation des ROS. Adapté de Bensaad K. (2005) *Nat Med* 11 : 1278-9

1.5.4 Les ROS : responsables de l'apparition des maladies neurodégénératives?

Plusieurs évidences suggèrent que les mitochondries jouent un rôle central dans les maladies neurodégénératives associées à l'âge. En effet, certaines études ont démontré que l'intégrité mitochondriale décline avec l'âge [372]. Dans les tissus post-mitotiques comme le cerveau, cette baisse de fonction est causée par l'accumulation de dommages au niveau de l'ADN mitochondrial. En effet, des études ont montré une augmentation de 8-oxo-2'-deoxyguanosine (oxo⁸dG) avec l'âge [373]. De plus, l'accumulation de dommages est plus importante au niveau de l'ADN mitochondrial que l'ADN génomique. La proximité de

l'ADN mitochondrial des sources oxydantes et le manque de protection par les histones expliquent ces effets délétères des ROS [323]. Étant donné que l'ADN mitochondrial code pour plusieurs composés de la chaîne de transport des électrons, l'accumulation de mutations provoque une augmentation dans la production net de ROS, qui à leur tour vont induire des dommages mitochondriaux, et ainsi diminuer le fonctionnement de la mitochondrie [374, 375]. Comme le stipule la théorie élaborée par Harman, lors du vieillissement, les dommages induits aux mitochondries, incluant les dommages oxydatifs, peuvent causer une diminution des défenses anti-oxydantes, provoquant une augmentation dans la production net de ROS [319, 375]. Cette hypothèse est supportée par des études qui montrent que la surexpression des défenses anti-oxydantes permet de diminuer les taux de ROS, et ainsi d'augmenter la longévité. Chez la *Drosophile*, la surexpression de la *Sod2* mitochondriale permet de prolonger la durée de vie [376]. Chez la souris, la surexpression de la *Catalase* spécifiquement dans la mitochondrie permet d'augmenter de 20% l'âge moyen et maximal [377]. Chez l'Homme, une étude récente analysant l'expression de gènes impliqués dans différents métabolismes dans le cerveau de personnes âgées démontre que les dommages oxydatifs jouent un rôle majeur dans le déclin de la fonction cognitive avec l'âge [378]. Les gènes dont l'expression diminue avec l'âge subissent plus de dommages oxydatifs sur leurs promoteurs comparés aux gènes sans variation d'expression [378]. Donc, un mauvais fonctionnement de la mitochondrie serait responsable des dommages sur les gènes vulnérables dans le cerveau lors du vieillissement.

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par la perte sélective, progressive et graduelle des neurones. Ces maladies incluent la maladie de Parkinson (MP), la maladie

d'Alzheimer (MA), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie d'Huntington (MH). Le plus grand facteur de risque de ces maladies est sans contredit l'âge. Ces maladies possèdent des défauts communs, en l'occurrence une fonction mitochondriale altérée, une augmentation des dommages oxydatifs, un dérèglement du système ubiquitine-protéasome, la présence d'agrégation anormale de protéines et un changement dans le métabolisme du fer [379, 380]. À cause de leur haut taux métabolique et de leur grand besoin en énergie, les neurones ont une consommation élevée en oxygène. Les dommages oxydatifs se manifestent par une augmentation des produits de la peroxydation des lipides, ainsi que l'oxydation des bases d'ADN et l'oxydation des protéines [381]. La maladie d'Alzheimer est caractérisée cliniquement par une diminution progressive de la cognition. La présence de plaques séniles composées du peptide β -amyloïde toxique ($A\beta$ 1-42) a été observée ainsi que des enchevêtrements de neurofibres formées de la protéine tau hyperphosphorylée [375]. Les dommages oxydatifs se manifestent de manière précoce dans le cerveau des patients MA, avant l'apparition de plaques [382]. Plusieurs voies liant les dommages oxydatifs à la pathologie de la MA ont été découvertes récemment. En effet, le stress oxydatif peut activer des voies de signalisation qui vont altérer l'*APP* (*l'amyloid protein precursor* qui peut être clivé par la β -secretase pour donner le $A\beta$ toxique) ou la protéine tau. Par exemple, le stress oxydatif peut augmenter l'expression de la β -secretase par l'activation de c-Jun ou de la MAPK p38 [383]. Il peut aussi augmenter la phosphorylation aberrante de tau par l'activation de GSK3 [384]. De son côté, la maladie de Parkinson est caractérisée cliniquement par une rigidité progressive et des tremblements. Elle est due à une perte des neurones pigmentés de la substance noire et à la présence de corps de *Lewy* (inclusion cytoplasmique contenant l' α -synucléine et l'ubiquitine) [375].

Des drogues comme la roténone et le MPTP ont des effets qui miment la MP, car leur infusion chronique chez des souris peut causer l'apparition du phénotype de Parkinson suite à la dégénérescence de la substance noire [385, 386]. Ces deux agents sont des inhibiteurs du complexe I de la mitochondrie, dont le blocage provoque une augmentation des ROS [387]. Des études ont montré qu'une mauvaise régulation de la protéine α -synucléine peut induire la MP. En effet, dans un modèle de souris transgéniques, la surexpression de l' α -synucléine affecte la fonction mitochondriale et cause des dommages oxydatifs, en augmentant la sensibilité au MPTP [388]. Les mêmes observations ont été obtenues suite à la surexpression d'une forme mutée de l' α -synucléine [389]. Plusieurs autres gènes associés à la MP interagissent avec la mitochondrie dans l'induction de la maladie. D'autres part, la sclérose latérale amyotrophique est caractérisée par une faiblesse progressive et une atrophie du tissu musculaire, sous jacente à une dégénération des neurones moteurs du cortex et de la moelle épinière. Cette maladie peut être causées par une mutation de la *Sod1* [375]. Des études ont montré que la surexpression de la protéine Sod1 mutée dans des souris transgéniques cause une altération du métabolisme mitochondrial dans le cerveau et la moelle épinière [390]. Étant une protéine cytoplasmique, des études démontrent qu'une fois mutée, celle-ci peut être localisé à la mitochondrie dans les tissus affectés [391-393]. Chez la souris, l'expression de la protéine Sod1 humaine mutée peut s'accumuler au niveau de la membrane mitochondriale externe, d'où un blocage de l'importation de la protéine, et l'augmentation aberrante de ROS. Ceci induit une oxydation des protéines et des lipides [390]. Finalement, la maladie de Huntington, caractérisée par la démence et des troubles psychiatriques, est causée par une perte des projections des neurones dans le cortex et le striatum. C'est une maladie

héréditaire causée par une mutation du gène *Huntingtin (HTT)* avec une augmentation des répétitions des trinuécléotides CAG [375]. Certaines toxines mitochondriales, tel que le 3-NP et le malonate, peuvent induire un phénotype de la MH en bloquant spécifiquement la succinate déshydrogénase dans le complexe II de la chaîne de transport des électrons [394]. Des études ont démontré que la HTT mutée peut interagir directement avec la mitochondrie, et altérer sa fonction [395]. Étant donné que p53 est impliqué dans la fonction mitochondriale et le stress oxydatif, une étude récente a démontré que la HTT mutée peut augmenter les niveaux et l'activité transcriptionnelle de p53 en se liant à celle-ci [396]. Ceci induit une activation de BAX et PUMA, menant à la dépolarisation de la membrane mitochondriale et à l'apoptose. La protéine PGC-1 α peut être associée à la MH. En effet, les souris mutantes pour *PGC-1 α* ont une altération de la fonction mitochondriale et une dégénération du striatum [397].

Les dommages oxydatifs peuvent aussi causer la mort neuronale dans plusieurs maladies neurodégénératives de la rétine. En effet, par sa consommation élevée d'oxygène et son exposition constante à la lumière, la rétine est très susceptible aux dommages oxydatifs [398]. Ces dommages vont ultimement causer une augmentation de la peroxydation des lipides, l'oxydation de l'ADN et des protéines [399]. Parmi les maladies oculaires associées à l'accumulation de dommages oxydatifs avec l'âge, on retrouve la dégénérescence maculaire (AMD), la rétinite pigmentaire et l'apparition de cataractes. L'AMD est une des causes majeures de la perte de vision chez la population vieillissante. Cette perte de vision est provoquée par l'accumulation de dépôts extracellulaires (*drusen*) au niveau de l'épithélium pigmenté (RPE) causant son atrophie [400]. Ceci est suivi par une perte

progressive des photorécepteurs de la macula. Lors de cette maladie, les radicaux libres peuvent être responsables de l'accumulation des dommages oxydatifs provoquant un mauvais fonctionnement de la mitochondrie et ultimement la mort des cellules [401]. Certaines évidences suggèrent que le peptide β -amyloïde toxique est présent dans les dépôts extracellulaires sur le RPE, provoquant une augmentation de ROS et l'apoptose des photorécepteurs dans un modèle murin de l'AMD [402]. D'autres évidences montrent que des souris *Sod1*^{-/-} souffrent de l'AMD [403]. Ces souris présentent une accumulation des dépôts au niveau de le RPE avec l'âge. De plus, les cellules de le RPE chez ces souris ont plus de dommages oxydatifs, causant une diminution de l'intégrité membranaire. D'autres parts, le *knockdown* de *Sod2* dans le RPE chez la souris provoque l'accumulation du taux de ROS et de dommages oxydatifs tel que l'accumulation de débris et de protéines oxydées, accélérant l'apparition de l'AMD [404]. La rétinite pigmentaire est une maladie neurodégénérative de la rétine due à la mort des photorécepteurs. Les photorécepteurs de types bâtonnets sont les premières cellules à disparaître, causant une perte de la vision nocturne. Il s'en suit la mort des photorécepteurs de types cônes, provoquant une perte complète de la vision [405]. Une étude a démontré que les dommages oxydatifs sont la principale cause de la mort des cônes. De plus, la surexpression des gènes *Sod2* et la Catalase permet de diminuer le taux de dommages oxydatifs dans la rétine chez la souris après la naissance, et de réduire le taux d'apoptose des cônes [405]. La cataracte est caractérisée par une opacification progressive du cristallin lors du vieillissement suite à l'accumulation de dommages oxydatifs induit par différents facteurs tel que les UV [406]. Ceux-ci causent la production de ROS menant à la modification et à la dénaturation des protéines du cytosquelette dans les cellules du cristallin. L'accumulation d'agrégats de ces

protéines endommagées cause une opacification du cristallin [400]. Tout comme le cristallin, une autre structure de l'œil, la cornée, exprime aussi plusieurs protéines anti-oxydantes pour combattre les dommages causés par la lumière. En effet, cette structure sert de barrière physique et biochimique pour protéger les structures internes de l'œil, comme le cristallin et la rétine [399]. Ainsi, le mauvais fonctionnement de la mitochondrie et le stress oxydatif contribuent au vieillissement, ce qui représente le facteur principal dans l'apparition des maladies neurodégénératives.

1.6 Hypothèses et objectifs

Chapitre 2 : *Bmi1* distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main progenitor cell population and is required for normal retinal development.

Le gène *Bmi1* joue un rôle important dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et celles des systèmes nerveux central et périphérique. Cependant, il ne serait pas essentiel à la prolifération de progéniteurs plus "commis" (c'est à dire ayant perdu leur multipotence). Nous avons émis l'hypothèse que le gène *Bmi1* permettrait de distinguer une rare population de progéniteurs immatures avec des caractéristiques de cellules souches, de celle de progéniteurs plus "commis" présents dans la rétine. De plus, celui-ci serait requis pour le développement normal de l'œil après la naissance. Notre premier objectif était d'isoler les progéniteurs immatures présents dans la rétine selon les niveaux d'expression du marqueur de progéniteurs rétiniens, soit SSEA1, pour vérifier le statut de *Bmi1* au niveau de ces cellules. Deuxièmement, étant donné que les progéniteurs immatures démontrent 2 propriétés fondamentales des cellules souches, soient la capacité de prolifération et d'auto-renouvellement, il était intéressant d'analyser l'effet de la mutation *Bmi1* sur la prolifération et l'auto-renouvellement de ces progéniteurs immatures à différents stades de développement de la rétine (aussi bien embryonnaire qu'après la naissance). De plus, en étant un répresseur du gène *p19^{ARF}*, qui lui-même est un activateur de *p53*, il était essentiel d'analyser la prolifération et l'auto-renouvellement des progéniteurs immatures doubles mutants pour *Bmi1* et *p53*. Finalement, il était pertinent

d'analyser la taille de la rétine après la naissance chez les souris *Bmi1*^{-/-} pour savoir si *Bmi1* est requis pour le développement post-natal de la rétine. Nos résultats démontrent que les progéniteurs immatures, capables de générer des colonies, sont uniquement présents dans la fraction enrichie pour *Bmi1* et SSEA1. De plus, les niveaux d'expression de *Bmi1* corrèlent avec la taille des colonies et leur capacité d'auto-renouvellement. Nos analyses révèlent aussi que *Bmi1* est requis pour la prolifération et la maintenance post-natale d'une sous-population de progéniteurs immatures localisés dans la vésicule optique, le corps ciliaire et la rétine périphérique, contrairement à la population principale de progéniteurs rétiniens. Aussi, les nouveaux-nés *Bmi1*^{-/-} développent des rétines de plus petite taille comparativement aux nouveaux-nés de type sauvage. Ainsi, nous concluons que *Bmi1* distingue une sous-population de progéniteurs immatures ayant des caractéristiques de cellule souches, de la population principale de progéniteurs, et que ce dernier est requis pour le développement normal de la rétine après la naissance.

Chapitre 3 : The Polycomb Group Gene *Bmi1* Regulates Antioxidant Defenses in Neurons by Repressing *p53* Pro-oxidant Activity

Les dommages cellulaires causés par les ROS mitochondriales accélèrent le processus du vieillissement. La balance entre les niveaux de genèse de ces métabolites et les mécanismes de défenses anti-oxydantes est critique pour déterminer le taux d'accumulation de dommages oxydatifs cellulaires et la durée de vie. Nos analyses préalables faites sur les souris *Bmi1*^{-/-} démontrent que celles-ci souffrent d'un vieillissement prématuré (i.e.

présence de cataractes, d'une activité β -galactosidase à pH acide associée à la sénescence et d'une gliose réactionnelle au niveau de l'œil). Nous avons émis l'hypothèse que le gène *Bmi1* est requis pour prévenir la mort des neurones et l'induction d'un phénotype de vieillissement prématuré, caractérisé par une baisse des défenses anti-oxydantes. Notre premier objectif était d'analyser l'expression de *Bmi1* dans les neurones du système nerveux central et, ensuite, voir si l'absence de *Bmi1* peut induire une augmentation de l'apoptose au niveau de ces cellules. Deuxièmement, il était intéressant d'analyser le métabolisme oxydatif dans les neurones *Bmi1*^{-/-} comparativement aux neurones de types sauvages, et vérifier leurs sensibilités différentielles à différents agents neurotoxiques. Troisièmement, nous avons analysé les mécanismes moléculaires qui régissent le rôle de *Bmi1* dans le contrôle ~~le~~ du métabolisme des radicaux libres. Nos résultats montrent que *Bmi1* est exprimé dans les différentes structures de l'œil et dans les neurones post-mitotiques du système nerveux central. Les souris *Bmi1*^{-/-} démontrent un phénotype de sénescence au niveau de l'œil et du cerveau, avec une augmentation de l'apoptose des neurones. *In vitro*, nous avons remarqué que les neurones *Bmi1*^{-/-} sont hypersensibles à plusieurs agents neurotoxiques. Ces neurones ont un taux anormalement élevé de ROS, surexpriment p53, et montrent une diminution dramatique des défenses anti-oxydantes. Nos analyses génétiques et moléculaires révèlent que la plupart des fonctions de *Bmi1* sur le métabolisme oxydatif sont liées à la répression de l'activité pro-oxydante de p53.

Annexe 1 : BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal.

Le glioblastome multiforme (GBM) est le cancer du cerveau le plus agressif. Le gène *Bmi1*, souvent associé au développement néoplasique, est très impliqué dans la prolifération des cellules souches cancéreuses. Les résultats présentés dans l'article de Abdouh et al (2009), démontrent que BMI1 et EZH2 (protéine polycomb appartenant au PRC2) sont surexprimés dans les cellules souches initiatrices de tumeurs (identifiées par le marqueur CD133), aussi bien au niveau de biopsies de GBM que de cellules de GBM en culture. Le Knockdown de l'expression de *BMI1* et *EZH2* dans les cellules de GBM (à l'aide d'ARN interférant) la croissance de ces cellules et formation de colonies. Ces effets corrént avec une déplétion de la population CD133 positive, causés par une augmentation de l'apoptose et de la différenciation cellulaire. De plus, l'ablation de *BMI1* empêche presque complètement la formation de tumeurs cérébrales chez des souris NOD-SCID. L'analyse de l'expression géniques (par chip d'ADN) démontre que *BMI1* répriment des gènes supresseurs de tumeurs alternatifs qui compensent la perte des voies *INK4A/ARF/P53* et l'hyperactivité de la voie *PI(3)K/AKT*.

RÉFÉRENCE

1. Murry, C.E. and G. Keller, *Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development*. Cell, 2008. **132**(4): p. 661-80.
2. Bear, M.F., *Neurosciences: Exploring the brain*. third édition ed. 2007, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
3. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*. Sixth Edition ed. 2000, Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
4. Oliver, G. and P. Gruss, *Current views on eye development*. Trends Neurosci, 1997. **20**(9): p. 415-21.
5. Marquardt, T., *Transcriptional control of neuronal diversification in the retina*. Prog Retin Eye Res, 2003. **22**(5): p. 567-77.
6. Adler, R. and M.V. Canto-Soler, *Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies*. Dev Biol, 2007. **305**(1): p. 1-13.
7. Duparc, R.H., et al., *Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle*. Dev Biol, 2007. **301**(2): p. 374-87.
8. Lamba, D., M. Karl, and T. Reh, *Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(6): p. 538-49.
9. Treisman, J.E., *How to make an eye*. Development, 2004. **131**(16): p. 3823-7.

10. Gehring, W.J., *The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types*. Int J Dev Biol, 2002. **46**(1): p. 65-73.
11. Walther, C. and P. Gruss, *Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS*. Development, 1991. **113**(4): p. 1435-49.
12. Chow, R.L., et al., *Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate*. Development, 1999. **126**(19): p. 4213-22.
13. Halder, G., P. Callaerts, and W.J. Gehring, *Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1788-92.
14. Tetreault, N., M.P. Champagne, and G. Bernier, *The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation*. Dev Biol, 2009. **327**(2): p. 541-50.
15. Bailey, T.J., et al., *Regulation of vertebrate eye development by Rx genes*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 761-70.
16. Chow, R.L. and R.A. Lang, *Early eye development in vertebrates*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 255-96.
17. Viczian, A.S., et al., *Expression of Xenopus laevis Lhx2 during eye development and evidence for divergent expression among vertebrates*. Dev Dyn, 2006. **235**(4): p. 1133-41.
18. Zuber, M.E., et al., *Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors*. Development, 2003. **130**(21): p. 5155-67.

19. Livesey, F.J. and C.L. Cepko, *Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(2): p. 109-18.
20. Marquardt, T. and P. Gruss, *Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all*. Trends Neurosci, 2002. **25**(1): p. 32-8.
21. Prada, C., et al., *Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina*. Eur J Neurosci, 1991. **3**(11): p. 1187.
22. Ohsawa, R. and R. Kageyama, *Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors*. Brain Res, 2008. **1192**: p. 90-8.
23. Harada, T., C. Harada, and L.F. Parada, *Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye*. Genes Dev, 2007. **21**(4): p. 367-78.
24. Cepko, C.L., et al., *Cell fate determination in the vertebrate retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 589-95.
25. Zhang, X.M. and X.J. Yang, *Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog*. Development, 2001. **128**(6): p. 943-57.
26. Hatakeyama, J. and R. Kageyama, *Retinal cell fate determination and bHLH factors*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(1): p. 83-9.
27. Brown, N.L., et al., *Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation*. Development, 2001. **128**(13): p. 2497-508.
28. Marquardt, T., et al., *Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells*. Cell, 2001. **105**(1): p. 43-55.

29. Furukawa, T., E.M. Morrow, and C.L. Cepko, *Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation*. Cell, 1997. **91**(4): p. 531-41.
30. Hatakeyama, J., et al., *Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type*. Development, 2001. **128**(8): p. 1313-22.
31. Hojo, M., et al., *Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina*. Development, 2000. **127**(12): p. 2515-22.
32. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
33. Oren, M., *Decision making by p53: life, death and cancer*. Cell Death Differ, 2003. **10**(4): p. 431-42.
34. Jacobs, W.B., D.R. Kaplan, and F.D. Miller, *The p53 family in nervous system development and disease*. J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1571-84.
35. Fortin, A., et al., *APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death*. J Cell Biol, 2001. **155**(2): p. 207-16.
36. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, *Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy*. Cell, 2002. **108**(2): p. 153-64.
37. Chipuk, J.E., et al., *PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1732-5.

38. Uo, T., Y. Kinoshita, and R.S. Morrison, *Apoptotic actions of p53 require transcriptional activation of PUMA and do not involve a direct mitochondrial/cytoplasmic site of action in postnatal cortical neurons*. J Neurosci, 2007. **27**(45): p. 12198-210.
39. Jost, C.A., M.C. Marin, and W.G. Kaelin, Jr., *p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 191-4.
40. Yang, A., et al., *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 305-16.
41. Fillippovich, I., et al., *Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53*. Oncogene, 2001. **20**(4): p. 514-22.
42. Pozniak, C.D., et al., *An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death*. Science, 2000. **289**(5477): p. 304-6.
43. Vogel, K.S. and L.F. Parada, *Sympathetic neuron survival and proliferation are prolonged by loss of p53 and neurofibromin*. Mol Cell Neurosci, 1998. **11**(1-2): p. 19-28.
44. Slack, R.S., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of the tumor suppressor, p53, induces apoptosis in postmitotic neurons*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 1085-96.
45. Jacobs, W.B., et al., *p63 is an essential proapoptotic protein during neural development*. Neuron, 2005. **48**(5): p. 743-56.
46. Lee, A.F., et al., *Evidence that DeltaNp73 promotes neuronal survival by p53-dependent and p53-independent mechanisms*. J Neurosci, 2004. **24**(41): p. 9174-84.

47. Walsh, G.S., et al., *The invulnerability of adult neurons: a critical role for p73*. J Neurosci, 2004. **24**(43): p. 9638-47.
48. Pozniak, C.D., et al., *p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons*. J Neurosci, 2002. **22**(22): p. 9800-9.
49. Molofsky, A.V., R. Pardal, and S.J. Morrison, *Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(6): p. 700-7.
50. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 675-99.
51. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 777-88.
52. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
53. Osawa, M., et al., *Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell*. Science, 1996. **273**(5272): p. 242-5.
54. Fuchs, E., *The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race*. Cell, 2009. **137**(5): p. 811-9.
55. McKay, R., *Stem cells--hype and hope*. Nature, 2000. **406**(6794): p. 361-4.
56. Huttner, W.B. and Y. Kosodo, *Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 648-57.

57. Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla, *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. Annu Rev Neurosci, 2009. **32**: p. 149-84.
58. Mayer-Proschel, M., et al., *Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells*. Neuron, 1997. **19**(4): p. 773-85.
59. Tropepe, V., et al., *Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon*. Dev Biol, 1999. **208**(1): p. 166-88.
60. Burrows, R.C., et al., *Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex*. Neuron, 1997. **19**(2): p. 251-67.
61. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. Science, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
62. Miller, F.D. and A. Gauthier-Fisher, *Home at last: neural stem cell niches defined*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 507-10.
63. Kokovay, E., Q. Shen, and S. Temple, *The incredible elastic brain: how neural stem cells expand our minds*. Neuron, 2008. **60**(3): p. 420-9.
64. Suh, H., et al., *In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 515-28.
65. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.

66. Temple, S., *Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture*. Nature, 1989. **340**(6233): p. 471-3.
67. Chojnacki, A.K., G.K. Mak, and S. Weiss, *Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both?* Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(2): p. 153-63.
68. Reynolds, B.A. and R.L. Rietze, *Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship*. Nat Methods, 2005. **2**(5): p. 333-6.
69. Marshall, G.P., 2nd, B.A. Reynolds, and E.D. Laywell, *Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo*. Curr Pharm Biotechnol, 2007. **8**(3): p. 141-5.
70. Machon, O., et al., *Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium*. Neuroscience, 2003. **122**(1): p. 129-43.
71. Zechner, D., et al., *beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system*. Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 406-18.
72. Woodhead, G.J., et al., *Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation*. J Neurosci, 2006. **26**(48): p. 12620-30.
73. Lie, D.C., et al., *Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1370-5.
74. Mizutani, K., et al., *Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 351-5.

75. Stump, G., et al., *Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain*. Mech Dev, 2002. **114**(1-2): p. 153-9.
76. Hatakeyama, J., et al., *Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation*. Development, 2004. **131**(22): p. 5539-50.
77. Gaiano, N., J.S. Nye, and G. Fishell, *Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain*. Neuron, 2000. **26**(2): p. 395-404.
78. Hitoshi, S., et al., *Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells*. Genes Dev, 2002. **16**(7): p. 846-58.
79. Yoon, K., et al., *Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors*. J Neurosci, 2004. **24**(43): p. 9497-506.
80. Ohtsuka, T., et al., *Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30467-74.
81. Lai, K., et al., *Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 21-7.
82. Machold, R., et al., *Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 937-50.

83. Bylund, M., et al., *Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity*. Nat Neurosci, 2003. **6**(11): p. 1162-8.
84. Ferri, A.L., et al., *Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain*. Development, 2004. **131**(15): p. 3805-19.
85. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-40.
86. Graham, V., et al., *SOX2 functions to maintain neural progenitor identity*. Neuron, 2003. **39**(5): p. 749-65.
87. Bertrand, N., D.S. Castro, and F. Guillemot, *Proneural genes and the specification of neural cell types*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(7): p. 517-30.
88. Ge, W., et al., *Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1319-24.
89. Sakakibara, S., et al., *Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell*. Dev Biol, 1996. **176**(2): p. 230-42.
90. Sakakibara, S., et al., *Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS*. J Neurosci, 2001. **21**(20): p. 8091-107.
91. Capela, A. and S. Temple, *LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal*. Neuron, 2002. **35**(5): p. 865-75.

92. Corti, S., et al., *Isolation and characterization of murine neural stem/progenitor cells based on Prominin-1 expression*. *Exp Neurol*, 2007. **205**(2): p. 547-62.
93. Coskun, V., et al., *CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(3): p. 1026-31.
94. Turner, D.L. and C.L. Cepko, *A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development*. *Nature*, 1987. **328**(6126): p. 131-6.
95. Wetts, R. and S.E. Fraser, *Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina*. *Science*, 1988. **239**(4844): p. 1142-5.
96. Duparc, R.H., et al., *Pax6 is required for delta-catenin/neurojugin expression during retinal, cerebellar and cortical development in mice*. *Dev Biol*, 2006. **300**(2): p. 647-55.
97. Harris, W.A. and M. Perron, *Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina*. *Int J Dev Biol*, 1998. **42**(3): p. 299-304.
98. Koso, H., et al., *SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway*. *Dev Biol*, 2006. **292**(1): p. 265-76.
99. Oron-Karni, V., et al., *Dual requirement for Pax6 in retinal progenitor cells*. *Development*, 2008. **135**(24): p. 4037-47.
100. Oliver, G., et al., *Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development*. *Development*, 1995. **121**(12): p. 4045-55.

101. Mathers, P.H., et al., *The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 603-7.
102. Jean, D., G. Bernier, and P. Gruss, *Six6 (Optx2) is a novel murine Six3-related homeobox gene that demarcates the presumptive pituitary/hypothalamic axis and the ventral optic stalk*. Mech Dev, 1999. **84**(1-2): p. 31-40.
103. Wetts, R., G.N. Serbedzija, and S.E. Fraser, *Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina*. Dev Biol, 1989. **136**(1): p. 254-63.
104. Ahmad, I., L. Tang, and H. Pham, *Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **270**(2): p. 517-21.
105. Perron, M. and W.A. Harris, *Retinal stem cells in vertebrates*. Bioessays, 2000. **22**(8): p. 685-8.
106. Tropepe, V., et al., *Retinal stem cells in the adult mammalian eye*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2032-6.
107. Edlund, T. and T.M. Jessell, *Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system*. Cell, 1999. **96**(2): p. 211-24.
108. Reh, T.A. and E.M. Levine, *Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina*. J Neurobiol, 1998. **36**(2): p. 206-20.
109. Kubo, F., M. Takeichi, and S. Nakagawa, *Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone*. Development, 2003. **130**(3): p. 587-98.

110. Bringmann, A., et al., *Muller cells in the healthy and diseased retina*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(4): p. 397-424.
111. Osakada, F., et al., *Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals*. J Neurosci, 2007. **27**(15): p. 4210-9.
112. Bernardos, R.L., et al., *Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells*. J Neurosci, 2007. **27**(26): p. 7028-40.
113. Deschamps, J., *Ancestral and recently recruited global control of the Hox genes in development*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(5): p. 422-7.
114. Coiffier, D., B. Charroux, and S. Kerridge, *Common functions of central and posterior Hox genes for the repression of head in the trunk of Drosophila*. Development, 2008. **135**(2): p. 291-300.
115. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 846-56.
116. Schuettengruber, B., et al., *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. Cell, 2007. **128**(4): p. 735-45.
117. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 9-22.
118. Breen, T.R., V. Chinwalla, and P.J. Harte, *Trithorax is required to maintain engrailed expression in a subset of engrailed-expressing cells*. Mech Dev, 1995. **52**(1): p. 89-98.

119. Hanson, R.D., et al., *Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14372-7.
120. Franke, A., et al., *Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of Drosophila melanogaster*. EMBO J, 1992. **11**(8): p. 2941-50.
121. Alkema, M.J., et al., *Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex*. Genes Dev, 1997. **11**(2): p. 226-40.
122. Francis, N.J. and R.E. Kingston, *Mechanisms of transcriptional memory*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(6): p. 409-21.
123. Otte, A.P. and T.H. Kwaks, *Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion?* Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(5): p. 448-54.
124. Muller, J., S. Gaunt, and P.A. Lawrence, *Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies*. Development, 1995. **121**(9): p. 2847-52.
125. Gould, A., *Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(4): p. 488-94.
126. van Lohuizen, M., *Functional analysis of mouse Polycomb group genes*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(1): p. 71-9.
127. Akasaka, T., et al., *A role for mel-18, a Polycomb group-related vertebrate gene, during theanteroposterior specification of the axial skeleton*. Development, 1996. **122**(5): p. 1513-22.

128. van der Lugt, N.M., et al., *Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene*. *Genes Dev*, 1994. **8**(7): p. 757-69.
129. Alkema, M.J., et al., *Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice*. *Nature*, 1995. **374**(6524): p. 724-7.
130. Simon, J., A. Chiang, and W. Bender, *Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the abdA and AbdB homeotic products*. *Development*, 1992. **114**(2): p. 493-505.
131. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis*. *Exp Hematol*, 2003. **31**(7): p. 567-85.
132. Sewalt, R.G., et al., *Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(6): p. 3586-95.
133. Lessard, J., S. Baban, and G. Sauvageau, *Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells*. *Blood*, 1998. **91**(4): p. 1216-24.
134. Tokimasa, S., et al., *Lack of the Polycomb-group gene rae28 causes maturation arrest at the early B-cell developmental stage*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(1): p. 93-103.
135. Strutt, H. and R. Paro, *The polycomb group protein complex of Drosophila melanogaster has different compositions at different target genes*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(12): p. 6773-83.

136. Shao, Z., et al., *Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex*. Cell, 1999. **98**(1): p. 37-46.
137. Jacobs, J.J. and M. van Lohuizen, *Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(2): p. 151-61.
138. Muller, J. and J.A. Kassis, *Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(5): p. 476-84.
139. Polo, S.E. and G. Almouzni, *Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours*. Curr Opin Genet Dev, 2006. **16**(2): p. 104-11.
140. Taylor-Harding, B., et al., *p55, the Drosophila ortholog of RbAp46/RbAp48, is required for the repression of dE2F2/RBF-regulated genes*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 9124-36.
141. Nekrasov, M., B. Wild, and J. Muller, *Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2*. EMBO Rep, 2005. **6**(4): p. 348-53.
142. Ketel, C.S., et al., *Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6857-68.
143. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
144. Czermin, B., et al., *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. Cell, 2002. **111**(2): p. 185-96.

145. Muller, J., et al., *Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex*. Cell, 2002. **111**(2): p. 197-208.
146. Ebert, A., et al., *Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in Drosophila*. Genes Dev, 2004. **18**(23): p. 2973-83.
147. Cao, R. and Y. Zhang, *The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(2): p. 155-64.
148. Kuzmichev, A., et al., *Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2893-905.
149. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb complexes and epigenetic states*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(3): p. 266-73.
150. Montgomery, N.D., et al., *The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation*. Curr Biol, 2005. **15**(10): p. 942-7.
151. Furuyama, T., et al., *SIR2 is required for polycomb silencing and is associated with an E(Z) histone methyltransferase complex*. Curr Biol, 2004. **14**(20): p. 1812-21.
152. Kuzmichev, A., et al., *Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3*. Mol Cell, 2004. **14**(2): p. 183-93.
153. Kuzmichev, A., et al., *Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 1859-64.

154. Saurin, A.J., et al., *A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins*. Nature, 2001. **412**(6847): p. 655-60.
155. Huang, D.H., et al., *pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6261-71.
156. Levine, S.S., et al., *The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6070-8.
157. Kallin, E.M., et al., *Genome-wide uH2A localization analysis highlights Bmi1-dependent deposition of the mark at repressed genes*. PLoS Genet, 2009. **5**(6): p. e1000506.
158. Buchwald, G., et al., *Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b*. EMBO J, 2006. **25**(11): p. 2465-74.
159. Li, Z., et al., *Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20643-9.
160. Cao, R., Y. Tsukada, and Y. Zhang, *Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 845-54.
161. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 873-8.
162. Klymenko, T., et al., *A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1110-22.

163. Mohd-Sarip, A., et al., *Synergistic recognition of an epigenetic DNA element by Pleiohomeotic and a Polycomb core complex*. Genes Dev, 2005. **19**(15): p. 1755-60.
164. Goldberg, M.L., R.A. Colvin, and A.F. Mellin, *The Drosophila zeste locus is nonessential*. Genetics, 1989. **123**(1): p. 145-55.
165. Decoville, M., et al., *DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes*. Genetics, 2001. **157**(1): p. 237-44.
166. Grimaud, C., et al., *RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements*. Cell, 2006. **124**(5): p. 957-71.
167. Sing, A., et al., *A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain*. Cell, 2009. **138**(5): p. 885-97.
168. Mishra, R.K., et al., *The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(4): p. 1311-8.
169. Wang, L., et al., *Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes*. Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 637-46.
170. Francis, N.J., R.E. Kingston, and C.L. Woodcock, *Chromatin compaction by a polycomb group protein complex*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1574-7.
171. Buchenau, P., et al., *The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in Drosophila embryos: impact on models for silencing*. J Cell Biol, 1998. **141**(2): p. 469-81.

172. Hansen, K.H., et al., *A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(11): p. 1291-300.
173. Schubert, D., et al., *Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27*. EMBO J, 2006. **25**(19): p. 4638-49.
174. Sung, S., et al., *Epigenetic maintenance of the vernalized state in Arabidopsis thaliana requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 706-10.
175. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. Nature, 2006. **441**(7091): p. 349-53.
176. Lee, T.I., et al., *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 301-13.
177. Vire, E., et al., *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 871-4.
178. Reynolds, P.A., et al., *Tumor suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24790-802.
179. Hernandez-Munoz, I., et al., *Association of BMI1 with polycomb bodies is dynamic and requires PRC2/EZH2 and the maintenance DNA methyltransferase DNMT1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 11047-58.
180. van der Vlag, J. and A.P. Otte, *Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation*. Nat Genet, 1999. **23**(4): p. 474-8.

181. Tie, F., et al., *The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3*. Development, 2001. **128**(2): p. 275-86.
182. Heard, E., P. Clerc, and P. Avner, *X-chromosome inactivation in mammals*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 571-610.
183. Wang, J., et al., *Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene*. Nat Genet, 2001. **28**(4): p. 371-5.
184. Mak, W., et al., *Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells*. Curr Biol, 2002. **12**(12): p. 1016-20.
185. Silva, J., et al., *Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes*. Dev Cell, 2003. **4**(4): p. 481-95.
186. Plath, K., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation*. Science, 2003. **300**(5616): p. 131-5.
187. O'Carroll, D., et al., *The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4330-6.
188. Hombria, J.C. and B. Lovegrove, *Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis*. Differentiation, 2003. **71**(8): p. 461-76.
189. Schepers, G.E., R.D. Teasdale, and P. Koopman, *Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 167-70.

190. Showell, C., O. Binder, and F.L. Conlon, *T-box genes in early embryogenesis*. Dev Dyn, 2004. **229**(1): p. 201-18.
191. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
192. Squazzo, S.L., et al., *Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner*. Genome Res, 2006. **16**(7): p. 890-900.
193. Antonchuk, J., G. Sauvageau, and R.K. Humphries, *HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo*. Cell, 2002. **109**(1): p. 39-45.
194. Kajiume, T., et al., *Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell cycle status of hematopoietic stem cells*. Exp Hematol, 2004. **32**(6): p. 571-8.
195. Kros1, J., et al., *The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential*. Immunity, 2003. **18**(4): p. 561-71.
196. Kamminga, L.M., et al., *The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2170-9.
197. Ohta, H., et al., *Polycomb group gene rae28 is required for sustaining activity of hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 759-70.
198. Park, I.K., et al., *Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 302-5.

199. Iwama, A., et al., *Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1*. *Immunity*, 2004. **21**(6): p. 843-51.
200. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation*. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
201. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 255-60.
202. Leung, C., et al., *Bmi-1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas*. *Nature*, 2004. **428**(6980): p. 337-41.
203. Liu, S., et al., *Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells*. *Cancer Res*, 2006. **66**(12): p. 6063-71.
204. He, S., et al., *Bmi-1 over-expression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions in vivo*. *Dev Biol*, 2009. **328**(2): p. 257-72.
205. Fortunel, N.O., et al., *Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature"*. *Science*, 2003. **302**(5644): p. 393; author reply 393.
206. Haupt, Y., et al., *bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis*. *Oncogene*, 1993. **8**(11): p. 3161-4.
207. Brunk, B.P., E.C. Martin, and P.N. Adler, *Drosophila genes Posterior Sex Combs and Suppressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene*. *Nature*, 1991. **353**(6342): p. 351-3.

208. van Lohuizen, M., et al., *Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging*. Cell, 1991. **65**(5): p. 737-52.
209. Negishi, M., et al., *Bmi1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(4): p. 992-8.
210. Voncken, J.W., et al., *Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 24): p. 4627-39.
211. Voncken, J.W., et al., *MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5178-87.
212. Jacobs, J.J., et al., *The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 164-8.
213. Gil, J. and G. Peters, *Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 667-77.
214. Bracken, A.P., et al., *The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells*. Genes Dev, 2007. **21**(5): p. 525-30.
215. Agherbi, H., et al., *Polycomb mediated epigenetic silencing and replication timing at the INK4a/ARF locus during senescence*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5622.
216. Park, I.K., S.J. Morrison, and M.F. Clarke, *Bmi1, stem cells, and senescence regulation*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 175-9.

217. Lowe, S.W. and C.J. Sherr, *Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. **13**(1): p. 77-83.
218. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways*. *Genes Dev*, 2005. **19**(12): p. 1432-7.
219. Bruggeman, S.W., et al., *Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice*. *Genes Dev*, 2005. **19**(12): p. 1438-43.
220. Gil, J., et al., *Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(1): p. 67-72.
221. Voncken, J.W., et al., *Rnf2 (Ring1b) deficiency causes gastrulation arrest and cell cycle inhibition*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2468-73.
222. Maertens, G.N., et al., *Several distinct polycomb complexes regulate and co-localize on the INK4a tumor suppressor locus*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6380.
223. Bracken, A.P., et al., *EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer*. *EMBO J*, 2003. **22**(20): p. 5323-35.
224. Bea, S., et al., *BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas*. *Cancer Res*, 2001. **61**(6): p. 2409-12.
225. Vonlanthen, S., et al., *The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression*. *Br J Cancer*, 2001. **84**(10): p. 1372-6.

226. Kim, J.H., et al., *The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins*. *Cancer Lett*, 2004. **203**(2): p. 217-24.
227. Dimri, G.P., et al., *The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(16): p. 4736-45.
228. Neo, S.Y., et al., *Identification of discriminators of hepatoma by gene expression profiling using a minimal dataset approach*. *Hepatology*, 2004. **39**(4): p. 944-53.
229. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
230. Hemmati, H.D., et al., *Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(25): p. 15178-83.
231. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
232. Bruggeman, S.W., et al., *Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma*. *Cancer Cell*, 2007. **12**(4): p. 328-41.
233. Abdouh, M., et al., *BM11 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal*. *J Neurosci*, 2009. **29**(28): p. 8884-96.
234. Kim, J.H., et al., *Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer*. *Breast*, 2004. **13**(5): p. 383-8.

235. Cui, H., et al., *Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells*. Am J Pathol, 2007. **170**(4): p. 1370-8.
236. Kirmizis, A., S.M. Bartley, and P.J. Farnham, *Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(1): p. 113-21.
237. van Kemenade, F.J., et al., *Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3896-901.
238. Varambally, S., et al., *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 624-9.
239. Boukarabila, H., et al., *The PRC1 Polycomb group complex interacts with PLZF/RARA to mediate leukemic transformation*. Genes Dev, 2009. **23**(10): p. 1195-206.
240. Villa, R., et al., *Role of the polycomb repressive complex 2 in acute promyelocytic leukemia*. Cancer Cell, 2007. **11**(6): p. 513-25.
241. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
242. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
243. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.

244. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. *Cell*, 1997. **88**(5): p. 593-602.
245. Herbig, U., et al., *Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)*. *Mol Cell*, 2004. **14**(4): p. 501-13.
246. Hampel, B., et al., *Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells*. *Exp Gerontol*, 2004. **39**(11-12): p. 1713-21.
247. Jackson, J.G. and O.M. Pereira-Smith, *p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8356-60.
248. Shelton, D.N., et al., *Microarray analysis of replicative senescence*. *Curr Biol*, 1999. **9**(17): p. 939-45.
249. Yoon, I.K., et al., *Exploration of replicative senescence-associated genes in human dermal fibroblasts by cDNA microarray technology*. *Exp Gerontol*, 2004. **39**(9): p. 1369-78.
250. Itahana, K., et al., *Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(1): p. 389-401.
251. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. *EMBO J*, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
252. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, *The INK4A/ARF locus and its two gene products*. *Curr Opin Genet Dev*, 1999. **9**(1): p. 22-30.

253. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. Cell, 2003. **113**(6): p. 703-16.
254. Fridman, A.L. and M.A. Tainsky, *Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling*. Oncogene, 2008. **27**(46): p. 5975-87.
255. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
256. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 187-95.
257. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
258. Takai, H., A. Smogorzewska, and T. de Lange, *DNA damage foci at dysfunctional telomeres*. Curr Biol, 2003. **13**(17): p. 1549-56.
259. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 611-22.
260. Fiorentino, F.P., et al., *Senescence and p130/Rb12: a new beginning to the end*. Cell Res, 2009. **19**(9): p. 1044-51.
261. Itahana, K., G. Dimri, and J. Campisi, *Regulation of cellular senescence by p53*. Eur J Biochem, 2001. **268**(10): p. 2784-91.

262. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-68.
263. Feldser, D.M. and C.W. Greider, *Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence*. Cancer Cell, 2007. **11**(5): p. 461-9.
264. Di Leonardo, A., et al., *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*. Genes Dev, 1994. **8**(21): p. 2540-51.
265. Parrinello, S., et al., *Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(8): p. 741-7.
266. Jacobs, J.J. and T. de Lange, *Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2302-8.
267. Stein, G.H., et al., *Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2109-17.
268. Zhu, J., et al., *Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf*. Genes Dev, 1998. **12**(19): p. 2997-3007.
269. Michaloglou, C., et al., *BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 720-4.
270. Lin, A.W., et al., *Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling*. Genes Dev, 1998. **12**(19): p. 3008-19.

271. Dimri, G.P., et al., *Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 273-85.
272. Ohtani, N., et al., *Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 1067-70.
273. Zhang, R., et al., *Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA*. Dev Cell, 2005. **8**(1): p. 19-30.
274. Yaswen, P. and J. Campisi, *Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry*. Cell, 2007. **128**(2): p. 233-4.
275. Sun, P., et al., *PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression*. Cell, 2007. **128**(2): p. 295-308.
276. Munro, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock*. Exp Cell Res, 2004. **295**(2): p. 525-38.
277. Ramsey, M.R. and N.E. Sharpless, *ROS as a tumour suppressor?* Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1213-5.
278. Takahashi, A., et al., *Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1291-7.
279. Sharpless, N.E., *INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus*. Mutat Res, 2005. **576**(1-2): p. 22-38.

280. Kim, W.Y. and N.E. Sharpless, *The regulation of INK4/ARF in cancer and aging*. Cell, 2006. **127**(2): p. 265-75.
281. Quelle, D.E., et al., *Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest*. Cell, 1995. **83**(6): p. 993-1000.
282. Kamijo, T., et al., *Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8292-7.
283. Weber, J.D., et al., *Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(1): p. 20-6.
284. Honda, R. and H. Yasuda, *Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53*. EMBO J, 1999. **18**(1): p. 22-7.
285. Eymin, B., et al., *p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumours established in nude mice*. Oncogene, 2003. **22**(12): p. 1822-35.
286. McKeller, R.N., et al., *The Arf tumor suppressor gene promotes hyaloid vascular regression during mouse eye development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3848-53.
287. Mason, S.L., O. Loughran, and N.B. La Thangue, *p14(ARF) regulates E2F activity*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4220-30.
288. Karayan, L., et al., *Human ARF protein interacts with topoisomerase I and stimulates its activity*. Oncogene, 2001. **20**(7): p. 836-48.

289. Fatyol, K. and A.A. Szalay, *The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits HIF-1-mediated transcription.* J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28421-9.
290. Lindstrom, M.S. and Y. Zhang, *B23 and ARF: friends or foes?* Cell Biochem Biophys, 2006. **46**(1): p. 79-90.
291. Sharpless, N.E., *Ink4a/Arf links senescence and aging.* Exp Gerontol, 2004. **39**(11-12): p. 1751-9.
292. Guney, I., S. Wu, and J.M. Sedivy, *Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3645-50.
293. Grandori, C., et al., *Werner syndrome protein limits MYC-induced cellular senescence.* Genes Dev, 2003. **17**(13): p. 1569-74.
294. Zindy, F., et al., *Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization.* Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2424-33.
295. de Stanchina, E., et al., *E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor.* Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2434-42.
296. Lomazzi, M., et al., *Suppression of the p53- or pRB-mediated G1 checkpoint is required for E2F-induced S-phase entry.* Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 190-4.
297. Kel, A.E., et al., *Computer-assisted identification of cell cycle-related genes: new targets for E2F transcription factors.* J Mol Biol, 2001. **309**(1): p. 99-120.

298. Aslanian, A., et al., *Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics*. Genes Dev, 2004. **18**(12): p. 1413-22.
299. Hansson, A., et al., *The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTalpha genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1073-81.
300. Kamijo, T., et al., *Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function*. Cancer Res, 1999. **59**(10): p. 2464-9.
301. Kronen-Herzig, A., E. Adamson, and D. Mercola, *Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3233-8.
302. Robertson, K.D. and P.A. Jones, *The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6457-73.
303. Gonzalez, S., et al., *Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 702-6.
304. Krishnamurthy, J., et al., *Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1299-307.
305. Chkhotua, A.B., et al., *Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(6): p. 1303-13.

306. Ressler, S., et al., *p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin*. Aging Cell, 2006. **5**(5): p. 379-89.
307. Janzen, V., et al., *Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a*. Nature, 2006. **443**(7110): p. 421-6.
308. Matheu, A., et al., *Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging*. Genes Dev, 2004. **18**(22): p. 2736-46.
309. Maier, B., et al., *Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53*. Genes Dev, 2004. **18**(3): p. 306-19.
310. Tyner, S.D., et al., *p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 45-53.
311. Bauer, J.H., et al., *Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult Drosophila melanogaster extends life span*. Curr Biol, 2005. **15**(22): p. 2063-8.
312. Cao, L., et al., *Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform*. Genes Dev, 2003. **17**(2): p. 201-13.
313. Varela, I., et al., *Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 564-8.
314. Keyes, W.M., et al., *p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging*. Genes Dev, 2005. **19**(17): p. 1986-99.

315. Sommer, M., et al., *DeltaNp63alpha overexpression induces downregulation of Sirt1 and an accelerated aging phenotype in the mouse*. Cell Cycle, 2006. **5**(17): p. 2005-11.
316. Garcia-Cao, I., et al., *"Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally*. EMBO J, 2002. **21**(22): p. 6225-35.
317. Matheu, A., et al., *Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 375-9.
318. Matheu, A., A. Maraver, and M. Serrano, *The Arf/p53 pathway in cancer and aging*. Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6031-4.
319. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
320. Kirkwood, T.B., *Understanding the odd science of aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 437-47.
321. Halliwell, B., *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1634-58.
322. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
323. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.

324. Kasai, H., *Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(4): p. 450-6.
325. Evans, M.D., M. Dizdaroglu, and M.S. Cooke, *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance*. Mutat Res, 2004. **567**(1): p. 1-61.
326. Yin, H. and N.A. Porter, *New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(1-2): p. 170-84.
327. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
328. Nemoto, S., et al., *Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7311-8.
329. Garrett, R.H.a.G., C.M., *Biochimie*. De Boeck Université ed. 2000, Paris.
330. Kristal, B.S. and U. Paolucci, *Caloric restriction in trans*. Sci Aging Knowledge Environ, 2003. **2003**(27): p. PE19.
331. Kushnareva, Y., A.N. Murphy, and A. Andreyev, *Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 545-53.
332. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36027-31.
333. Fridovich, I., *Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7761-4.

334. Halliwell, B., *Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment*. *Drugs Aging*, 2001. **18**(9): p. 685-716.
335. Brigelius-Flohe, R., *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(9-10): p. 951-65.
336. Budanov, A.V., et al., *Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD*. *Science*, 2004. **304**(5670): p. 596-600.
337. Taylor, S.W., et al., *Characterization of the human heart mitochondrial proteome*. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(3): p. 281-6.
338. Joubert, F., et al., *NADH enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP): applications to enzyme and mitochondrial reaction kinetics, in vitro*. *Biophys J*, 2004. **86**(1 Pt 1): p. 629-45.
339. Shih, A.Y., et al., *Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(24): p. 22925-36.
340. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. *Genes Dev*, 1999. **13**(1): p. 76-86.
341. Wakabayashi, N., et al., *Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(7): p. 2040-5.
342. Itoh, K., et al., *Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles*. *Genes Cells*, 2003. **8**(4): p. 379-91.

343. Dinkova-Kostova, A.T., et al., *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11908-13.
344. Wild, A.C., H.R. Moinova, and R.T. Mulcahy, *Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33627-36.
345. Sasaki, H., et al., *Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44765-71.
346. Nguyen, T., P. Nioi, and C.B. Pickett, *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13291-5.
347. Ishii, T., et al., *Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16023-9.
348. Faraonio, R., et al., *p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes*. J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 39776-84.
349. Vargas, M.R. and J.A. Johnson, *The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e17.
350. Leung, L., et al., *Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48021-9.

351. Lee, J.M., et al., *NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37948-56.
352. Calkins, M.J., et al., *Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(1): p. 244-9.
353. Kelly, D.P. and R.C. Scarpulla, *Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function*. Genes Dev, 2004. **18**(4): p. 357-68.
354. Wu, Z., et al., *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. Cell, 1999. **98**(1): p. 115-24.
355. St-Pierre, J., et al., *Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators*. Cell, 2006. **127**(2): p. 397-408.
356. Finkel, T., *Oxidant signals and oxidative stress*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 247-54.
357. Wu, G.S., *The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(2): p. 156-61.
358. Janicke, R.U., D. Sohn, and K. Schulze-Osthoff, *The dark side of a tumor suppressor: anti-apoptotic p53*. Cell Death Differ, 2008. **15**(6): p. 959-76.
359. Hussain, S.P., et al., *p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2350-6.

360. Bensaad, K., et al., *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. Cell, 2006. **126**(1): p. 107-20.
361. Velasco-Miguel, S., et al., *PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes*. Oncogene, 1999. **18**(1): p. 127-37.
362. Budanov, A.V., et al., *Identification of a novel stress-responsive gene Hi95 involved in regulation of cell viability*. Oncogene, 2002. **21**(39): p. 6017-31.
363. Cano, C.E., et al., *Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 219-26.
364. Sablina, A.A., et al., *The antioxidant function of the p53 tumor suppressor*. Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1306-13.
365. Polyak, K., et al., *A model for p53-induced apoptosis*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 300-5.
366. Rivera, A. and S.A. Maxwell, *The p53-induced gene-6 (proline oxidase) mediates apoptosis through a calcineurin-dependent pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29346-54.
367. Liu, Z., et al., *PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1647-54.
368. Trinei, M., et al., *A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(24): p. 3872-8.

369. Tan, M., et al., *Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 12061-6.
370. Drane, P., et al., *Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis*. Oncogene, 2001. **20**(4): p. 430-9.
371. Dhar, S.K., et al., *Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 21698-709.
372. Shigenaga, M.K., T.M. Hagen, and B.N. Ames, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10771-8.
373. Richter, C., J.W. Park, and B.N. Ames, *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(17): p. 6465-7.
374. Trifunovic, A., *Mitochondrial DNA and ageing*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(5-6): p. 611-7.
375. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Nature, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
376. Sun, J., et al., *Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult Drosophila melanogaster*. Genetics, 2002. **161**(2): p. 661-72.
377. Schriener, S.E., et al., *Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria*. Science, 2005. **308**(5730): p. 1909-11.

378. Lu, T., et al., *Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain*. Nature, 2004. **429**(6994): p. 883-91.
379. Reddy, P.H. and M.F. Beal, *Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?* Brain Res Brain Res Rev, 2005. **49**(3): p. 618-32.
380. Jenner, P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **53 Suppl 3**: p. S26-36; discussion S36-8.
381. Moreira, P.I., et al., *Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology*. Curr Alzheimer Res, 2005. **2**(4): p. 403-8.
382. Nunomura, A., et al., *Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(8): p. 759-67.
383. Tamagno, E., et al., *Beta-site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways*. J Neurochem, 2005. **92**(3): p. 628-36.
384. Lovell, M.A., et al., *Induction of hyperphosphorylated tau in primary rat cortical neuron cultures mediated by oxidative stress and glycogen synthase kinase-3*. J Alzheimers Dis, 2004. **6**(6): p. 659-71; discussion 673-81.
385. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1301-6.
386. Fornai, F., et al., *Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3413-8.

387. Sherer, T.B., et al., *Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2003. **23**(34): p. 10756-64.
388. Song, D.D., et al., *Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP*. Exp Neurol, 2004. **186**(2): p. 158-72.
389. Martin, L.J., et al., *Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death*. J Neurosci, 2006. **26**(1): p. 41-50.
390. Mattiazzi, M., et al., *Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29626-33.
391. Higgins, C.M., C. Jung, and Z. Xu, *ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes*. BMC Neurosci, 2003. **4**: p. 16.
392. Vijayvergiya, C., et al., *Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice*. J Neurosci, 2005. **25**(10): p. 2463-70.
393. Liu, J., et al., *Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria*. Neuron, 2004. **43**(1): p. 5-17.
394. Brouillet, E., et al., *Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7105-9.

395. Panov, A.V., et al., *Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines*. Nat Neurosci, 2002. **5**(8): p. 731-6.
396. Bae, B.I., et al., *p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease*. Neuron, 2005. **47**(1): p. 29-41.
397. Lin, J., et al., *Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice*. Cell, 2004. **119**(1): p. 121-35.
398. Abrahan, C.E., et al., *Oxidative stress promotes proliferation and dedifferentiation of retina glial cells in vitro*. J Neurosci Res, 2009. **87**(4): p. 964-77
399. Lassen, N., et al., *Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in Aldh3a1(-/-)/Aldh1a1(-/-) knock-out mice*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p.25668-76
400. Sacca, S.C., et al., *Gene-environment interactions in ocular diseases*. Mutat Res, 2009. **667**(1-2): p.98-117
401. Jarrett, S.G., *Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration*. Prog Retin Eye Res, 2008. **27**(6): p.596-607
402. Bruban, J., et al., *Amyloid-beta(1-42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells*. Aging Cell, 2009. **8**(2): p.162-77
403. Imamura, I., et al., *Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p.11282-7
404. Justilien, V., et al., *SOD2 knockdown mouse model of early AMD*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(10): p.4407-20

405. Usui, S., et al., *Increased expression of catalase and superoxide dismutase 2 reduces cone cell death in retinitis pigmentosa*. Mol Ther, 2009. **17**(5): p.778-86
406. Wolf, N., et al., *Age-related cataract progression in five mouse models for anti-oxidant protection or hormonal influence*. Exp Eye Res, 2005. **81**(3): p.276-85

CHAPITRE 2

ARTICLE

***Bmi1* distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main progenitor cell population and is required for normal retinal development**

Wassim Chatoo[‡], Mohamed Abdouh[‡], Robert-Hugues Duparc and Gilbert Bernier

(Manuscrit accepté pour publication dans le périodique *Stem Cells*)

Le chapitre 2 est un article qui où nous avons étudié l'implication de *Bmi1* dans la prolifération et l'auto-renouvellement des progéniteurs immatures de la rétine. Cette étude montre que *Bmi1* permet de distinguer les progéniteurs immatures de la population principale de progéniteurs rétiniens grâce à son niveau d'expression. De plus, *Bmi1* est requis pour la maintenance des cellules souches dans l'œil après la naissance, et pour le développement normal de la rétine.

Dr Mohamed Abdouh, étudiant post-doctoral dans le laboratoire, a contribué de façon égale dans la conception, l'élaboration et l'écriture du manuscrit. Il a participé à l'assemblage de tous les résultats obtenus par cytométrie en flux. Il a recueilli les résultats des figures 1, 2 et 3, et des figures supplémentaires 1 et 4. Robert-Hugues Duparc, étudiant à la maîtrise, a participé à la mise au point de la culture de cellules souches rétiniennes à partir d'embryons âgés de 9.5 jours. J'ai contribué à l'analyse de la mutation *Bmi1* dans les progéniteurs rétiniens à différents stades (Figure 4, 5, 6 et 7, ainsi que les figures supplémentaires 2, 3, 5 et le tableau I).

Abstract

The developing mammalian retina is generated by the proliferation and differentiation of multipotent retinal progenitor cells (RPCs) giving rise to neuronal and glial lineages. Whether an immature progenitor/stem cell subpopulation is present in the developing mammalian retina remains undefined. Deficiency in the Polycomb group gene *Bmi1* results in reduced proliferation and postnatal depletion of neural and hematopoietic stem cells. We show here that *Bmi1* is required for the self-renewal of immature RPCs and for postnatal retinal development. In the embryo, *Bmi1* is highly enriched in a rare RPC subpopulation expressing the cell surface antigen SSEA-1 and the stem cell markers Musashi, Lhx2 and Sox2. At all developmental stages analyzed, *Bmi1* deficiency resulted in reduced proliferation and self-renewal of most immature RPCs. *Bmi1*-deficient retinal colonies overexpressed *p19^{Arf}*, and co-inactivation of *p53*, which lies downstream of *p19^{Arf}*, partially restored their self-renewal. *P19^{Arf}* and *p16^{Ink4a}* were also upregulated *in vivo*, correlating with reduced RPC proliferation in the peripheral retina of *Bmi1^{-/-}* fetus and newborn mice. Likewise, the retina of *Bmi1*-deficient animals was smaller than normal after birth. The proliferation and postnatal maintenance of a second immature RPC population located in the ocular ciliary body was also impaired. *Bmi1* thus distinguishes immature RPCs from the main RPC population and is required for normal retinal development.

Introduction

The distinct competence of retinal progenitor cells (RPCs) to generate in a sequential order the diverse class of neurons and a single glial cell type during retinal development is thought to be modulated by an intrinsic transcription factors molecular program and by extrinsic clues [1-4]. Notably, recent molecular analysis revealed that the RPC pool is heterogeneous based on the highly variable combinatorial expression of transcription factors in single RPC [5].

Additional evidences that mammalian RPCs are heterogeneous and may represent several distinct cell populations also exist. First, at least 2 populations of RPC have been isolated based on the differential expression of the cell surface marker SSEA-1 [6]. SSEA-1 is predominantly expressed by immature progenitors located at the retinal periphery during development, and is later found exclusively expressed in the ocular ciliary body (CB). Second, conditional inactivation of *Pax6* suggests that even within the peripheral retina, possibly 2 RPC populations may exist based on distinct *Pax6* genetic dependence [7]. Third, using Hoechst dye efflux exclusion, a rare RPC population capable of neurosphere formation and corresponding to ~0.01% of all cells has been isolated from the embryonic stage (e)18.5 rat retina, suggesting that immature progenitor/stem cells may be present in the general RPC population [8]. Finally, quiescent cells with “stem cell” characteristics have been isolated from the ocular CB epithelium of adult mice, and Müller glial cell were shown to re-enter the cell cycle and generate new neurons upon toxic damage in the post-natal retina [9-11]. These observations raise the issue that the developing retina may

contain a highly complex hierarchy of progenitor and stem cell populations, similarly as observed in the developing mammalian brain.

We sought to determine whether an immature progenitor/stem cell population is present in the developing mouse retina using *Bmi1* as genetic tool. Previous studies revealed that *Bmi1* is required for the self-renewal of neural stem cells from the central and peripheral nervous system, but dispensable for the proliferation of restricted neural progenitor cells [12-15]. In the retina, we found that colony-forming cells were uniquely present within the SSEA-1⁺ population, which contained a rare *Bmi1*-enriched stem cell sub-fraction. Likewise, *Bmi1* expression level correlated with retinal colony size and self-renewal capability. While *Bmi1* was not required for the proliferation of the main RPC population, it was required for the proliferation and post-natal maintenance of discrete subpopulations of RPCs located in the optic vesicle neural ectoderm, ocular CB, and peripheral retina. Hence, *Bmi1*-null mice develop smaller retinas. Our data reveal that *Bmi1* distinguishes immature progenitor/stem cells from the main RPC population and is required for normal retinal development.

Materials and Methods

Mice

Bmi1^{-/-} (in the C57Bl/6 background, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam), *p53*^{+/-} (B6.129S2-Trp53tm1Tyj/J, Jackson Laboratories) and wild type C57Bl/6 inbred mice (Charles River) were used in accordance with the Animal Care Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre.

Cell Cultures

Optic vesicles and hindbrains from e9.5 embryos were dissected-out in HBSS, directly triturated into single cell suspension, and cells were placed in neural stem cell (NSC) media: DMEM/F12, 0.25% glucose, B27 supplement, Heparin (2 $\mu\text{g/ml}$; Sigma), Gentamycin (25 $\mu\text{g/ml}$; Invitrogen) and human recombinant FGF2 (10 ng/ml; Peprotech). e12.5 and e18.5 retinas were dissected-out in HBSS, digested in a mixture of papain (20 $\mu\text{g/ml}$; Worthington) and DNase I (100 $\mu\text{g/ml}$; Sigma) for 10 min at 37°C, and cells were plated in NSC media supplemented with EGF (20 ng/ml). Cells were maintained in culture in 6-well plates (Sarstedt) for 7 to 11 days at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. When applicable, BrdU (Bromodeoxy-Uridine 10 $\mu\text{g/ml}$, SIGMA) was added to the culture media. For passages, neurospheres were dissociated with an enzyme free solution (Chemicon) at 37°C for 20 min and the single cell suspension was plated at 2.000 cells/ml in NSC media.

For cell differentiation assays, retinal and hindbrain-derived neural spheres were plated in poly-L-lysine- (0,5 mg/ml) and laminin-coated (10 ng/ml; Sigma) chamber slides (BD Falcon) in differentiation media: DMEM/F12, 0,25% glucose, B27 supplement, gentamycin (25 $\mu\text{g/ml}$), BDNF (10 ng/ml), NGF (10 ng/ml) (Invitrogen) and 1% Fetal Bovine Serum (Sigma). After 5 days, cultures were exposed to serum-free differentiation media.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

For cell membrane epitope analyses, cells were stained with a mouse anti-SSEA-1 (1:300,

Koso et al., 2006) and a rat anti-CD133 (1:100, Chemicon) antibodies. For intracellular epitope staining, cells were incubated with the anti-SSEA-1 antibody, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min, permeabilized in 0.5% TritonX100 for 5 min, and incubated with mouse anti-Bmi1 antibody (1:150, Abcam). The primary antibodies were visualized using PE-conjugated anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch), FITC-conjugated anti-rat IgG, or FITC-conjugated anti-mouse IgG (Chemicon). Sorting was done using a FACSVantage flow cytometer (Becton-Dickinson).

Immunolabeling

Tissues were fixed in 4% PFA/3% sucrose/PBS, pH 7.4, cryoprotected in PBS/30% sucrose, and frozen in CRYOMATRIX embedding medium (CEM) (Fisher Scientific). Otherwise, tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin according to standard protocols. 7 μ m thick sections were mounted on Super-Frost glass slides (Fisher Scientific) and processed for immunofluorescence or immunohistochemistry. For immunofluorescence labelling, sections were incubated overnight with primary antibodies at 4°C, and then with secondary antibodies. Slides were mounted in DAPI-containing mounting medium (Vector Laboratories). For immunohistochemistry labelling, slices were analyzed according to the Vectastain[®] ABC kit manufacturer instructions (Vector). Peroxidase substrates used are Vector[®] VIP (Pink) (Vector), and DAB (brown) (Sigma). Slides were counter-stained with hematoxylin and mounted in Permount (Fisher). Observations were made under a fluorescence microscope (Leica DMRE, Leica Microsystems) and images were captured with a digital camera (Retiga EX; QIMAGING; with OpenLab, ver.3.1.1 software; Open-Lab, Canada). For BrdU incorporation analyses,

pregnant mice or pups were injected intraperitoneally with BrdU (50 µg/g) 90 min before sacrifice. Antibodies used are listed in the supplementary Materials section.

RT-PCR

Primers were designed to flank individual exons and tested by PCR in reverse transcription RT⁺ and RT⁻ control extracts. Total RNA (1 µg) (TRIzol reagent; Invitrogen) was reverse-transcribed using the MML-V reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplification was performed using the HotStar TAQ polymerase (Invitrogen). PCR was run as follow; 94°C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94°C, annealing at 57°C and extension at 72°C in an Applied Biosystems thermal cycler. Real-time PCR was performed using the Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) and a Real-Time PCR apparatus (Icycler, BioRad). Primers sets used are listed in the supplementary Materials section.

Statistical analyses

Statistical differences were analyzed using Student's *t*-test for unpaired samples. An analysis of variance followed by the Dunnett test was used for multiple comparisons with one control group. Data are presented as mean ± standard deviation. The *P* value was set as mentioned in the figures.

Results

Bmi1 is highly expressed in RPCs located in the peripheral retina

By using developmental and proliferation markers in combination with Bmi1 expression, we attempted to locate a pool of putative immature RPCs in the developing mouse retina. In the optic vesicle and the e10.5 retina, Bmi1 was co-expressed with Pax6 in all

neuroepithelial cells. Notably, at e10.5, Pax6 expression was most intense in the distal retina and ciliary marginal zone (CMZ), while Bmi1 was enriched in the central retina and CMZ (Supplementary Fig. 1) [16,17]. The Ki67 antigen is expressed at all phase of the cell cycle, but not in G0, and is used as a marker for progenitors [18,19]. At e12.5, Bmi1 expression was low in most Ki67⁺ RPCs located in the central retina, and higher in Ki67⁺ RPCs located in the more peripheral retina (Fig. 1A). Quantification of the fluorescence signal revealed that Bmi1 is expressed ~2 folds more in cells of the peripheral retina than in those of the central retina (Fig. 1B). Within the proliferating retinal margin, some cells expressed Bmi1 at even higher levels than their neighbors, revealing the heterogeneous composition of the RPC population based on Bmi1 immunoreactivity (Fig. 1B, Supplementary Fig. 1). Bmi1 was also expressed in Ki67⁻ and TuJ1⁺ immature neurons (Fig. 1A, and Supplementary Fig. 1), in accordance with the observation that Bmi1 is highly expressed in mature retinal and cortical neurons [20]. We also confirmed that Bmi1-positive cells located in the peripheral retina were mitotically active RPCs since they incorporated Bromodeoxy-Uridine (BrdU) (Fig. 1A).

One previously defined marker that partially delineates central versus peripheral RPCs is the cell surface antigen SSEA-1 [6]. SSEA-1 marks a regionally restricted immature RPC subpopulation. Immunofluorescence analysis of e12.5 retinal sections revealed that SSEA-1 is expressed in central and peripheral RPCs. SSEA-1 expression in peripheral RPCs appeared more intense than in centrally located RPCs. Importantly, these cells co-expressed Bmi1 (Fig. 1C).

Bmi1 is expressed at low levels in the main RPC population

To better define in which cell populations Bmi1 is expressed, we purified by fluorescence activated cell sorting (FACS) SSEA-1 and CD133 positive and negative retinal cells at e12.5 stage and analyzed gene expression in these fractions by quantitative RT-PCR (Q-PCR) (Fig. 2A). In the developing and adult brain, CD133/prominin is mostly expressed by progenitor/stem cells located in the subventricular zone [21,22]. We found that Bmi1 expression was enriched in double-negative (SSEA-1⁻/CD133⁻) cells that expressed the neural differentiation genes Neurogenin 2 and NeuroD (Fig. 2A). This is consistent with Bmi1 being expressed in nearly all postmitotic retinal neurons and photoreceptors [20]. In contrast, SSEA-1⁺/CD133⁺ and SSEA-1⁺/CD133⁻ cells were enriched for the stem cell markers Lhx2, Sox2, Musashi, and Nestin but not for Bmi1 (Fig. 2A) [23-26]. From this analysis, we concluded that Bmi1 is expressed at low levels in the main RPC population at e12.5.

We also performed a neurosphere assay with the sorted cell populations to evaluate their growth properties. Cells were cultured in stringent conditions allowing the growth of only progenitor/stem cells. This consists of plating cells at low density (2500 cells/ml) in low adhesion plates in neural stem cell (NSC) media containing the growth factors FGF2 (10 ng/ml) and EGF (20 ng/ml) [27-29]. In primary culture, all 4 populations generated neurospheres, but large neurospheres were only found in the SSEA-1⁺/CD133⁺ (0.11 +/- 0.10 %) and SSEA-1⁺ (0.30 +/- 0.04 %) populations (Fig. 2B). Self-renewal is defined as the capacity of a stem cell to maintain its proliferation and multiple-differentiation potential over time. To define if these colonies displayed self-renewal potential, we performed dissociation of colonies in bulk (because colonies were in general too small for clonal

dissociation assays). Notably, only the SSEA-1⁺/CD133⁺ and SSEA1⁺ spheres were able to form secondary colonies, suggesting that the most primitive progenitors are contained within the SSEA-1⁺ cell fraction (Fig. 2C).

A rare *Bmi1*^{high} subpopulation is present within the SSEA-1⁺ RPC population

If stem-like cells are present in the e12.5 retina, we rationalized that the SSEA-1 positive RPC population must be heterogeneous and perhaps contains a rare cell population expressing *Bmi1* at high levels. To test this, we labeled e12.5 retinal cells with the SSEA-1 antibody and with an anti-*Bmi1* antibody that is effective for FACS analysis [30]. Labeled cells were sorted in SSEA-1⁻/*Bmi1*⁻ (Negative), SSEA-1⁻/*Bmi1*^{low}, SSEA-1⁺/*Bmi1*^{low} and SSEA-1⁺/*Bmi1*^{high} cell fractions (Fig. 3A). Interestingly, all SSEA-1⁺ expressed *Bmi1*. SSEA-1⁺/*Bmi1*^{low} and SSEA-1⁺/*Bmi1*^{high} cells represented about 64% and 3% of all analyzed cells, respectively (Fig. 3). We could not perform cell culture post-sorting with this method owing to the fixation procedures. However, Q-PCR analyses of the purified cells revealed that compared with the main SSEA-1⁺/*Bmi1*^{low} cell population, the SSEA-1⁺/*Bmi1*^{high} cell population was highly enriched for the neural stem cell markers *Lhx2*, *Sox2* and *Musashi*, and this by an order of 8 to 16 folds (Fig. 3B). These data revealed that a RPC subpopulation corresponding to less than 3% of all retinal cells expressed at very high level the stem cell determinant genes *Bmi1*, *Lhx2*, *Sox2* and *Musashi*.

***Bmi1* is required for the self-renewal of NE progenitors from the optic vesicle**

Neuroepithelial (NE) progenitors represent the most primitive neural progenitors from which radial glial cells and adult neural stem cells of the central nervous system (CNS) are

thought to derive [31,32]. We previously reported on the isolation and characterization of embryonic retinal stem/progenitor cells located in the optic vesicle of mouse embryos [33]. While the optic vesicle is strictly composed of proliferating NE progenitors, less than 0.1% of these cells are capable of generating floating sphere colonies at clonal cell density in FGF2-containing serum free media [33]. Importantly, these retinal colonies express neural stem cell markers, including *Bmi1* (Supplementary Fig. 2, and [33]). To address the possible function of *Bmi1* in this context, we performed neural stem cell cultures of micro-dissected optic vesicles from WT, *Bmi1*^{+/+} and *Bmi1*^{-/-} e9.5 embryos (Fig. 4). After 1 week in culture, we determined the number and size of all retinal spheres generated per genotype. We found that, when compared to WT littermates, the size of *Bmi1*^{-/-} retinal colonies was significantly reduced, and where large colonies were nearly absent (Fig. 4A and C). However, the number of colony forming cells was not significantly different between all genotypes (Fig. 4A and B). To analyze the underlying cellular mechanism of reduced colonies size, we performed BrdU incorporation assay as well as immunostaining with an antibody against PH3, which labels cells at the G2/M phase of the cell cycle. We found that loss of *Bmi1* resulted in a severe reduction in cells entering the S phase and a modest reduction of cells in G2/M (Fig. 4D). We also analyzed the expression of progenitors/stem cells markers in WT and *Bmi1*^{-/-} colonies. No differences were found in Nestin and SSEA-1 expression between both genotypes, suggesting that *Bmi1* deficiency does not grossly affect progenitor/stem cell identity (Supplementary Fig. 2). *Bmi1* immunoreactivity was not observed in *Bmi1*^{-/-} retinal colonies, confirming the specificity of the antibody (Supplementary Fig. 2, and [20]).

To test if loss of *Bmi1* affects retinal stem cell proliferation maintenance, we performed dissociation assays on single spheres at low cell density (2500 cells/ml) in NSC media. Under these conditions, we obtained an average of 20 new colonies/1000 cells in WT samples. Although loss of one *Bmi1* allele reduced self-renewal potential by ~50%, loss of both alleles led to a near complete absence of secondary colonies formation (Fig. 4E).

In the central and peripheral nervous system, *Bmi1* deficiency is associated with increased expression of *p16^{Ink4a}* and *p19^{Arf}*, and inactivation of *p16^{Ink4a}* in *Bmi1^{-/-}* mice partially rescued the self-renewal defect of *Bmi1^{-/-}* neural stem cells [12]. Furthermore, inactivation of both *p16^{Ink4a}* and *p19^{Arf}* completely rescued the defective growth phenotype of *Bmi1^{-/-}* neural stem cells [13,14]. To evaluate the molecular mechanism resulting in self-renewal defect of *Bmi1^{-/-}* embryonic retinal colonies, we measured the expression levels of *p16^{Ink4a}* and *p19^{Arf}* in primary retinal cultures. The expression of these transcripts was significantly increased (56 +/- 7 and 4 +/- 1 folds, respectively) in *Bmi1^{-/-}* retinal colonies (Fig. 4F and data not shown). *p19^{Arf}* increases p53 activity by inhibiting Mdm2-mediated p53 degradation [34,35]. The increase in *p19^{Arf}* expression in retinal stem cells of *Bmi1^{-/-}* embryos is thus predicted to increase p53 activity. *P53* has been shown to block neural stem cells proliferation, and inactivation of *p53* can rescue the premature senescence phenotype of *Bmi1^{-/-}* mouse embryonic fibroblasts [20,36,37]. To address the possible role of *p53* in the *Bmi1*-null phenotype, WT, *p53^{-/-}* and *Bmi1^{-/-}/p53^{-/-}* embryos at e9.5 were used to establish retinal sphere cultures (Fig. 5). *P53* deficiency alone resulted in increase retinal colonies number and size in primary cultures and upon serial passages. Co-deletion of *Bmi1*

and *p53* only partially restore *Bmi1*^{-/-} colonies number and size at passage 1 (Fig. 5A and B). However, after passage 2, colonies number was almost totally restored to WT levels in the double-mutants (Fig. 5C). Cell proliferation was also improved, as assessed by BrdU incorporation assays (Fig. 5C). These results reveal that *p53* inactivation can rescue the senescence but only partially restore the proliferation phenotype of *Bmi1*^{-/-} retinal colonies.

***Bmi1* is required for the self-renewal of immature RPCs**

During retinal development, NE progenitors from the optic vesicle progressively give rise to more mature RPCs having acquired definitive retinal identity. We analyzed the behavior of RPCs from WT and *Bmi1*^{-/-} e12.5 retinas using the neurosphere assay. After 10 days in culture, the number and size of all retinal spheres generated was analyzed. Although there was no difference in the frequency of small colonies or in the total number of colonies, there was a reduction in the number of large spheres in *Bmi1*^{-/-} cultures when compared to WT (Supplementary Fig. 3A). To evaluate if *Bmi1* deficiency also affected the self-renewal of these early progenitors, we performed dissociation assays using the largest spheres (> 400). Under these conditions, the number of secondary spheres generated in *Bmi1*^{-/-} culture was reduced compared to WT (Supplementary Fig. 3B). The expression levels of *p16*^{Ink4a} and *p19*^{arf} were also increased [112 (n = 3; *P* = 0.005) and 5 times (n = 3; *P* = 0.045), respectively] in *Bmi1*^{-/-} retinal colonies when compared to WT colonies. *Bmi1* is thus required for the proliferation and self-renewal of immature RPCs (forming the largest spheres) isolated from the e12.5 retina. To evaluate if *Bmi1* expression level correlated with retinal colonies size, we separated retinal colonies from WT embryos based on their size

and measured *Bmi1* level in each group. Notably, larger retinal colonies presented higher BMI1 expression levels (Supplementary Fig. 3C).

***Bmi1* deficiency impairs the proliferation of a unique RPC population**

Late during retinal development (e18.5), we observed that the expression of SSEA-1 was mainly restricted in the CB and retinal margin (site II), while its expression was absent in the non-proliferative retinal margin (site I) and very low in the central retina (site III) (Fig. 6A). This suggests that most immature RPCs are located at the retinal periphery just before birth. To test whether *Bmi1* was enriched in the SSEA-1⁺ cell fraction. We sorted e18.5 retinal cells based on the expression levels of SSEA-1 (see diagram in Fig. 6B). We found that *Bmi1* was enriched 3 folds in the SSEA-1⁺ fraction (~12% of the cell population), when compared to the SSEA-1⁻ fraction (~88% of the cell population) (n = 3; *P* = 0.007). We also cultured the SSEA-1⁺ and SSEA-1⁻ cell fractions in NSC media, and found that only the SSEA-1⁺ cell fraction could generate neurospheres (Fig. 6B). Accordingly, immunofluorescence analysis revealed that most progenitors of the central retina express *Bmi1* at low levels, while remaining *Bmi1*^{high} cells were post-mitotic neurons (Supplementary Fig. 4).

We then evaluated the biological impact of *Bmi1* deficiency on retinal development. Cellular proliferation analyses using anti-BrdU, anti-PH3 and anti-Ki67 antibodies revealed that within the central portion of the retina, there was no differences in the number of progenitors entering the S-phase (BrdU positive cells), in the total number of progenitors (Ki67 positive cells) or in the number of progenitors in mitosis (PH3 positive cells)

between *Bmi1*^{-/-} and WT fetus (Fig. 6C). However, the number of progenitors entering S-phase as well as the total number of Ki67⁺ progenitors was significantly reduced in the peripheral retina of *Bmi1*^{-/-} fetus (Fig. 6C). Previous reports on *Bmi1* deficiency revealed that *Bmi1* function in repressing the *Ink4a/Arf* locus *in vivo* occurs during post-natal life. Because of our above results, we analyzed *Ink4a/Arf* expression levels in the developing retina of *Bmi1*^{-/-} fetus. Expression of *p16*^{*Ink4a*} and *p19*^{*Arf*} was increased by 260 (n = 3; *P* = 0.003) and 26 times (n = 3; *P* = 0.026) respectively in the retina of e18.5 *Bmi1*^{-/-} fetus when compared to WT littermates. We also cultured e18.5 retinal cells to analyze RPCs behavior in the absence of *Bmi1*. The total number of retinal colonies was slightly reduced in *Bmi1*^{-/-} samples when compared to WT (n = 3; *P* = 0.07) (Fig 6D). Size distribution revealed that in *Bmi1*^{-/-} cultures, small colonies were more abundant while the largest colonies (more than 150µm) were less frequent (Fig 6D). The expression of *p16*^{*Ink4a*} and *p19*^{*Arf*} was also increased in *Bmi1*^{-/-} retinal colonies (Fig. 6E). These results reveal that *Bmi1* is required for the proliferation of a distinct RPC population located in the peripheral portion of the developing retina.

***Bmi1* is required for the proliferation of progenitor cells from the ocular ciliary body**

In an *in vitro* neurosphere assay, it has been reported that the pigmented CB epithelium of rodents harbors a stem cell-like population with the capacity to give rise to retinal cells in the presence of serum and FGF2 [9,10]. Importantly, the ocular CB, the iris and the retina are all derived from the optic vesicle neural ectoderm [38]. *Bmi1* is expressed in the CB at e18.5 (Supplementary Fig. 4) and in the CB of adult mice (Supplementary Fig. 5B). *Bmi1* expression was also detected in adult retinal neurons, as previously reported

(Supplementary Fig. 5B, and [20]). To address the possible role of *Bmi1* in this context, we performed a neurosphere assay on the CB epithelium of WT and *Bmi1*^{-/-} littermates at e18.5. The total number of colonies derived from the CB was only modestly reduced in *Bmi1*^{-/-} samples. However, larger colonies were significantly less abundant (Supplementary Fig. 5A). We then performed CB cultures from WT and *Bmi1*^{-/-} littermates at postnatal stage (P20). After 1 week in culture, cells from WT mice generated numerous large floating sphere colonies (Supplementary Fig. 5C). In contrast, sphere colonies from *Bmi1*^{-/-} mice were smaller and significantly less abundant. These data suggest that *Bmi1* is required for the postnatal maintenance of progenitors located in the CB.

***Bmi1* is required for postnatal retinal development**

To assess if *Bmi1* is required for postnatal retinal development, we performed flat mount analyses on retinas from WT and *Bmi1*^{-/-} littermates at P6. We found that the diameter of *Bmi1*^{-/-} retinas was smaller than in WT controls (Fig. 7A). This was also visible on sections, where the length of the retina was reduced despite comparable overall eye size. In contrast, the thickness of the retina was normal (Fig. 7B and C). Reduced retinas length in *Bmi1*^{-/-} animals correlated with reduced numbers of proliferating cells (BrdU-positive) and progenitor cells (Ki67-positive) in the peripheral retina (Fig. 7D and E). BrdU- and Ki67-positive cells were rarely found in the central retina; i.e. on each side of the optic nerve head (Fig. 7D). Smaller retinas diameter may also result from increased cell death. To evaluate this, we performed labeling with an anti-caspase 3 antibody. Caspase-3 positive cells were rarely found in the peripheral retina, and no differences were observed between WT and *Bmi1*^{-/-} animals. Caspase-3 positive cells were however found in the central retina

(were most cells are negative for Ki67 and BrdU), and we observed more caspase-3 positive cells in the inner nuclear layer of *Bmi1* mutants when compared to WT littermates (Fig. 7F). These results indicate that *Bmi1* deficiency leads to reduced proliferation and number of RPCs located in peripheral retina after birth, leading to smaller retina diameter. In addition, *Bmi1* deficiency results in increased cell death of neurons or neuronal precursors located in the inner nuclear layer of the central retina during the early postnatal developmental period.

Discussion

This manuscript addresses the important question of the presence of heterogeneous populations of RPCs in the retina. More specifically, it shows how the stem cell marker *Bmi1* distinguishes 2 populations of RPC based on its genetic dependency and expression levels, with a more primitive and immature class of progenitor/stem cells and the main restricted RPC group.

Bmi1 expression level defines most immature RPCs

We and Koso et al., 2006 [6] observed that the cell surface antigen SSEA-1 is predominantly expressed in the peripheral retina at most developmental stages. By immunofluorescence, we determined that progenitor cells expressing *Bmi1* at high levels are also located mostly in the peripheral retina. FACS analyses and neurosphere assays revealed that the colony-forming units of the developing retina is entirely contained within the SSEA-1⁺ population. Within this cell population, we isolated a *Bmi1*^{high} fraction (expressing ~10 times more *Bmi1*) representing ~3% of all retinal cells. This rare subpopulation is highly enriched for the stem cell determinant genes *Lhx2*, *Sox2* and *Musashi*, but not for the neural differentiation genes *NeuroD* and *Ngn2*. From this, we concluded that *Bmi1* expression level defines a rare RPC subpopulation showing immature stem cell-like characteristics.

Accordingly, *Bmi1* gene-dosage also directly affects the proliferation of immature retinal progenitor/stem cells. In retinal colonies from the e9.5 optic vesicle, we observe a ~50% reduction in self-renewal capacity upon loss of a single *Bmi1* allele (Fig. 4E). We

also observed a similar trend in WT retinal colonies at e12.5 retina, where *Bmi1* expression level correlates with colony size and self-renewal potential (Supplementary Fig. 3). Thus, very high *Bmi1* expression distinguishes most immature RPCs from other RPCs *in vivo*, and high *Bmi1* expression levels correlates with retinal colonies having the largest size and greatest self-renewal capacity *in vitro*.

***Bmi1* dependency distinguishes immature RPC from the main RPC population**

Bmi1^{-/-} neuroepithelial retinal progenitors isolated at e9.5 (which are the most primitive) show decreased proliferation and reduced self-renewal. Later on, at e12.5 and e18.5, the more restricted proliferation and self-renewal defects observed only in large spheres illustrate the requirement for *Bmi1* in the most immature RPCs. Notably, as retinal development progresses, the average and maximum size of all retinal spheres progressively decrease, together with their capacity to generate secondary neurospheres in serial passage (Supplementary Table 1). In fact, self-renewal capacity was not observed in e18.5 WT retinal colonies. The progressive loss in proliferation and self-renewal capacity of immature RPCs between e9.5 and e18.5 correlates with the formation of the ocular CB (around e14.5) and with the restricted expression of SSEA-1 at the retinal periphery and in the CB [6,10]. We found that *Bmi1* is also required for the proliferation of immature progenitors located in the CB. The postnatal depletion of CB progenitor/stem cells observed between e18.5 and P20 in *Bmi1*^{-/-} mice also indicates that *Bmi1* is required for the maintenance of this cell population *in vivo*. This is similar to the postnatal depletion of cortical neural stem cells observed in *Bmi1*^{-/-} mice [12]. However, it is not clear yet to which extent CB progenitors possess a real capacity to generate retinal neurons [39-41]. This raises the possibility that in

the retina, they may be no retinal stem cells beyond the optic vesicle stage that match the gold standard established for neural stem cells found in the adult mammalian brain.

***Bmi1* is required for postnatal retinal development**

Molofsky et al. (2003) [12] demonstrated that restricted neural progenitors are different from stem cells because of their ability to go through limited number of division. In our cultures of e12.5 and e18.5 retinas, we found small or no difference in the frequency of small colonies representing the vast majority of restricted RPCs between WT and *Bmi1*^{-/-} embryos. Likewise, proliferation of the main RPC population located in the central retina at e18.5 (which expresses *Bmi1* at low levels) was not significantly affected by *Bmi1* deficiency. Hence, while the overall thickness of the retina appeared normal, retina diameter was reduced in *Bmi1*^{-/-} mice at P6, consistent with the reduced proliferation of RPCs located in the peripheral retina (at both e18.5 and P6). The reduced proliferation of peripheral RPCs also correlates with increased *p19^{Arf}* and *p16^{Ink4a}* expression at e18.5 *in vivo*. Our data reveal that *Bmi1* is required for the postnatal maintenance of RPCs involved in radial growth of the mouse retina.

***P53* controls immature retinal progenitors senescence**

Bmi1 controls the proliferation of numerous cell types through repression of the *Ink4a/Arf* locus [42]. *P19^{Arf}* increase *p53* activity by inhibiting *Mdm2*, and *p53* plays a negative role in the proliferation and self-renewal of neural stem cells [34-37]. Accordingly, we observed that *p53* deficiency increases the proliferation and number of secondary retinal neurospheres. Bruggerman et al. (2005) and Molofsky et al. (2005) [13, 14] have noticed a

complete rescue of proliferation in *Bmi1/Ink4a/Arf*-deficient cortical neural stem cells, where *p19^{Arf}* has a major role. Herein, we observed a gradual rescue of *Bmi1*-deficient retinal colonies proliferation and self-renewal phenotypes upon *p53* inactivation. This observation is interesting because of the adaptation phenomena occurring in the double knockout stem cells. One hypothesis can be that the $p16^{\text{Ink4a}}/\text{Rb}$ pathway is involved in the growth arrest of colonies at early passages, while the $p19^{\text{Arf}}/p53$ pathway is involved in the induction of replicative senescence, which occurs upon serial passages [43]. We previously showed that *p53* inactivation in *Bmi1^{-/-}* mouse embryonic fibroblasts completely rescued the replicative senescence phenotype and partially rescued the proliferation phenotype [20]. Again, in this model, *Bmi1^{-/-}/p53^{-/-}* mouse embryonic fibroblasts progressively adapted after 2-3 passages. This reveals that *p53* plays a major role in the senescence phenotype observed in *Bmi1^{-/-}* cells.

In conclusion, our work identifies *Bmi1* as a critical proliferation and self-renewal determinant for immature RPCs. High *Bmi1* expression level defines most immature RPCs while *Bmi1* gene-dosage influence their proliferation and self-renewal capacity. Although restricted RPCs may partially depend on *Bmi1* for their proliferation in some context, *Bmi1* genetic dependency distinguishes immature retinal progenitor/stem cells from the main RPC population. The biological impact of *Bmi1* deficiency on retinal development is ultimately revealed after birth, where *Bmi1* is required for the proliferation maintenance of peripheral RPCs and radial growth of the mouse retina.

Acknowledgments

We thank M. van Lohuizen for providing Bmi1 knockout mice. This work was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, Canadian Institutes of Health Research, Foundation Fighting Blindness Canada, Turmel Family Foundation for Macular Degeneration Research. G.B is supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec. W.C. is a Scholar from the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal.

References

1. Reh TA, Kljavin IJ. Age of differentiation determines rat retinal germinal cell phenotype: induction of differentiation by dissociation. *J Neurosci* 1989;9:4179-4189.
2. Watanabe T, Raff MC. Rod photoreceptor development in vitro: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron* 1990;4:461-467.
3. Belecky-Adams T, Cook B, Adler R. Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the "window-labeling" technique. *Dev Biol* 1996;178:304-315.
4. Cepko CL, Austin CP, Yang X et al. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:589-595.
5. Trimarchi JM, Stadler MB, Cepko CL. Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression. *PLoS ONE* 2008;3:e1588.
6. Koso H, Ouchi Y, Tabata Y et al. SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway. *Dev Biol* 2006;292:265-276.
7. Oron-Karni V, Farhy C, Elgart M, et al. Dual requirement for Pax6 in retinal progenitor cells. *Development* 2008;135:4037-4047.
8. Bhattacharya S, Jackson JD, Das AV et al. Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2764-2773.
9. Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:517-521.
10. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000;287:2032-2036.
11. Osakada F, Ooto S, Akagi T et al. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci* 2007;27:4210-4219.

12. Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T et al. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 2003;425:962-967.
13. Bruggeman SW, Valk-Lingbeek ME, van der Stoop PP et al. Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev* 2005;19:1438-1443.
14. Molofsky AV, He S, Bydon M et al. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 2005;19:1432-1437.
15. Zencak D, Lingbeek M, Kostic C et al. Bmi1 loss produces an increase in astroglial cells and a decrease in neural stem cell population and proliferation. *J Neurosci* 2005;25:5774-5783.
16. Walther C, Gruss P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 1991;113:1435-1449.
17. Bernier G, Vukovich W, Neidhardt L et al. Isolation and characterization of a downstream target of *Pax6* in the mammalian retinal primordium. *Development* 2001;138:3987-3994.
18. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-322.
19. Endl E, Hollmann C, Gerdes J. Antibodies against the Ki-67 protein: assessment of the growth fraction and tools for cell cycle analysis. *Methods Cell Biol* 2001;63:399-418.
20. Chato W, Abdouh M, David J et al. The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *J Neurosci* 2009;29:529-542.
21. Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. *Cancer Res* 2007;67:5727-5736.
22. Coskun V, Wu H, Blanche B, Tsao S et al. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1026-1031.

23. Zimmerman L, Parr B, Lendahl U et al. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 1994;12:11-24.
24. Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T et al. RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15194-15199.
25. Ellis P, Fagan BM, Magness ST et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* 2004;26:148-165.
26. Tetreault N, Champagne MP, Bernier G. The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. *Dev Biol* 2009;327:541-550.
27. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 1992;12:4565-4574.
28. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707-1710.
29. Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD et al. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 1993;11:951-966.
30. Heffner M, Fearon DT. Loss of T cell receptor-induced Bmi-1 in the KLRG1(+) senescent CD8(+) T lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13414-13419.
31. Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:777-788.
32. Huttner WB, Kosodo Y. Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:648-657.
33. Duparc RH, Abdouh M, David J et al. Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle. *Dev Biol* 2007;301:374-387.

34. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:731-737.
35. Sharpless NE, Ramsey MR, Balasubramanian P et al. The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 2004;23:379-385.
36. Gil-Perotin S, Marin-Husstege M, Li J, Soriano-Navarro M et al. Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *J Neurosci* 2006;26:1107-1116.
37. Meletis K, Wirta V, Hede SM et al. p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* 2006;133:363-369.
38. Hyer J. Looking at an oft-overlooked part of the eye: a new perspective on ciliary body development in chick. *Dev Neurosci* 2004;26:456-465.
39. Abdouh M, Bernier G. In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Exp Eye Res* 2006;83:153-164.
40. Ohta K, Ito A, Tanaka H. Neuronal stem/progenitor cells in the vertebrate eye. *Dev Growth Differ* 2008;50:253-259.
41. Cicero SA, Johnson D, Reyntjens S et al. Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:6685-6690.
42. Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S et al. The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 1999;397:164-168.
43. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 2007;35:7475-7484.

Legend to the figures

Figure 1. Bmi1 is expressed in embryonic retinal progenitors. **A.** Frozen eye sections from embryonic day 12.5 were labeled with antibodies against Bmi1, BrdU and Ki67. For BrdU labeling, pregnant mice were injected intraperitoneally with a BrdU solution 90 minutes before sacrifice. Arrowhead point to BrdU and Bmi1 double positive cells. **B.** Quantification of Bmi1 staining intensity in the regions depicted in the schematic panel at the left. Regions II and III were delineated as shown in **C.** The MFI (mean fluorescence intensity) in each field is determined using the ImageJ software. Data are expressed as MFI \pm sd (n = 4). **C.** Frozen eye sections as in (**A**) were labeled with antibodies against Bmi1 and SSEA-1. *: Prospective pigmented ciliary body epithelium, I: non-proliferative ciliary margin, II: proliferative ciliary margin, and III: central retina. ONbL; outer neuroblastic layer, INbL; inner neuroblastic layer, and RPE; retinal pigmented epithelium. Scale bars; 70 μ m (**A**), and 50 μ m (**C**).

Figure 2. SSEA-1 labels immature RPCs. Embryonic day 12.5 retinal cells were sorted by FACS on the basis of SSEA1 and CD133 expression levels as shown in the biparametric diagrams (**A**). The R1 gate delineates the cell population analyzed. Cell purity was ~95% for all sorted populations. **A.** Sorted cells were analyzed by real-time PCR for the expression of progenitor/stem cells and differentiation markers. Data are expressed as fold change over gene expression in negative cells (SSEA-1⁻/CD133⁻), which was set at 1. Results are Mean \pm sd. (n = 3; * P <0.05; ** P <0.01). **B.** Size distribution analysis of

primary neurospheres obtained after 10 days culture of sorted cells. Results are Mean +/- sd (* P <0.05; ** P <0.01 as compared to the sizes of spheres generated in the negative cells culture). **C.** Self-renewal analysis. Secondary neurospheres obtained after dissociation of the primary neurospheres. The graph shows the numbers of secondary neurospheres obtained per 10.000 cells plated for the four sorted cell populations. Data are expressed as Mean +/- sd. (* P <0.05; ** P <0.01 as compared to the sizes of secondary spheres generated in the negative cells culture).

Figure 3. *Bmi1* is highly enriched in a SSEA-1 positive RPC subpopulation. **A.** Embryonic day 12.5 retinal cells were sorted by FACS on the basis of SSEA-1 and *Bmi1* expression levels; (A) negative cells; (B) SSEA-1⁻/*Bmi1*^{low} cells; (C) SSEA-1⁺/*Bmi1*^{low} cells; (D) SSEA-1⁺/*Bmi1*^{high} cells. Cell purity was ~97% for all sorted populations. **B.** Sorted cells were analyzed by real-time PCR for the expression of progenitor/stem cells and differentiation markers. Data are expressed as fold change over gene expression in negative cells, which was set at 1. Note that the y-axis is in log scale. Note that *Bmi1* transcripts levels were decreased in the SSEA-1⁺/*Bmi1*^{low} sorted cells. This may be due to transcriptional difference between the Negative population cells and the SSEA-1⁺/*Bmi1*^{low} cells. Results are Mean +/- sd. (n = 3; * P <0.05; ** P <0.01).

Figure 4. *Bmi1* deficiency affects the self-renewal of NE progenitors from the mouse optic vesicle. **A.** Neurosphere assay with e9.5 optic vesicle cells maintained in culture for 7 days. Phase contrast pictures of primary floating neurospheres. **B.** Neurosphere assay was performed using optic vesicles from WT (n= 10), *Bmi1*^{+/-} (n= 11) and *Bmi1*^{-/-} (n= 8).

Results are mean \pm sd. The difference observed is statistically non significant. **C.** Size distribution of the neurospheres generated. Results are mean \pm sd. (n = 4; * P <0.05; ** P <0.01 as compared to the sizes of WT spheres). **D.** Frozen neurospheres sections were immunolabeled with antibodies against BrdU and PH3. Neurospheres were pulsed with BrdU for 90 min. Data are expressed as the percentages of positive cells over all DAPI stained nuclei. Results are mean \pm sd. (n = 4-5; * P <0.05 as compared to the percentage of positive cells in WT spheres). **E.** First passage. Left panels; phase contrast pictures of neurospheres obtained. Right panel shows the number of secondary neurospheres obtained per 1.000 cells plated after dissociation of the primary neurospheres. Data are expressed as Mean \pm sd. (n = 5-8; * P <0.05 as compared to the frequency of secondary spheres generated in WT cells culture). **F.** WT and *Bmi1*^{-/-} optic vesicle primary spheres were analyzed by RT-PCR for the expression of *Bmi1*, *p16* and *p19* transcripts. Hprt was used as internal standard.

Figure 5. *P53* controls the senescence of *Bmi1*^{-/-} NE progenitors. **A.** Neurosphere assay with e9.5 optic vesicle cells from WT, *p53*^{-/-} and *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-}. Top panels; phase contrast pictures of neurospheres obtained after 7 days in culture. Bottom left panel shows the total number of colonies. Results are Mean \pm sd. (n = 3; * P <0.05). Bottom right panel depicts the size distribution of the neurospheres generated. Results are Mean \pm sd. (* P <0.05; ** P <0.01). **B and C.** Self-renewal analysis. **B.** 1st Passage. Phase contrast pictures of neurospheres obtained. The graph shows the number of secondary neurospheres obtained per 1.000 cells plated. Data are expressed as Mean \pm sd. (n = 3; * P <0.05 as compared to the frequency of secondary spheres generated in WT cells culture). **C.** 2nd Passage. Left

panels; phase contrast pictures of neurospheres obtained. Middle panel shows the tertiary neurospheres obtained after dissociation of the secondary neurospheres. The graph shows the numbers of tertiary neurospheres obtained per 1.000 cells plated. Data are expressed as Mean +/- sd (n = 3; * $P < 0.05$ as compared to the frequency of tertiary spheres generated in WT cells culture). Right panel; frozen neurospheres sections were labeled with antibodies against BrdU and PH3. Neurospheres were pulsed with BrdU for 90 min. Data are expressed as the percentages of positive cells over all DAPI stained nuclei. Results are mean +/- sd. (n = 3; * $P < 0.05$ as compared to the percentage of positive cells in WT spheres).

Figure 6. *Bmi1* is required for the proliferation of RPCs located in the distal retina. **A.** Formalin-fixed paraffin embedded e18.5 eye sections were labeled with anti-SSEA-1 antibodies. *: Prospective pigmented ciliary body epithelium, I: non-proliferative ciliary margin, II: proliferative ciliary margin, and III: central retina. **B.** Retinal cells isolated at e18.5 were sorted by FACS on the basis of SSEA-1 expression levels (left panel). Cell purity was ~95% for both sorted populations. Right panel, phase contrast picture of sorted e18.5 retinal cells that were maintained in culture for 10 days. Note that only the positive cells fraction is able of neurospheres formation. **C.** Frozen eye sections from embryonic day 18.5 were labeled with antibodies against BrdU (left panel). Pregnant mice were injected intraperitoneally with a BrdU solution for 90 minutes before sacrifice. Right panel shows the percentages of BrdU, Ki67 and PH3 positive cells counted over all cells (DAPI stained nuclei) in the peripheral retina (site II) and central retina (Site III). Data are Mean +/- sd. (n = 3-5; * $P < 0.05$ as compared to WT). For PH3-positive cells, the percentages were 0.53 +/-

0.05 vs. 0.60 +/- 0.05 in the margin, and 0.57 +/- 0.03 vs. 0.58 +/- 0.05 in the central retina for WT and *Bmi1*^{-/-}, respectively. I: non-proliferative ciliary margin, II: proliferative ciliary margin, and III: central retina. **D.** Neurosphere assay with e18.5 retinal cells from WT and *Bmi1*^{-/-} maintained in culture for 10 days. Left panels; phase contrast pictures of neurospheres obtained. Middle panel shows the total number of colonies. Results are Mean +/- sd. (n = 2). The difference observed is not statistically significant. Right panel presents the size distribution of neurospheres generated. Results are Mean +/- sd. (**P*<0.05; ***P*<0.01). **E.** WT and *Bmi1*^{-/-} e18.5 retinal primary spheres were analyzed by RT-PCR for *Bmi1*, *p16* and *p19* transcripts expression. *hprt* was used as internal standard. Scale bars; (A) 50 μm and (C) 70 μm.

Figure 7. *Bmi1* deficient mice show postnatal retardation growth of the retina. **A.** Microphotographs of WT and *Bmi1*^{-/-} retinas on flat mounts at P6. Results are Mean radius (R) measures +/- sd. (n = 6 radius measures in 3 independent retinas; *P* = 0.001). **B.** Phase contrast micrographs of hematoxylin-stained P6 WT and *Bmi1*^{-/-} mice eyes sections. Arrowheads point to the optic nerve head. **C.** Graphs depicting retina thickness and length measures of the micrographs shown in (B). Results are Mean +/- sd. (n = 3; **P*<0.05). **D.** Formalin-fixed paraffin embedded P6 WT and *Bmi1*^{-/-} eye sections were labeled with anti-BrdU and anti-Ki67 antibodies. For BrdU labeling, pups were injected intraperitoneally with a BrdU solution 90 minutes before sacrifice. **E.** Graph depicting the percentages of BrdU⁺ and Ki67⁺ cells over the total hematoxylin stained nuclei in the peripheral retina as shown in (D). Results are Mean +/- sd. (n = 3; **P*<0.05). **F.** Formalin-fixed paraffin embedded P6 WT and *Bmi1*^{-/-} eye sections were labeled with anti-activated caspase 3

antibodies. Data are expressed as the number (Mean \pm sd.; $n = 3$) of apoptotic cells per section in the inner nuclear layer and the ganglion cell layer. Scale bars; 1 mm (*A* and *B*) and 50 μm (*D*).

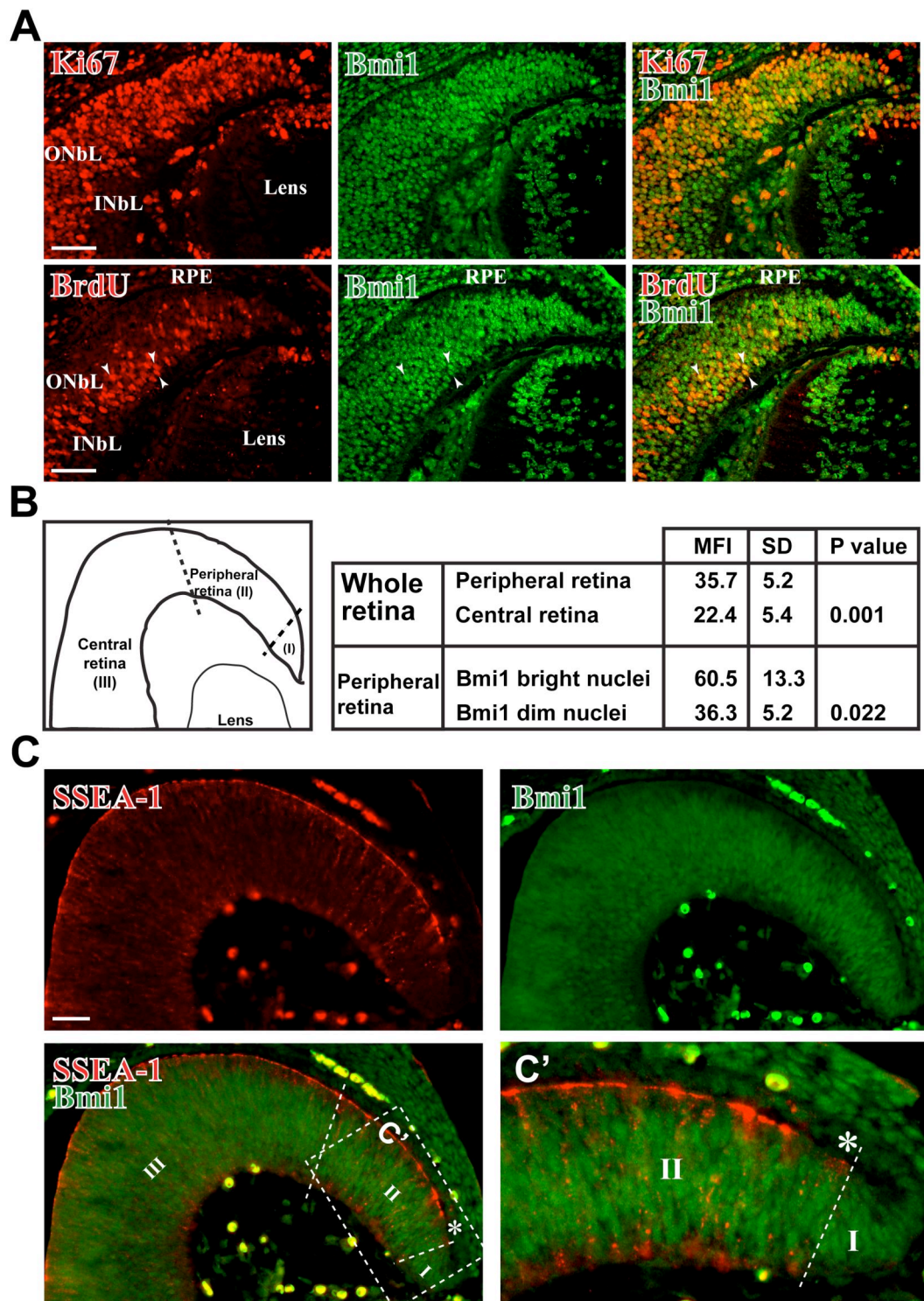


Figure 1

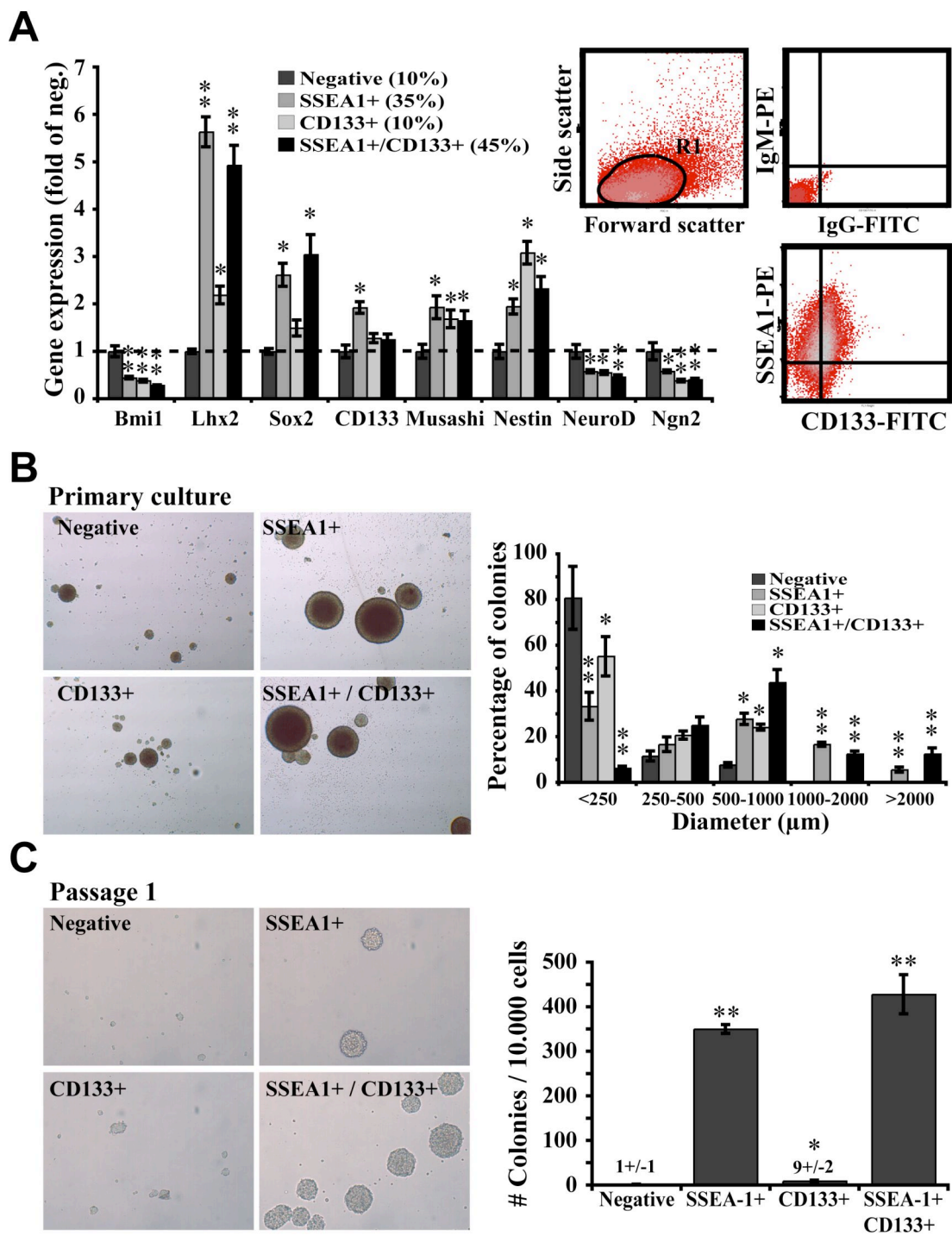


Figure 2

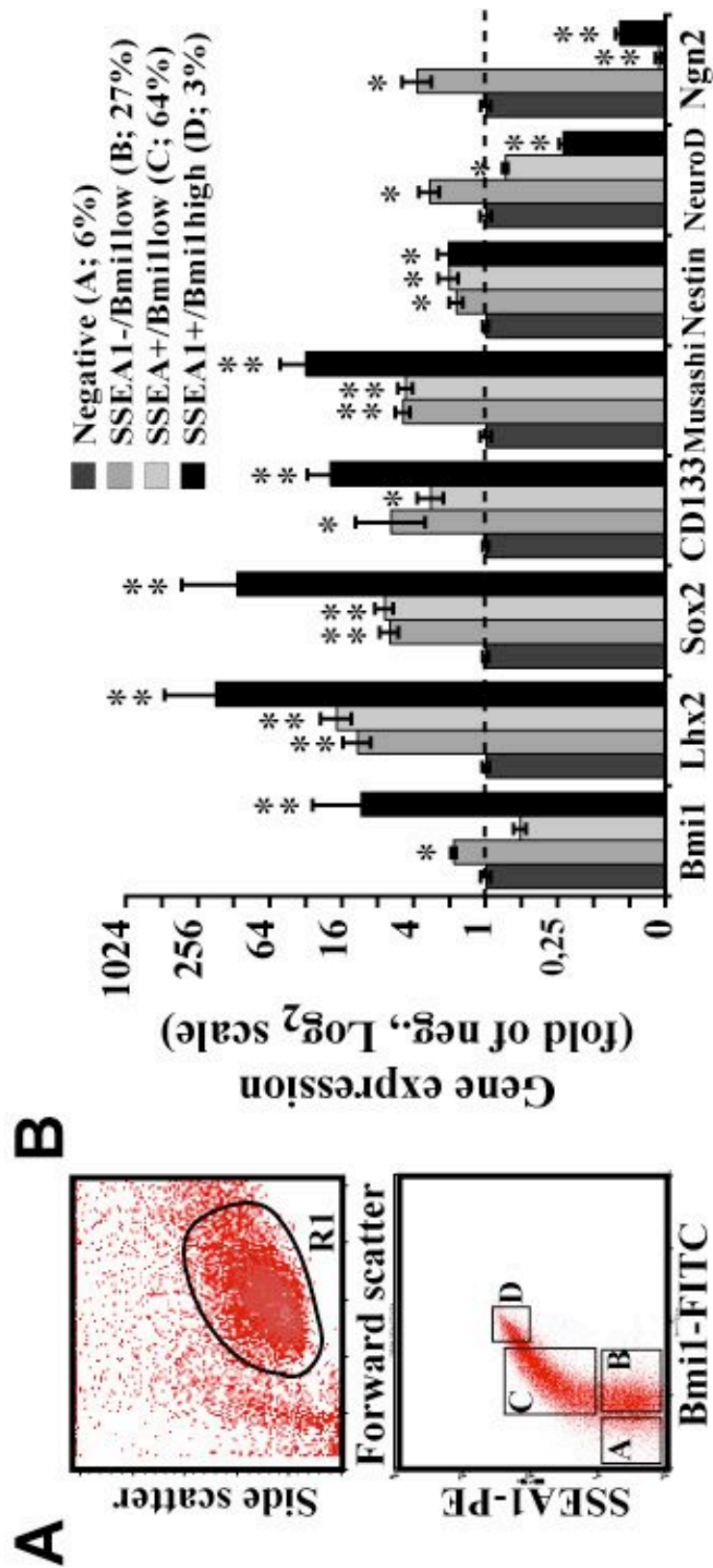


Figure 3

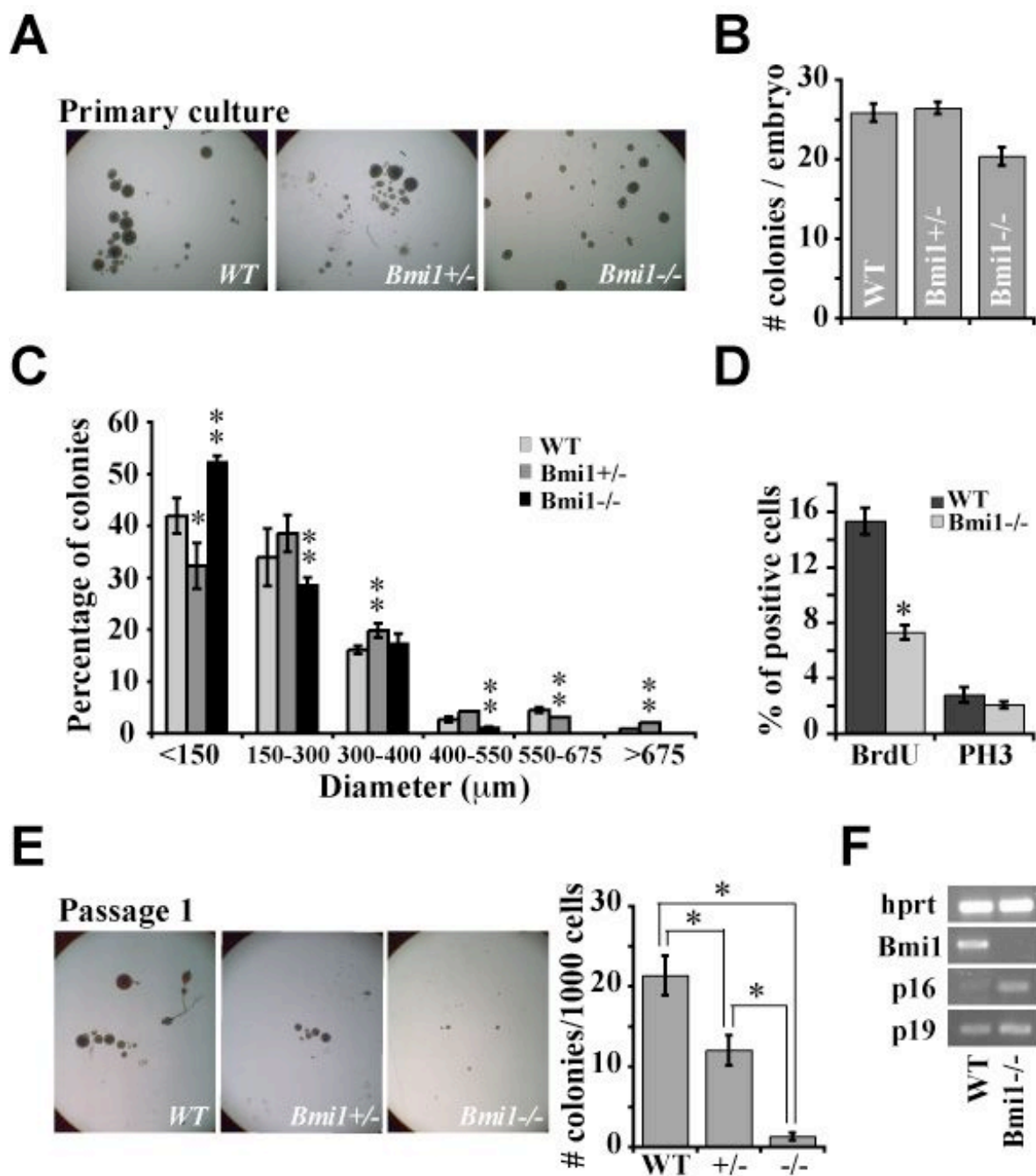


Figure 4

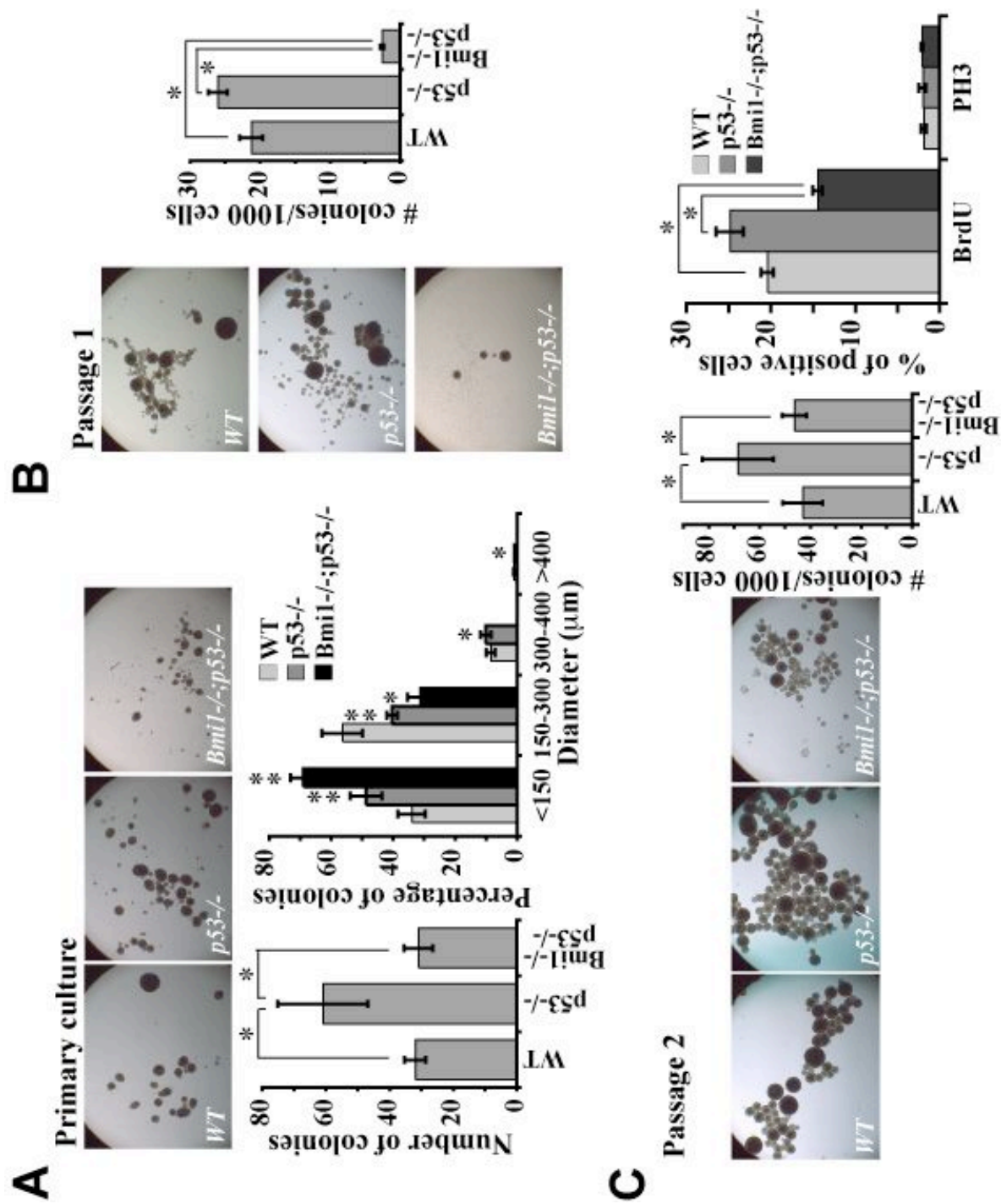


Figure 5

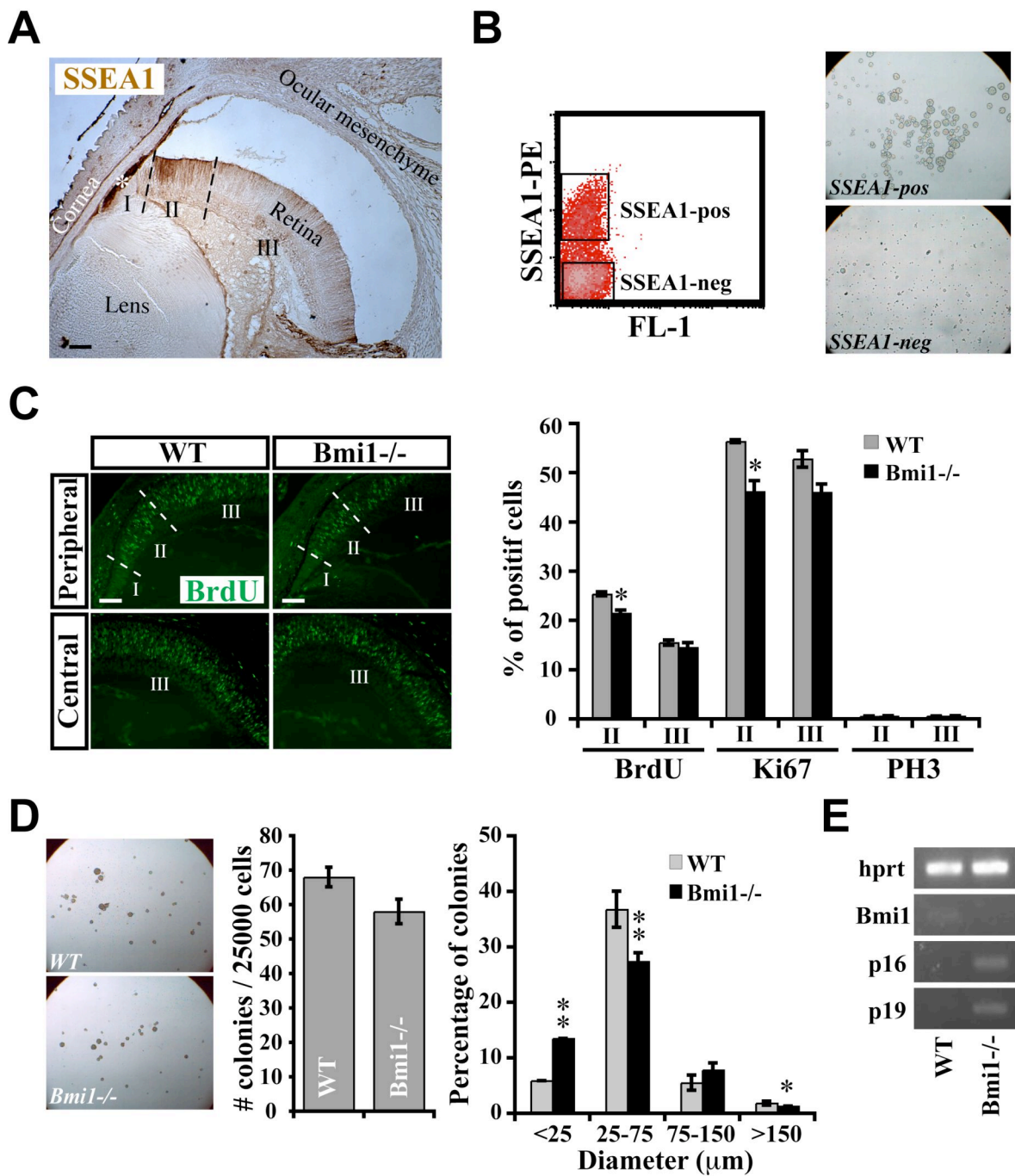


Figure 6

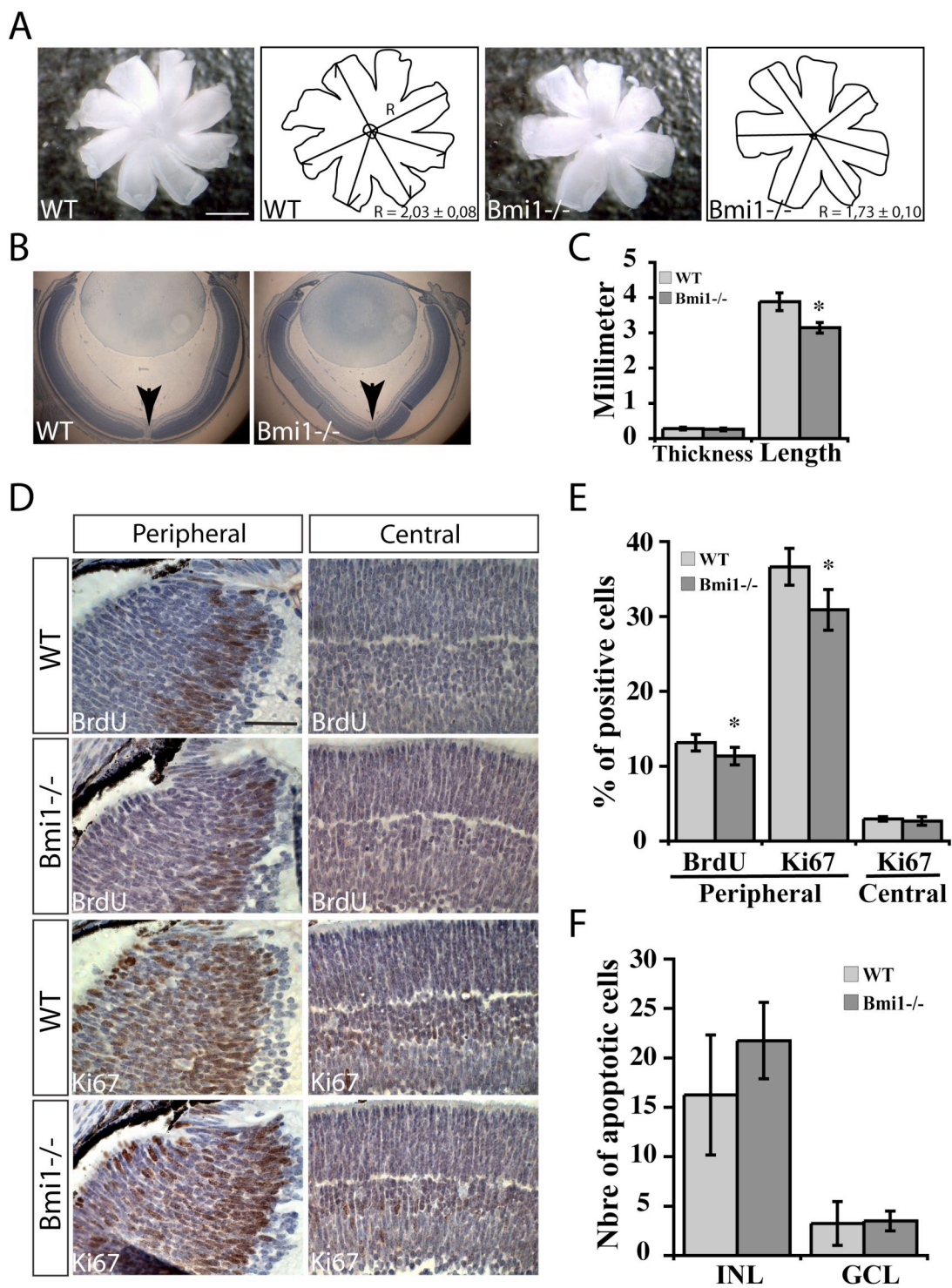


Figure 7

Supplementary Materials

Antibodies

Rabbit anti-Pax6 (1:500) and rabbit anti-GFAP (1:400, DAKO), mouse anti-Bmi1 (1:200, US Biological), rabbit anti-Musashi (1:100, Abcam), mouse anti-Nestin (1:150, BD Transduction Laboratory), rabbit anti-PH3 (1:200, Upstate), rabbit anti-blue opsin (S-opsin) (1:300), rabbit anti-recoverin (1:1000), rabbit anti-red/green opsin (M-opsin) (1:300), mouse anti-Tuj1 (1:150) and mouse anti-glutamine synthetase (1:100, chemicon), mouse anti-GAD45 (1:100, Pharmingen), rabbit anti-CRALBP (1:500, kindly given by Dr Saari's lab), rabbit anti-Ki67 (1:500, Novocastra Laboratories Ltd), mouse anti-BrdU (1:100) and mouse anti-Syntaxin (1:200, SIGMA), 4D2 (1:50, kindly given by Dr Molday's lab), and mouse anti-SSEA1 (1:500, Koso et al., 2006). Secondary antibodies used were PE-conjugated anti-mouse IgM, FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG and rhodamine-conjugated donkey anti-rabbit (1:300, Chemicon), and AlexaFluor633-conjugated donkey anti-sheep (1:1000, Molecular Probes).

Primers

Bmi1	(F) 5'-GGAGACCAGCAAGTATTGTCCTATTTG-3'
	(R) 5'-CTTACGATGCCCAGCAGCAATG-3'
p16 ^{Ink4a}	(F) 5'-CAACGCCCCGAACTCTTTC-3'
	(R) 5'-GCAGAAGAGCTGCTACGTGAAC-3'
p19 ^{Arf}	(F) 5'-GGCTAGAGAGGATCTTGAGAAGAGG-3'
	(R) 5'-GCCCATCATCATCACCTGGTCCAGG-3'
Sox2	(F) 5'-TAAGGGTTCTTGCTGGGTTTT-3'
	(R) 5'-AGACCACGAAAACGGTCTTG-3'

Musashi	(F) 5'-ACGTTTGAGAGCGAGGACAT-3' (R) 5'-TAGGTGTAACCAGGGGCAAG-3'
Nestin	(F) 5'-AGAAGACCAGCAGGCGTTTA-3' (R) 5'-TCCTCTGCGTCTTCAAACCT-3'
CD133	(F) 5'-TGAAAAGTTGCTCTGCGAACC-3' (R) 5'-TCTCAAGCTGAAAAGCAGCA-3'
NeuroD	(F) 5'-TCAACCCTCGGACTTTCTTG-3' (R) 5'-TTTCAAAGAAGGGCTCCAGA-3';
Ngn2	(F) 5'-TGGCATCACCCTCTCTGAC-3' (R) 5'-GAAAGGAGAAAAGGGGATCG-3';
Lhx2	(F) 5'-GATCTCGCCTGGAAACAGAG-3' (R) 5'-TCGCTCAGTCCACAAAACACTG -3'
hprt	(F) 5'-ACTGTAATGATCAGTCAACGGG-3' (R) 5'-GGCCTGTATCCAACACTTGG-3'.

Supplementary Figures Legends

Supplementary Figure 1. *Bmi1* is expressed in RPCs and in retinal neurons. **A.** Frozen eye sections from embryonic days 9.5 and 10.5 were labeled with antibodies against *Bmi1* and *Pax6*. **B.** Frozen eye sections from embryonic day 12.5 were labeled with anti-*Bmi1* antibody. Picture shows a magnified view at the retinal margin. Arrowheads point to *Bmi1* bright nuclei. **C.** Formalin-fixed paraffin-embedded e12.5 eye sections were labeled with antibodies against *Bmi1* (brown) and *Tuj1* (pink). Scale bars; 50 μm (**A** and **C**), and 10 μm (**B**).

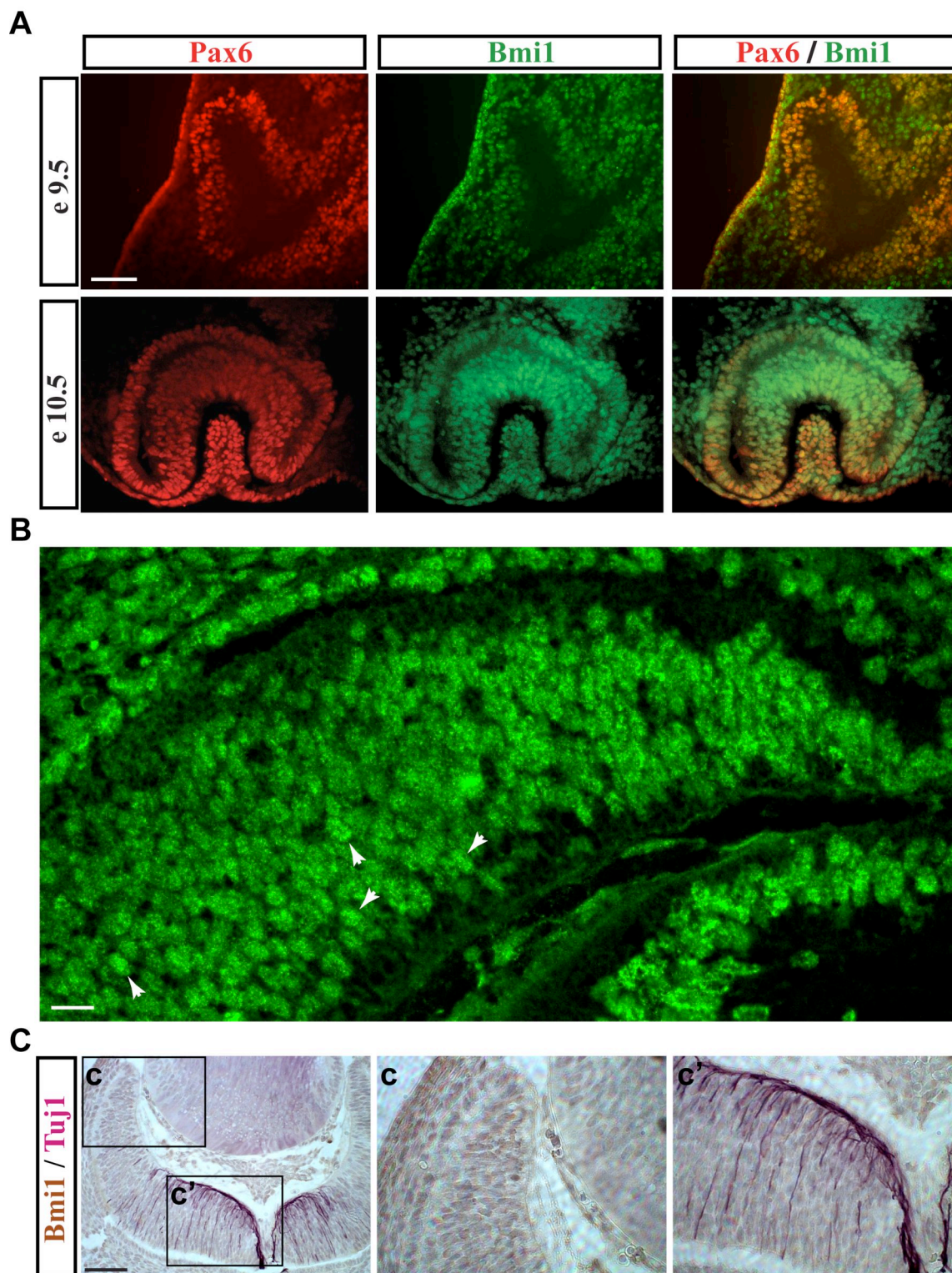
Supplementary Figure 2. *Bmi1* deficiency does not grossly affect retinal progenitor/stem cell identity. Frozen WT and *Bmi1*^{-/-} neurospheres sections were labeled with antibodies

against *Bmi1*, Nestin, and SSEA-1. DAPI was used to visualize the nuclei. Scale bars; 100 μm .

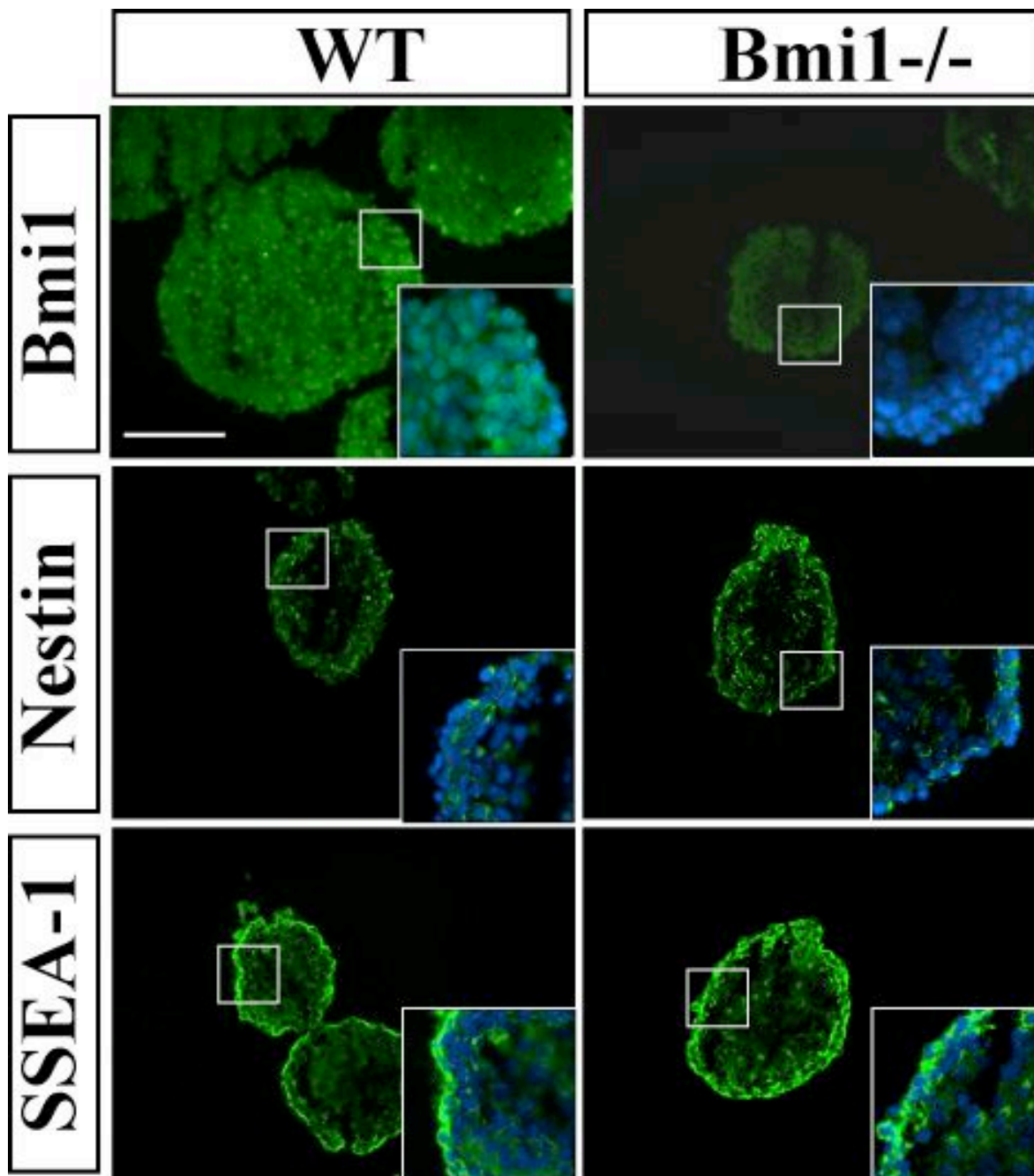
Supplementary Figure 3. *Bmi1* deficiency affects immature RPCs proliferation and self-renewal. **A.** Neurosphere assay were performed using WT and *Bmi1*^{-/-} e12.5 retinal cells. Left panels; phase contrast pictures of neurospheres generated after 7 days in culture. Right panel shows the total number of colonies per retina. Results are Mean +/- sd. and are representative of 3 independent cultures. Lower panel shows size distribution of the neurospheres generated. Results are Mean +/- sd. (n = 3; ***P*<0.01). **B.** Self-renewal analysis. Secondary neurospheres obtained after dissociation of the primary neurospheres. The graph shows the numbers of secondary neurospheres obtained per 1.000 cells plated. Data are expressed as Mean +/- sd. (n = 3; **P*<0.05 as compared to the frequency of secondary spheres generated in the WT cells culture). **C.** Real-Time PCR analysis of *Bmi1* transcripts level in WT neurospheres of different sizes (see picture in **A** for the size gradations). Grade 1 to 4: smallest to biggest colonies. Data are expressed as fold change over *Bmi1* expression in the smallest colonies, which was set at 1. Results are Mean +/- sd. (n = 3; **P*<0.05).

Supplementary Figure 4. e18.5 embryo frozen eye sections were labeled with antibodies against *Bmi1* and Ki67. Nuclei were visualized by DAPI staining. Arrowheads point to *Bmi1*⁺/*Ki67*⁻ cells. ONbL; outer neuroblastic layer, INbL; inner neuroblastic layer. Scale bar; 50 μm .

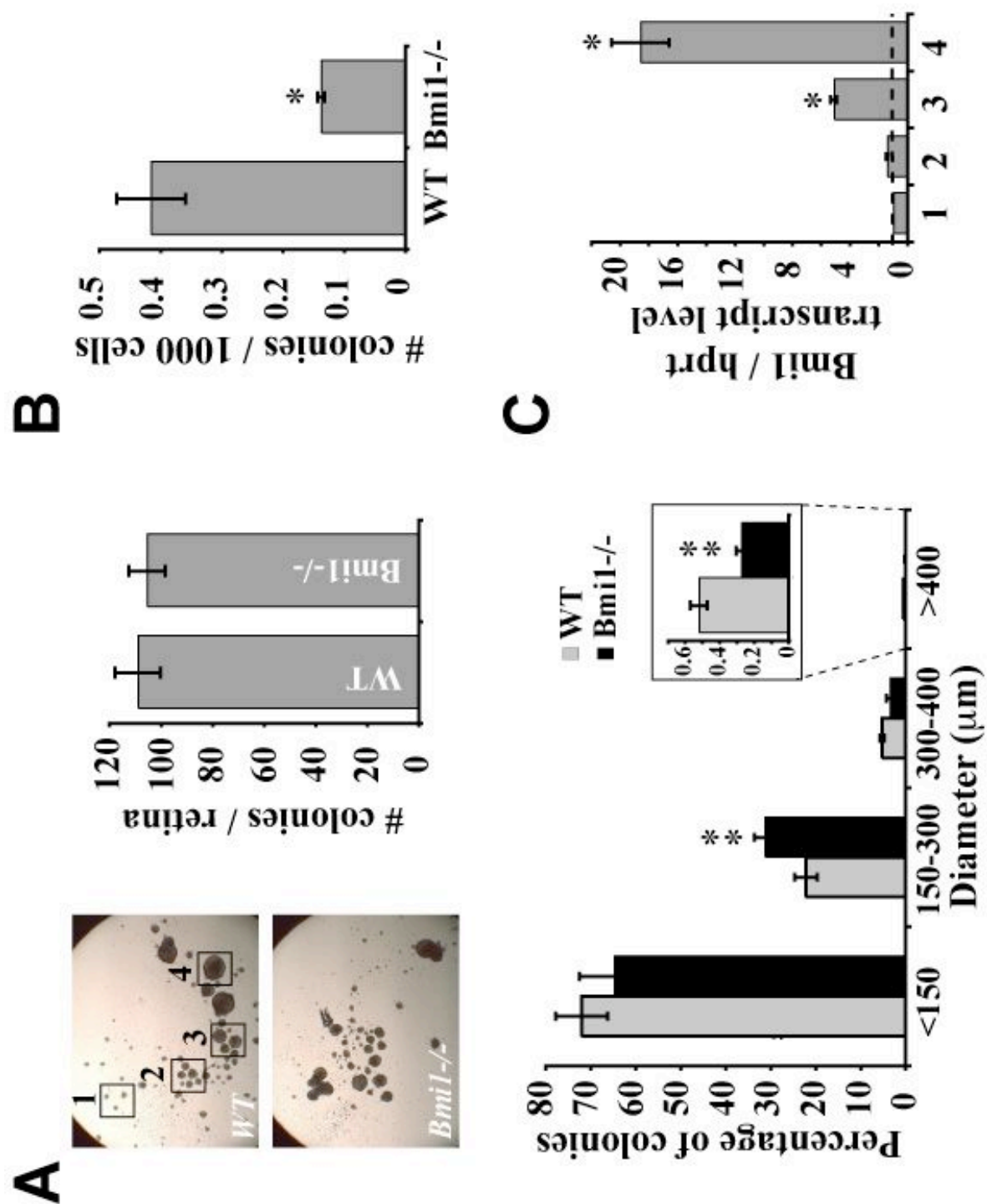
Supplementary Figure 5. *Bmi1* is required for the postnatal maintenance of CB progenitors. **A.** Dissociated CB epithelial cells from WT and *Bmi1*^{-/-} fetus at e18.5 were cultured in a neurosphere assay for 10 days. Left panels; phase contrast pictures of neurospheres obtained. In the inserts are large colonies found in the edges of the culture dishes. Middle panel shows the total number of colonies. Results are Mean +/- sd. (n = 3; **P*<0.05). Right panel depicts the size distribution of neurospheres generated. Results are Mean +/- sd. (***P*<0.01). **B.** Frozen adult mice eye sections were labeled with antibodies against *Bmi1*. Nuclei were visualized by DAPI staining. Arrowhead points *Bmi1* expression in retina photoreceptors. Scale bars; 50 μm. **C.** Neurosphere assay with adult ciliary body epithelial cells from 3 week old WT and *Bmi1*^{-/-} mice maintained in culture for 10 days. Left panels; phase contrast pictures of neurospheres obtained. Right panel shows the total number of colonies. Results are Mean +/- sd. (n = 3; **P*<0.05).



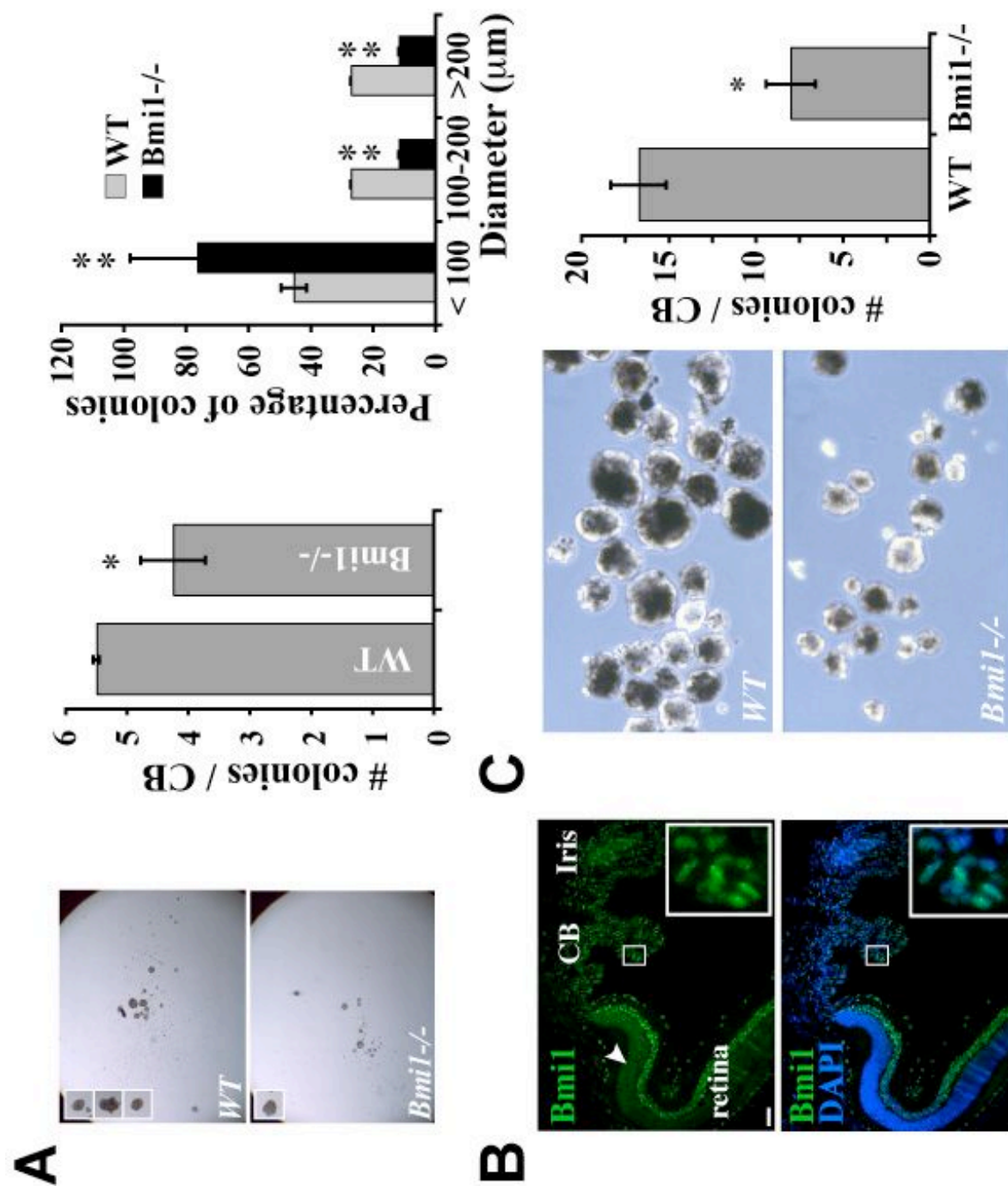
Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 5.

Supplementary Table 1. Retinal sphere proliferation capacity decreases upon developmental maturation

Developmental stage	Maximum size in the upper 5 percentile (μm) ¹	Median size (μm) ¹	Maximum passage number ²
e9.5	600	214	8
e12.5	340	140	1
e18.5	200	70	0

¹ Values were determined based on neurospheres size distribution measured at respective embryonic stages.

² Values were determined from successive passage in single sphere dissociation assays.

CHAPITRE 3

ARTICLE

The Polycomb group gene *Bmi1* regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity

Wassim Chatoo^{1‡}, Mohamed Abdouh^{1‡}, Jocelyn David¹, Marie-Pier Champagne¹, José
Ferreira³, Francis Rodier⁴, and Gilbert Bernier^{1,2,*}

Published online January 14, 2009

J Neurosci, (2009) 29 (2) : 529-542

¹ *Developmental Biology Laboratory, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 Boul. l'Assomption, Montreal, Canada, H1T 2M4*

² *Department of Ophthalmology, University of Montreal, Montreal, Canada, H3T 1J4*

³ *Department of Pathology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Canada, H1T 2M4*

⁴ *Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley CA, USA*

‡ These authors contributed equally to this work

Le chapitre 3 est un article où nous avons étudié l'implication de *Bmi1* dans la régulation des radicaux libres dans les neurones post-mitotiques. Cette régulation est effectuée de façon p53-dépendante. Cette étude est la première à démontrer que l'oncogène *Bmi1* possède une fonction dans la survie des neurones post-mitotiques. D'autre part, cette étude procure les premières évidences de l'activité pro-oxydante de p53 dans les neurones dans des conditions physiologiques.

Dr Mohamed Abdouh, étudiant post-doctoral dans le laboratoire, a contribué de façon égale dans la conception, l'élaboration et l'écriture du manuscrit. Il a participé à toutes les analyses effectuées *in vivo* chez la souris *Bmi1*^{-/-} (Figure 1 et 3), ainsi que les différentes analyses par Real-time PCR (Figure 8 et 9). Dr Jocelyn David a également participé à l'élaboration des résultats présentés dans la figure 1. Marie-Pier Champagne, étudiant à la maîtrise dans le laboratoire, a contribué au maintien des cohortes des souris sauvages et *Bmi1*^{+/-} répertoriées dans la figure 3. Dr Francis Rodier, étudiant post-doctoral dans le laboratoire de Dre Judith Campisi, a contribué à ce manuscrit en effectuant les analyses de prolifération sur les MEFs présentés dans la figure 5. J'ai effectué les différentes expériences et les analyses *in vitro*, tel que la mise en culture des neurones et des MELFs *Bmi1*^{-/-}, le traitement aux agents neurotoxiques et les immunoprécipitations de chromatine (Figure 4, 6, 7, 8 et 9). Le pathologiste, Dr José Ferreira, nous a aidé dans l'analyse des échantillons des cerveaux et des immunohistochimies.

Abstract

Aging may be determined by a genetic program and/or by the accumulation rate of molecular damages. Reactive oxygen species (ROS) generated by the mitochondrial metabolism have been postulated to be the central source of molecular damages and imbalance between levels of intracellular ROS and antioxidant defenses is a characteristic of the aging brain. How aging modifies free radicals concentrations and increases the risk to develop most neurodegenerative diseases is poorly understood, however. Here we show that the Polycomb group and oncogene *Bmi1* is required in neurons to suppress apoptosis and the induction of a premature aging-like program characterized by reduced antioxidant defenses. Before weaning, *Bmi1*^{-/-} mice display a progeroid-like ocular and brain phenotype while *Bmi1*^{+/-} mice, although apparently normal, have reduced lifespan. *Bmi1* deficiency in neurons results in increased p19^{Arf}/p53 levels, abnormally high ROS concentrations and hypersensitivity to neurotoxic agents. Most *Bmi1* functions on neurons oxidative metabolism are genetically linked to repression of *p53* pro-oxidant activity, which also operates in physiological conditions. In *Bmi1*^{-/-} neurons, p53 and co-repressors accumulate at antioxidant gene promoters, correlating with a repressed chromatin state and antioxidant genes downregulation. These findings provide a molecular mechanism explaining how *Bmi1* regulates free radical concentrations and reveal the biological impact of *Bmi1* deficiency on neuronal survival and aging.

Introduction

Mitochondria are required for cellular aerobic respiration but are also the main source of intracellular reactive oxygen species (ROS), which are thought to be causal for most oxidative damage that accumulates with age (Balaban et al., 2005; Halliwell, 2006; Lin and Beal, 2006). The balance between ROS and antioxidant molecules is critical to determine the rate of oxidative damage accumulation, and thus possibly cellular and organism lifespan (Harman, 1956).

The role of the p53 gene in organism aging and on cellular oxidative metabolism remains highly controversial. A constitutively active form of p53 was shown to induce a premature aging-like phenotype in mice, while expression of a dominant-negative form of p53 in the central nervous system (CNS) of *Drosophila* was shown to result in lifespan extension, both suggesting that *p53* activity promotes aging (Tyner et al., 2002; Bauer et al., 2005). In cell lines, p53 over-expression can also repress glutathione S-transferase alpha 1 (GST α 1), NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1), and cystine/glutamate transporter (xCT) expression, and interfere with antioxidant defenses activated by Nrf2 (Faraonio et al., 2006). In contrast, transgenic mice expressing an extra-genes dose of *p53* and *p19^{Arf}* have reduced tumor incidence, extended median but not maximum lifespan, and show increase resistance to paraquat (Matheu et al., 2007). P53 is proposed to mediate these biological effects by reducing ROS through activation of Sestrin1 and Sestrin2 (Sablina et al., 2005; Matheu et al., 2007). Whether p53 is a pro- or anti-aging gene and whether its activity is pro- or antioxidant thus remains an open question.

Bmi1 is a member of the Polycomb group family. Polycomb group proteins form large multimeric complexes that silence specific target genes by modifying chromatin organization (Valk-Lingbeek et al., 2004). *Bmi1*^{-/-} mice show axial skeleton defects and impaired development and degeneration of the cerebellum (Jacobs et al., 1999). *Bmi1* is required for the proliferation of hematopoietic and neural stem cells (Lessard and Sauvageau, 2003; Park et al., 2003; Molofsky et al., 2003). *Bmi1* deficient stem cells and mouse embryonic fibroblasts (MEFs) proliferate poorly owing to derepression of the *Ink4a/Arf* locus (Jacobs et al., 1999; Molofsky et al., 2003). The *Ink4a/Arf* locus encodes two tumor suppressor proteins: p16^{Ink4a} and p19^{Arf}. P16^{Ink4a} is a cyclin-dependent kinase inhibitor that blocks the activity of Cdk4/6 by preventing its association to cyclin D, which results in Rb hypophosphorylation and cell cycle arrest or senescence. P19^{Arf} binds and inhibits the activity of the E3-ubiquitin ligase mouse double minute 2 (Mdm2), which prevents p53 targeting for proteasomal degradation (Sherr, 2001; Sharpless et al., 2004).

We show here that *Bmi1* is expressed in ocular tissues and in post-mitotic neurons of the CNS. *Bmi1*^{-/-} mice display a progeroid-like ocular and brain phenotype while *Bmi1*^{+/-} mice have reduced lifespan. *Bmi1*^{-/-} neurons are hypersensitive to several neurotoxic agents. They also present abnormally high ROS concentrations, increased p19^{Arf}/p53 levels and dramatic reduction in antioxidant defenses. Genetic and molecular analyses revealed that most *Bmi1* functions on neurons oxidative metabolism are linked to repression of p53 pro-oxidant activity, which also operates in physiological conditions.

Materials and methods

Mice. *Bmi1*^{-/-} mice (in the C57Bl/6 background) are a gift from M. Van Lohuizen (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam). *p53* heterozygote mice (B6.129S2-Trp53tm1Tyj/J) were purchased from the Jackson Laboratories. Wild type C57Bl/6 inbred mice (Charles River, Canada) were maintained in our facilities and used in accordance with the Animal Care Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre.

Neuronal cultures. Embryonic day 18.5 cortical neuron cultures were established by mechanical dissociation of the cortices into a single cell suspension. Cells were plated at 1.5×10^5 cells/well on poly-L-lysine-coated 8-well cultures slides (BD Biosciences) in serum-free media containing Neurobasal-A Medium (Invitrogen), Glutamax-I (Gibco), gentamycin (50 µg/ml; Gibco), B27 supplement (Gibco), NGF (50 ng/ml; Invitrogen) and BDNF (0.5 ng/ml; Invitrogen). For the β -amyloid transfection experiments, the human β -amyloid (1-42 form) (from n1953 to n2081; GeneBank Accession # NM_201413) cDNA was cloned by RT-PCR using human retina, and inserted into the DUAL-IRESGFP plasmid. The plasmid was purified on cesium chloride column by ultracentrifugation. Neurons were nucleofected with plasmid DNA using the Mouse Neuron Nucleofector Kit according to manufacturer's instructions (Amaxa Biosystems). In these experiments, electroporation efficiency was around 10%.

Mouse embryonic fibroblasts. Cultures were established from day 14 (MEFs) or day 18 (MELFs) embryos and cultured at 3% or 20% oxygen concentration in DMEM containing 10% FBS and gentamycin (50 µg/ml; Gibco). Cells were frozen after the first passage

following establishment and were considered at population doubling zero (PD 0) at this point. Cell number was determined and population doubling calculated at each passage. MEFs (PD 0) were infected overnight with high titer lentiviruses encoding either GFP or GSE22, a genetic suppressor element of p53 (for details on lentivectors used see Beausejour et al. 2003). Lentiviral titers were adjusted to infect more than 90% of cells and infection rates were verified by immunohistochemistry.

Immunolabeling. For fixation, tissues were immersed for 1 h at room temperature in 4% paraformaldehyde (PFA)/3% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Samples were washed three times in PBS, cryoprotected in PBS/30% sucrose, and frozen in CRYOMATRIX embedding medium (CEM) (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA). Otherwise, tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin according to standard protocols. 5 to 7 μ m thick sections were mounted on Super-Frost glass slides (Fisher Scientific) and processed for immunofluorescence or immunohistochemistry staining. For immunofluorescence labeling, sections were incubated overnight with primary antibody solutions at 4°C in a humidified chamber. After three washes in PBS, sections were incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Slides were mounted on coverslips in DAPI-containing mounting medium (Vector Laboratories, CA). For immunohistochemistry labeling, formalin-fixed paraffin-embedded slices were analyzed by using the Vectastain[®] ABC kit (Vector) according to the manufacturer instructions. Peroxidase substrates used are the Vector[®] VIP (Pink) (Vector), and DAB (brown) (Sigma). Observations were made under a fluorescence microscope (Leica DMRE, Leica Microsystems) and images were captured with a digital camera

(Retiga EX; QIMAGING; with OpenLab, ver.3.1.1 software; Open-Lab, Canada). Antibodies used in this study were sheep anti-Chx10 (Exalpha Biologicals), rabbit anti-Pax6, rabbit anti-MAP2, mouse anti-NeuN, rabbit anti-GFAP (DAKO), rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling), mouse anti-mouse Bmi1, mouse anti-human Bmi1 and rabbit anti-human Bmi1 (US Biological), rabbit anti-p19^{Arf} (Abcam), and mouse anti-BrdU (Sigma). Secondary antibodies used were FITC-conjugated donkey anti-mouse and rhodamine-conjugated donkey anti-rabbit (Chemicon), and AlexaFluor633-conjugated donkey anti-sheep (Molecular Probes).

Real-Time RT-PCR. All primers were designed to flank individual exons and tested by PCR in RT⁺ and RT⁻ control extracts. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription (RT) was performed using 1 µg of total RNA and the MML-V reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplification was performed using the HotStar TAQ polymerase (Invitrogen). PCR was run as follow; 94°C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94°C, annealing at 57°C and extension at 72°C in a Applied Biosystems thermal cycler. Real-time PCR was performed using the Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) and a Real-Time PCR apparatus (BioRad). Primers sets used were as follow:

Bmi1 (F) 5'-GGAGACCAGCAAGTATTGTCCTATTTG-3'; (R) 5'-CTTACGATGCCCAGCAGCAATG-3', p16^{Ink4a} (F) 5'-CAACGCCCCGAACCTTTTC-3'; (R) 5'-GCAGAAGAGCTGCTACGTGAAC-3', p19^{Arf} (F) 5'-GGCTAGAGAGGATCTTGAGAAGAGG-3'; (R) 5'-GCCCATCATCATCACCTGGTCCAGG-3', bcl2l2 (F) 5'-

GACGAGTTTGAGACCCGTTT-3'; (R) 5'-ATCCAATCCTGCACTTGTCC-3', Noxa (F) 5'-AGTTCGCAGCTCAACTCAGG-3'; (R) 5'-GCCGTAAATTCACCTTGTCTCC-3', Puma (F) 5'-CAAGAAGAGCAGCATCGACA-3'; (R) 5'-TAGTTGGGCTCCATTTCTGG-3', Apaf1 (F) 5'-TGCTCAGCGGATAAGAAGGT-3'; (R) 5'-TCCCAGAGCTTGAGGAAGAA-3', xCT (F) 5'-TGGAGGTCTTTGGTCCTTTG-3'; (R) 5'-CCAGGATGTAGCGTCCAAAT-3', GST-1 α (F) 5'-CGCCACCAAATATGACCTCT-3'; (R) 5'-CCATGGCTCTTCAACACCTT-3', NQO1 (F) 5'-TTCTCTGGCCGATTCAGAGT-3'; (R) 5'-GAGTGTGGCCAATGCTGTAA-3', Sod1 (F) 5'-CGGATGAAGAGAGGCATGTT-3'; (R) 5'-CACCTTTGCCCAAGTCATCT-3', Sod2 (F) 5'-GGCCAAGGGAGATGTTACAA-3'; (R) 5'-GCTTGATAGCCTCCAGCAAC-3', Sestrin1 (F) 5'-TCGTGTGCACTCCTGAAAAG-3'; (R) 5'-TACCGGGTAATGGCTCTCAG-3', Sestrin2 (F) 5'-CCTCCTTTGTGTTGTGCTGT-3'; (R) 5'-ACGGTTCTCCATTTCTCCT-3', and hprt (F) 5'-ACTGTAATGATCAGTCAACGGG-3'; (R) 5'-GGCCTGTATCCAACACTTGG-3'.

Western blotting. WT and *Bmi1*^{-/-} neurons were homogenized in lysis buffer (10 mM tris, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 % NP-40 and protease inhibitor cocktail). Following centrifugation at 10.000 rpm, 4°C, 10 min, pellets-containing nuclei were dissolved in resuspension buffer (10 mM HEPES, 0.4 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1mM DTT and protease inhibitors). Samples were ultra-centrifuged at 55.000 rpm, 4°C, 10 min and supernatants-containing nuclear extracts were analyzed by immunoprecipitation. Otherwise, total protein extracts were prepared in buffer K (20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 150 mM KCl, 30 mM sodium pyrophosphate, 0.1% NP-40, 5 mM EDTA, 10 mM NaF,

0.1 mM Na₃VO₄, and protease inhibitors). Proteins contents were quantified using the Bradford reagent. For immunoprecipitation, we used a sheep anti-p53 polyclonal antibody (Calbiochem), and Salmon Sperm DNA-protein A/G beads (Upstate). Beads with bound immunocomplexes were washed with buffer K, and bound proteins were heat eluted with Laemmli buffer. Eluted proteins were resolved by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to a Nitrocellulose Blotting Membrane (Pall, FL) that was exposed to an anti-acetylated lysine antibody (Cell signaling). For Western blots on total protein extracts, the primary antibodies used were; rabbit anti-p53 polyclonal antibody, anti-Nrf2 polyclonal antibody and anti-PGC-1 α polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-Sirt1 polyclonal antibody, anti-phospho-histone H2A.X monoclonal antibody (Upstate), and anti- β actin monoclonal antibody (Abcam). Membranes were treated with corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed using the Immobilon Western (Millipore).

Chromatine Immunoprecipitation (ChIP). ChIP was performed using the ChIP Assay kit (Upstate). Briefly, 1-1,5 x 10⁶ fixed cells were sonicated to shear the chromatin and immunoprecipitated using mouse anti-p53 (DO-1), goat anti-N-CoR (Santa Cruz), rabbit anti-H3Me2Lys9, rabbit anti-H3Me2Lys27 (Cell signaling), rabbit anti-HDAC1, rabbit anti-Acetyl-H4, and anti-mouse IgG (Upstate) antibodies. Promoter fragments were amplified using primers to x-CT, Sod2 and β -major chain as follows; x-CT (-193 to + 15); (F) 5'-ATCCATTGAGCAACCCACA -3' and (R) 5'-AGCTGAGCTGGTGTGTAATG-3', and Sod2 (-537 to + 23); (F1) 5'-CAAACCTGCGACGTGATTTA-3', (R1) 5'-AGCTGCAAAGCTTCCACTCT-3', (F2) 5'-AATTTGGCACAGGGGAGAC-3' and (R2)

5'-CGCCCGACACAACATTATT-3' for site 1 and site 2, respectively, and β -major (F) 5'-CAGTGAGTGGCACAGCATCC-3', (R) 5'-CAGTCAGGTGCACCATGATGT-3'.

Micro-array analyses. Total RNA was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) and purified by the RNeasy MiniElute Cleanup kit (Qiagen) from 5 WT and 5 *Bmi1*^{-/-} neuronal cultures. Microarray analysis using BeadChip Mouse Genome (Illumina) was performed at the Centre d'innovation at Genome Quebec (McGill university, Montreal, PQ). Data were analyzed using the FlexArray software.

Senescence-associated (SA) β -galactosidase assay. SA β -galactosidase staining was detected histochemically at pH 6 as described previously (Dimri et al., 1995). Briefly, tissue slices were fixed in PBS-containing 1% formaldehyde, 0,4% glutaraldehyde, and 0,02% Igepal. After 3 washes, slices were exposed to the x-gal solution (1 mg/ml x-gal; 5 mM K₃Fe(CN)₆; 5 mM K₄Fe(CN)₆; 1 mM MgCl₂, in PBS; pH 6.0). Slides were mounted and observations made under a microscope (Leica DMRE, Leica Microsystems) and images were captured with a digital camera (Retiga EX; QIMAGING; with OpenLab, ver.3.1.1 software; Open-Lab, Canada).

Cell viability analysis. For apoptosis, activated-caspase 3 staining was performed by IHC using a rabbit anti-cleaved caspase-3 antibody (Cell Signaling). For the quantification of caspase-3 independent cell death (i.e. vacuolization), neurons overall morphology was visualized by IHC using the rabbit anti-MAP2 (Cell Signaling). Grades of vacuolization were determined empirically according the vacuole density inside the cell. The measure is

qualitative by nature (Grade I, few small vacuoles i.e. close to- but not normal; Grade II, more vacuoles- clearly abnormal; Grade III, filled with vacuoles- near autolysis).

ROS and lipid peroxidation levels. Cortices were prepared on ice prior to homogenization while cultured embryonic neurons were collected following trypsin treatment (TrypLE™ Express, Invitrogen). Samples were homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer in 5mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 (Merck, Darmstadt, Germany). The dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma) staining method was used for the quantification of ROS generation (Radak et al., 2004). The dye was added to the homogenates to achieve a final concentration of 25 μ M. Fluorescence intensity was monitored using a fluorescence multi-well plate reader (Perseptive Biosystems), at excitation 485 nm and emission 530 nm. On the other hand, homogenates were tested for lipid peroxidation by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) according to the thiobarbituric acid reactive substrate (TBARS) method (Buege and Aust, 1978). The homogenates were mixed to 0.6% TBA mixture and boiled for 30 min. After cooling on ice, the chromogenic reaction was read in a spectrophotometer (Beckman) at 535 nm. Data are normalized to the amounts of proteins per sample.

Statistical analysis. Statistical differences were analyzed using Student's *t*-test for unpaired samples. An analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test was used for multiple comparisons with one control group. For non parametric data analysis (i.e. cataract incidence phenomenon), a Chi-square test was performed. The criterion for significance (*P* value) was set as mentioned in the figures.

Results

***Bmi1* is expressed in ocular tissues and post-mitotic neurons of the mature CNS**

In the rodent eye, all retinal cells are post-mitotic by postnatal day (d) 25 and we observed robust *Bmi1* expression in retinal neurons, ciliary body epithelium (CBE) and lens cells of d25 and 9 months old mice (Fig. 1A and data not shown). Dual immunofluorescence using antibodies against the lineage-specific markers *Chx10* and *Pax6* showed that in the retina, *Bmi1* is expressed in bipolar, ganglion and a subset of amacrine cells. *Bmi1* was also detected in mouse and human photoreceptors (Fig. 1A and data not shown). In the mouse brain, *Bmi1* was expressed in cells of the upper cortical layers and the hippocampus, but not in the white matter (Fig. 1B and data not shown). Most CNS neurons in both humans and mice expressed *Bmi1* (Fig. 1B and C), while only some astrocytes in mice did (Fig. 1C). These data indicate that *Bmi1* is robustly expressed in ocular tissues and in nearly all post-mitotic neurons of the developing and adult CNS of mice and men.

***Bmi1* deficiency results in a premature aging-like ocular phenotype**

During the course of our study, we found that ~90% of *Bmi1*^{-/-} mice (n = 10, *P* = 0.001) in the C57BL/6 genetic background presented bilateral lens cataracts at d20-25 (Fig. 2A); remaining *Bmi1*^{-/-} mice had unilateral cataracts (n = 2). No cataracts were found in WT littermates at this early age (n = 10). Lens cataracts are well-established biomarker of aging (Group, 1991; Wolf et al., 2005). In cell dissociation assays, we also found that the CBE of *Bmi1*^{-/-} mice was more sensitive to protease treatment than that of WT littermates, with ≥90% of cell viability for 8 minutes of protease treatment for WT (n = 5), and ≥90% of cell

viability at 6 minutes 50 seconds of protease treatment for *Bmi1*^{-/-} (n = 3, P = 0.04). This suggests that Bmi1 deficiency compromises the structural integrity of the CBE extracellular matrix. Alterations of the extracellular matrix are found in eyes of aged mammals (Ihanamaki et al., 2001). To evaluate whether the observed cataracts were due to a developmental defect or to accelerated aging, we tested the eyes for the presence of senescence-associated (SA) β -galactosidase activity, an enzymatic biomarker of cellular senescence (Dimri et al., 1995). We observed robust staining for the SA β -galactosidase activity in the lens, and weaker staining in the CBE of *Bmi1*^{-/-} mice (Fig. 2A). Reactive gliosis in the retina and brain is observed in neurodegenerative diseases, CNS lesions and during normal aging in humans and mice (Silver and Miller, 2004). Likewise, *Bmi1*^{-/-} mice had a reactive gliosis in the retina at d25 (Fig. 2B). Up-regulation of p16^{Ink4a} and p19^{Arf} genes has been correlated with normal tissue aging *in vivo*, and we could confirm this in the CNS of aging mice and humans by analyzing protein and gene expression (data not shown) (Krishnamurthy et al., 2004). We dissected eye structures (lens, retina, iris and CBE) from WT and *Bmi1*^{-/-} littermates at d25, and evaluated p16^{Ink4a} and p19^{Arf} genes expression. Compared to WT mice, expression of both genes was increased in most eye structures of *Bmi1*^{-/-} mice, including the retina (Fig. 2C). These findings reveal that *Bmi1* deficiency results in a premature aging-like ocular phenotype.

Bmi1 gene-dosage modulates lifespan

Bmi1^{+/-} mice are fertile and apparently normal, in contrast with *Bmi1*^{-/-} mice, which present growth defects and a lethality rate exceeding 75% before weaning (Jacobs et al., 1999). However, we noticed that ~10% of *Bmi1*^{+/-} mice developed lens cataracts by the time of

weaning, in contrast to their wild type (WT) littermates, which did not have cataracts at this early age. This suggested the possibility that *Bmi1* gene-dosage may influence cellular aging and organism lifespan. To assess the potential involvement of *Bmi1* gene-dosage in the regulation of lifespan, we analyzed cohorts of WT and *Bmi1*^{+/-} mice in the C57BL/6 genetic background over a period of 36 months. In general, *Bmi1*^{+/-} mice were indistinguishable from their WT littermates. However, at 15 months of age they progressively presented features resembling those of 22-24 months old C57BL/6 WT mice, such as hair loss covering more than 20% of body surface, lens cataracts and reduced locomotor activity. Kaplan-Meier analysis revealed that loss of one *Bmi1* allele reduced the median and maximum lifespan by ~35% (Fig. 3A). These data reveal that *Bmi1* gene-dosage can modulate lifespan.

Loss of *Bmi1* results in activation of a p53-dependent apoptotic cascade in CNS neurons

Consistent with *Bmi1* expression in most post-mitotic cortical neurons, we found a significant up-regulation of *p16*^{Ink4a} (174.9 +/- 33.7, *P* = 0.004), *p19*^{Arf} (5.3 +/- 0.7, *P* = 0.002) and *p21*^{Cip1} (1.9 +/- 0.2, *P* = 0.006) in the cerebral cortex of *Bmi1*^{-/-} mice (*n* = 3) at P20 when compared to WT littermates (*n* = 4), as measured by quantitative RT-PCR. Immunostaining also revealed robust *p19*^{Arf} expression in individual cortical neurons (NeuN+) of *Bmi1*^{-/-} mice, but not of WT littermates (Fig. 3B). *p19*^{Arf} increases p53 activity by inhibiting Mdm2-mediated p53 degradation (Sherr, 2006). The increased in *p19*^{Arf} expression in retinal and cortical neurons of *Bmi1*^{-/-} mice is thus predicted to increase p53 activity. One way p53 might promote aging in the CNS is by rendering neurons more

susceptible to apoptosis. Ectopic expression of p53 in mouse cortical neurons has been shown to induce apoptosis, and *p53*^{-/-} neurons are resistant to apoptosis induced by the topoisomerase I inhibitor and DNA-damaging agent camptothecin (Fortin et al., 2001; Cregan et al., 2004). We quantified the expression of p53 target genes involved in apoptosis in the cortex of *Bmi1*^{-/-} mice. Puma, Noxa, Bcl2l2 and Apaf1 expression were significantly increased (Fig. 3C). Furthermore, immunostaining for activated caspase-3, a marker of apoptosis, showed that, compared to WT, *Bmi1*^{-/-} mice had a 3-5 fold increased apoptosis in the cortex and hippocampus (Fig. 3D).

To evaluate p53 expression in the CNS of WT and *Bmi1*-null mice, we performed Western blot analysis on cortical extracts using antibodies against p53. In these conditions, p53 was not detectable. We rationalized that this could be explained by a dilution effect. To test this, we first analyzed *Bmi1* expression in the embryonic cortex at e18.5, and found robust expression in cortical neurons (Fig. 4A). We then performed embryonic cortical neuron cultures from e18.5 WT and *Bmi1*-null littermates, where more than 95% of cells present after 7 days were post-mitotic neurons expressing the neuronal marker MAP2 along with *Bmi1* (Fig. 4B). As expected, *p16*^{Ink4a} and *p19*^{Arf} expression levels were increased in cultured *Bmi1*^{-/-} neurons (Fig. 4C). We measured total p53 levels by Western blot at day 7 of culture. We found that in *Bmi1*^{-/-} neurons, the total amount of p53 was increased near 3.5 times at normal oxygen tension (data not shown). To further validate our findings, we cultured WT and *Bmi1*^{-/-} neurons at 3% oxygen concentration, to reduce oxidative stress. Using these conditions, we observed that total p53 was increased ~1.8 times in *Bmi1*^{-/-} neurons compared to WT (Fig. 4D). One post-translational modification linked to p53

activation is lysine acetylation, and recent work revealed that p53 acetylation (but not phosphorylation) is indispensable for its growth arrest and apoptotic activities (Vaziri et al., 2001; Tang et al., 2008). We found that the acetylated form of p53 was increased ~2.2 times in *Bmi1*^{-/-} neurons at normal oxygen tension (Fig. 4D). Because Bmi1 deficiency may induce p53 activation through a p19^{Arf}-independent pathway, such as through increased DNA damage, we measured γ H2AX levels by Western blot and immunofluorescence. γ H2AX is a DNA damage sensor that also helps to maintain genome integrity, and DNA damage is followed by the accumulation of γ H2AX foci in the cell nucleus. In both WT and *Bmi1*^{-/-} neurons, γ H2AX expression was not detected by Western blot, and no differences could be observed either by immunofluorescence (Fig. 4E and data not shown). Taken together, these results suggest that loss of Bmi1 results in activation of a p53-dependent apoptotic cascade in the cerebral cortex, and reveal that p19^{Arf} expression as well as total p53 level and p53 activation state are increased in cultured *Bmi1*^{-/-} neurons.

P53 inhibition can rescue *Bmi1*^{-/-} MEFs senescence and proliferation phenotypes

Previous work revealed that *Bmi1*^{-/-} MEFs proliferate poorly and become prematurely senescent at passage 3 (Jacobs et al., 1999). To evaluate the specific contribution of p53 to the phenotype of *Bmi1*^{-/-} cells, we inhibited its activity in *Bmi1*^{-/-} MEFs using a retrovirus expressing a dominant-negative form of p53 (GSE22). In mice, ambient oxygen (20%) concentration is sufficient to induce MEFs senescence through accumulation of oxidative damages and induction of p53 (Parrinello et al., 2003). To test the possibility that oxygen concentration may also influence the *Bmi1*^{-/-} phenotype, we cultured MEFs at 3% and 20% oxygen concentration (Fig. 5A-D). We found that inactivation of p53 in *Bmi1*^{-/-} MEFs lead

to a gradual but almost complete rescue of growth capabilities in either 3% or 20% oxygen tension, revealing that p53 inactivation alone is sufficient to rescue both premature senescence and proliferation defects caused by the loss of Bmi1 in MEFs.

***Bmi1*^{-/-} neurons are hypersensitive to neurotoxic agents in a p53-dependent manner**

To address whether the apoptotic features observed in the CNS of *Bmi1*^{-/-} mice were cell-autonomous to neurons and p53-dependent, we used neuronal cultures. Neurons from both genotypes were treated with 1 μM of camptothecin and analyzed in a time course (Cregan et al., 2004). Our data revealed that at 24 hour, ~45% of *Bmi1*^{-/-} neurons had disappeared from the cultures, compared to only ~12% for WT neurons (Fig. 6). A similar trend was found at 48 hour (Fig. 6). Immunostaining of the cells 24 hours post-treatment using an antibody against the activated form of caspase-3 revealed a marked increase in apoptotic neurons in *Bmi1*^{-/-} samples compared to WT (Fig. 6A). To test the role of p53 in this context, we infected neurons with an adenovirus expressing a dominant-negative form of p53 (DNp53), which blocks p53 tetramerization and DNA binding-dependent transcriptional activity (Ferbeyre et al., 2002). In both WT and *Bmi1*^{-/-} neurons, DNp53 rescued camptothecin-induced apoptosis (Fig. 6A), showing that *Bmi1* deficiency results in a p53-dependent increased sensitivity to DNA damages cause by topoisomerase I inhibition.

Exogenously added H₂O₂ induces neuronal death mainly by activation of the MST/FOXO signaling pathway (Lehtinen et al., 2006). To test the resistance of *Bmi1*^{-/-} neurons to this oxidant, we treated neurons with 5 μM of H₂O₂. 16 h later, we analyzed cell number, caspase-3 activation and cellular morphology. Differences in cell viability were

not found between WT and *Bmi1*^{-/-} neurons (Fig. 6B). Furthermore, addition of the DNp53 virus did not rescue either WT or *Bmi1*^{-/-} neurons viability. These data revealed that *Bmi1* deficiency does not alter neurons sensitivity to H₂O₂.

Bmi1^{-/-} mice display a progeroid phenotype in the CNS and age is the prime risk factor to develop Alzheimer disease. Based on this, we hypothesized that *Bmi1*^{-/-} neurons are more sensitive to β -amyloid toxicity. Extra-cellular A β ₄₂ peptide accumulates in senile plaques of Alzheimer patient brains, but evidence reveals that intracellular A β ₄₂ also accumulates in neurons, and that A β ₄₂-induced cell death in neurons is mediated by p53 (Zhang et al., 2002; Ohyagi et al., 2005; LaFerla et al., 2007). We electroporated WT and *Bmi1*^{-/-} neurons with plasmids driving expression of A β ₄₂/GFP or of a mutated form lacking the first ATG. Time course analyses of cell survival at 48, 72 and 96 hours post-electroporation revealed that *Bmi1*^{-/-} neurons were significantly more sensitive to intracellular A β ₄₂ peptide toxicity than WT neurons (Fig. 6C).

***Bmi1*^{-/-} neurons are hypersensitive to a mitochondrial toxin**

Mitochondria are the main source of intracellular ROS. To test if *Bmi1*^{-/-} neurons were more sensitive to these metabolites, we treated neurons with 3-nitropropionic acid (3-NP), a succinate dehydrogenase inhibitor. 3-NP exposure blocks complex II of the mitochondria respiratory chain, generates mitochondrial ROS, and leads to phase II antioxidant response genes activation by Nrf2 (Calkins et al., 2005; Shih et al., 2005). 3-NP treatment induced caspase-3-dependent (apoptosis) and caspase-3-independent (vacuolization) neuronal cell

death (Fig. 7A). *Bmi1*^{-/-} neurons were significantly more sensitive than WT neurons to both forms of 3-NP-induced cell death (Fig. 7A and B). DNp53 rescued WT and *Bmi1*^{-/-} neurons from caspase-3-dependent cell death, but only rescued *Bmi1*^{-/-} neurons from caspase-3-independent cell death (Fig. 7B). These results suggest that *Bmi1*-deficiency possibly affects neurons capacity to scavenge mitochondrial ROS.

Identification of new *Bmi1*-regulated molecular pathways in neurons

To identify *Bmi1*-regulated molecular pathways that could explain the increase sensitivity of *Bmi1*^{-/-} neurons to a mitochondrial toxin, we performed DNA microanalyses on cultured embryonic cortical neurons. Because *Bmi1* is a transcriptional repressor, we first focused on up-regulated genes. Our data reveal that in *Bmi1*^{-/-} neurons, there is an up-regulation of most previously identified *Bmi1*-target genes including p16^{Ink4a}, p21^{Cip1}, and Hox genes (*Hoxa5*, *Hoxd8* and *Hoxa7*), as well as previously uncharacterized *Bmi1*-regulated homeobox genes (*Engrailed 1* and *Tal1*) (Table 1) (Molofsky et al., 2003). New potential *Bmi1*-regulated genes involved in neurogenesis (*dendrin*, *decorin* and *neuritin*), cell survival (*Eda2r*, *Gria3* and α -synuclein), or neuronal functions (*AMPA3*, *GABA-A* and *neurotensin*) were also identified. Notably, we identified 4 genes involved in antioxidant defenses that are down-regulate in *Bmi1*^{-/-} neurons (*Nrf1*, *GST-1 α* , *Aldh6a1* and *Sestrin 1*), suggesting that the oxidative metabolism may be affected by *Bmi1* deficiency (Table 1).

Reduced antioxidant defenses in *Bmi1*^{-/-} neurons is linked to p53 activity

To test the possibility that *Bmi1* regulates the oxidative metabolism in neurons, we quantified ROS levels. Notably, we found a 2 folds increase in ROS concentrations in

cultured *Bmi1*^{-/-} neurons compared to WT (Fig. 8A). Infection with the DNp53 adenovirus (or supplementation with the antioxidant N-acetyl-cysteine) efficiently restored ROS concentrations to WT levels, suggesting that ROS accumulation in *Bmi1*^{-/-} neurons is dependent on increased p53 activity (Fig. 8A). Because DNp53 might also interfere with the function of other proteins, including the p53-family members p63 and p73 (Jacobs et al., 2006), we further assess the specific role of p53 in this context by using *p53* knockout mice. WT, *Bmi1*^{-/-}, *p53*^{-/-} and *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-} embryos were used to establish cortical neuron cultures. After 1 week, we quantified ROS levels and found that genetic ablation of *p53* could also prevent ROS accumulation in *Bmi1*^{-/-} neurons (Fig. 8B). These results suggest that in *Bmi1*^{-/-} neurons, p53 is stabilized or activated, resulting in elevated ROS concentrations.

To address how *Bmi1* deficiency leads to elevated ROS concentrations, we evaluated the expression of several antioxidant genes, including those previously linked to *p53* activity i.e. GSTα1, NQO1, xCT, Sestrin1, Sestrin2, Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) and Mn superoxide dismutase (Sod2) in WT, *Bmi1*^{-/-}, *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-} or DNp53-infected *Bmi1*^{-/-} cultured neurons (Sablina et al., 2005; Dhar et al., 2006; Faraonio et al., 2006; Matheu et al., 2007). We found that compared to WT, expression of all tested genes was reduced in *Bmi1*^{-/-} neurons, and that this reduction was most dramatic for phase II genes (Fig. 8C). Importantly, DNp53 could restore the expression of most genes to WT levels in *Bmi1*^{-/-} neurons, similarly as genetic ablation of *p53* (Fig. 8C and D). We also cultured neurons at 3% oxygen concentration. We found that reducing oxygen concentration had no impact on ROS levels in *Bmi1*^{-/-} and *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-} neurons (Fig. 9A

and data not shown). These results reveal that abnormal antioxidant gene expression in *Bmi1*^{-/-} neurons is genetically linked to *p53* activity.

To further explore the underlying molecular mechanism, we compared the expression of Sirt1, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) and Nrf2 in WT and *Bmi1*^{-/-} neurons. PGC-1 α and Nrf2 are activators of antioxidant defense genes in neurons, and Sirt1 can promote PGC-1 α activity by deacetylation (Calkins et al., 2005; Shih et al., 2005; St-Pierre et al., 2006; Kim et al., 2007). Sirt1, PGC-1 α and Nrf2 protein levels were modestly increased in *Bmi1*^{-/-} neurons, and the acetylated form of PGC-1 α was slightly reduced (Fig. 8E). No significant variations in gene expression were found by quantitative RT-PCR (data not shown). Thus, expression levels of PGC-1 α , Nrf2 and Sirt1 are close to normal in *Bmi1*^{-/-} neurons.

To test the possibility that antioxidant genes are actively repressed by *p53* in *Bmi1*^{-/-} neurons, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments at the *xCT* and *Sod2* promoters. When compared to WT, we found that *p53* was enriched at the *xCT* and *Sod2* promoters in *Bmi1*^{-/-} neurons, and this correlated with a repressed chromatin state, as shown by the accumulation of dimethylated histone H3 at lysine 9 and 27 (Fig. 8F) (Sparmann and van Lohuizen, 2006). No variations were found for acetylated histone H4, a mark of active chromatin. We also assess whether *p53* accumulation at these regions of the chromatin was accompanied by the presence of co-repressors. HDAC3/N-CoR and HDAC1/Sin3a co-repressor complexes have been described in various systems (Jepsen and Rosenfeld, 2002; Karagianni and Wong, 2007). We found that HDAC1 and N-CoR were

enriched at the *xCT* and *Sod2* promoters in *Bmi1*^{-/-} neurons. No variations were found at the *β-globin* promoter, which was used as an internal control (Fig. 8F). These findings suggest that *Bmi1* deficiency results in increased ROS concentration in neurons due to a repressive action of p53 on the expression of antioxidant genes (see model in Fig. 9C).

***P53* is pro-oxidant in neurons and in the CNS in physiological conditions**

In physiological conditions, *p53* is proposed to have an anti-oxidant activity in most tissue and primary cell lines, such as in embryonic lung fibroblasts (Matheu et al., 2007). However, we found that genetic ablation of *p53* in *Bmi1*^{-/-} neurons could restore ROS to normal levels, showing that *p53* is pro-oxidant in this pathological context. To explore the possibility that *p53* is also pro-oxidant in neurons in physiological conditions, we established neuronal and lung fibroblast cultures from WT and *p53*^{-/-} embryos at 3% and 20% oxygen concentration. At day 7 post-plating (neurons) or passage 1 (lung fibroblasts), we measured ROS level and compared gene expression. Notably, *p53*^{-/-} neurons showed reduced ROS level when compared to WT at both oxygen concentrations (Fig. 9A). In contrast, *p53*^{-/-} lung fibroblasts presented increased ROS concentrations in the same conditions (Fig.9B). Consistently, *p53* deficiency in neurons resulted in up-regulation of *xCT*, *GSTα1*, *NQO1* and *Sestrin1* expression when compared to WT, with the exception of *Sestrin2*, which expression was modestly reduced (Fig. 9A). In contrast, *GSTα1*, *NQO1*, and *Sestrin2* expression was reduced in *p53*^{-/-} lung fibroblasts, while *Sestrin1* expression was increased (Fig. 9B). Little variations in ROS levels were observed by modifying oxygen concentration in neurons, but not in MELFs (Fig. 9A and B). To validate these observations *in vivo*, we compared lipid peroxidation and gene expression in the brain,

lung, and liver of WT and *p53*^{-/-} littermates at 2 months of age. Lipid peroxidation is the result of cumulative oxidative damage to cell membranes and thus reflects imbalance in ROS levels. Analysis of older *p53*-null mice was not possible due to the rapid development of tumors in these animals. When compared with WT, we found that lipid peroxidation levels were much higher in the liver and lung of *p53*^{-/-} mice and significantly lower (by 42%) in the brain (Table 2). Furthermore, Real-time PCR analyses revealed that anti-oxidant gene expression levels are significantly higher in the cortex of *p53*-null mice compared to their WT littermates (Table 2). Thus, in sharp contrast with the proposed general anti-oxidant function of *p53* (Matheu et al., 2007), our results demonstrate that *p53* is pro-oxidant in neurons and in the CNS of mammals in pathological and physiological conditions (see model in Fig. 9C).

Discussion

The *Bmi1* oncogene has been extensively studied for its role in the maintenance of cell proliferation (Sparmann and van Lohuizen, 2006). However, *Bmi1* is also widely expressed in post-mitotic ocular tissues and in neurons of the adult CNS (this study). Here, we uncover a new function for *Bmi1* in controlling survival and antioxidant defenses in neurons through repression of *p53* pro-apoptotic and pro-oxidant activities. These findings have implications for the understanding of normal CNS aging and age-related neurodegenerative diseases.

Bmi1 and the p19^{Arf}/p53 pathway

We have shown that *in vivo*, p19^{Arf} RNA and protein expression levels are increased in *Bmi1*^{-/-} neurons, and that the downstream p53 apoptotic cascade is activated. *In vitro*, *Bmi1*^{-/-} neurons have increased total and activated p53 protein levels, are hypersensitive to camptothecin-induced apoptosis, and can be rescued by the DNp53 virus. These data suggest that p53 mediates most of the apoptotic phenotype observed in *Bmi1*^{-/-} neurons. We also found that *Bmi1*^{-/-} neurons also present abnormally high free radical concentrations and are hypersensitive to a mitochondrial toxin, implying a role for *Bmi1* in regulation of mitochondria oxidative metabolism. Genetic inactivation of *p53* revealed that deregulation of the oxidative metabolism in *Bmi1*^{-/-} neurons is mostly, if not entirely, mediated by *p53*. This is supported by the observation that antioxidant gene levels in *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-} neurons (where xCT and GST have supra-physiologic levels) are almost identical to those observed in *p53*^{-/-} neurons (compare Fig. 8D to Fig. 9A). However, total ROS levels are apparently distinct between *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-} and *p53*^{-/-} neurons (compare Fig. 8B to Fig. 9A). These observations suggest that most but maybe not all *Bmi1* functions are mediated through repression of *p53* activity. These additional functions may be explained by p19^{Arf}-mediated actions through Mdm2 on the p63 and p73 protein variants, which are also expressed in CNS neurons (Jacobs et al., 2006).

P53 and CNS aging

Upon accumulation of mutations, p53 promotes apoptosis or senescence in premalignant tissues to prevent carcinogenesis (Sherr, 2001; Sharpless et al., 2004). One way p53 may promote mitochondria-mediated cell death in dividing cells is by increasing ROS

concentrations through repression of antioxidant genes (Dhar et al., 2006; Faraonio et al., 2006). Paradoxically, p53 was proposed to stimulate antioxidant defenses in various organs in physiological conditions through its positive action on Sestrin(s), and thus protect the genome from accumulation of mutations by lowering intracellular ROS levels (Sablina et al., 2005; Matheu et al., 2007). During development, *p53* has a function in eliminating supernumerary neurons and neuronal progenitors (Jacobs et al., 2006). Later on, *p53* is required to prevent tumor development from progenitor/stem cells, oligodendrocytes or astrocytes. However, p53 activity is apparently not required in adult neurons, which are post-mitotic and not tumor-prone. Rather, all evidence suggests that p53 activity in neurons is pathological (Zhang et al., 2002; Bae et al., 2005; Ohyagi et al., 2005; Nair, 2006; Nair et al., 2006; Kieran et al., 2007).

We found here that in contrast with other organs and cultured lung fibroblasts, *p53* is pro-oxidant in brain tissue and cultured neurons. Our data argue that *p53* is always active in neurons to levels that are pro-oxidant, in sharp contrast with other cell types. Notably, expression of a dominant-negative form of p53 in the CNS of *Drosophila*, but not in other organs, was shown to result in lifespan extension and improved resistance to paraquat, suggesting that the deleterious function of p53 in neurons is conserved in insects (Bauer et al., 2005). These observations may explain why transgenic mice with extra-copies of *p53* and *p19^{Arf}* do not have an increase in maximum lifespan, despite being protected from tumor burden (Matheu et al., 2007). In these animals, increasing p53 gene-dosage is predicted to increase oxidative damage accumulation in the CNS, which is unlikely to promote lifespan extension.

***Bmi1*, aging and neurodegenerative diseases**

When compared with *PGC-1 α* , the function of *Bmi1* on the antioxidant defense system appears to overlap only partially. *PGC-1 α ^{-/-}* mice show only a modest reduction in the basal expression level of *Sod1*, *Sod2* and catalase genes in the brain, but *PGC-1 α ^{-/-}* cells are highly inefficient to activate antioxidant genes expression when challenge with oxidants (St-Pierre et al., 2006). In contrast, *Bmi1^{-/-}* neurons have abnormally low basal expression levels for most antioxidant genes, yet can still respond to 3-NP treatment by activating phase II gene expression, although less efficiently (data not shown). These observations suggest that *Bmi1* deficiency results in the constitutive repression of antioxidant genes (model in Fig. 9), while *PGC-1 α* deficiency results in defective activation of antioxidant genes upon acute oxidative stress. In contrast to *Bmi1^{-/-}* neurons, *PGC-1 α ^{-/-}* cells are also more sensitive to the action of H₂O₂. Importantly, catalase, which scavenges H₂O₂, is mostly present in the non-mitochondrial cytoplasm and peroxisomes, and thus may be more protective against exogenous H₂O₂ than against mitochondrial ROS. Catalase is the only antioxidant gene we tested which expression is unaffected in *Bmi1^{-/-}* neurons.

The free radical theory of aging proposes that cellular and DNA damage produced by mitochondrial ROS are the causal factor of cellular and organismal aging (Harman, 1956), and we showed here that loss of *Bmi1* leads to a dramatic reduction in antioxidant defenses and to concomitant increase in ROS concentrations. Furthermore, *Bmi1^{-/-}* neurons are hypersensitive to neurotoxic agents and have an elevated level of spontaneous apoptosis in non-toxic conditions when compared to WT neurons. Taken together, this provides a most plausible mechanism to explain why *Bmi1*-deficient mice and neurons age

prematurely. In the context of normal aging, our finding brings the possibility that reduced *BMI1* expression in human brain neurons may contribute to the age-associated reduction in antioxidant defenses, leading to accumulation of oxidative damage and to neuronal dysfunction. The activity of *Bmi1* against mitochondrial ROS may be also relevant to age-associated neurodegenerative diseases where cell death is apparently mediated by oxidative damage, such as in Parkinson disease (Thomas and Beal, 2007). *Bmi1* activity against p53-mediated neuronal apoptosis may be relevant to Alzheimer and Huntington diseases. P53 expression is increased in Alzheimer disease brains, its transcription is activated by intracellular A β_{42} , and p53 inhibition prevents A β_{42} -induced neuronal cell death (Zhang et al., 2002; Ohyagi et al., 2005). We found here that *Bmi1* deficiency sensitizes neurons to apoptosis induced by the intracellular A β_{42} peptide. Because this system is far from physiological conditions, more work will be required to evaluate the possible implication of BMI1 in Alzheimer disease. In the Huntington disease brain, complex II activity is reduced, and 3-NP administration results in a striatal movement disorder in rodents and primates resembling Huntington disease (Lin and Beal, 2006). Notably, p53 is activated by mutant Huntingtin protein (Bae et al., 2005). We found that *Bmi1* deficiency dramatically increases neurons vulnerability to 3-NP toxicity and that p53 inhibition can rescue this phenotype. Our study reveals how the activity of *Bmi1* in post-mitotic neurons is required to block the induction of a pro-apoptotic and pro-oxidant molecular aging program mostly driven by *p53*.

Acknowledgements

We thank M. Van Lohuizen for *Bmi1*^{+/-} mice, G. Ferbeyre for the DNp53 virus, E. Drobetsky, E. Milot, and L. Levin for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, Natural Science and Engineering Research Council of Canada, and Turmel Family Foundation for Macular Degeneration Research. F.R. was supported by NIH program project grant AG017242 to Judith Campisi. G.B. is supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec. W.C. is a Scholar from the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal.

References

- 1) Bae BI, Xu H, Igarashi S, Fujimuro M, Agrawal N, Taya Y, Hayward SD, Moran TH, Montell C, Ross CA, Snyder SH, Sawa A (2005) p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47:29-41.
- 2) Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.
- 3) Bauer JH, Poon PC, Glatt-Deeley H, Abrams JM, Helfand SL (2005) Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Curr Biol* 15:2063-2068.
- 4) Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22:4212-22.
- 5) Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302-310.
- 6) Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson DA, Chan K, Kan YW, Johnson JA (2005) Protection from mitochondrial complex II inhibition in vitro and in vivo by Nrf2-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:244-249.
- 7) Cregan SP, Arbour NA, Maclaurin JG, Callaghan SM, Fortin A, Cheung EC, Guberman DS, Park DS, Slack RS (2004) p53 activation domain 1 is essential for PUMA upregulation and p53-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 24:10003-10012.

- 8) Dhar SK, Xu Y, Chen Y, St Clair DK (2006) Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression. *J Biol Chem* 281:21698-21709.
- 9) Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367.
- 10) Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, Cimino F (2006) p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem* 281:39776-39784.
- 11) Ferbeyre G, de Stanchina E, Lin AW, Querido E, McCurrach ME, Hannon GJ, Lowe SW (2002) Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22:3497-3508.
- 12) Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, Hakim A, Albert PR, Cecconi F, Helin K, Park DS, Slack RS (2001) APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 155:207-216.
- 13) Group TI-ACS (1991) Risk factors for age-related cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts. The Italian-American Cataract Study Group. *Am J Epidemiol* 133:541-553.
- 14) Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.
- 15) Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.

- 16) Ihanamaki T, Salminen H, Saamanen AM, Pelliniemi LJ, Hartmann DJ, Sandberg-Lall M, Vuorio E (2001) Age-dependent changes in the expression of matrix components in the mouse eye. *Exp Eye Res* 72:423-431.
- 17) Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M (1999) The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397:164-168.
- 18) Jacobs WB, Kaplan DR, Miller FD (2006) The p53 family in nervous system development and disease. *J Neurochem* 97:1571-1584.
- 19) Jepsen K, Rosenfeld MG (2002) Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci* 115:689-698.
- 20) Karagianni P, Wong J (2007) HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. *Oncogene* 26:5439-5449.
- 21) Kieran D, Woods I, Villunger A, Strasser A, Prehn JH (2007) Deletion of the BH3-only protein puma protects motoneurons from ER stress-induced apoptosis and delays motoneuron loss in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20606-20611.
- 22) Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM, Puigserver P, Sinclair DA, Tsai LH (2007) SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 26:3169-3179.
- 23) Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE (2004) *Ink4a/Arf* expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114:1299-1307.

- 24) LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499-509.
- 25) Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villen J, Becker EB, DiBacco S, de la Iglesia N, Gygi S, Blackwell TK, Bonni A (2006) A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 125:987-1001.
- 26) Lessard J, Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423:255-260.
- 27) Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.
- 28) Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borrás C, Flores JM, Vina J, Blasco MA, Serrano M (2007) Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448:375-379.
- 29) Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425:962-967.
- 30) Nair VD (2006) Activation of p53 signaling initiates apoptotic death in a cellular model of Parkinson's disease. *Apoptosis* 11:955-966.
- 31) Nair VD, McNaught KS, Gonzalez-Maeso J, Sealfon SC, Olanow CW (2006) p53 mediates nontranscriptional cell death in dopaminergic cells in response to proteasome inhibition. *J Biol Chem* 281:39550-39560.
- 32) Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, Shoji M,

- Checler F, Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, Tabira T (2005) Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19:255-257.
- 33) Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423:302-305.
- 34) Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5:741-747.
- 35) Radak Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S (2004) Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J* 18:749-750.
- 36) Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM (2005) The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11:1306-1313.
- 37) Sharpless NE, Ramsey MR, Balasubramanian P, Castrillon DH, DePinho RA (2004) The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23:379-385.
- 38) Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:731-737.
- 39) Sherr CJ (2006) Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 6:663-673.

- 40) Shih AY, Imbeault S, Barakauskas V, Erb H, Jiang L, Li P, Murphy TH (2005) Induction of the Nrf2-driven antioxidant response confers neuroprotection during mitochondrial stress in vivo. *J Biol Chem* 280:22925-22936.
- 41) Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
- 42) Sparmann A, van Lohuizen M (2006) Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6:846-856.
- 43) St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127:397-408.
- 44) Tang Y, Zhao W, Chen Y, Gu W (2008) Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133:612-626.
- 45) Thomas B, Beal MF (2007) Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2:R183-194.
- 46) Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415:45-53.
- 47) Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, Van Lohuizen M (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118:409-418.

- 48) Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107:149-159.
- 49) Wolf N, Penn P, Pendergrass W, Van Remmen H, Bartke A, Rabinovitch P, Martin GM (2005) Age-related cataract progression in five mouse models for anti-oxidant protection or hormonal influence. *Exp Eye Res* 81:276-285.
- 50) Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A (2002) Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol* 156:519-529.

Figure legends

Figure 1. *Bmi1* is expressed in post-mitotic neurons of the CNS. **A**, Frozen eye sections from d25 WT and *Bmi1*^{-/-} littermates were analyzed by immunofluorescence. No specific *Bmi1* labeling was detected in *Bmi1*^{-/-} samples. **B**, Brain sections from d25 WT and *Bmi1*^{-/-} littermates were analyzed as in (**A**). **C**, Mouse and human brain sections were analyzed by immunohistochemistry (IHC) (*Bmi1* is in brown; MAP2, NeuN and GFAP are in pink). Scale bars; 20 μm. Outer nuclear layer (onl), inner nuclear layer (inl) and ganglion cell layer (gcl).

Figure 2. *Bmi1* deficiency results in an early aging-like phenotype in the eye. **A**, Lenses from *Bmi1*^{-/-} mice show visible cataracts (top panels). Frozen eye sections from WT and *Bmi1*^{-/-} littermate mice were stained for SA β-galactosidase activity (arrowheads). **B**, Immunofluorescence analysis of 3 weeks old WT and *Bmi1*^{-/-} mice retinal sections labeled with a GFAP antibody. GFAP (red) is overexpressed in *Bmi1*^{-/-} retina. Outer nuclear layer (onl), inner nuclear layer (inl), ganglion cell layer (gcl) and ciliary body (C.B.). Scale bars; 20 μm. **C**, Gene expression was analyzed by RT-PCR in WT, *Bmi1*^{+/-} and *Bmi1*^{-/-} eye structures. *hpert* was used as internal standard.

Figure 3. *Bmi1* modulates lifespan and neuronal apoptosis in the CNS. **A**, Kaplan-Meier representation of the survival curves of WT and *Bmi1*^{+/-} mice (19 mice per cohort). Statistical significance was assessed using the log rank test relative to WT; *P* < 0.0001. **B**, Cortical sections from d25 WT and *Bmi1*^{-/-} littermates labeled with p19^{Arf} and NeuN antibodies. Arrowheads indicate neurons expressing p19^{Arf}. Scale bars; 20 μm. **C**, Real-

Time PCR analysis of genes expression in the *Bmi1*^{-/-} cortex (relative to WT). Results are Mean \pm s.d. (n = 4 sets of brains; ***P* < 0.01). **D**, IHC analysis of WT and *Bmi1*^{-/-} brain sections labeled with anti-caspase-3 antibodies. Data are expressed as the percentage of caspase-3+ nuclei over total hematoxylin-stained nuclei counts. Results are Mean \pm s.d. (n = 5; ***P* < 0.01).

Figure 4. P53 expression level and activation state are enhanced in *Bmi1*^{-/-} neurons. **A** and **B**, Bmi1 is expressed in embryonic cortical neurons. **A**, Sections of mouse embryos (e18.5) were analyzed by IHC using a Bmi1 antibody. Bmi1 is highly expressed in neurons of the upper cortical layer. **B**, Embryonic (e.18.5) neurons were cultured on poly-L-lysine substrate in serum-free media containing NGF and BDNF. 7 days later, they were labeled with Bmi1 and MAP2 antibodies and analyzed by immunofluorescence. Bmi1 (green) is co-expressed with the neuronal marker MAP2 (red) (arrowheads). Scale bars; 20 μ m. **C**, Real-time PCR analysis shows that *p16*^{Ink4a} and *p19*^{Arf} expression levels are increased in cultured *Bmi1*^{-/-} neurons. Results are Mean \pm s.d. as compared to WT levels set at 1 (n = 3-4 independent cell cultures; **P* < 0.05, ***P* < 0.01). **D**, Western blot analysis shows that the expression levels of total and acetylated p53 are increased in cultured *Bmi1*^{-/-} neurons. Data are calculated as ratios of p53 levels to those of β -actin. Ratios in *Bmi1*^{-/-} samples are compared to the ratios in WT samples set at 1 (n = 3 independent cultures; *P* = 0.02 for p53 expression analysis, and *P* = 0.001 for acetylated p53 expression analysis). **E**, Western blot analysis of cultured WT and *Bmi1*^{-/-} neurons using an anti- γ H2AX antibody shows that γ H2AX is not detected under these conditions. WT neural stem cells irradiated at 10 Gy were used as positive control.

Figure 5. Premature senescence and slow proliferation phenotypes of *Bmi1*^{-/-} MEFs are p53-dependent. **A and B**, WT and *Bmi1*^{-/-} MEFs were cultured under 3% or 20% oxygen concentration and population doublings (PD) were calculated at every passage. Cells were infected at PD 0 with a control retrovirus encoding GFP (-GFP) or GSE-22 (-GSE), a dominant negative peptide that inactivates p53. GSE can rescue the premature senescence phenotype of *Bmi1*^{-/-} MEFs. **C and D**, BrdU incorporation assay (1 hour exposure) reveals that GSE can restore *Bmi1*^{-/-} MEFs proliferation rate close to that of WT-GFP or WT-GSE MEFs. Results are Mean \pm s.d. of triplicates (data are representative of 4 independent cell cultures; ***P* < 0.01).

Figure 6. *Bmi1*^{-/-} neurons are hypersensitive to neurotoxic agents. **A**, Neurons were treated with camptothecin (CA; 1 μ M), and labeled with MAP2 and caspase-3 antibodies. Data are expressed as the percentage of MAP2⁺/caspase-3⁺ cells over total MAP2⁺ cells. Results are Mean \pm s.d. (n = 5; **P* < 0.05; ***P* < 0.01) (left panel). Total number of viable neurons was calculated at time zero, 24 and 48 hours after CA exposure for WT and *Bmi1*^{-/-} neurons to generate a time course plot. Results are Mean \pm s.d. (n = 3; ***P* < 0.01 as compared to WT) (right panel). **B**, Neurons were treated with H₂O₂ (5 μ M), and cell death analyzed and expressed as the percentage of vacuolized MAP2⁺ cells over total MAP2⁺ cells. Results are Mean \pm s.d. (n = 5). Vacuolization grades reflect the degree at which neurons are affected; Grade I, mildly affected; Grade II, moderately affected; Grade III, severely affected (left panel). Total number of viable WT and *Bmi1*^{-/-} neurons was calculated at various H₂O₂ concentrations to define the EC₅₀s. Data were calculated using 3

independent cell cultures. Values in brackets are the EC₅₀s (right panel). **C**, Neurons were electroporated with plasmids driving expression of A β ₄₂, or A β ₄₂ lacking the first ATG (control). Both A β ₄₂ and control constructs carried the GFP transgene. We performed the analysis by counting the total number of neurons double positive for MAP2⁺ and GFP⁺ staining at different time points. Data are expressed as percentages relative to control-plasmid transfected WT neurons. Results are Mean \pm s.d. (n = 3; **P* < 0.05; ***P* < 0.01).

Figure 7. *Bmi1*^{-/-} neurons are hypersensitive to the mitochondrial toxin 3-NP. **A** and **B**, E18.5 WT and *Bmi1*^{-/-} neurons were exposed to 3-NP (2 mM) for 16 hours. **A**, Neurons were labeled with caspase-3 (brown) and MAP2 (pink) antibodies, and analyzed by IHC. Upon 3-NP exposure, most *Bmi1*^{-/-} neurons presented caspase-3 dependent (arrowhead) or caspase-3 independent (vacuolization; arrow) cell death. Caspase-3 positive nuclei not expressing MAP2 represent remains of dead astrocytes or fibroblasts. Scale bar: 20 μ m. **B**, Data are expressed as the percentage of MAP2⁺/caspase-3⁺ cells over total MAP2⁺ cells (left panel) or as the percentage of vacuolized MAP2⁺ cells over total MAP2⁺ cells (right panel). Vacuolization grades are as described in Fig. 6B. Results are Mean \pm s.d. (n = 5; **P* < 0.05; ***P* < 0.01).

Figure 8. Antioxidant defenses are deficient in *Bmi1*^{-/-} neurons. **A**, ROS concentrations were measured with the fluorescent dye DCFDA. Data were normalized to the protein contents and expressed as fold change relative to WT. Results are Mean \pm s.d. (n = 3 independent cultures; **P* < 0.05; ***P* < 0.01). **B**, ROS levels in *Bmi1*^{-/-} and *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-} neurons. Measurements were done as in (**A**). **C** and **D**, gene expression levels were

analyzed by Real-Time PCR in *Bmi1*^{-/-}, DNp53-infected *Bmi1*^{-/-}, and *Bmi1*^{-/-}/*p53*^{-/-} neurons. Dashed lines represent the basal gene expression level measured in WT neurons (normalized to 1). Results are Mean \pm s.d. (n = 5 independent cultures; **P* < 0.05; ***P* < 0.01). **E**, Western blot analysis of neuronal extracts for the expression of Sirt1, Nrf2, and total and acetylated forms of PGC-1 α . For PGC-1 α detection, proteins were immunoprecipitated with an anti-PGC-1 α antibody and Western blotting were done using anti-PGC-1 α antibody (total PGC-1 α), or an anti-acetylated-Lysine (K acet.). β -actin was used as loading reference. **F**, Chromatin immunoprecipitation was performed with WT and *Bmi1*^{-/-} neuronal extracts. Immunoprecipitated DNA/protein complexes were analyzed using primers directed against the *xCT*, *Sod2* (2 sites) and *β -major* promoters. Results are Mean \pm s.d. (n = 3 independent cultures; **P* < 0.05 as compared to values in WT set at 1).

Figure 9. *p53* is pro-oxidant in cultured neurons and in the CNS. **A**, ROS levels in WT and *p53*^{-/-} neurons cultured at 3% or 20% oxygen concentrations. Data are represented as fold change relative to WT samples. Results are Mean \pm s.d. (n = 3; **P* < 0.05) (left panel). Expression levels of antioxidant genes in *p53*^{-/-} neurons were analyzed by Real-time PCR. Dashed line represents the basal gene expression level measured in WT neurons (normalized to 1). Results are Mean \pm s.d. (n = 3 independent cultures; **P* < 0.05; ***P* < 0.01) (right panel). **B**, ROS (left panel) and gene expression (right panel) levels in WT and *p53*^{-/-} mouse embryonic lung fibroblasts (MELFs) were analyzed as in (**A**) (n = 3; **P* < 0.05; ***P* < 0.01). **C**, Working model. i) Upon oxidative stress, Nrf2 and PGC-1 α are recruited to antioxidant gene promoters to induce transcription. ii) In physiological condition, p53 may compete or not with Nrf2 and PGC-1 α for association at promoters,

establishing equilibrium. iii) *Bmi1* deficiency leads to increase p53 accumulation at promoters and to gene repression through recruitment of co-repressors. The p53 repressor complex may or not displace Nrf2 and PGC-1 α from the promoter.

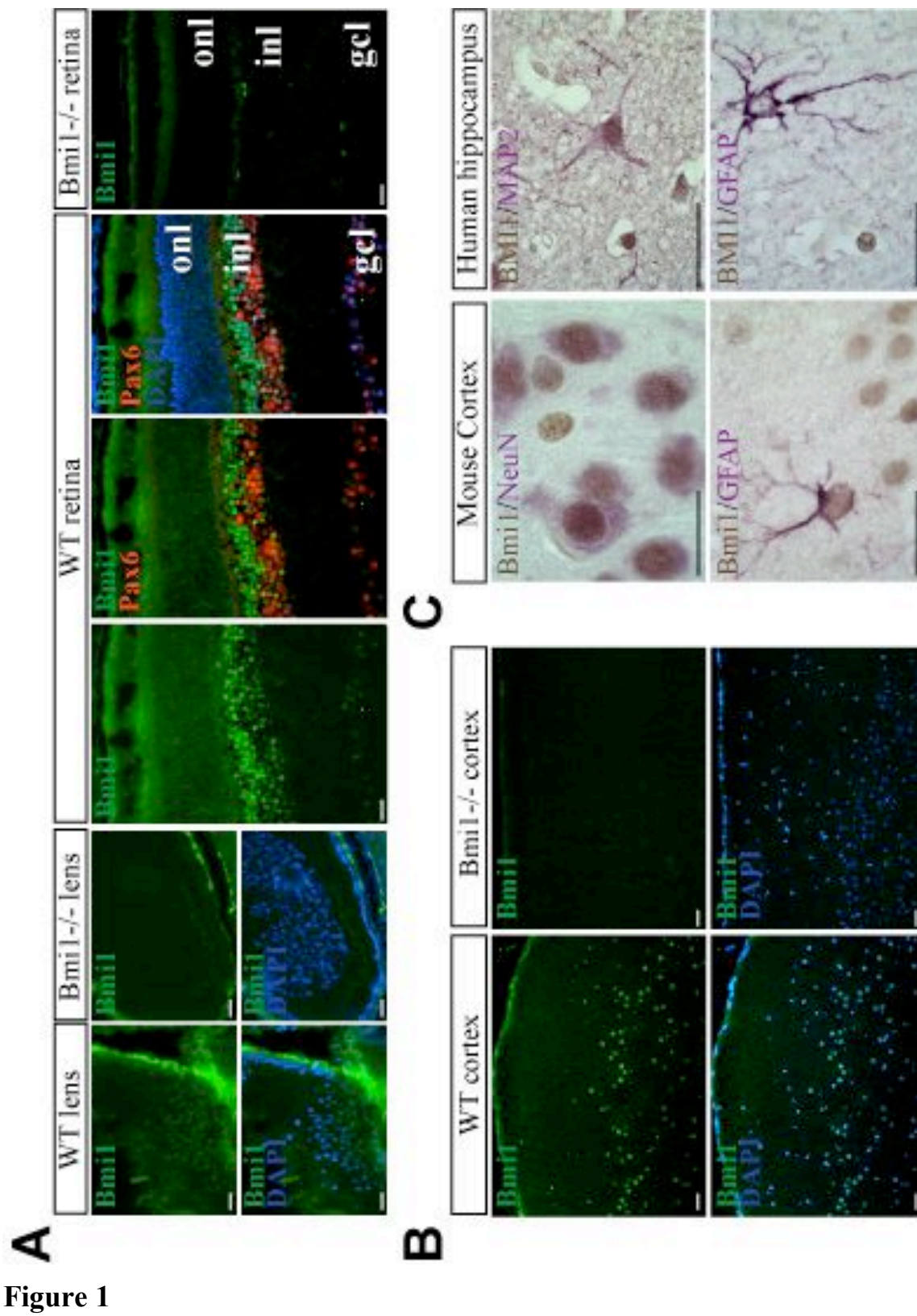


Figure 1

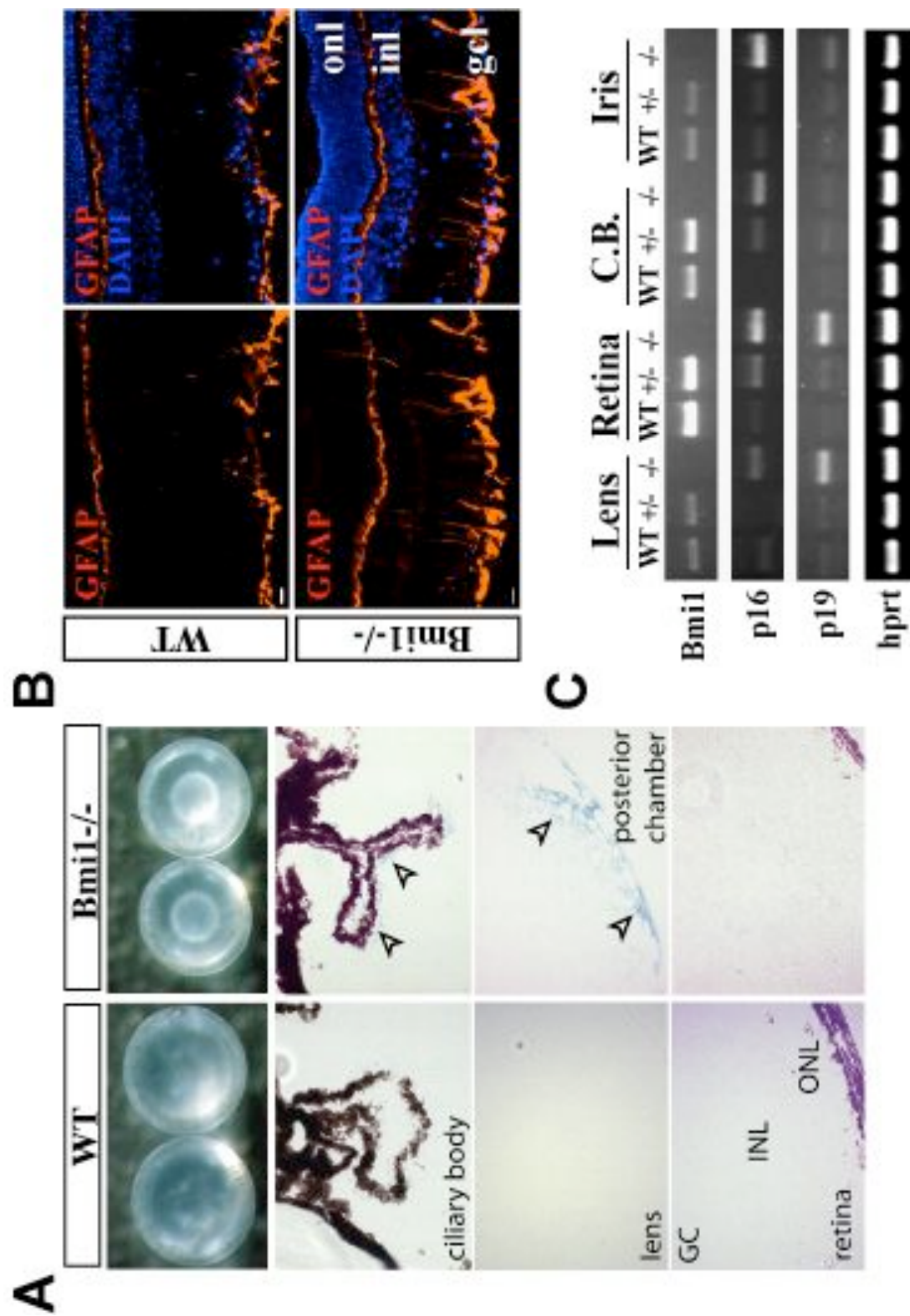


Figure 2

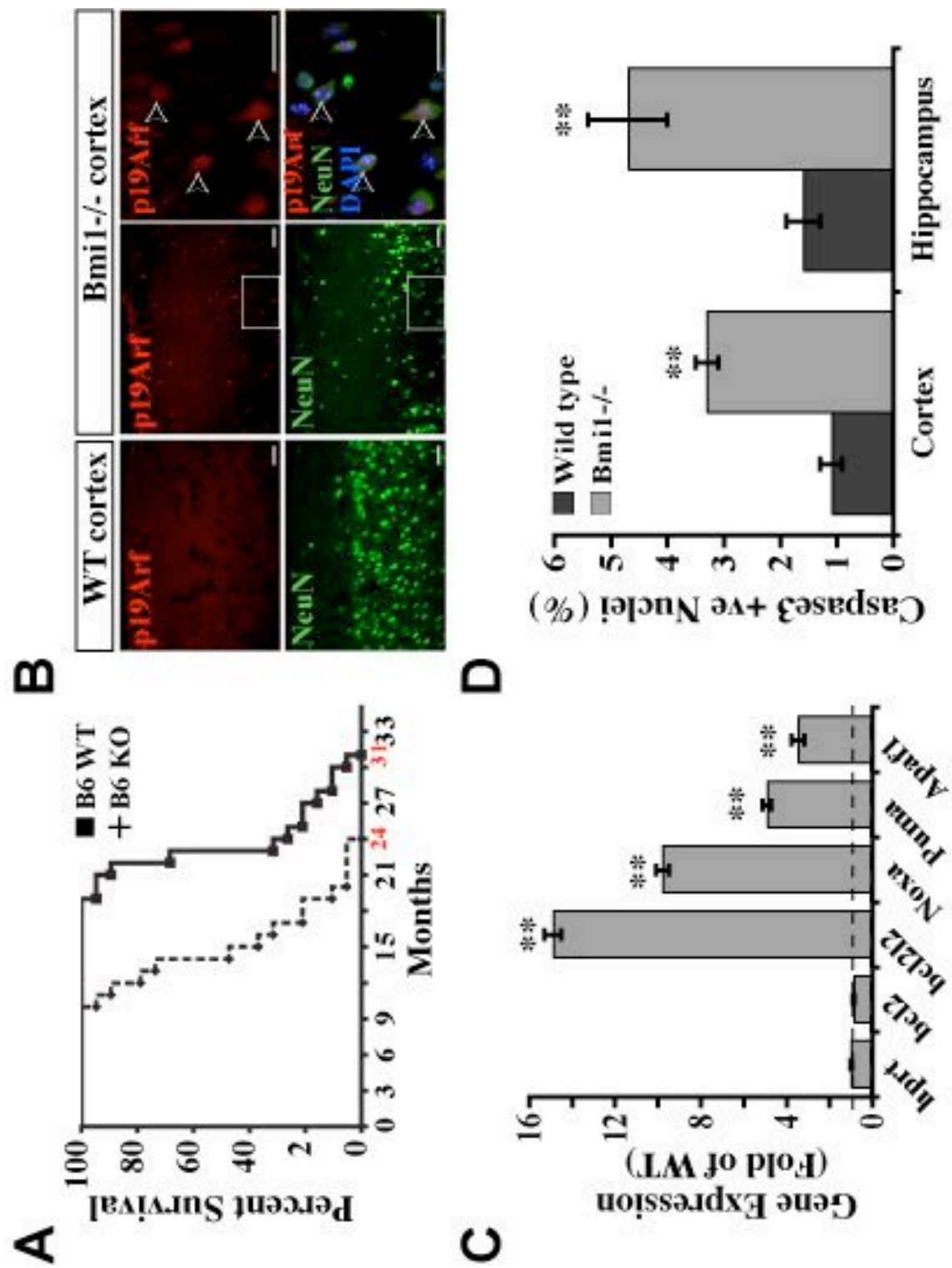


Figure 3

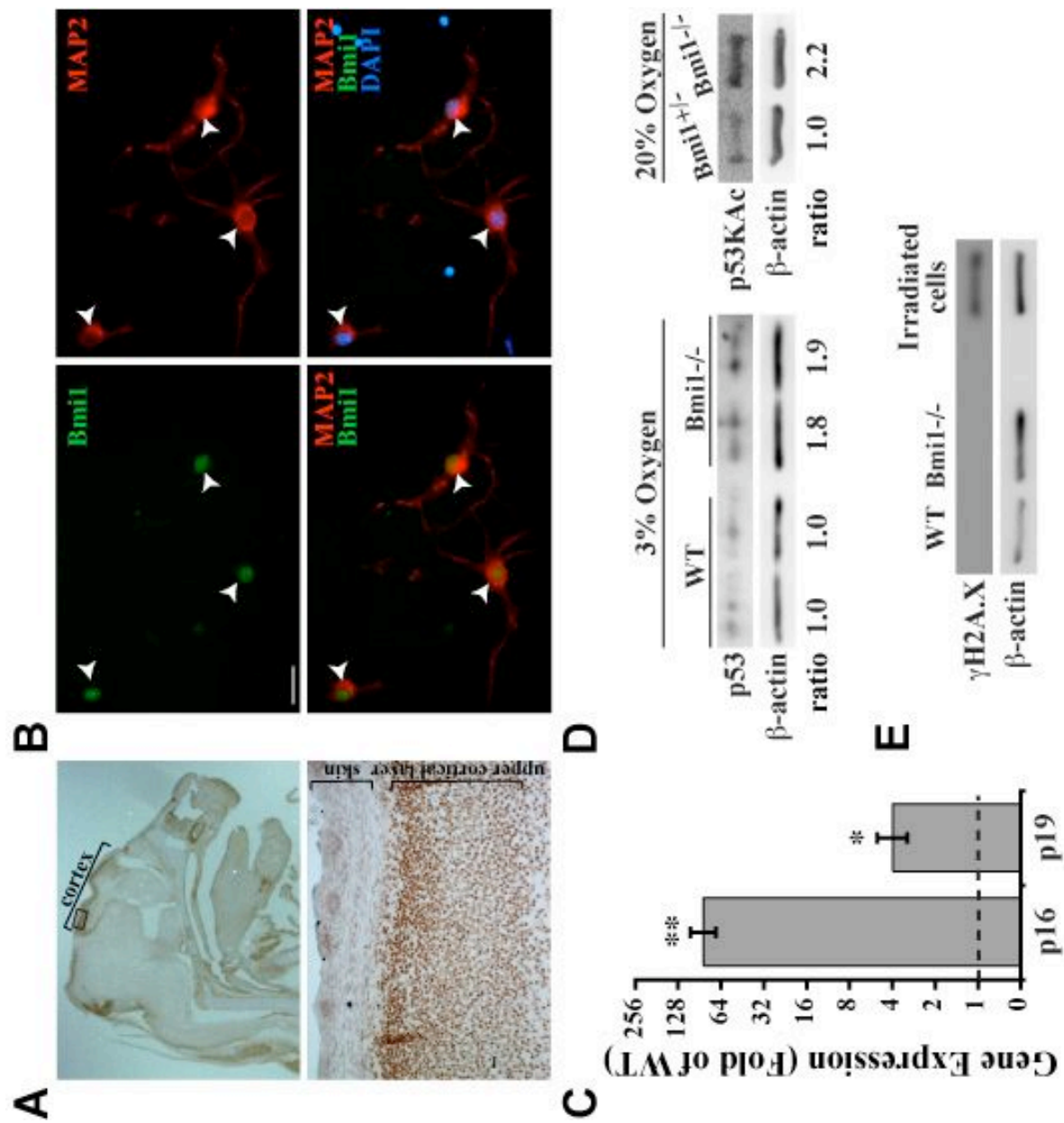
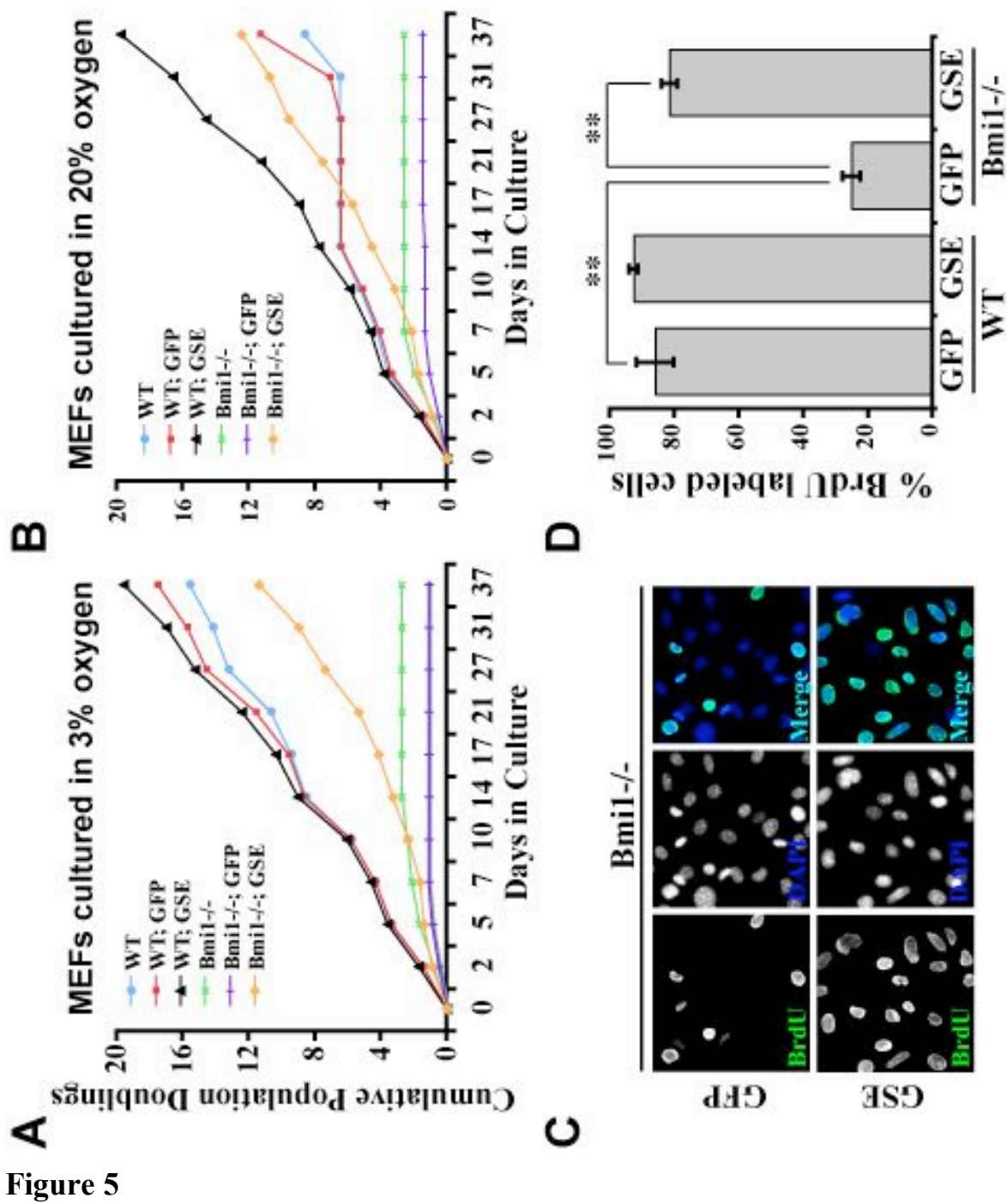
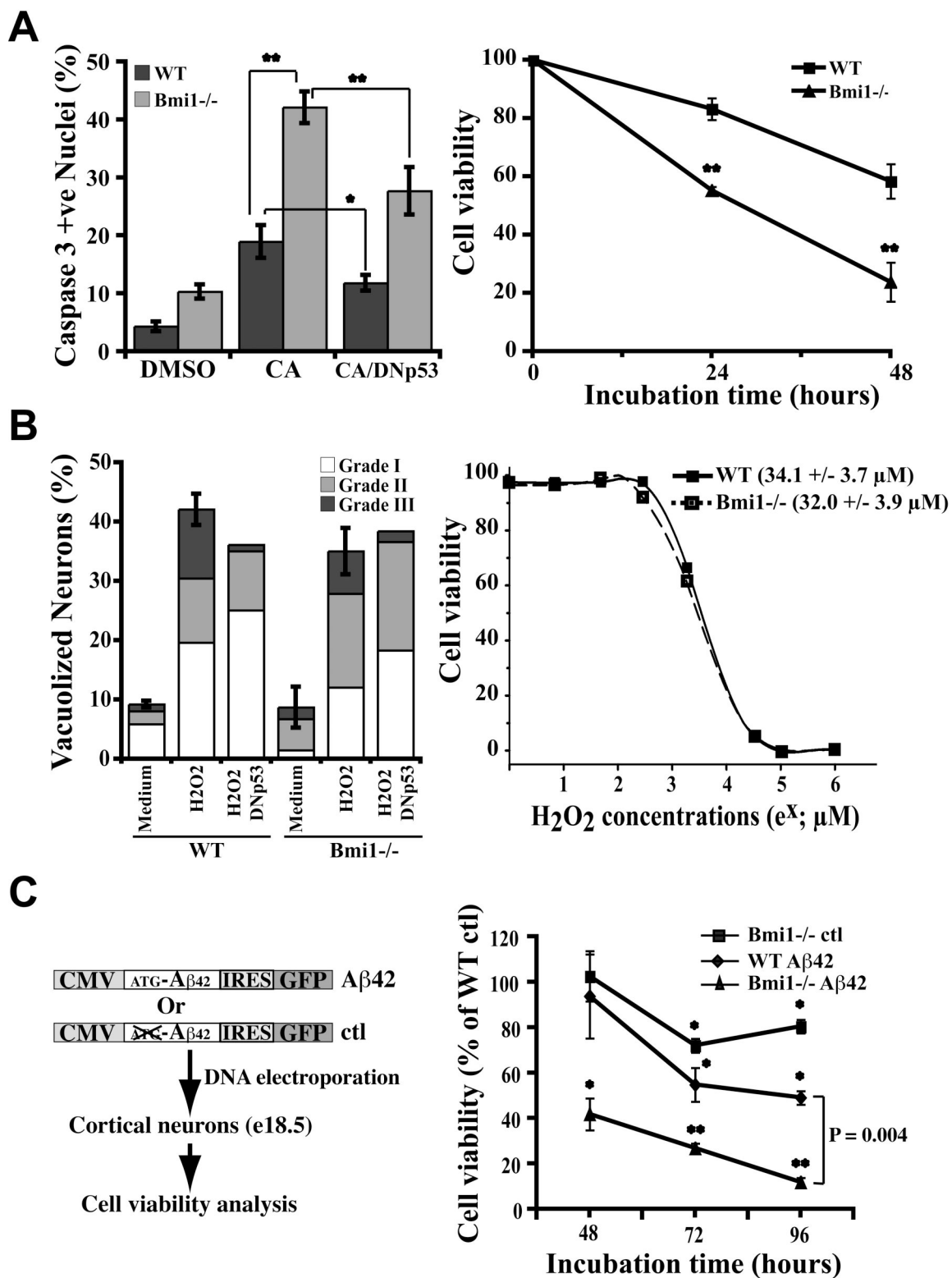


Figure 4





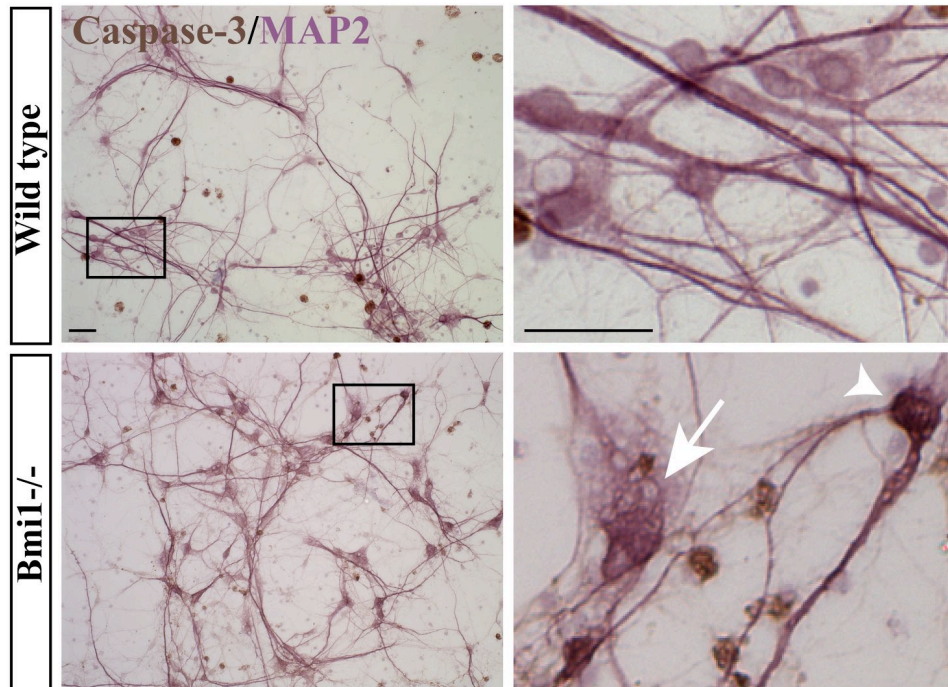
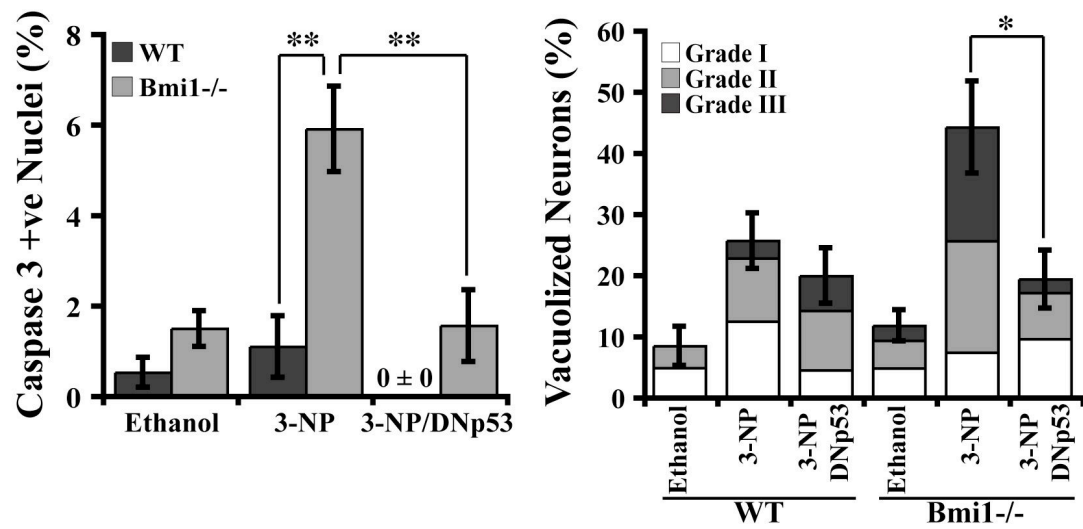
A**B**

Figure 7

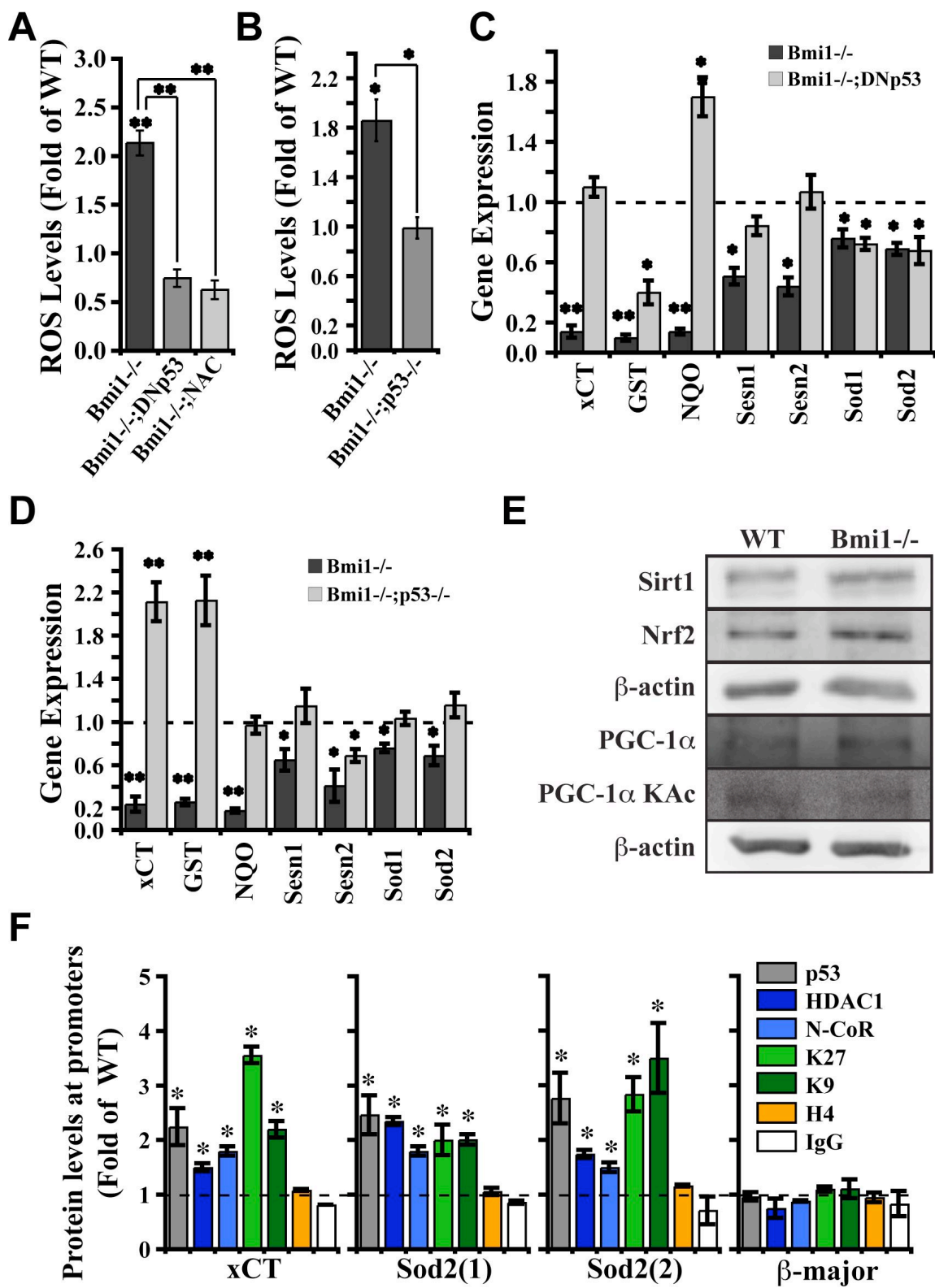


Figure 8

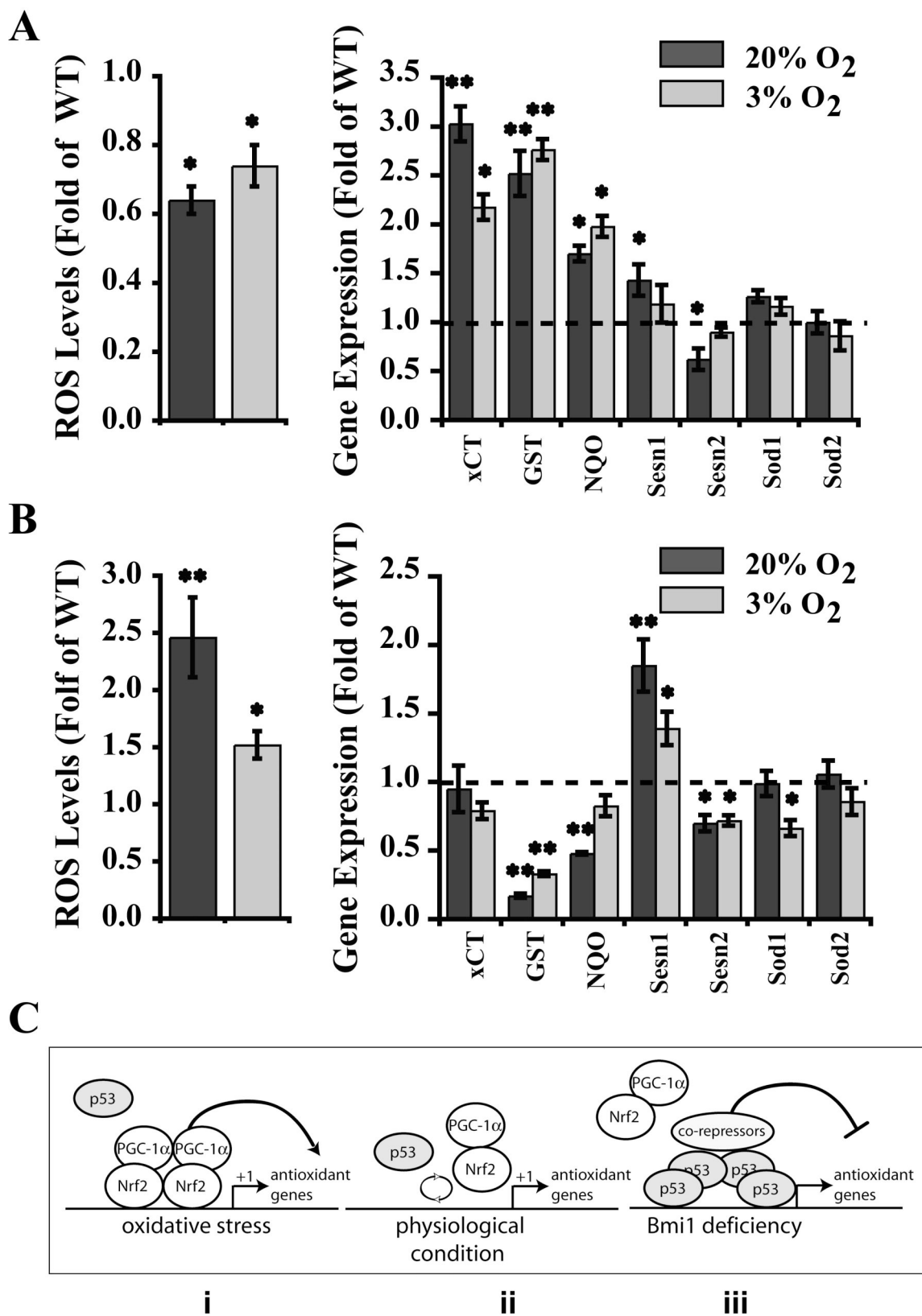


Figure 9

Table 1. List of genes whose expression is modulated in cultured *Bmi1*^{-/-} neurons.

Up-regulated genes		Accession	Fold	P-value	qPCR
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Cdkn2a), mRNA.		NM_001040654	5.43	0,0012	85,5 ± 12,0
Decorin (Dcn), mRNA.		NM_007833	3,92	0,0170	1,8 ± 0,1
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a), mRNA.		NM_001111099	3,48	0,0011	1,5 ± 0,1
Homeobox A5 (Hoxa5), mRNA.		NM_001111099	3,35	0,0068	nd ^a
Neurotenin (Nis), mRNA.		NM_024435	3,27	0,0245	nd
Engrailed 1 (En1), mRNA.		NM_010133	3,13	0,0044	nd
Dendrin (Ddn), mRNA.		NM_001013741	3,07	0,0370	1,9 ± 0,1
Homeobox D8 (Hoxd8), mRNA.		NM_008276	2,87	0,0031	nd
T-cell acute lymphocyte leukemia 1 (Tall), mRNA.		NM_011527	2,83	0,0001	nd
Ectodysplasin receptor (Eda2r), mRNA.		NM_175540	2,52	0,0343	4,1 ± 0,6
Homeobox A7 (Hoxa7), mRNA.		NM_010455	2,42	0,0089	194,3 ± 31,1
Heparan sulfate glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (HS3ST2), mRNA.		NM_001081327	2,36	0,0415	nd
Potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4 (Kcnc4), mRNA.		NM_145922	2,33	0,0012	nd
CrySTALLIN, mu (Crym), mRNA.		NM_016669	2,31	0,0004	nd
Regulator of G-protein signaling 4 (Rgs4), mRNA.		NM_009062	2,31	0,0175	nd
Guanine deaminase (Gda), mRNA.		NM_010266	2,30	0,0313	nd
Neurtin 1 (Nrn1), mRNA.		NM_153529	2,30	0,0000	nd
Fos-like antigen 2 (Fosl2), mRNA.		NM_008037	2,30	0,0035	nd
Glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3) (Gria3), mRNA.		NM_016886	2,29	0,0000	nd
Synuclein, alpha (Snca), mRNA.		NM_009221	2,26	0,0183	1,9 ± 0,2
RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 (Rasgrf1), mRNA.		NM_011245	2,25	0,0057	nd
Epoxide hydrolase 1, microsomal (Ephx1), mRNA.		NM_010145	2,21	0,0205	nd
Growth differentiation factor 10 (Gdf10), mRNA.		NM_145741	2,17	0,0119	nd
Argininosuccinate synthetase 1 (Ass1), mRNA.		NM_007494	2,12	0,0032	nd
Gammabutyrobetaine synthase (GABA-A) receptor, subunit beta 1 (Gabbr1), mRNA.		NM_008069	2,09	0,0097	nd
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4) (Cdkn2b), mRNA.		NM_007670	2,07	0,0014	nd
Contactin-associated protein 4 (Cntnap4), mRNA.		NM_130457	2,04	0,0148	nd
Insulin-like growth factor 2 (Igf2), mRNA.		NM_00112273	2,02	0,0010	nd
Glycine receptor, alpha 2 subunit (Glr2), mRNA.		NM_183427	2,02	0,0162	nd
Down-regulated genes		Accession	Fold	P-value	qPCR
Nuclear respiratory factor 1 (Nrf1), mRNA.		NM_010938	0,82	0,0245	0,5 ± 0,1
Similar to Glutathione S-transferase, mRNA.		XM_001473911	0,80	0,0411	0,3 ± 0,0
Sestrin 1 (Sesn1), mRNA.		NM_001013370	0,72	0,0014	0,6 ± 0,1
Aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1 (Aldh6a1), mRNA.		NM_134042	0,72	0,0389	nd

^a nd, not determined

Tableau II. P53 is pro-oxidant in the central nervous system

	Tissues		
	Liver	Lung	Cortex
MDA adduct ^a	1.58 +/- 0.13*	1.91 +/- 0.11*	0.58 +/- 0.04*
Gene expression levels ^b			
xCT	0.24 +/- 0.01*	0.35 +/- 0.04*	1.65 +/- 0.11*
GST	1.70 +/- 0.19*	0.78 +/- 0.09*	1.78 +/- 0.03*
NQO	0.94 +/- 0.03	0.43 +/- 0.08*	1.37 +/- 0.07*
Sesn1	0.85 +/- 0.03*	0.31 +/- 0.06*	1.53 +/- 0.17*
Sesn2	0.24 +/- 0.01*	0.27 +/- 0.04*	1.48 +/- 0.04*
Sod1	0.90 +/- 0.03	0.87 +/- 0.03*	1.42 +/- 0.04*
Sod2	0.78 +/- 0.03*	0.61 +/- 0.03*	1.00 +/- 0.09

^a Lipid peroxidation was measured in p53^{-/-} liver, lung and brain homogenates as concentration of MDA. Data were normalized to sample protein contents and are represented as fold change relative to WT samples set at 1. Results are Mean ± s.d. (n = 3-5; *P < 0.05).

^b Real-Time PCR analysis of antioxidant gene expression levels in p53^{-/-} liver, lung and brain. Data are represented as fold change relative to WT samples set at 1. Results are Mean ± s.d. (n = 3-4; *P < 0.05).

CHAPITRE 4

Discussion, conclusions et perspectives

Le chapitre 4 est une discussion des résultats présentés dans cette thèse, et permet d'élaborer des perspectives afin de mieux comprendre le rôle de Bmi1 dans la régulation des cellules du système nerveux central chez les mammifères.

Le gène Polycomb *Bmi1* : un gène essentiel à la prolifération cellulaire

La protéine Bmi1 appartient à la famille des gènes Polycomb. Elle a été initialement caractérisée comme un oncogène [1]. Bmi1 fait partie du complexe multimérique PRC1 requis au maintien de la répression des gènes *Hox* durant le développement [2]. Bmi1 est aussi impliqué dans l'auto-renouvellement des CSH et CSN, en réprimant le locus *Ink4a/Arf* [3-5]. En outre, Bmi1 est nécessaire à la prolifération des cellules souches cancéreuses [6, 7]. Étant un régulateur épigénétique, Bmi1 pourrait être impliqué dans une multitude de processus cellulaires.

Bmi1 : un outil moléculaire pour l'isolation des cellules souches rétiniennes / progéniteurs immatures

Différentes études stipulent que la rétine de mammifères en développement est constituée de deux types de progéniteurs, avec des potentiels de prolifération différents [8-10]. Cependant, au niveau de la rétine adulte, peu d'évidences sont connues concernant les caractéristiques et la localisation de ces cellules immatures, car aucune approche scientifique n'est encore optimale pour permettre leur identification et leur isolement. Nos résultats montrent que le marqueur de cellules souches Bmi1 permet de distinguer deux populations de progéniteurs rétiniens grâce à son niveau d'expression et sa dépendance dans ces cellules. En effet, les progéniteurs avec des niveaux élevés de Bmi1 sont principalement localisés au niveau de la rétine périphérique. Le marqueur de surface

SSEA1 est aussi exprimé dans les progéniteurs immatures au niveau de la rétine périphérique, et n'est pas présent dans la rétine centrale [11]. Ces cellules, qui expriment fortement SSEA1, forment les plus grosses colonies en cultures, (une des caractéristiques des cellules souches). L'utilisation de SSEA1 en combinaison avec *Bmi1* a permis l'isolation d'une population représentant 3% de la rétine totale. Cette rare population, exprimant fortement *Bmi1*, surexprime également différents marqueurs de cellules souches. Ainsi le niveau d'expression de *Bmi1* permet de définir une rare sous population de progéniteurs immatures avec des caractéristiques de cellules souches.

L'analyse des progéniteurs immatures présents dans la vésicule optique à e9.5 montre une réduction marquée de la prolifération chez les embryons *Bmi1*^{-/-}. En effet, la taille des colonies *Bmi1*^{-/-} en culture est réduite comparativement aux colonies WT. De plus, le potentiel d'auto-renouvellement est presque absent dans ces cellules. Ces résultats concordent avec l'étude de Molofsky *et al*, qui montrent un effet similaire pour les cellules souches neurales *Bmi1*^{-/-} [3]. De plus, ces défauts de prolifération dans les progéniteurs immatures *Bmi1*^{-/-} sont causés par la dérégulation du locus *Ink4a/Arf*. Deux études démontrent que l'inactivation de ce locus dans les cellules souches neurales *Bmi1*^{-/-} permet de restaurer la prolifération [12, 13]. Il serait intéressant de vérifier l'expression de la β -galactosidase à pH acide dans les colonies *Bmi1*^{-/-} en culture pour confirmer l'entrée en sénescence de ces cellules. L'activité β -galactosidase à pH acide est une caractéristique de cellules en sénescences [14]. Nos analyses au stade e12.5 et e18.5 du développement rétiniens montrent aussi une diminution de la prolifération des progéniteurs immatures *in*

vivo et *in vitro*. Ces résultats illustrent l'importance de Bmi1 dans les progéniteurs immatures à différents stades de développement (Figure 1).

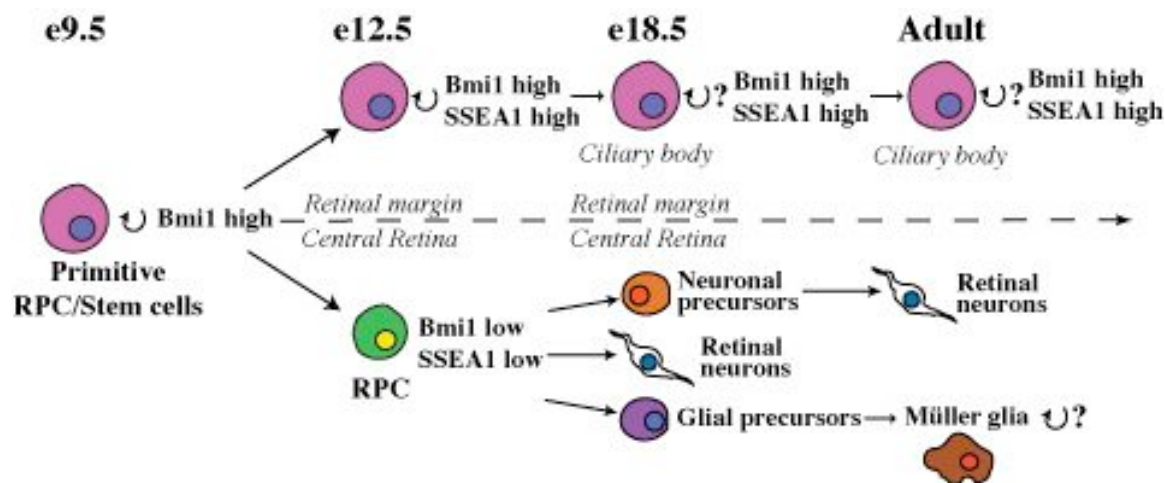


Figure 1 Modèle illustrant l'importance de Bmi1 dans les progéniteurs immatures à différents stades de développement. À tous les stades, les progéniteurs avec des niveaux élevés de Bmi1 sont principalement localisés au niveau de la rétine périphérique, comme SSEA-1 (*Retinal margin* et *Ciliary body*). Dans la rétine centrale, la population principale de progéniteurs expriment faiblement Bmi1 et vont donner naissance aux principaux types cellulaires. RPC, *retinal progenitor cells*; demi-cercle avec flèche, pour l'auto-renouvellement.

Nos résultats au stade e9.5 et e12.5 montrent aussi que la prolifération des progéniteurs immatures dépend du niveau d'expression de Bmi1 dans ces cellules (Figure 1). Ces résultats sont confirmés par d'autres études qui montrent que la surexpression de Bmi1 permet d'augmenter l'auto-renouvellement dans les SCH et CSN en atténuant les niveaux de p16 et p19 [15, 16]. Il serait intéressant de vérifier l'effet de la surexpression de Bmi1 dans les progéniteurs immatures de la rétine.

Certaines évidences démontrent que les progéniteurs immatures peuvent se retrouver au niveau du corps ciliaire de l'oeil adulte des mammifères [8-10, 17, 18]. De plus, le marqueur SSEA1 se retrouve seulement dans la ZMC et dans le corps ciliaire au cours du développement rétinien [11]. Nos résultats montrent que *Bmi1* est requis pour la prolifération des progéniteurs immatures localisés dans le corps ciliaire (Figure 1). De plus, elles sont en accord avec les études démontrant que *Bmi1* est requis au maintien des cellules souches dans le SNC après la naissance [3, 12, 13].

p53 est responsable de la sénescence des progéniteurs rétiniens immatures

Différentes études ont illustré le fait que p53 supprime la prolifération des cellules souches neurales [19, 20]. Étant donné que p19, réprimée par *Bmi1*, permet indirectement l'activation de p53, nous avons investigué si l'inactivation de p53 dans les progéniteurs immatures *Bmi1*^{-/-} permettrait de restaurer le défaut de prolifération cellulaire. Nos conclusions montrent une restauration graduelle du phénotype de prolifération et de l'auto-renouvellement des progéniteurs doubles-mutants pour *Bmi1/p53*. Nos résultats sont en accord avec l'étude de Akala *et al* dans les CSH qui montre que l'inactivation de p53 dans les cellules *Bmi1*^{-/-} permet un rétablissement de la prolifération [21]. Cette observation confirme que p53 joue un rôle majeur dans le défaut de prolifération observée dans les cellules *Bmi1*^{-/-}.

Bmi1 est requis pour le développement normal de la rétine après la naissance

L'analyse des yeux *Bmi1*^{-/-} après la naissance montre une réduction du diamètre de la rétine à P6. Cette réduction est causée par la diminution de la prolifération des progéniteurs immatures localisés dans la ZMC de la rétine. Cette population de progéniteurs est responsable de la croissance radiale de la rétine [22]. *Bmi1* est donc requis pour la maintenance de ces progéniteurs immatures après la naissance. Par contre, l'épaisseur de la rétine semble normale chez les souris *Bmi1*^{-/-}, confirmant que les progéniteurs les plus différenciés, présents dans la rétine centrale, ne sont pas affectés par l'absence de *Bmi1*. Les mutations d'autres gènes, tels que *Chx10* ou la *cyclin D1*, ont été associées à un défaut de la croissance rétinienne [23, 24]. L'étude de Martins *et al* montre qu'un autre oncogène, soit *N-myc*, permet le contrôle de la prolifération des progéniteurs rétiniens [25]. Souvent associé à la régulation de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire durant le développement, *N-myc* permet de coordonner la croissance de la rétine après la naissance [25]. Cependant, aucune différence n'est observée dans l'épaisseur des rétines *N-myc*^{-/-} comparativement aux rétines contrôles. Ainsi, comme *N-myc*, *Bmi1* est requis pour la maintenance des progéniteurs rétiniens après la naissance, impliquée dans la croissance radiale chez la souris.

Apparition d'un phénotype de vieillissement accéléré dans le SNC en absence de Bmi1

Nous avons découvert que *Bmi1* est fortement exprimé dans les neurones post-mitotiques de la rétine et du cerveau. L'analyse de la souris mutante pour *Bmi1* au jour 25 post-natal

révèle la présence d'un phénotype de vieillissement prématuré au niveau de l'œil. En l'occurrence, nous avons observé la présence de cataractes bilatérales au niveau du cristallin. La cataracte est un biomarqueur du vieillissement chez les mammifères [26, 27]. Nous avons observé d'autres anomalies telles que la présence d'une activité β -galactosidase à pH acide dans le cristallin et le corps ciliaire ainsi qu'une gliose réactionnelle au niveau de la rétine et dans le cortex chez la souris *Bmi1*^{-/-}. La gliose réactionnelle est souvent observée lors de lésions du SNC ou lors du vieillissement normale [28]. Au niveau moléculaire, l'analyse des différentes structures de l'œil et du cortex démontre que le locus *Ink4a/Arf*, codant pour les gènes *p16* et *p19*, est dérégulé chez la souris *Bmi1*^{-/-}. En effet, ce locus subit une dérégulation avec l'âge dans la plupart des tissus chez la souris, et sa dérégulation est considérée comme un biomarqueur moléculaire du vieillissement [29]. D'autres études ont démontré qu'au niveau de la peau chez la souris et l'humain, une diminution de l'expression de *Bmi1* est observée avec l'âge et est corrélée avec une augmentation de l'expression de *p16* [30, 31]. Donc en absence de *Bmi1* chez la souris, la dérégulation du locus *Ink4a/Arf* pourrait être responsable du phénotype de vieillissement accéléré observé dans le SNC au début du stade adulte.

En outre, nous avons observé une augmentation de l'apoptose dans le cerveau des souris *Bmi1*^{-/-} au jour 25 après la naissance. Des marquages immunohistochimiques de coupes de cerveaux montrent une augmentation de l'expression du gène *p19*. Celui-ci provoque l'augmentation des niveaux de p53 en inhibant Mdm2 [32, 33]. L'analyse des gènes cibles pro-apoptotiques de p53 nous a révélés une augmentation de l'expression de ces gènes dans le cerveau des souris *Bmi1*^{-/-}, illustrant une activation de l'apoptose p53-dépendante. Nos

résultats *in vitro* confirment aussi que p53 est responsable de l'induction de l'apoptose dans les neurones *Bmi1*^{-/-}. En effet, les niveaux de p53 totale et activé sont plus élevés dans les neurones *Bmi1*^{-/-}. Ces neurones sont aussi hypersensibles à la camptothécine, comparativement aux neurones WT. De plus, le blocage de la voie p53 avec un dominant négatif inhibe l'apoptose induite au niveau des neurones *Bmi1*^{-/-}. Donc, l'absence de Bmi1 résulte en une hypersensibilité des neurones aux agents induisant l'apoptose de manière p53-dépendant.

Bmi1 est nécessaire à la survie des neurones en contrôlant les défenses anti-oxydantes

Nous avons démontré un dérèglement du système oxydatif dans les neurones *Bmi1*^{-/-}. Le traitement des neurones *Bmi1*^{-/-} avec une toxine qui affecte les mitochondries (soit le 3-NP) nous a permis d'observer une hypersensibilité de ces cellules comparativement aux neurones WT. Nous avons aussi observé une augmentation des niveaux de ROS dans les neurones *Bmi1*^{-/-} en culture. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Liu *et al.* Ces auteurs ont observé une augmentation du niveau de ROS dans différents types cellulaires hématopoïétiques, tel que les thymocytes et les splénocytes *Bmi1*^{-/-} [34]. De plus, lorsqu'ils traitent les thymocytes *Bmi1*^{-/-} avec de la roténone, un inhibiteur de la chaîne mitochondriale, ils observent une hypersensibilité de ces derniers comparativement aux thymocytes sauvages. En outre, ils démontrent que le traitement des souris *Bmi1*^{-/-} avec un agent antioxydant, soit le N-acétylcystéine, permet un renversement de l'hypertrophie du thymus et de la perte de poids observés chez ces souris [34]. Notre analyse par microarray

et l'expression de différents gènes impliqués dans l'élimination des ROS montrent une réduction de ces gènes antioxydants dans les neurones *Bmi1*^{-/-}. Parmi ces gènes, les gènes de détoxification de classe II (incluant *x-CT*, *GST* et *NQO1*) sont les plus affectés. L'étude de Liu *et al* montre que l'augmentation du taux de ROS est causée par une dérégulation de différents gènes pro-oxydants, normalement réprimés par Bmi1 et les PcG [34]. Ainsi les niveaux élevés de ROS dans les cellules *Bmi1*^{-/-} pourraient être causés par une répression des gènes antioxydants ou une activation de gènes pro-oxydant. Cependant, l'expression de ces gènes pro-oxydants devra être mesurée dans les neurones *Bmi1*^{-/-} pour mieux comprendre leur implication dans les hauts taux de ROS. Il sera aussi intéressant de traiter les neurones *Bmi1*^{-/-} au N-acétylcystéine pour voir si les niveaux d'expression des gènes anti-oxydants sont restaurés.

La régulation des défenses antioxydantes dans les neurones par Bmi1 ne peut être comparée à d'autres régulateurs du métabolisme oxydatif, tel que PGC-1 α . En effet, les neurones *PGC-1 α* ^{-/-} ont une faible réduction de l'expression des gènes antioxydants, contrairement aux neurones *Bmi1*^{-/-}. Lorsque les neurones *PGC-1 α* ^{-/-} sont traités avec des agents oxydants, ils sont incapables d'induire une activation de l'expression des gènes antioxydants [35, 36]. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'absence de Bmi1 résulte en une répression continue des gènes antioxydants, tandis que PGC-1 α est requis pour induire l'activation de ces gènes en réponse au stress oxydatif.

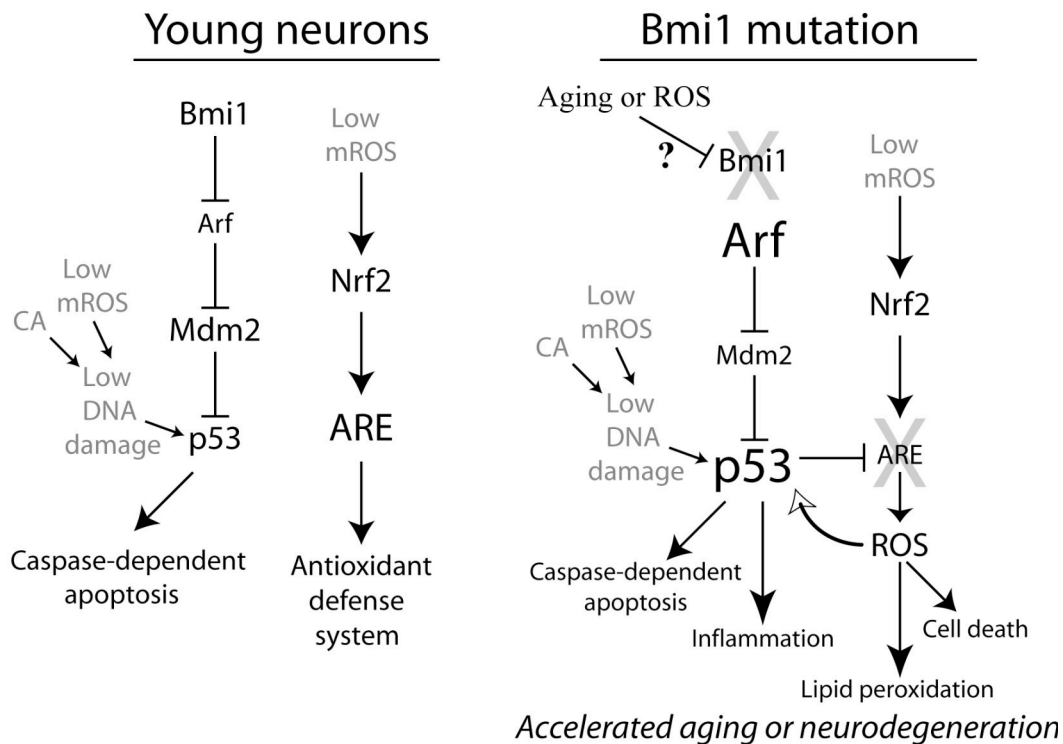


Figure 2 Modèle illustrant l'importance de Bmi1 dans le contrôle du métabolisme oxydatif via la répression de p53. En absence de Bmi1, de faibles niveaux de stress vont activer p53. Celui-ci va permettre la répression des gènes anti-oxydants (ARE), provoquant une augmentation des niveaux de ROS. Ceux-ci vont à leur tour activer p53, provoquant la sénescence et la mort cellulaire.

Il est rapporté que p53 peut agir de façon pro-oxydante lors d'un stress intense et prolongé [37]. Les niveaux pathologiques élevés de p53 dans les neurones *Bmi1*^{-/-}, nous ont amenés à émettre l'hypothèse que la régulation du métabolisme oxydatif passerait par p53 (Figure 2). Celui-ci peut réprimer l'activation des gènes anti-oxydants en se liant directement sur leurs promoteurs de ces gènes [38, 39]. Dans les neurones *Bmi1*^{-/-}, nous montrons que p53 s'accumule sur le locus des gènes anti-oxydants, tel que *x-CT* et *Sod2*, et permet le recrutement de corépresseurs (Figure 3). Cette accumulation pourrait empêcher la fonction activatrice de Nrf2 et ainsi provoquer la répression des gènes anti-oxydants. Par le fait

même, cette accumulation de p53 et des corépresseurs empêcherait la liaison de la machinerie transcriptionnelle. Pour confirmer nos observations, nous avons bloqué la voie p53 dans les neurones *Bmi1*^{-/-}. L'inactivation de p53 a permis de restaurer les niveaux d'expression des gènes anti-oxydants ainsi que les niveaux de ROS aux mêmes niveaux observés dans les neurones sauvages. Ces résultats montrent que l'expression anormale des gènes anti-oxydants dépend presque entièrement de l'activité de p53 dans les neurones *Bmi1*^{-/-}. Une étude démontre que dans une lignée cancéreuse humaine, BMI1 est requis pour inhiber l'activité de P53, empêchant ainsi l'augmentation de ROS et l'induction de l'apoptose [40]. Ces résultats concordent avec nos observations mais dans un système différent. Une autre observation importante à noter est que les niveaux de ROS dans les neurones mutantes pour *Bmi1/p53* ne sont pas tout à fait similaires à ceux observés dans les neurones *p53*^{-/-}. Ces observations suggèrent que la plupart des fonctions de *Bmi1* sont dus à la répression de l'activité de p53. Les fonctions additionnelles peuvent être expliquées par une répression par Mdm2 des isoformes de p53, soit p63 et p73 [41, 42].

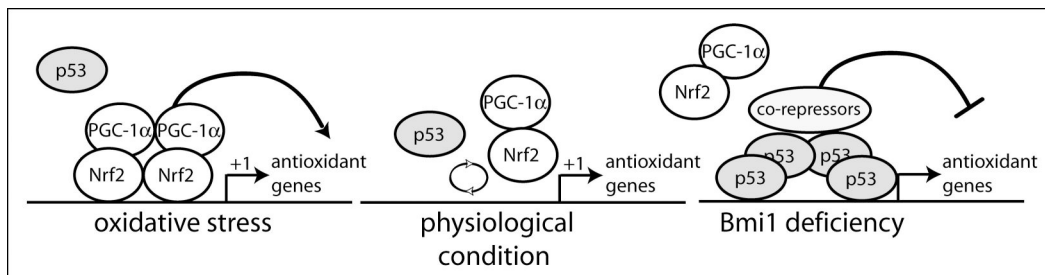


Figure 3 Modèle illustrant la répression des gènes anti-oxydants dans les neurones par p53 en absence de Bmi1. En condition de stress normal, des régulateurs du métabolisme oxydatif (tel que Nrf2 et PGC-1 α) activent les gènes anti-oxydants pour diminuer les niveaux de ROS. Dans des conditions physiologiques, p53 est en compétition avec Nrf2 et PGC-1 α pour réprimer l'expression des gènes anti-oxydants, établissant un équilibre dans la régulation des ROS. En absence de Bmi1 et dans des conditions pathologiques, p53 s'accumule sur le promoteur des gènes antioxydants pour réprimer leurs expressions, provoquant une augmentation des niveaux de ROS.

p53 et la régulation du stress oxydatif dans les neurones du SNC

La fonction principale de p53 consiste à protéger l'organisme contre l'apparition de cancer. En effet, pour prévenir l'accumulation de dommages à l'ADN, p53 peut adopter une fonction anti-oxydante. Dans un contexte physiologique dans plusieurs organes, p53 empêche l'accumulation de mutations en diminuant les taux de ROS. En effet, il permet l'activation de plusieurs gènes antioxydants, tels que les *Sestrins* et la *GPX* [37, 43]. Par exemple, dans les fibroblastes de poumons et autres cellules prolifératives, nos résultats et ceux d'autres groupes montrent que p53 est requis pour maintenir un niveau basal de ROS, prévenant l'accumulation de dommages cellulaires et ainsi l'apparition de tumeurs [44]. Une étude démontre que dans une lignée de cellules ganglionnaires rétiniennes (cellules

RGC-5), p53 possède une fonction anti-oxydante [45]. En effet, Le *Knock-down* de p53 dans cette lignée provoque une légère augmentation des ROS intracellulaires. De plus, p53 se lie sur le promoteur de la catalase pour permettre son activation. Ces observations ne concordent pas avec nos résultats pour plusieurs raisons. Premièrement, il est important de souligner que cette lignée cellulaire provient de cellules rétiniennes transformées de rat. En étant mitotiquement actives, elles diffèrent des cellules ganglionnaires (RGC) retrouvées dans la rétine, et s'apparentent plus à des cellules gliales [46]. Deuxièmement, l'étude de O'Connor *et al* montrent que l'expression des autres gènes anti-oxydants, tel que *Sestrin2*, *Sod1* et *2*, ne varient pas dans les cellules *p53^{-/-}* [45]. Troisièmement, nos analyses d'expression montrent que seule la catalase n'est pas affectée dans les neurones *Bmi1^{-/-}*. Donc, contrairement aux études antérieures, nos résultats démontrent que dans le cerveau, p53 possède une fonction pro-oxydante dans des conditions physiologiques. Dans ce cas ci, p53 serait délétère, car étant toujours actif, il réprimerait continuellement les gènes anti-oxydants, ce qui augmenteraient les taux de ROS, et provoqueraient l'élimination des cellules.

Une autre théorie que l'on pourrait avancer serait que la régulation des ROS par p53 serait dépendante du niveau de stress selon chaque type cellulaire. En effet, dans les cellules qui prolifèrent, en présence de faibles niveaux de stress, p53 activerait d'abord un programme de défenses anti-oxydantes pour protéger la cellule contre le cancer. Si les conditions de stress persistent ou s'intensifient, p53 deviendrait pro-oxydant pour éliminer la cellule. Par contre dans les neurones post-mitotiques, les niveaux de stress requis pour activer la fonction pro-oxydante de p53 seraient beaucoup plus bas par rapport aux cellules

prolifératives. Ainsi, par le fait même, p53 serait presque toujours pro-oxydant et empêcherait l'accumulation de cellules post-mitotiques sénescents dans le cerveau. Il serait alors intéressant de vérifier la fonction de p53 dans d'autres types cellulaires post-mitotiques, tel que le cœur, pour mieux comprendre sa fonction.

Une autre explication pourrait être suggéré pour expliquer la fonction de p53 dans la régulation du métabolisme oxydatif (Figure 4). Dans les cellules qui prolifèrent (telle que les MELFs), p53 posséderait une fonction anti-oxydante grâce à son activation par une protéine impliquée dans le cycle cellulaire. Cette protéine permettrait la liaison de p53 sur le promoteur des gènes anti-oxydants pour induire leurs activations. Des protéines comme les facteurs E2F pourraient jouer ce rôle [47, 48]. Cependant, dans les neurones, l'absence de ces facteurs impliqués dans le cycle cellulaire fait en sorte que p53 resterait pro-oxydant en réprimant l'expression des gènes anti-oxydants.

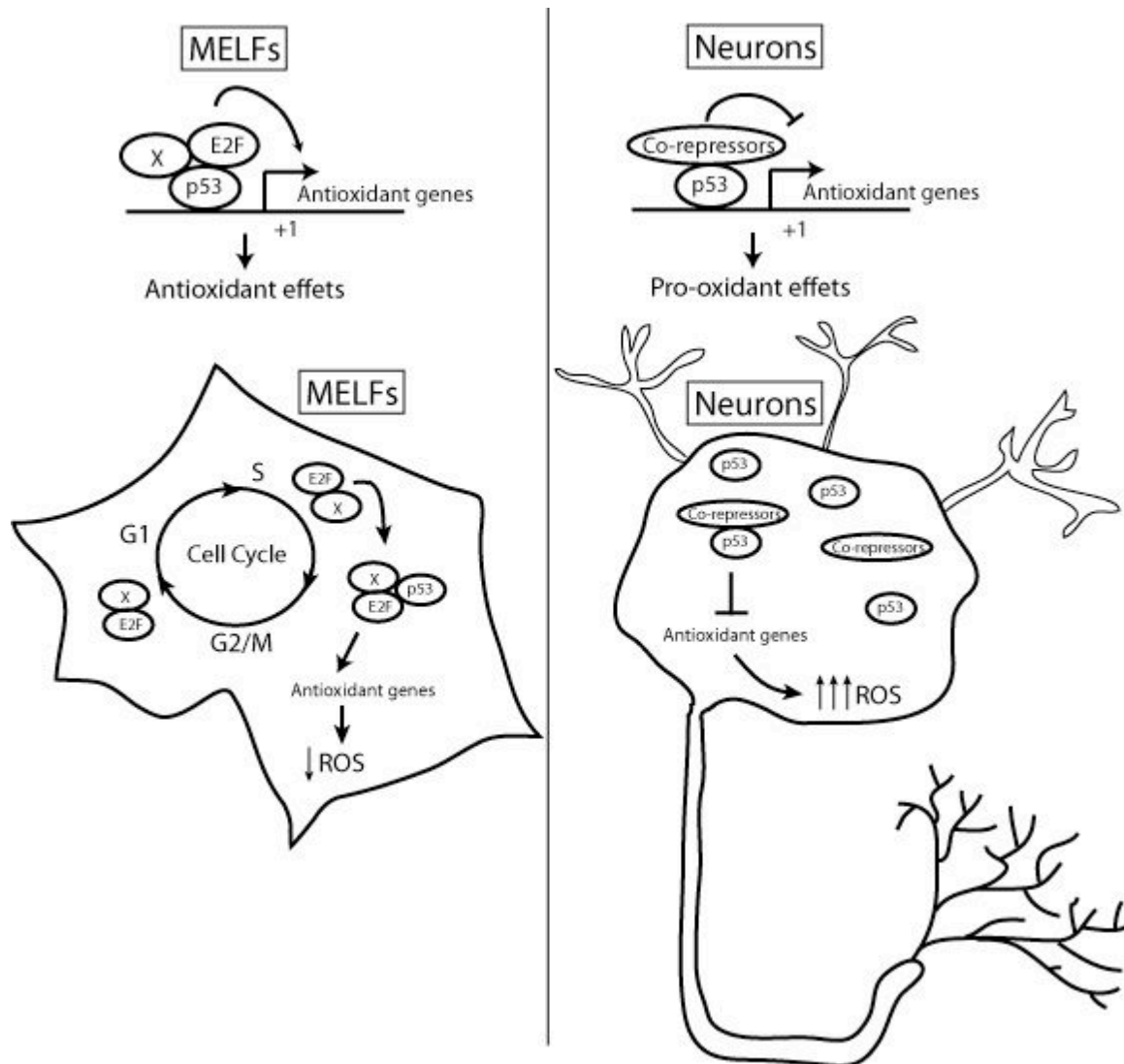


Figure 4 Modèle illustrant le mécanisme moléculaire sur la fonction de p53 dans différents types cellulaires.

Nos résultats suggèrent donc que p53 est toujours pro-oxydant dans les neurones post-mitotiques dans un contexte physiologique ou pathologique. Cette observation corrèle avec une étude montrant que l'expression d'une forme dominante négative de p53 seulement dans les neurones du SNC chez la *Drosophila* provoque une augmentation de la durée de vie. Ces neurones deviennent aussi résistants à des agents oxydants [49]. D'autres études démontrent que des modèles murins avec une copie supplémentaire de *Ink4a/Arf* ou

Arf/p53 ne montrent pas d'augmentation de la durée de vie maximale, bien que diminuant l'incidence de tumeurs [44, 50]. Ces observations couplées à nos résultats, illustrant une augmentation de l'apoptose p19/p53-dépendante dans les neurones *in vitro* et *in vivo* chez les souris *Bmi1*^{-/-}, suggèrent que l'augmentation de p53 provoque une accumulation des dommages oxydatifs dans le SNC. Cette accumulation de dommages empêcherait ainsi l'augmentation de la durée de vie.

Bmi1 : lien entre le vieillissement et les maladies neurodégénératives

Les dommages cellulaires causés par les ROS mitochondriales accélèrent le processus du vieillissement [51]. La balance entre le taux de ROS et les défenses anti-oxydantes est critique pour déterminer le taux d'accumulation de dommages oxydatifs cellulaires, et la durée de vie [51]. Nous montrons que la perte de Bmi1 dans les neurones provoque une réduction marquée des défenses anti-oxydantes et une augmentation de la concentration des ROS. Cette élévation des taux de ROS serait responsable de l'augmentation des dommages cellulaires observés dans le cerveau des souris *Bmi1*^{-/-}, avec notamment une gliose réactionnelle dans le cortex et dans la rétine. Ces résultats pourraient expliquer le vieillissement prématuré observée dans le SNC des souris *Bmi1*^{-/-}. Des analyses préliminaires nous ont révélés que les niveaux d'expression de BMI1 diminuent en fonction de l'âge au niveau des cerveaux humain et murin. Cependant, les raisons sont encore inconnues. En somme, nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression de BMI1 dans les neurones du cerveau pourrait contribuer à une réduction des défenses anti-

oxydantes avec l'âge. Ce qui engendre une accumulation des dommages oxydatifs et un mauvais fonctionnement des neurones.

L'implication de *Bmi1* dans la régulation du métabolisme oxydatif permet d'établir un lien avec les maladies neurodégénératives associées à l'âge. Ces maladies sont souvent liées à une dérégulation du métabolisme oxydatif de la mitochondrie, provoquant la mort neuronale. Dans certaines de ces maladies, la mort neuronale est provoquée de façon p53-dépendante, tel que la maladie de Parkinson (MP), d'Alzheimer (MA) et de Huntington (MH) [52-57]. Il est rapporté que p53 est augmenté dans le cerveau des patients souffrant d'Alzheimer [54]. De plus, le fragment toxique A β ₄₂ intracellulaire, associé à l'apparition de la MA, peut se lier au promoteur de p53 et provoquer son activation, induisant ainsi l'apoptose. Le blocage de la voie p53 permet d'empêcher la mort cellulaire induite par A β ₄₂ [57]. Nous montrons que les neurones *Bmi1*^{-/-} ont un taux d'apoptose plus élevé lorsqu'on les infecte avec le fragment A β ₄₂ intracellulaire. Ces résultats *in vitro* suggèrent une implication de *Bmi1* dans la MA. Des analyses *in vivo* avec des modèles murins prédisposés à cette maladie croisés avec des souris hétérozygotes *Bmi1*^{+/-} seront nécessaire pour mieux comprendre l'implication de *Bmi1*. En effet, il sera intéressant de voir si les souris doubles mutants développent la MA d'une façon prématurée. Nous avons aussi remarqué que les neurones *Bmi1*^{-/-} sont plus sensibles au 3-NP, une toxine mitochondriale capable induire un phénotype similaire à celui de la MH en bloquant le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale [58]. Incidemment, p53 peut être augmenté par la protéine Huntingtin mutée, associée à l'apparition de la MH [56]. De plus, les niveaux de p53 sont aussi élevés dans le cerveau de patients souffrant de la MH. Nos résultats

montrent que l'inhibition de p53 dans les neurones *Bmi1*^{-/-} diminue la mort neuronale suite à un traitement au 3-NP. Récemment, il a été rapporté que la protéine Huntingtin peut interagir avec Bmi1 [59]. Cette liaison peut être affectée lorsque Huntingtin est mutée, provoquant ainsi une altération de la transcription de gènes dans la MH. D'autres études seront nécessaires pour mieux étudier l'implication de Bmi1 dans la MH. Il sera intéressant de traiter les souris *Bmi1*^{-/-} au 3-NP et vérifier si ces souris sont hypersensibles et développent la MH d'une façon prématurée.

Nous montrons que Bmi1 participe activement au contrôle de la prolifération des cellules souches rétinienne, et des défenses anti-oxydantes dans les neurones en bloquant la fonction de p53. Cependant, il est intéressant de se demander comment s'effectue cette répression. Nos analyses semblent montrer une répression de p53 via la voie p19/Arf, notamment dans les neurones. Dans le système hématopoïétique, l'absence de p53 dans les cellules souches *Bmi1*^{-/-} permet un renversement du phénotype, contrairement aux cellules souches mutantes pour Bmi1/p19 [21]. Des expériences additionnelles sur des neurones devront être effectuées pour voir si l'absence de p19 dans les neurones *Bmi1*^{-/-} pourrait bloquer l'induction du programme pro-apoptotique et pro-oxydant initié par p53. En effet, nous effectuerons des cultures de neurones doubles mutantes *Bmi1/p19*, et nous analyserons les niveaux de ROS, des gènes anti-oxydantes et de p53 dans ces cellules. D'autres mécanismes de répression de p53 par Bmi1 peuvent aussi être envisagés. Bmi1 pourrait induire une répression de p53 directement au niveau transcriptionnel, en permettant la monoubiquitination du locus ou en interagissant avec des corépresseurs sur son promoteur [2, 60, 61]. Cette répression pourrait aussi s'effectuer au niveau protéique,

où Bmi1 interagirait avec un répresseur (ex : Sirt1) ou un activateur (ex : E4F1) de p53 [62-64]. p53 pourrait aussi être activée dans les neurones *Bmi1*^{-/-} via la famille des MAP kinases, tels que JNK et p38 MAPK. Des études ont démontré que suite à un stress oxydatif, ces protéines permettent l'activation de p53 [53, 65, 66]. Il sera intéressant d'analyser les niveaux de JNK dans les neurones *Bmi1*^{-/-}. Ensemble, ces travaux permettraient de mieux comprendre le rôle de Bmi1 dans la répression de p53.

Bmi1 : régulateur multifonctionnel

Un autre groupe de gènes possède des fonctions similaires à celles décrites pour *Bmi1* dans nos études. La famille des gènes *FoxO* est impliquée dans la régulation des cellules souches neurales. En effet, les cellules *FoxO*^{-/-} ont un défaut du potentiel d'auto-renouvellement [67, 68]. Des études ont montré que cette famille de gènes et leur homologue chez *C. elegans*, *DAF-16*, régulent l'expression de plusieurs protéines anti-oxydantes et augmentent la résistance au stress oxydatif dans les tissus post-mitotiques [69-71]. Comme *Bmi1*, les gènes *FoxO* régulent négativement l'activité de p53, via une interaction directe [72]. En outre, les FoxOs régulent les niveaux de radicaux libres dans les CSH [73, 74]. Il sera intéressant d'analyser le métabolisme oxydatif dans les cellules souches *Bmi1*^{-/-} pour déterminer si l'augmentation des ROS serait responsable de la diminution de la prolifération des cellules mutantes.

D'autres part, les cellules souches cancéreuses (CSC), gardent leur taux de radicaux libres à un niveau bas grâce à un programme anti-oxydant efficace [75]. En effet, les CSC démontrent une augmentation de l'expression de plusieurs gènes anti-oxydants leur

permettant de garder le taux de ROS endogènes à un niveau modéré [76]. Ainsi, comme les ROS sont les principaux médiateurs de la thérapie induite par radiation ionisante, l'expression élevée de gènes anti-oxydants dans les CSC empêchent les dommages à l'ADN et protègent ces cellules contre l'apoptose induite par la radiothérapie [76-78]. Cet avantage permet aux CSC de survivre aux traitements et de maintenir leur pouvoir tumorigénique [79]. Sachant que *Bmi1* permet de maintenir les défenses anti-oxydantes dans les neurones et possède une fonction importante dans les cellules souches, il serait intéressant de vérifier si l'inactivation de *Bmi1* dans les CSC permettrait une diminution des défenses anti-oxydantes. Ceci engendrerait une augmentation des niveaux de ROS suite aux traitements, et la perte du caractère souche des CSC et leur capacité d'initier la formation de tumeurs.

Conclusion

En résumé, les résultats présentés dans cette thèse sur la fonction de *Bmi1* illustrent un certain paradoxe. D'une part, nous démontrons que *Bmi1* est requis pour la maintenance de la capacité proliférative des progéniteurs immatures présents dans la rétine en développement, et qu'il est nécessaire pour le développement normal de la rétine après la naissance. D'autres part, nos observations montrent que cet oncogène est exprimé dans les neurones post-mitotiques du SNC, où il joue un rôle dans le métabolisme oxydatif. Nos résultats montrent que le syndrome de vieillissement prématuré observé chez la souris *Bmi1*^{-/-} récapitule certains aspects du vieillissement normal du cerveau. Cela suggère un modèle où l'absence de *Bmi1* cause une augmentation de l'activation de p53, provoquant une diminution des défenses anti-oxydantes dans le cerveau lors du vieillissement. Cependant, le mécanisme moléculaire de répression de p53 par *Bmi1* reste encore peu connu. Cette étude est très importante, car elle démontre que via sa régulation par *Bmi1*, p53 possède une fonction pro-oxydante et pro-vieillescence dans le SNC dans des conditions physiologiques. Nos observations permettent de mieux comprendre le processus de vieillissement normal du SNC et les facteurs de risque des maladies neurodégénératives reliées à l'âge.

RÉFÉRENCE

1. Haupt, Y., et al., *bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis*. *Oncogene*, 1993. **8**(11): p. 3161-4.
2. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(11): p. 846-56.
3. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation*. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
4. Jacobs, J.J., et al., *The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus*. *Nature*, 1999. **397**(6715): p. 164-8.
5. Park, I.K., et al., *Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 302-5.
6. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 255-60.
7. Abdouh, M., et al., *BM11 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal*. *J Neurosci*, 2009. **29**(28): p. 8884-96.
8. Ahmad, I., L. Tang, and H. Pham, *Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **270**(2): p. 517-21.
9. Perron, M. and W.A. Harris, *Retinal stem cells in vertebrates*. *Bioessays*, 2000. **22**(8): p. 685-8.

10. Tropepe, V., et al., *Retinal stem cells in the adult mammalian eye*. Science, 2000. **287**(5460): p. 2032-6.
11. Koso, H., et al., *SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway*. Dev Biol, 2006. **292**(1): p. 265-76.
12. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways*. Genes Dev, 2005. **19**(12): p. 1432-7.
13. Bruggeman, S.W., et al., *Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice*. Genes Dev, 2005. **19**(12): p. 1438-43.
14. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
15. Iwama, A., et al., *Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1*. Immunity, 2004. **21**(6): p. 843-51.
16. He, S., et al., *Bmi-1 over-expression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions in vivo*. Dev Biol, 2009. **328**(2): p. 257-72.
17. Lord-Grignon, J., M. Abdouh, and G. Bernier, *Identification of genes expressed in retinal progenitor/stem cell colonies isolated from the ocular ciliary body of adult mice*. Gene Expr Patterns, 2006. **6**(8): p. 992-9.

18. Abdouh, M. and G. Bernier, *In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals*. *Exp Eye Res*, 2006. **83**(1): p. 153-64.
19. Gil-Perotin, S., et al., *Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors*. *J Neurosci*, 2006. **26**(4): p. 1107-16.
20. Meletis, K., et al., *p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells*. *Development*, 2006. **133**(2): p. 363-9.
21. Akala, O.O., et al., *Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53^{-/-}p16Ink4a^{-/-}p19Arf^{-/-} multipotent progenitors*. *Nature*, 2008. **453**(7192): p. 228-32.
22. Harris, W.A. and M. Perron, *Molecular recapitulation: the growth of the vertebrate retina*. *Int J Dev Biol*, 1998. **42**(3): p. 299-304.
23. Burmeister, M., et al., *Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation*. *Nat Genet*, 1996. **12**(4): p. 376-84.
24. Ma, C., D. Papermaster, and C.L. Cepko, *A unique pattern of photoreceptor degeneration in cyclin D1 mutant mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(17): p. 9938-43.
25. Martins, R.A., et al., *N-myc coordinates retinal growth with eye size during mouse development*. *Genes Dev*, 2008. **22**(2): p. 179-93.
26. Wolf, N., et al., *Age-related cataract progression in five mouse models for anti-oxidant protection or hormonal influence*. *Exp Eye Res*, 2005. **81**(3): p. 276-85.

27. Lassen, N., et al., *Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in Aldh3a1(-/-)/Aldh1a1(-/-) knock-out mice*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25668-76.
28. Silver, J. and J.H. Miller, *Regeneration beyond the glial scar*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 146-56.
29. Krishnamurthy, J., et al., *Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging*. J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1299-307.
30. Ressler, S., et al., *p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin*. Aging Cell, 2006. **5**(5): p. 379-89.
31. Cordisco, S., et al., *Bmi-1 Reduction Plays a Key Role in Physiological and Premature Aging of Primary Human Keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2009.
32. Kamijo, T., et al., *Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8292-7.
33. Honda, R. and H. Yasuda, *Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53*. EMBO J, 1999. **18**(1): p. 22-7.
34. Liu, J., et al., *Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 387-92.
35. St-Pierre, J., et al., *Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators*. Cell, 2006. **127**(2): p. 397-408.

36. McGill, J.K. and M.F. Beal, *PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease?* Cell, 2006. **127**(3): p. 465-8.
37. Sablina, A.A., et al., *The antioxidant function of the p53 tumor suppressor.* Nat Med, 2005. **11**(12): p. 1306-13.
38. Faraonio, R., et al., *p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes.* J Biol Chem, 2006. **281**(52): p. 39776-84.
39. Dhar, S.K., et al., *Specificity protein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression.* J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 21698-709.
40. Alajez, N.M., et al., *Targeted depletion of BMI1 sensitizes tumor cells to P53-mediated apoptosis in response to radiation therapy.* Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1469-79.
41. Jacobs, W.B., D.R. Kaplan, and F.D. Miller, *The p53 family in nervous system development and disease.* J Neurochem, 2006. **97**(6): p. 1571-84.
42. Wang, X., et al., *MDM2 and MDMX can interact differently with ARF and members of the p53 family.* FEBS Lett, 2001. **490**(3): p. 202-8.
43. Budanov, A.V., et al., *Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD.* Science, 2004. **304**(5670): p. 596-600.
44. Matheu, A., et al., *Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway.* Nature, 2007. **448**(7151): p. 375-9.

45. O'Connor, J.C., et al., *A novel antioxidant function for the tumor-suppressor gene p53 in the retinal ganglion cell*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(10): p. 4237-44.
46. Moorhouse, A.J., et al., *A patch-clamp investigation of membrane currents in a novel mammalian retinal ganglion cell line*. Brain Res, 2004. **1003**(1-2): p. 205-8.
47. Chen, D., et al., *Division and apoptosis of E2f-deficient retinal progenitors*. Nature, 2009. **462**(7275): p. 925-9.
48. Chong, J.L., et al., *E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells*. Nature, 2009. **462**(7275): p. 930-4.
49. Bauer, J.H., et al., *Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult Drosophila melanogaster extends life span*. Curr Biol, 2005. **15**(22): p. 2063-8.
50. Matheu, A., et al., *Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging*. Genes Dev, 2004. **18**(22): p. 2736-46.
51. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
52. Levy, O.A., C. Malagelada, and L.A. Greene, *Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps*. Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 478-500.
53. Karunakaran, S., et al., *Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in dopaminergic neurons of substantia nigra leads to nuclear translocation of p53 in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice*. J Neurosci, 2008. **28**(47): p. 12500-9.

54. Ohyagi, Y., et al., *Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease*. FASEB J, 2005. **19**(2): p. 255-7.
55. Mandir, A.S., et al., *A novel in vivo post-translational modification of p53 by PARP-1 in MPTP-induced parkinsonism*. J Neurochem, 2002. **83**(1): p. 186-92.
56. Bae, B.I., et al., *p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease*. Neuron, 2005. **47**(1): p. 29-41.
57. Zhang, Y., et al., *Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons*. J Cell Biol, 2002. **156**(3): p. 519-29.
58. Brouillet, E., et al., *Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 7105-9.
59. Kim, M.O., et al., *Altered histone monoubiquitylation mediated by mutant huntingtin induces transcriptional dysregulation*. J Neurosci, 2008. **28**(15): p. 3947-57.
60. Otte, A.P. and T.H. Kwaks, *Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion?* Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(5): p. 448-54.
61. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb complexes and epigenetic states*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(3): p. 266-73.
62. Chen, W.Y., et al., *Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses*. Cell, 2005. **123**(3): p. 437-48.

63. Langley, E., et al., *Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence*. EMBO J, 2002. **21**(10): p. 2383-96.
64. Le Cam, L., et al., *E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation*. Cell, 2006. **127**(4): p. 775-88.
65. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
66. Mielke, K. and T. Herdegen, *JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system*. Prog Neurobiol, 2000. **61**(1): p. 45-60.
67. Renault, V.M., et al., *FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(5): p. 527-39.
68. Paik, J.H., et al., *FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis*. Cell Stem Cell, 2009. **5**(5): p. 540-53.
69. Nemoto, S. and T. Finkel, *Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2450-2.
70. Kops, G.J., et al., *Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 316-21.
71. Salih, D.A. and A. Brunet, *FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 126-36.

72. Nemoto, S., M.M. Fergusson, and T. Finkel, *Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway*. Science, 2004. **306**(5704): p. 2105-8.
73. Tothova, Z., et al., *FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress*. Cell, 2007. **128**(2): p. 325-39.
74. Miyamoto, K., et al., *Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(1): p. 101-12.
75. Liou, G.Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free radical research, 2010. **44**(5): p. 479-496
76. Diehn, M., et al., *Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells*. Nature, 2009. **458**(7239): p.780–783.
77. Shackleton, M., et al., *Generation of a functional mammary gland from a single stem cell*. Nature, 2006. **439**(7072): p. 84–88
78. Powell, S. and T.J. McMillan, *DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation*. Radiother Oncol, 1990. **19**(2): p.95–108
79. Tothova, Z. and D.G. Gilliland, *FoxO Transcription Factors and Stem Cell Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(2): p.140-152

ANNEXE 1

L'annexe 1 est un article qui illustre le rôle de *BMI1* dans l'auto-renouvellement du glioblastome multiforme (GBM) humain. Cette étude montre que BMI1 est exprimée dans les tumeurs de GBM et est fortement enrichie dans les cellules CD133 positives. D'autres part, cette étude démontre que le knockdown de BMI1 par shRNA empêche la formation de colonies *in vitro* et de tumeurs cérébrales *in vivo*. Cette étude procure les premières évidences de l'implication de EZH2 dans la croissance des GBM.

Dr Mohamed Abdouh, étudiant post-doctoral dans le laboratoire, et Sabrina Facchino, étudiant au PhD, ont contribué de façon égale dans la conception, l'élaboration et l'écriture du manuscrit. J'ai contribué à ce manuscrit en effectuant les injections de cellules de GBM dans le cortex des souris.

Neurobiology of Disease

BMI1 sustains human glioblastoma multiform stem cell renewal

Abbreviated title: BMI1 sustains stemness of GBM cells

Authors: Mohamed Abdouh^{1‡}, Sabrina Facchino^{1‡}, Wassim Chatoo¹, Vijayabalan Balasingam³, José Ferreira⁴, and Gilbert Bernier^{1,2,*}

¹ Developmental Biology Laboratory, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 Boul. l'Assomption, Montreal, Canada, H1T 2M4

² Department of Ophthalmology, University of Montreal, Montreal, Canada, H3T 1J4

³ Department of Surgery, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Canada, H1T 2M4

⁴ Department of Pathology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Canada, H1T 2M4

‡ These authors contributed equally to this work

*Corresponding author: Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Centre de recherche, Pavillon Marcel-Lamoureux
5415 boulevard de l'Assomption
Montréal, Québec, H1T 2M4
Tel: 514-252-3400 ext. 4648
Fax: 514-252-3569

Number of figures and tables: 8 figures and 1 table

Supplemental material: 3 supplementary figures and legends, and 1 supplementary table

Number of pages: 43 pages

Abstract: 175 words

Introduction: 488 words

Discussion: 1283 words

Key words: Polycomb, Stem cells, CD133, human, glioblastoma, short hairpin RNA

Acknowledgments: We are grateful to the Brain Tumor Tissue bank and Brain Tumor Foundation of Canada for archival brain tumor samples supply. We thank Nathalie Hanley for assistance in flow cytometry cell sorting. This work is supported in part by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, and Canadian Institutes of Health Research. G.B is supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec. W.C. is a Scholar from the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal.

Abstract

Glioblastoma multiform (GBM) is one of the most common and aggressive types of brain tumors. In GBM, a subpopulation of CD133 positive cancer initiating cells displays stem cell characteristics. The Polycomb group (PcG) and oncogene BMI1 is part of the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) that regulates gene expression by modifying chromatin organization. Here we show that BMI1 is expressed in human GBM tumors and highly enriched in CD133 positive cells. Stable BMI1 knockdown using short hairpin RNA-expressing lentiviruses resulted in inhibition of clonogenic potential *in vitro* and of brain tumor formation *in vivo*. Cell biology studies support the notion that BMI1 prevents CD133 positive cell apoptosis and/or differentiation into neurons and astrocytes, depending on the cellular context. Gene expression analyses suggest that BMI1 represses alternate tumor suppressor pathways that attempt to compensate for *INK4A/ARF/P53* deletion and PI(3)K/AKT hyperactivity. Inhibition of EZH2, the main component of the PRC2, also impaired GBM tumor growth. Our results reveal that PcG proteins are involved in GBM tumor growth and required to sustain cancer initiating stem cell renewal.

Introduction

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common and deadly brain tumor. There are two subtypes of GBM. Primary GBM arises without evidence of prior clinical disease, whereas secondary GBM derives from preexisting low-grade lesions (Maher et al., 2001; Louis et al., 2007). Notably, the prognosis has not changed significantly for decades, with a median survival of less than one year (Holland, 2001; Maher et al., 2001). A better understanding of GBM molecular genetics will reveal the mechanisms underlying the initiation and progression of the disease, and open new gates to develop therapeutic strategies.

Polycomb group (PcG) proteins form large multimeric complexes that are involved in gene silencing through modifications of chromatin organization (Sparmann and van Lohuizen, 2006). They are classically subdivided into two groups, namely Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) and PRC2 (Levine et al., 2002). The sequential histone modifications induced by the PRC2 complex (which includes EZH2) and the PRC1 complex (which includes BMI1) allow stable silencing of gene expression (Dellino et al., 2004; Wang et al., 2004). A number of observations have implicated these proto-oncogenes in human cancers (Orian et al., 1992; Lassman et al., 2004; Valk-Lingbeek et al. 2004). *EZH2*, the core component of the PRC2, is upregulated in lymphoma, prostate and breast cancer (van Kemenade et al., 2001; Visser et al., 2001; Varambally et al., 2002; Kleer et al., 2003). *Bmi1* was originally identified as an oncogenic partner in lymphomagenesis, and was subsequently found to be overexpressed in various human cancers, including medulloblastomas (van Lohuizen et al., 1991; Haupt et al., 1991; Jacobs et al., 1999a; Vonlanthen et al., 2001; Dimri et al., 2002; Leung et al., 2004; Bruggeman et al., 2007).

Mice lacking *Bmi1* display neurological abnormalities and post-natal depletion of stem cells from the central and peripheral nervous systems (Jacobs et al., 1999b; Molofsky et al., 2003; Molofsky et al., 2005; Bruggeman et al., 2005; Zencak et al., 2005). *Bmi1* is also required for the self-renewal of normal and leukemic stem cells (Park et al., 2003; Lessard and Sauvageau, 2003). Importantly, the *INK4A/ARF* locus, encoding for the two tumor suppressor proteins p16^{INK4A} and p14^{ARF}, is the main target of BMI1 oncogenic and stem cell proliferation activities (Valk-Lingbeek et al. 2004).

Here we report that BMI1 and EZH2 are overexpressed in human GBM tumors and highly enriched in tumor-initiating CD133⁺ stem cells. Ablation of BMI1 or EZH2 expression in GBM cell lines cultured as neurospheres inhibited their growth and clonogenic potential. These effects, which were independent of a functional *INK4A/ARF* locus, correlated with depletion of the CD133⁺ cell population owing to increased apoptosis and differentiation. BMI1 knockdown also completely prevented brain tumor formation in mice, even when up to 1×10^5 cells were transplanted. Gene expression analyses suggest that BMI1 represses alternate tumor suppressor pathways that attempt to compensate for *INK4A/ARF/P53* deletion and PI(3)K/AKT hyperactivity. This work revealed that PcG proteins are required in human GBM to sustain cancer-initiating stem cell renewal.

Materials and methods

Glioblastoma (GBM) specimen. Paraffin-embedded archival primary GBMs were obtained from the department of pathology of the Maisonneuve-Rosemont Hospital, and the Brain Tumor Tissue Bank (Toronto, Ca). Fresh tumors were obtained from consenting patients and used with permission of our institutes' ethical committee.

Cell cultures. Fresh GBM samples were processed for cell cultures within 1 hour after reception. Tumor was washed and cut in small pieces before mechanical dissociation in oxygenated HBSS. Cell suspensions were passed over a 40 μm filter mesh. After centrifugation, cells were resuspended in DMEM/F12 medium (Invitrogen) containing 0.25% glucose, N2 and B27 supplements, Heparin (2 $\mu\text{g/ml}$; Sigma), Gentamycin (25 $\mu\text{g/ml}$; Invitrogen), human recombinant FGF2 (10 ng/ml; Peprotech), and human recombinant EGF (20 ng/ml; Sigma). Afterwards, cultures were allowed to grow for three weeks to form spherical colonies (i.e. neurospheres). For passages, neurospheres were incubated in an enzyme free solution (Chemicon) at 37°C for 20 min, and mechanically dissociated with a 20G needle. After trituration, the single cell suspension was plated in the same culture medium as stated before.

ShRNA construction and lentiviral infection. Oligonucleotides were synthesized that consisted of sequence-specific nucleotides stretch designed to target the BMI1 ORF (BC_011652) oligo #1 from 1061 to 1081; CCTAATACTTTCCAGATTGAT, oligo #2 from 500 to 518; GCAGAAATGCATCGAACAA, oligo #3 from 1051 to 1069;

AATGGACATACCTAATACT, and oligo #4 from 573 to 591; GGTACTTCATTGATGCCAC – used as scramble, Supplementary Fig. 1), or the EZH2 ORF (NM_001991) (oligo #7 from 324 to 344; CGGAAATCTTAAACCAAGAAT – which we used in this study, oligo #8 from 950 to 970; CCCAACATAGATGGACCAAAT, and oligo #9 from 1544 to 1564; GCTAGGTTAATTGGGACCAAA), followed by the loop sequence (TTCAAGAGA) and finally the reverse complements of the targeting sequences. The double-stranded shRNA sequences were cloned downstream of the H1P promoter of the H1P-UbqC-HygroEGFP plasmid using Age1, Sma1, and Xba1 cloning sites (Ivanova et al., 2006). The shRNA-expressing lentiviral plasmids were cotransfected with plasmids pCMVdR8.9 and pHCMV-G into 293FT packaging cells using Lipofectamin (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Viral containing media were collected, filtered, and concentrated by ultracentrifugation. Viral titers were measured by serial dilution on 293T cells followed by microscopic analysis 48 hr later. For viral transduction, lentiviral vectors were added to dissociated cancer cells prior to plating. Hygromycin selection (150 µg/ml) was added 48 h later.

Cell differentiation assays. Neurospheres were picked-up and deposited in a chamber slides (Lab-tek) coated with poly-L-lysine (0.5 mg/ml) and laminin (10 ng/ml; Sigma), in DMEM/F12 medium supplemented with 0.25% glucose, N2 and B27 supplements, Gentamycin (25 µg/ml), and 1% Fetal Bovine Serum (Invitrogen). After 10 days culture, they attached and grew in monolayers. Cells were washed with PBS to remove residual floating cells and stained for differentiation markers.

Colony formation assay. After infection with the respective viruses for 48 hours, the selection was added. Three days later, cells were sorted for CD133⁺ cells by a FACSVantage (cell purity ~95%) and 5.000 CD133⁺ cells were plated on a thin layer Matrigel substrat-treated 6 well plate (BD Bioscience) and allowed to grow to confluence (~10 days for the control). Cultures were fixed in PBS containing 4% PFA, and stained with Cresyl Violet. After washing, phase contrast micrographs were taken.

Immunolabeling. For fixation, tissues were immersed for 1 h at room temperature in 4% paraformaldehyde (PFA)/3% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Samples were washed three times in PBS, cryoprotected in PBS/30% sucrose, and frozen in CRYOMATRIX embedding medium (CEM) (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA). Otherwise, tissues were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin according to standard protocols. 5 to 7 μ m thick sections were mounted on Super-Frost glass slides (Fisher Scientific) and processed for immunofluorescence or immunohistochemistry staining. For immunofluorescence labeling, sections were incubated overnight with primary antibody solutions at 4°C in a humidified chamber. After three washes in PBS, sections were incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Slides were mounted on coverslips in DAPI-containing mounting medium (Vector Laboratories, CA). For immunohistochemistry labeling, slices were analyzed by using the Vectastain[®] ABC kit (Vector) according to the manufacturer instructions. Peroxidase substrates used are the Vector[®] VIP (Pink) (Vector), and DAB (brown) (Sigma). Observations were made under a fluorescence microscope (Leica DMRE, Leica Microsystems) and images were captured with a digital camera (Retiga EX; QIMAGING;

with OpenLab, ver.3.1.1 software; Open-Lab, Canada). Antibodies used in this study were mouse anti-mouse BMI1, rabbit anti-human EZH2 (US Biological), mouse anti-NeuN, rabbit anti-MAP2, mouse anti-Human Nuclei (Chemicon), mouse anti-CD133 (AC133) (Miltenyi biotec), mouse anti-PCNA, rabbit anti-GFAP (DAKO), rabbit anti-Ki67 (Novocastra), mouse anti-GFP, mouse anti-mitochondria (abcam), rabbit anti-activated caspase 3 (Cell signaling), rat anti-CD31 (PECAM-1) (PharMingen), and mouse anti-Nestin (BD Transduction Laboratory). For immunofluorescence, the secondary antibodies used were rhodamine-conjugated donkey anti-mouse, FITC-conjugated donkey anti-mouse, and FITC-conjugated goat anti-rat (Chemicon).

RT-PCR. All primers were designed to flank individual exons and tested by PCR in RT⁺ and RT⁻ control extracts. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription (RT) was performed using 1 µg of total RNA and the MML-V reverse transcriptase (Invitrogen). PCR amplification was performed using the HotStar TAQ polymerase (Invitrogen). PCR was run as follow; 94°C for 10 min, followed by 30 cycles of denaturing at 94°C, annealing at 57°C and extension at 72°C in a Applied Biosystems thermal cycler. Real-time PCR was performed using the Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) and a Real-Time PCR apparatus (ABI Prism 7000). Primer sets used were as follow: BMI1 (F) 5'-AATCCCCACCTGATGTGTGT-3'; (R) 5'-GCTGGTCTCCAGGTAACGAA-3', Musashi (F) 5'-GTTTCGGCTTCGTCACCTTTC-3'; (R) 5'-AAGGCCACCTTAGGGTCAAT-3', SOX2 (F) 5'-CACAACCTCGGAGATCAGCAA-3'; (R) 5'-CGGGGCCGGTATTTATAATC-3', LHX2 (F) 5'-CCAAGGACTTGAAGCAGCTC-3'; (R) 5'-TAAGAGGTTGCGCCTGAACT-3',

CD133 (F) 5'-TTGTGGCAAATCACCAGGTA-3'; (R) 5'-TCAGATCTGTGAACGCCTTG-3', EZH2 (F) 5'-AGGACGGCTCCTCTAACCAT-3'; (R) 5'-CTTGGTGTGCACTGTGCTT-3', p21/Cip (F) 5'-CCGAAGTCAGTTCCTTGTGG-3'; p21/Cip (R) 5'-GTCGAAGTTCATCGCTCAC-3', HLA-DRB4 (F) 5'-ACAACACTACGGGGTTGTGGAG -3'; (R) 5'-CGGAACACCTGACTTCAAT -3', HLA-DPA1 (F) 5'-TTGGCTTTCCTGCTGAGTCT-3'; (R) 5'-CCCTGTTGGTCTATGCGTCT-3', HLA-DRA (F) 5'-AGACAAGTTCACCCACCAG-3'; (R) 5'-AGCATCAAACCTCCAGTGCT-3', HLA-DMA (F) 5'-TACGACGAGGACCAGCTTTT-3'; (R) 5'-GCGTGAACACTTCAGCGATA-3', FOXO3A (F) 5'-ACAAACGGCTCACTCTGTCC-3'; (R) 5'-TCTTGCCAGTTCCTCATTTC-3', P18 (F) 5'-GCGCTGCAGGTTATGAAAC-3'; (R) 5'-GGGCAGGTTCCCTTCATTAT-3', PCNA (F) 5'-GGCGTGAACCTCACCAGTAT-3'; (R) 5'-TCACTCCGTCTTTTGCACAG-3', GAPDH (F) 5'-TCACCAGGGCTGCTTTTAAC-3'; (R) 5'-ATCCACAGTCTTCTGGGTGG-3'.

GAPDH was used as an internal standard for data calibration. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula was used for the calculation of differential gene expression.

Gene amplification analysis. Genomique DNA was isolated using TRIzol reagent according to the protocole provided (Invitrogen). Quantitative PCR amplification was performed using the Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) and Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System. We evaluated loci copy number in each sample by comparison to the reference β actin gene. We also choose PAX6 gene as another reference gene so as to confirm reliability of this qPCR assay. Primer sets used were as follow: BMI1

(F) 5'-TGTGTGCTTTGTGGAGGGTA-3'; (R) 5'-CATTTCACAGATTGCAGGA-3',
 PAX6 (F) 5'-ACCACACCGGGTAATTTGAA-3'; (R) 5'-
 GCCAGATGTGAAGGAGGAAA-3', EGF-R (F) 5'-GCTAACGTGCAGGGATTGTT-3';
 (R) 5'-GTTGAGGGCAATGAGGACAT-3', PDGF-R (F) 5'-
 ATGCTCTCCAGTGGCAGTTT-3'; (R) 5'-TGCACTGCAACCTTGAACCTC-3', *INK/ARF*
 locus (F) 5'-TGGAAATCCTGAGGTTGGTC-3'; (R) 5'-ACT GCG GAG CAA TGA
 AGA CT -3', and β actin (F) 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3'; (R) 5'-
 TGTTGGCGTACAGGTCTTTG-3'. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula was used for the calculation of
 differential gene copy numbers. DNA from human retina was used as calibrator (gene copy
 = 2N).

Western blotting. Total protein extracts were prepared in the CompleteMini protease inhibitor cocktail solution (Roche Diagnostics). Proteins contents were quantified using the Bradford reagent. Proteins were resolved in Laemmli buffer by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to a Nitrocellulose Blotting Membrane (Pall, FL) that was exposed to the primary antibodies; mouse anti-mouse Bmi1, rabbit anti-human EZH2 (US Biological), and mouse-anti β actin (Abcam) antibodies. Membranes were treated with corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed using the Immobilon Western (Millipore).

Fluorescence-activated cell sorting (FACS). For BMI1 expression analysis, single-cell suspension was fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized by incubation in 0.5% TritonX100 for 5 min on ice. Cells were incubated with mouse anti BMI1 antibody

(1.T.21, abcam). The primary antibodies were visualized by using FITC-conjugated goat anti-mouse (Chemicon). Cells were acquired in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson) at a flow rate of 250 cells/second. Dead cells and cell debris were excluded from acquisition by gating with FCS and SSC biparametric plot.

For the analysis of apoptosis, cells were resuspended in 1x Annexin V binding buffer, and stained with Cy5-Annexin V (Pharmingen). Just before cell acquisition in a FACScalibur, 5 μ l of 7-AAD was added.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). ChIP was performed using the ChIP Assay kit (Upstate). Briefly, 1-1.5 x 10⁶ fixed cells were sonicated to shear the chromatin and immunoprecipitated using mouse anti-mouse BMI1 (US Biological), and anti-mouse IgG (Upstate) antibodies. Immunoprecipitated DNA was amplified using primers to p21, HOXC13, and β -major chain. Primers are p21 site 1; (F) 5'-AGCTTTCACCCCCAGAACT-3' and (R) 5'-GATGATTTCTCCCAGGCTGA-3', p21 site 2; (F) 5'-TCAGCCTACAGCACCTGTCA-3' and (R) 5'-CAGCAAGGCAGACAGAACAG-3', p21 site 3; (F) 5'-CTGTTCTGTCTGCCTTGCTG-3' and (R) 5'-ATTGCCAGAGTCCAGCAGTT-3', p21 site 4; (F) 5'-ACACCCATGAGGGACACCT-3' and (R) 5'-ATACAAGGAAGGCCCTGGTC-3', p21 site 5; (F) 5'-ACCAGGGCCTTCCTTGTATC-3' and (R) 5'-GTCACCTCCAGTGGTGTCT-3', HOXC13 site 1; (F) 5'-ACGTGAACCTGCAGCAGAA-3' and (R) 5'-CTTGGCCCTAGAGGACAGGT-3', HOXC13 site 2; (F) 5'-AGCAGAGCTCAGTGGGAGAG-3' and (R) 5'-AATTCAGGCCACCCTTAG-3', β -major (F) 5'-GGCTGTCATCACTTAGACCTC-3'

and (R) 5'-GGTTGCTAGTGAACACAGTTG-3'. β major was used as an internal standard for data calibration, and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula was used for the calculation of differential levels of immunoprecipitated chromatin.

Micro-array analyses. Total RNA was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) and purified by the RNeasy MiniElute Cleanup kit (Qiagen) from scrambled-virus or shBMI1-infected GBM cells (2 independent tumors were used, with 3 infections per virus). Microarray analysis using BeadChip Mouse Genome (Illumina) was performed at the Centre d'innovation at Genome Quebec (McGill university, Montreal, PQ). Data were analyzed using the FlexArray software. Data were validated by Real-Time PCR for some transcripts.

Stereotactic intracranial cell transplantation into NOD-SCID mice. Animals were handled in strict accordance with the Animal Care Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre. Cells were resuspended in oxygenated HBSS and 3 μ l aliquots were injected stereotactically into 60 day-old NOD-SCID mouse brain, following administration of general anaesthesia (Somnotol; 60 mg/kg). Mice were placed in the stereotactic frame using ear bars and a hole was bored in the skull. The injection coordinates were 2 mm to the right of the midline, 2 mm posterior to the coronal suture and 3 mm deep. The scalp was closed with wound clips (Harvard). Animals were followed daily for development of neurological deficits.

Statistical analysis. Statistical differences were analyzed using Student's *t*-test for unpaired samples. An analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test was used for multiple comparisons with one control group. Survival curve statistics were made with the Prism 5 software. The criterion for significance (*P* value) was set as mentioned in the figures.

Results

BMI1 and EZH2 are highly enriched in CD133⁺ GBM cells

We previously showed that in contrast with mouse astrocytes, normal human brain astrocytes do not express BMI1 *in vivo* (Chatoo et al., 2009). We sought to determine if primary GBM tumors express BMI1 and EZH2. By using immunohistochemical stainings, we found that BMI1 and EZH2 are highly expressed in GBM tumors (5 archival paraffin-embedded, and 4 newly resected tumors) (Fig 1 and data not shown). In these tumors, BMI1 was expressed in GFAP positive cells, suggesting that BMI1 is expressed in transformed human astrocytes *in vivo*. EZH2 was highly expressed in Nestin positive cells, which may correspond to astrocytes and/or neural stem cells (Fig. 1A and data not shown). Increasing reports had pointed that brain tumors originate from CD133⁺ cancer stem-like cells that recapitulate the self-renewal and multi-lineage differentiation characteristics of the original tumor (Hemmati et al., 2003, Singh et al., 2003, Galli et al., 2004, Yuan et al., 2004). We found that BMI1 and EZH2 were co-expressed with CD133 in GBM tumors (Fig. 1B and data not shown). BMI1 and EZH2 expression in GBM tumors was accompanied by the expression of the progenitor/stem cell markers MUSASHI, SOX2 and LHX2 (Fig. 1C, and Supplementary Fig. 1A). It was also reported that cancer stem cells are frequently observed within vascular niches (Calabrese et al., 2007). BMI1 or EZH2-expressing tumor cells were found intimately associated with CD31 positive vessels (Vecchi et al., 1994) (Fig. 1D and data not shown).

Recent findings revealed that the gene expression profile of all GBM cell lines (such as the U87 cell line) does not reflect the expression profile of original GBM tumors (Lee et al., 2006). In contrast, GBM cell lines derived from GBM tumors but grown as

neurospheres in serum-free neural stem cell (NSC) media share a much closer gene expression profile with the original tumors. Notably, GBM-derived neurospheres express BMI1 (Lee et al., 2006). We cultured cells isolated from 6 GBM tumors in NSC media. Five cell lines were established, generating neurospheres that could be maintained for more than 15 passages (Fig. 2A). When cultured in serum-containing media, these cells differentiated into neurons (MAP2 and NeuN positive) and astrocytes (GFAP positive) (Fig. 2A and data not shown). As previously reported, several differentiated cancer cells aberrantly co-expressed MAP2 and GFAP (Hemmati et al., 2003; and data not shown). Floating GBM neurospheres expressed BMI1 and EZH2 and the NSC markers MUSASHI, SOX2 and LHX2 as revealed by immunofluorescence, RT-PCR and Western blot analyses (Fig. 2A-C, and data not shown). We sorted CD133⁻ and CD133⁺ cells from GBM neurospheres using magnetic microbeads. By using quantitative real time PCR, we found that BMI1 (~8 times) and EZH2 (~3 times) were highly enriched in the CD133⁺ cell fraction (Fig. 2D). Moreover, by using flow cytometry analysis, we also found that BMI1 was expressed in 85% of CD133⁺ cells (Fig. 2E). These observations indicate that BMI1 is robustly expressed in GBM tumors and highly enriched in CD133⁺ stem cell-like GBM cells.

***BMI1* is not amplified in GBM tumors**

PDGF and EGFR genes amplification as well as *INK4A/ARF*, *PTEN* and *RB* deletions, and *P53* mutations are hallmarks of gliomas transformation (Ohgaki and Kleihues, 2007, CGAR Network, 2008). Hence, high BMI1 expression level in GBM tumors may also be due to gene amplification. In most of our tumor samples, we observed *EGFR* and *PDGFR*

amplifications as well as bi-allelic *INK4A/ARF* deletions (Fig. 2F). However, BMI1 gene amplification was not observed (Fig. 2F).

BMI1 knockdown inhibits colony growth and leads to CD133⁺ stem cell depletion

To address the role of BMI1 and EZH2 in GBM, we used replication-incompetent lentiviruses to knockdown these factors. A lentiviral construct driving an shRNA under the control of the U6 promoter and a fusion hygromycin/GFP protein under the control of the CMV promoter was used (Ivanova et al. 2006). BMI1 or EZH2 expression was significantly reduced in 293T cells and in cultured GBM cells using different shRNA constructs (Fig. 3A and Supplementary Fig. 1B).

These viruses were used to infect 3 independent GBM cell lines cultured on matrigel in NSC media, where a total of 5000 cells (2500 cells/ml) were plated per well. In this colony-forming assay, control-virus infected GBM cells generated adherent colonies growing as a dense cell monolayer (Fig. 3B). In contrast, knockdown of BMI1 or EZH2 resulted in fewer colonies growing as a loose cell monolayer (Fig. 3B, and Supplementary Fig. 2).

We also used the classical neurosphere assay to evaluate the effect of BMI1 knockdown. Virus infected cells (with over 95% of infection as visualized by GFP fluorescence) were grown in NSC media with hygromycin in non-adherent cell culture dishes at 2000 cells/ml. After 5 days, we observed that BMI1 knockdown resulted in smaller sphere colonies, and this effect was apparently dose-dependent (Fig. 3C). After 2 weeks, control colonies generated a dense neuroepithelial cell layer reaching near confluence. In contrast, shBMI1#1-infected cells did not reach confluence and had a

differentiated morphology. When cells were serially cultured, we observed that shBMI1#1-infected cells were unable to ensure continuous passages, and were depleted after the first passage (Fig. 3D). ShBMI1#3-infected cells could grow for serial passages but more slowly than the control cell population (Fig. 3D).

Cell growth retardation may result from increased apoptosis or differentiation, and/or reduced proliferation. When compared to control GBM cells, shBMI1-infected cells displayed significantly more apoptosis at 24, 48 and 72 hours post-infection (~ 4 to 7 times) (Fig. 3E and data not shown). When neurospheres grown in NSC media were plated on a gelatin matrix to force adhesion, we observed after 48 hours that shBMI1-infected colonies contained more neurons (MAP2⁺) and astrocytes (GFAP⁺) than the control culture (Fig. 3F). To better understand cell fate following BMI1 knockdown, we analyzed stem cell genes expression (CD133/PROMININ, MUSASHI, SOX2 and LHX2). In colonies grown for 2 weeks in NSC media (as in panel 3C), BMI1 knockdown was accompanied by a dramatic reduction in stem cell genes expression, thus suggesting depletion of the stem cell pool (Fig. 3G). Notably, even partial BMI1 knockdown with shBMI1#3 (44% of remaining transcripts) significantly affected *CD133/PROMININ* expression (Fig. 3G). These observations reveal that BMI1 is required to prevent apoptosis and/or differentiation of the CD133⁺ stem cell population.

Cell density modulates CD133⁺ cell survival

BMI1 knockdown leads to apoptosis and depletion of the CD133⁺ cell population in low-density cell culture conditions. We hypothesized that cell density may be important for cell viability. We cultured scramble- and shBMI1-infected GBM cells at 2.5×10^4 cells/ml in

NSC media for 5 days in the presence of hygromycin. Under these conditions, we found that the overall proportion of CD133⁺ was comparable in both cell populations (Fig. 4A and B). Cell sorting analysis revealed that only CD133⁺ cells could form colonies, and that shBMI1-infected CD133⁺ cells generated smaller colonies than scramble-infected cells (Fig. 4C). We also analyzed cells by FACS for Annexin-V staining and observed that culturing shBMI1-infected cells at high density reduced apoptosis at levels that were comparable to controls (4.3 +/- 0.7 in scramble-infected cultures versus 5.0 +/- 0.6 in shBMI1-infected cultures; n = 5 independent cultures). These culture conditions, which at least transiently preserve the CD133⁺ cell population, allowed us to further study the biological and molecular functions of *BMI1* in gliomagenesis.

BMI1 is required for brain tumor formation in xenografts

To investigate the role of BMI1 in tumor growth *in vivo*, 1x10⁵ GBM cells infected with either controls or shBMI1 viruses were injected stereotactically in brains of non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice. We analyzed the expression of CD133 by FACS in cells cultured at high density (2.5x10⁴ cells/ml). At the time of injection and depending on the cell line, 20-65% of both control- and shBMI1-virus infected cells expressed CD133. After 6 to 8 weeks, all control group animals (i.e. GFP virus, n = 15; scramble virus, n = 14; or no virus, n = 15) started to show neurological symptoms or die suddenly. In contrast, most animals injected with the shBMI1-GBM cells survived (n = 21). Kaplan-Meier survival curve showed that mice injected with control cells- (i.e. naive cells), or empty virus- (i.e. GFP), or scrambled virus-infected cells (i.e. scramble) died prematurely when compared to naive NOD/SCID mice (Christianson et al.,

1997) or with mice injected with shBMI1-infected cells (Fig. 5A and B). Mice bearing xenografts in which BMI1 was knockdown exhibited a median survival that was very close to that of normal NOD/SCID mice (Fig. 5A and B, and Christianson et al., 1997). In control animals, typical hemorrhagic GBM tumors (n = 11) were observed macroscopically (Fig. 5C), and could be used to establish new glioma neurosphere cultures when dissociated and maintained in NSC media (data not show). We also observed large invasive but non-hemorrhagic tumors crossing both brain hemispheres (n = 3). One very large tumor (but non-infiltrating) that was histologically similar to the tumor of origin was obtained (Supplementary Fig. 3). In contrast, no tumors were found in the brain of mice injected with shBMI1-infected cells (macroscopically or microscopically). In one animal that was sacrificed at day 32 post-transplantation for the presence of a thymic tumor, we could detect transplanted human GBM cells lining the cortical ventricular zone, nearby the hippocampus (Fig. 5D). However, these cells did not form a tumor mass.

Histological analysis of solid hemorrhagic tumors in control animals revealed expression of the GFP transgene and of the human-specific mitochondrial antigen, confirming the human origin of the tumor (Fig. 6B and C). BMI1, EZH2, Ki67, PCNA, Nestin and GFAP were robustly expressed in these tumors (Fig. 6A-D). Altogether, these observations show that cultured GBM cells retain the capacity to generate brain tumors resembling the tumor of origin and expressing BMI1 and EZH2.

To investigate why shBMI1-infected glioma cells did not generate tumors, we transplanted 1×10^5 cells infected with shBMI1 or scrambled viruses. Animals were analyzed 10 days post-injection. In control animals, we observed a tumor mass within the right ventricle (Fig. 7A). A similar but smaller mass was observed in animals injected with

shBMI1-infected GBM cells (Fig. 7A). Both cell masses expressed the GFP transgene, indicating their human origin (Fig. 7B). We also noticed that grafted cells were sometime in very close association with the microvasculature of the cortical ventricular zone (Fig. 7B). While a small fraction of control tumor cells were positive for activated caspase-3, nearly all shBMI1-infected tumor cells were positive, revealing massive apoptosis (Fig. 7B). Thus, while high cell density can transiently preserve cell viability of shBMI1-infected glioma cells *in vitro*, this is not sufficient to prevent cell death upon transplantation in mice. These results revealed that BMI1 is required for GBM tumor development *in vivo*.

BMI1 regulates multiple cellular pathways

To identify the molecular pathways underlying the observed effects of BMI1 knockdown, we surveyed gene expression changes by performing DNA micro-array analyses. Since BMI1 main function is attributed to its repressive action on the *INK4A/ARF* locus (Jacobs et al. 1999b), we used two *INK4A/ARF*-deleted tumor cell lines (GBM1202 and GBM0607; Fig. 2F) to identify alternate pathways that may required active transcriptional repression by BMI1 in order to allow for gliomagenesis. We found significant changes in the expression (either up- or down) of 1769 genes in the shBMI1-infected cells compared to either control shRNA or non-infected cells. Both cell lines gave nearly identical differential gene expression profiles. No relevant differences in gene expression were detected between non-infected and control shRNA-expressing cells (data not shown).

Because BMI1 is a transcriptional repressor (Chatoo et al., 2009, Lee et al., 2006), we first focused on upregulated genes. More than 12 homeobox genes of the HOX gene cluster, which are known direct BMI1 targets, were differentially expressed (Alkema et al.,

1995, va der Lugt et al., 1996, Hanson et al., 1999, Molofsky et al., 2003). This confirmed the validity of our assay (Table 1, and supplementary table). Notable observations were the massive upregulation of antigen presentation (HLA) molecules, Notch ligands and downstream targets, neural and glial differentiation markers, as well as cell cycle-control, cell death and stress response factors *i.e.* $P21^{Cip}$, $P18^{INK4C}$, $FOXOA3$, $GAS1$ and $GADD45$ (Table 1; and supplementary table). We also identified 2 genes known as markers of progenitor/stem cells that were downregulated in shBMI1-infected cells ($CD133/PROMININ$ and $NUMB$) as well as one cell proliferation marker ($PCNA$). These results strengthened the idea that BMI1 maintain cancer stem cells in an undifferentiated state and that abrogation of its activity results in the induction of cell death, cell cycle exit and/or differentiation pathways (Table 1; and supplementary table). Based on genetic studies, Bmi1 was proposed to control $p21^{Cip1}$ expression in murine embryonic cortical progenitors (Fasano et al., 2007). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments using GBM cells revealed that BMI1 could directly bind the chromatin at the $P21^{Cip}$ promoter and $HOXC13$ promoter (positive control), but not at the β - $MAJOR$ promoter of the β - $GLOBIN$ gene (negative control) (Fig. 8A and B). This provides the first molecular evidence that the regulation of $P21^{Cip}$ by BMI1 is direct.

Discussion

BMI1 has been involved in the pathogenesis of several human malignancies (Lessard and Sauvageau, 2003; Bruggeman et al., 2007). Overexpression of BMI1 was found in medulloblastoma, lung and breast tumors (Vonlanthen et al., 2001; Kimm et al., 2004; Leung et al., 2004). Abnormal EZH2 expression is also associated with human cancers (Kleer et al., 2003). We report here that BMI1 and EZH2 are expressed in GBM tumors, highly enriched in CD133⁺ tumor-initiating cells, and required for tumor cell growth.

What is the mechanism of BMI1 up-regulation in GBM tumors?

BMI1 gene amplification has been identified in human B-cell lymphoma lines (Bea et al., 2001). However, we did not detect *BMI1* gene amplification in four independent GBM tumors. This suggests that high BMI1 expression level in GBM cells is due to increased gene transcription. BMI1 expression levels may simply reflect the stem cell state of GBM tumors, since *BMI1* is highly expressed in normal neural stem cells (Molofsky et al., 2003; Zencak et al. 2005). Alternatively, "supra-physiological" BMI1 levels in cancerous neural stem cells may be required to confer biological properties that are not present in normal cells. This gain-of-function activity may contribute to cell transformation. In this context, classical oncogenes overexpressed in GBM (such as *MYC* or *RAS*) and anti-oncogenes deleted or mutated in GBM (such as *P53*, *NF1* or *PTEN*) may be responsible for regulating BMI1 expression levels. For example, C-MYC has been shown to positively regulate *BMI1* expression in the NIH3T3 cell line with doxycycline-inducible expression of the FoxM1c transcription factor (Li et al., 2008). In turn, *p53* and *Pten* co-deletion results in glioma formation in mice owing to dramatic up-regulation of *c-myc* in astrocytes and neural stem

cells (Zheng et al. 2008). Chromosomal aberrations may also account for *BMI1* upregulation, as reported for a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia (Larmonie et al., 2008).

BMI1 in glioma subtypes

Knockdown of *BMI1* or *EZH2* had a significant effect on GBM cell growth in 4 independent cell lines. A similar response was observed with an astrocytoma grade III tumor sample. In contrast, an oligodendroma tumor sample was resistant to *BMI1* knockdown and was modestly affected by *EZH2* knockdown (Supplementary Fig.2). Gliomas are classified histologically, immunohistochemically and ultrastructurally as astrocytomas (graded from pilocytic astrocytoma; grade I, to the most aggressive glioblastoma; grade IV), or oligodendromas (Maher et al., 2001). However, oligodendromas represent a distinct subtype of gliomas, possibly having a different cell of origin than astrocytoma and GBM. This may explain the selective dependency of GBM over PcG proteins. Alternatively, the mutational profile of each tumor, independently of its subtype, may determine PcG proteins dependency.

BMI1 prevents immunogenicity and differentiation of GBM stem cells

Neural stem cells are recognized to have a low immunogenic potential, in part because they do not express HLA molecules (Hori et al., 2003; Mammolenti et al., 2004; Ubiali et al., 2007). We found that *BMI1* knockdown induced an upregulation of a large group of HLA class II molecules (and to a lesser extent class I molecules) (Table 1; and supplementary table). This is provocative since the malignancy and invasion capacity of GBM cells can to

some extent be ascribed to their ability to effectively evade the immune system (by downregulation of HLA class I and class II molecules) (Facoetti et al., 2005; Zagzag et al. 2005). This suggests that BMI1 may allow GBM tumor cells to be undetectable by the host immune system through maintenance of a low immunogenic stem cell-like phenotype. BMI1 may thus confer GBM cells immune evasion either by preventing stem cell differentiation or through direct repression of HLA genes expression.

We also found that BMI1 knockdown induces an upregulation of transcripts involved in neurogenesis and gliogenesis, and this is supported by our *in vitro* observations revealing increased neural and glial cell differentiation. This possibility is further supported by the downregulation of *CD133/PROMININ* and *MUSASHI* expression upon BMI1 knockdown. Our data support the idea that BMI1 is required to maintain the undifferentiated state and self-renewal capacity of cancer initiating cells in the tumor bulk.

BMI1 prevents cell cycle exit and apoptosis of GBM stem cells

Recently, a meta-analysis performed with hundreds of independent GBM tumors revealed that combined co-inactivation of 3 major oncogenic pathways is required for GBM tumor formation. This includes the ARF/MDM2/P53, P15^{INK4B}/P16^{INK4A}/P18^{INK4C}/RB and RAS/PI(3)K/AKT pathways (CGAR Network, 2008). BMI1 functions are mainly attributed to its repressive action on the *INK4A/ARF* locus and on P53 activity (Jacobs et al., 1999b; Chatoos et al., 2009). The *INK4A/ARF* locus operates upstream of P53 and RB. In this regards, it is notable that *INK4A/ARF* is deleted in $\geq 50\%$ of GBM tumors and that *P53* is mutated in 35% of GBM tumors (CGAR Network, 2008). Notably, Bmi1 oncogenic function in transformed murine astrocytes is independent of a functional *Ink4a/Arf* locus

(Bruggeman et al., 2007). To identify possible alternate tumor suppressor pathways, we thus used two glioma cell lines having homozygous deletions of the *INK4A/ARF* locus and performed gene expression profile analyses. We found that *P21^{Cip}* transcripts were upregulated after BMI1 knockdown, and our CHIP assays suggest that *P21^{Cip}* repression by BMI1 is direct. *P21^{Cip}* is a direct positive target of P53, and *P21^{Cip}* inhibits cell growth and the RB pathway by blocking CDK4/CDK6 activity. BMI1 may also directly repress *FOXO3* expression (table 1). *FOXO3*, a potent inducer of apoptosis in cancer cells, is deleted in some GBM tumors, and is inhibited by activated AKT (Greer and Brunet, 2005; Jagani et al., 2008). *P18^{INK4C}* was shown to compensate for *P16^{INK4A}* deletion in gliomas (Ramsey et al., 2007; Wiedemeyer et al., 2008). *P16^{INK4A}* and *P18^{INK4C}* operate upstream of RB to block cell cycle progression (Cánepa et al., 2007; Maddika et al., 2007). Notably, co-deletion of *P18^{INK4C}* in *P16^{INK4A}*-null gliomas significantly increases tumorigenicity, while functional reconstitution of *P18^{INK4C}* in *P18^{INK4C}/P16^{INK4A}* double-mutant GBM cells impairs cell cycle progression and clonogenic potential (Wiedemeyer et al., 2008). We found that *P18^{INK4C}* is upregulated following BMI1 knockdown in *INK4A/ARF* deleted GBM tumors, suggesting that repression of this locus is critical for BMI1 oncogenic function (Table 1). Taken together, these observations account for BMI1 requirement in GBM stem cell proliferation and survival. They also allow us to suggest a model where GBM-tumors dependency over BMI1 is mediated through its repressive action on alternate tumor suppressor pathways that attempt to overcome *INK4A/ARF/P53* inactivation and PI(3)K/AKT hyperactivity (see model in Fig. 8C). Because there is evidence that Bmi1 can also repress *p21^{Cip1}* expression in normal stem cells (Fasano et al. 2007), not all BMI1 activities ascribed here in GBM cells necessarily represent gain-of-functions.

EZH2 in brain tumors

Our data are the first to reveal a direct involvement of EZH2 in human GBM. These observations would justify more intensive investigations of EZH2 role in glioblastoma tumors since inhibitors of histone methyltransferase already exist and could represent a new therapeutic approach. Notably, a cancer-specific complex (PRC4) containing EZH2, EED, SUZ12 and SIRT1, a deacetylase, has been isolated in transformed cells lines, and SIRT1 knockdown increases radio-sensitivity of CD133-positive glioma cells (Chang et al. 2009). This raises the issue of whether EZH2 forms a complex with SIRT1 in GBM cells and whether increase PcG proteins expression levels in GBM leads to the formation of new molecular complexes having biochemical activities not present in normal cells.

In conclusion, increasing evidences pointed that brain malignancies originate from- and contain cancer stem cells expressing the cell surface marker CD133 (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2004). We found that BMI1 and EZH2 are highly expressed in CD133⁺ GBM stem cells and required to sustain their self-renewal. PcG proteins thus orchestrate important aspects of cancer stem cell biology and could represent prime molecular targets to cure glioma patients.

References

- Alkema MJ, van der Lugt NM, Bobeldijk RC, Berns A, van Lohuizen M (1995) Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature* 374(6524):724-727.
- Bea S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernandez L, Hernandez S, Fernandez PL, van Lohuizen M, Colomer D, Campo E (2001) BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res* 61:2409–2412.
- Bruggeman SW, Valk-Lingbeek ME, van der Stoop PP, Jacobs JJ, Kieboom K, Tanger E, Hulsman D, Leung C, Arsenijevic Y, Marino S, van Lohuizen M (2000). Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev* 19(12):1438-1443.
- Bruggeman SW, Hulsman D, Tanger H, Buckle T, Blom M, Zevenhoven J, van Tellingen O, van Lohuizen M (2007) Bmi1 Controls Tumor Development in an Ink4a/Arf-Independent Manner in a Mouse Model for Glioma. *Cancer Cell* 12:328–341.
- Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS, Gajjar A, Davidoff A, Gilbertson RJ (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11(1):69-82.
- Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF (2007) INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59(7):419-26.

- Chang CJ, Hsu CC, Yung MC, Chen KY, Tzao C, Wu WF, Chou HY, Lee YY, Lu KH, Chiou SH, Ma HI (2009) Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 380(2):236-242.
- Chatoo W, Abdouh M, David J, Champagne MP, Ferreira J, Rodier F, Bernier G (2009) The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *J Neurosci* 29(2):529-542.
- CGAR (The Cancer Genome Atlas Research Network) (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061-1068.
- Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SC, Pirrotta V (2004) Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* 13:887–893.
- Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V (2002) The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 62:4736–4745.
- Facoetti A, Nano R, Zelini P, Morbini P, Benericetti E, Ceroni M, Campoli M, Ferrone S (2005) Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors. *Clin Cancer Res* 11(23):8304-8311.
- Fasano CA, Dimos JT, Ivanova NB, Lowry N, Lemischka IR, Temple S (2007) shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell* 1:87-99.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like

- neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64:7011–7021.
- Greer EL, Brunet A (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24(50):7410-7425.
- Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NM, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ (1999) Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(25):14372-14377.
- Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM (1991) Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65(5):753-763.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI (2003) Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15178–15183.
- Holland EC (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2:120–129.
- Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, Streilein JW, Young MJ (2003) Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. *Stem Cells* 21(4):405-416.
- Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR (2006) Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442:533-538.

- Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M (1999a) Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* 13:2678-2690.
- Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M (1999b) The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397:164-168.
- Jagani Z, Singh A, Khosravi-Far R (2008) FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1785(1):63-84.
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(20):11606-11611.
- Lassman AB, Dai C, Fuller GN, Vickers AJ, Holland EC (2004) Overexpression of c-MYC promotes an undifferentiated phenotype in cultured astrocytes and allows elevated Ras and Akt signaling to induce gliomas from GFAP-expressing cells in mice. *Neuron Glia Biol* 1:157-163.
- Lee TI et al. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125:301–313.
- Lessard J, Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423(6937):255-260.
- Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, Liu J, Tanger E, Saremaslani P, Van Lohuizen M, Marino S (2004) Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428:337–341.

- Levine SS, Weiss A, Erdjument-Bromage H, Shao Z, Tempst P, Kingston RE (2002) The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol* 22:6070-6078.
- Li SK, Smith DK, Leung WY, Cheung AM, Lam EW, Dimri GP, Yao KM (2008) FoxM1c counteracts oxidative stress-induced senescence and stimulates Bmi-1 expression. *J Biol Chem* 283(24):16545-16553.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2):97-109.
- Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M (2007) Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Upd* 10(1-2):13-29.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15:1311-1333.
- Mammolenti M, Gajavelli S, Tsoulfas P, Levy R (2004) Absence of major histocompatibility complex class I on neural stem cells does not permit natural killer cell killing and prevents recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Stem Cell* 22:1101-1110.
- Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ (2003) Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* 425(6961):962-967.
- Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R (2005) Bmi-1 promotes neural stem

- cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 19:1432-1437.
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453.
- Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, Kaye AH, Chow CW, Gonzales MF (1992) Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. *Br J Cancer* 66:106-112.
- Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423:302-305.
- Ramsey MR, Krishnamurthy J, Pei XH, Torrice C, Lin W, Carrasco DR, Ligon KL, Xiong Y, Sharpless NE (2007) Expression of p16Ink4a compensates for p18Ink4c loss in cyclin-dependent kinase 4/6-dependent tumors and tissues. *Cancer Res* 67(10):4732-4741.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353:811-822.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63:5821-5828.
- Sparmann A, van Lohuizen (2006) Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Rev* 6:846-856.
- Ubiali F, Nava S, Nessi V, Frigerio S, Parati E, Bernasconi P, Mantegazza R, Baggi F (2007) Allorecognition of human neural stem cells by peripheral blood lymphocytes

- despite low expression of MHC molecules: role of TGF-beta in modulating proliferation. *Int Immunol* 19(9):1063-1074.
- Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118:409–418.
- van Kemenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T, Fieret E, Hamer KM, Satijn DP, Otte AP, Meijer CJ (2001) Coexpression of BMI-1 and EZH2 Polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 97:3896–3901.
- van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, Wientjens E, van der Gulden H, Berns A (1991) Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65(5):737-752.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2002) The Polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 419:624–629.
- Vecchi A, Garlanda C, Lampugnari MG (1994) Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 63:247-254.
- Visser HP, Gunster MJ, Kluin-Nelemans HC, Manders EM, Raaphorst FM, Meijer CJ, Willemze R, Otte AP (2001) Visser, H. P. et al. The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 112:950–958.
- Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt HJ, Gugger M, Kappeler A, Borner M, van Lohuizen

- M, Betticher DC (2001) The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer* 84:1372–1376.
- Wang L, Brown JL, Cao R, Zhang Y, Kassis JA, Jones RS (2004) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* 14:637–646.
- Wiedemeyer R, Brennan C, Heffernan TP, Xiao Y, Mahoney J, Protopopov A, Zheng H, Bignell G, Furnari F, Cavenee WK, Hahn WC, Ichimura K, Collins VP, Chu GC, Stratton MR, Ligon KL, Futreal PA, Chin L (2008) Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell* 13(4):355-364.
- Yuan X, Curtin J, Xiong Y, Liu G, Waschmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23:9392–9400.
- Zagzag D, Salnikow K, Chiriboga L, Yee H, Lan L, Ali MA, Garcia R, Demaria S, Newcomb EW (2005) Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain. *Lab Invest* 85:328-341.
- Zencak D, Lingbeek M, Kostic C, Tekaya M, Tanger E, Hornfeld D, Jaquet M, Munier FL, Schorderet DF, van Lohuizen M, Arsenijevic Y (2005) Bmi1 loss produces an increase in astroglial cells and a decrease in neural stem cell population and proliferation. *J Neurosci* 25(24):5774-5783.
- Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen A, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA,

Ligon KL, Wong WH, Chin L, DePinho RA (2008) p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature* 455:1129-1133.

Figure Legends

Figure 1. Glioblastoma multiform tumors express BMI1 and EZH2. **A.** Formalin-fixed paraffin-embedded GBM samples were immunolabeled with antibodies against BMI1 or EZH2 (brown) and GFAP or Nestin (pink). Arrowheads point to double positive cells. **B.** Frozen GBM samples were immunolabeled with antibodies against BMI1 (red) and CD133 (green). DAPI (blue) stains nuclei. Arrowheads point to double positive cells. **C.** RT-PCR analysis performed on a freshly isolated GBM sample with primers against *GAPDH*, *BMI1*, *MUSASHI*, *SOX2* and *LHX2*. **D.** Frozen GBM samples were immunolabeled with antibodies against BMI1 (red) and CD31 (green). DAPI (blue) stains nuclei. Arrowheads point to BMI1 cells surrounding a blood vessel. Dashed lines (in **A** and **B**) delineate the border of the tumor. Scale bars are 100 μm .

Figure 2. BMI1 and EZH2 are highly enriched in CD133⁺ cells. **A.** Frozen GBM neurospheres were immunolabeled with antibodies against BMI1 (upper panels), or GFAP and MAP2 after plating in medium-induced differentiation (lower panels). DAPI stains nuclei in blue. **B.** RT-PCR analysis performed on cultured neurospheres with primers against *GAPDH*, *BMI1*, *MUSASHI*, *SOX2* and *LHX2*. **C.** Western blot analysis performed on freshly isolated GBM sample and neurospheres using anti-EZH2 and anti- β -actin antibodies. **D.** CD133⁻ and CD133⁺ purified GBM cells with CD133-coupled magnetic beads were analyzed by Real-Time PCR for the expression of *PROMININ* (*CD133*), *BMI1* and *EZH2* transcripts. Data are expressed as fold change over gene expression in negative cells (CD133⁻) which was set at 1. Results are Mean \pm s.d. (n = 3; *P<0.05; **P<0.01). **E.**

Dissociated neurospheres were stained with anti-BMI1 and anti-CD133 antibodies. The R1 gate delineates the cell population analyzed. Values are the percentages of cells in the corresponding regions. *F*. Gene copy number was assessed by quantitative Real-Time PCR in GBM samples. Data are expressed relative to healthy human retina genomic DNA and calibrated to β -actin used as internal standard. An other internal standard was used which consisted of PAX6. Scale bars are 60 μ m.

Figure 3. BMI1 or EZH2 knockdown reduces GBM cells clonogenic potential and leads to depletion of the CD133⁺ cell population. *A*. Short hairpin (sh) RNA down-regulation of BMI1 and EZH2 expression. Western blot analysis performed on shBMI1- or scramble-infected 293FT cells using anti-BMI1, anti-EZH2 and anti- β -actin antibodies. β -actin was used as an internal standard to quantify BMI1 and EZH2 expression levels (Left and middle panels). GBM cells were infected with one of two lentiviruses expressing shBMI1, or scramble virus, and were analyzed by Real-Time PCR for the expression of BMI1 transcripts. Data are expressed as fold change over BMI1 expression in the scramble-infected cells which was set at 1. Results are Mean \pm s.d. (n = 3; **P<0.01) (Right panel). *B*. ShBMI1 or scramble-infected GBM cells were plated on matrigel substrat. 48 h later, hygromycin selection was added and cells were allowed to grow for 10 days. Cultures were fixed and stained with Cresyl Violet, and phase contrast micrographs were taken. *C*. ShBMI1 or scramble-infected GBM cells were plated on non-adherent culture plates. 48 h later, hygromycin selection was added and cells were allowed to grow for two weeks. *D*. Cells cultured in (*C*) were followed for 5 passages. Colonies were passaged every two weeks. Results are cumulative cells number (log scale) over consecutive passages. Note

that shBMI1-#1-infected cells were depleted following the first passage. **E.** GBM cells cultured as in (C) were analyzed for apoptosis using Annexin-V staining and FACS analysis. Data are expressed as the percentage of Annexin+/7-AAD- cells (Mean +/- s.d.; n = 3; *P<0.05). **F.** ShBMI1 or scramble-infected GBM cells were plated on gelatin-coated chamber slides and allowed to differentiate for 7 days. Cultures were analyzed by immunofluorescence using antibodies against GFAP, or MAP2. Data are expressed as the percentages of positive cells over the total number of DAPI-stained nuclei (n = 3; *P<0.05). **G.** GBM cells cultured as in (C) were analyzed by Real-Time PCR. Data are expressed as fold change over gene expression in the scramble-infected cells which was set at 1. Results are Mean +/- s.d. (n = 3; *P<0.05; **P<0.01).

Figure 4. High cell density prevents CD133⁺ cell depletion upon BMI1 knockdown. **A.** Experimental scheme used to study differential gene expression (Microarray), BMI1 binding to candidate genes (ChIP), and BMI1 function *in vivo*. **B.** Scramble or BMI1 shRNA-infected neurospheres were dissociated and stained with anti-CD133 antibodies. The R1 gate delineates the cell population analyzed. All cells analyzed were GFP positive. The values are the percentages of CD133⁺ and CD133⁻ in both cultures. The panel to the right shows CD133⁺ and CD133⁻ cells as viewed under a fluorescence microscope. **C.** Size distribution of spheres obtained from scramble or shBMI1-infected CD133⁺ or CD133⁻ sorted cells after 5 days of culture. Phase contrast pictures are shown.

Figure 5. BMI1 is required for intra-cranial GBM tumor formation. **A.** Kaplan-Meier representation of the survival curves of mice injected with naive cells, cells infected with an

empty virus, a scrambled or a ShBMI1 viruses. * Median survival for this mouse strain was previously reported (mean +/- sd; 191 +/- 11 days*, Christianson et al., 1997. 158: 3578).

B. Data summary from the Kaplan-Meyer curves shown in **A**. Statistical significance was assessed using the log rank test relative to scramble. **C.** Representative images of brains bearing secondary tumors following engraftment of scrambled virus-infected GBM cells. Hemoragic tumor (top panels; dashed lines). Non hemoragic tumor (lower panels). Cresyl violet coloration showed that GBM cells localize mainly in the grafted right hemisphere with some spreading in the contralateral hemisphere. **D.** Frozen sections of a brain injected with shBMI1-infected GBM cells were immunolabeled with antibodies to human nuclei (green). Nuclei were visualized by DAPI (blue). The grafted cells were confined to the injection site. The contralateral left hemisphere was used as a non grafted control. Scale bar; 200 μm .

Figure 6. Engrafted tumors resemble the tumor of origin and retain PcG proteins expression. Formalin-fixed paraffin-embedded sections of brains injected with scrambled virus-infected GBM cells were analysed by immunohistochemistry. **A.** Sections were immunolabeled with antibodies against PCNA and GFAP. **B.** Sections were immunolabeled with antibodies against GFP (from the lentiviral transgene). **C.** Sections were immunolabeled with antibodies against human mitochondria and Ki67. **D.** Sections were immunolabeled with antibodies against BMI1, EZH2, GFAP, and Nestin. Dashed line delineates the border of the tumor. Scale bar; 100 μm .

Figure 7. BMI1 knockdown results in glioma cell apoptosis *in vivo*. **A-B.** Formalin-fixed paraffin-embedded sections of brains injected with scrambled- or shBMI1-infected GBM cells were analysed by immunohistochemistry 10 days post-injection. **A.** Sections were stained with hematoxylin and eosin. The tumor cell mass was consistently found in the right ventricle. **B.** Sections were immunolabeled with antibodies against GFP (carried by the transgene), or clivage-activated caspase-3. GFP immunoreactivity revealed that tumor cells are in close association with the microvasculature. Caspase-3 immunoreactivity uncovered that BMI1 knockdown cells undergo massive apoptosis. Scale bars; 50 μ m.

Figure 8. BMI1 promotes GBM tumor formation and stem cell renewal by blocking alternate tumor suppressor pathways. **A.** Schematic representation of the genomic DNA sequence of $P21^{Cip1}$. The boxes represent the exons. The primers used were chosen in the promoter region. **B.** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed with cultured GBM cell extracts. Immunoprecipitated DNA/protein complexes were analyzed by Real-Time PCR using primers directed against the *P21* (5 sites), *HOXC13* (2 sites) and β -*MAJOR* promoters. Data are expressed as fold change relative to the input which was set at 1. Results are Mean \pm s.d. (n = 5; *P < 0.05; **P < 0.01). **C.** Model of BMI1 function in gliomas: Crossed lines highlight the most common mutations and deletions found in GBM (CGAR Network, 2008). Dashed lines represent the classical targets of BMI1. Red lines represent possible new BMI1 targets, as reported in this study. Based on this, we propose that GBM tumor dependency over BMI1 is mediated through BMI1 repressive action on alternate tumor suppressor pathways that attempt to overcome *INK4A/ARF/P53* inactivation and PI(3)K/AKT hyperactivity.

Table 1. BMI1 knockdown induces an upregulation of critical cell death, growth arrest and cell differentiation pathways

Target ID	Definition	Array	P-value	qPCR	P-value
HLA cluster					
HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4.	4.291	6.3E-05	1.945	0.0001
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1.	3.186	7.6E-05	3.575	0.0080
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha.	2.659	2.7E-04	4.53	0.0368
HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha.	2.281	6.6E-05	2.885	0.0134
HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta.	2.119	3.3E-05	n.d.	
HOX cluster					
HOXB5	homeo box B5.	2.331	3.40E-04	n.d.	
HOXB2	homeo box B2.	2.134	3.33E-04	n.d.	
HOXA9	homeo box A9.	1.962	2.46E-04	n.d.	
HOXB7	homeo box B7.	1.715	2.10E-03	n.d.	
HOXB8	homeo box B8.	1.621	3.02E-04	n.d.	
Notch signaling pathway					
DLL1	delta-like 1 (Drosophila).	2.507	7.1E-05	n.d.	
LFNG	lunatic fringe homolog (Drosophila).	2.428	1.8E-05	n.d.	
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1.	2.274	1.1E-07	n.d.	
DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila).	2.232	6.7E-05	n.d.	
DLL3	delta-like 3 (Drosophila).	2.228	1.4E-04	n.d.	
Cell death and growth					
GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma.	2.386	5.1E-06	n.d.	
EMP1	epithelial membrane protein 1.	2.226	4.5E-05	n.d.	
NALP1	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 1.	2.078	2.2E-05	n.d.	
GAS1	growth arrest-specific 1.	2.061	3.4E-04	n.d.	
FOXO3A	forkhead box O3A.	1.592	6.88E-06	2.865	0.029
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1).	1.349	2.6E-05	3.555	0.0315
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18).	1.320	8.6E-04	6.840	0.0125
Neuronal development and differentiation					
GABBR2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2.	6.352	2.2E-05	n.d.	
NXPH1	neurexophilin 1.	3.031	1.2E-04	n.d.	
EPHA4	EPH receptor A4.	2.259	9.5E-08	n.d.	
ENC1	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain).	2.181	5.0E-04	n.d.	
FHL1	four and a half LIM domains 1.	2.168	1.4E-04	n.d.	

Astrocyte phenotype

FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3.	2.419	5.60E-05	n.d.	
GFAP	glial fibrillary acidic protein.	2.006	5.90E-07	n.d.	

Oligodendrocyte phenotype

OMG	oligodendrocyte myelin glycoprotein.	2.042	2.1E-08	n.d.	
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha.	2.017	9.2E-05	n.d.	

Stem cell phenotype

NUMBL	numb homolog (Drosophila)-like.	<u>0.707</u>	1.3E-06	n.d.	
CD133	prominin 1 (PROM1).	<u>0.687</u>	5.7E-07	<u>0.01</u>	0.0001
BMI1	polycomb group ring finger 4 (PCGF4).	<u>0.325</u>	6.0E-14	<u>0.01</u>	0.0002

GBM cells (from two independent tumors) were infected or not with scrambled virus or shBMI1#1. Cells were maintained in culture at high density (2.5×10^4 cells/ml) in neural stem cell media. No relevant differences in gene expression were detected between non-infected and scrambled shRNA-expressing cells. Data were analyzed using the FlexArray software and were expressed as fold change (Array column) over values in scrambled shRNA-infected cells. Data were validated by Real-Time PCR (qPCR column) for some transcripts.

Values underlined are for genes whose expression were downregulated.

n.d., Not determined.

Figure 1.

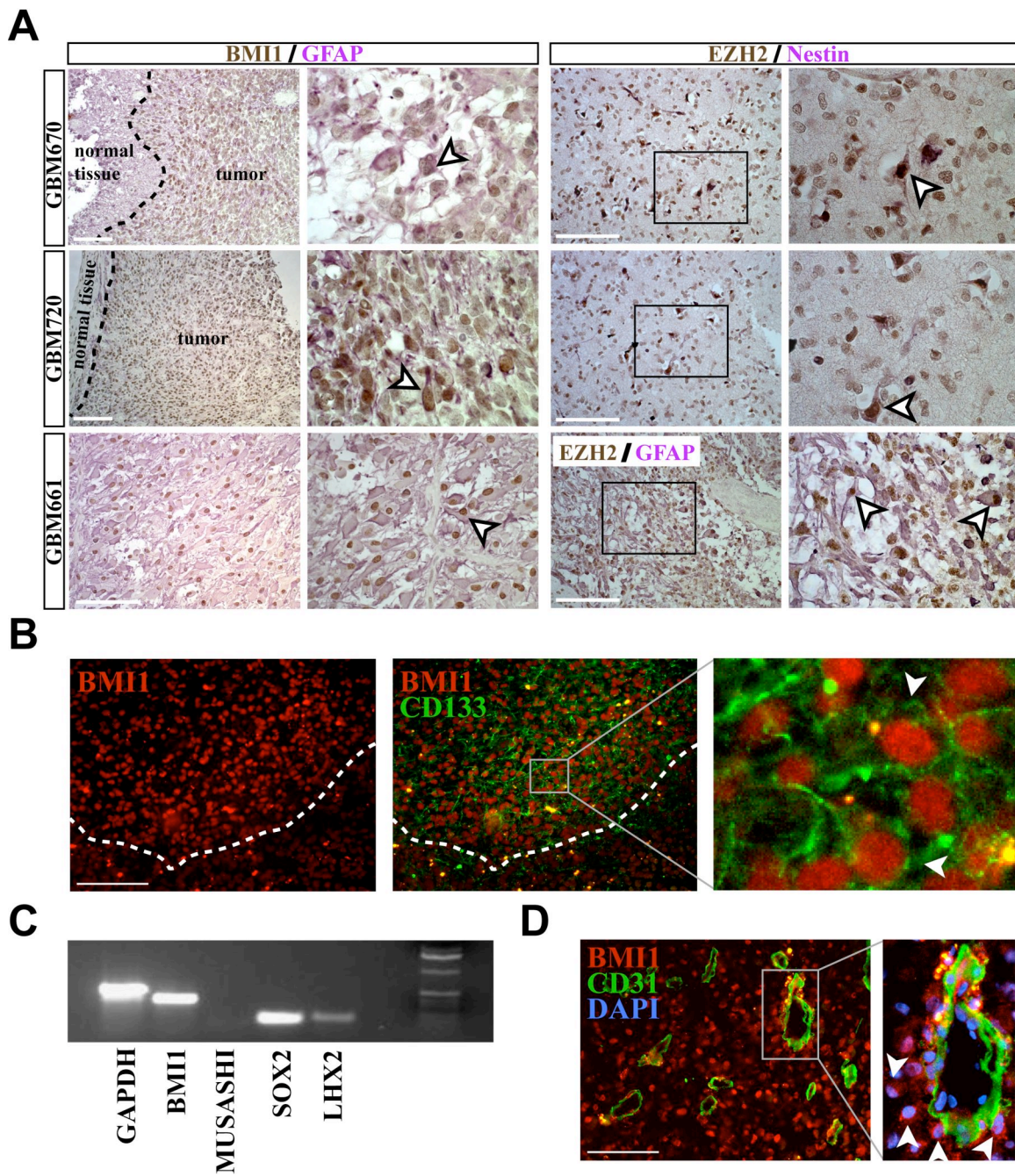


Figure 2.

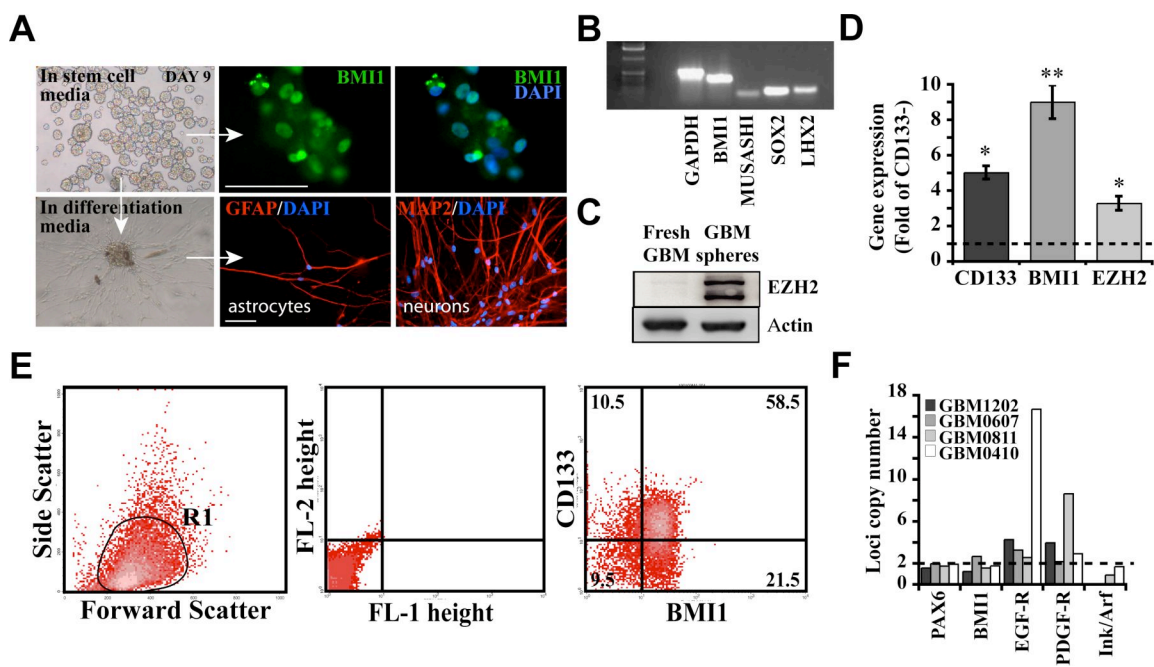


Figure 3.

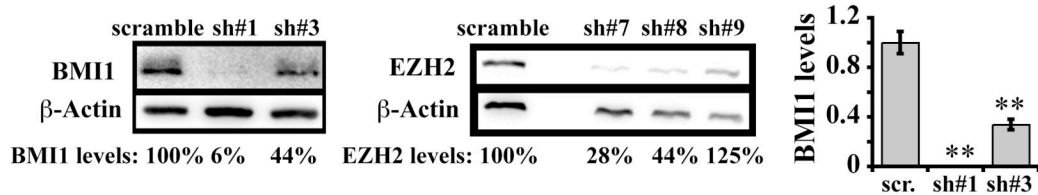
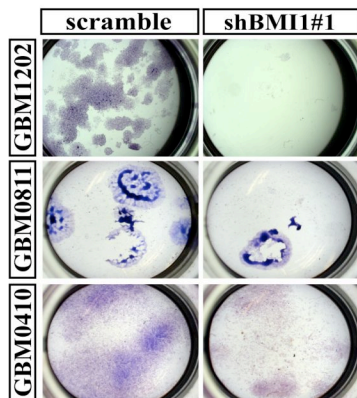
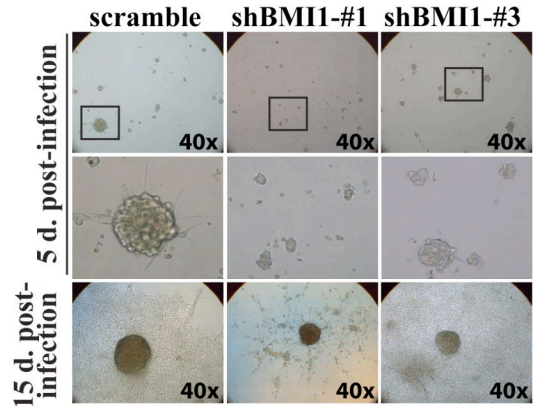
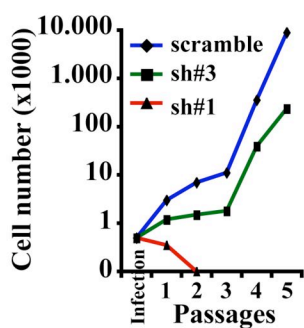
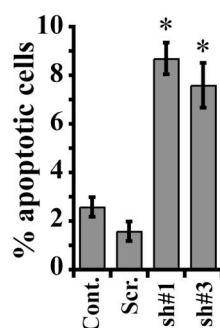
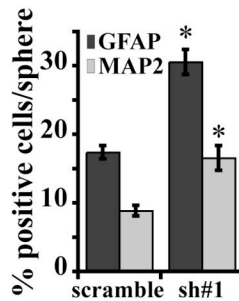
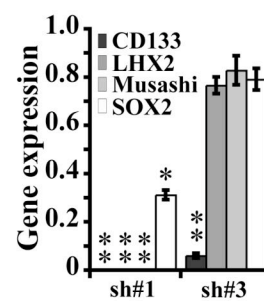
A**B****C****D****E****F****G**

Figure 4.

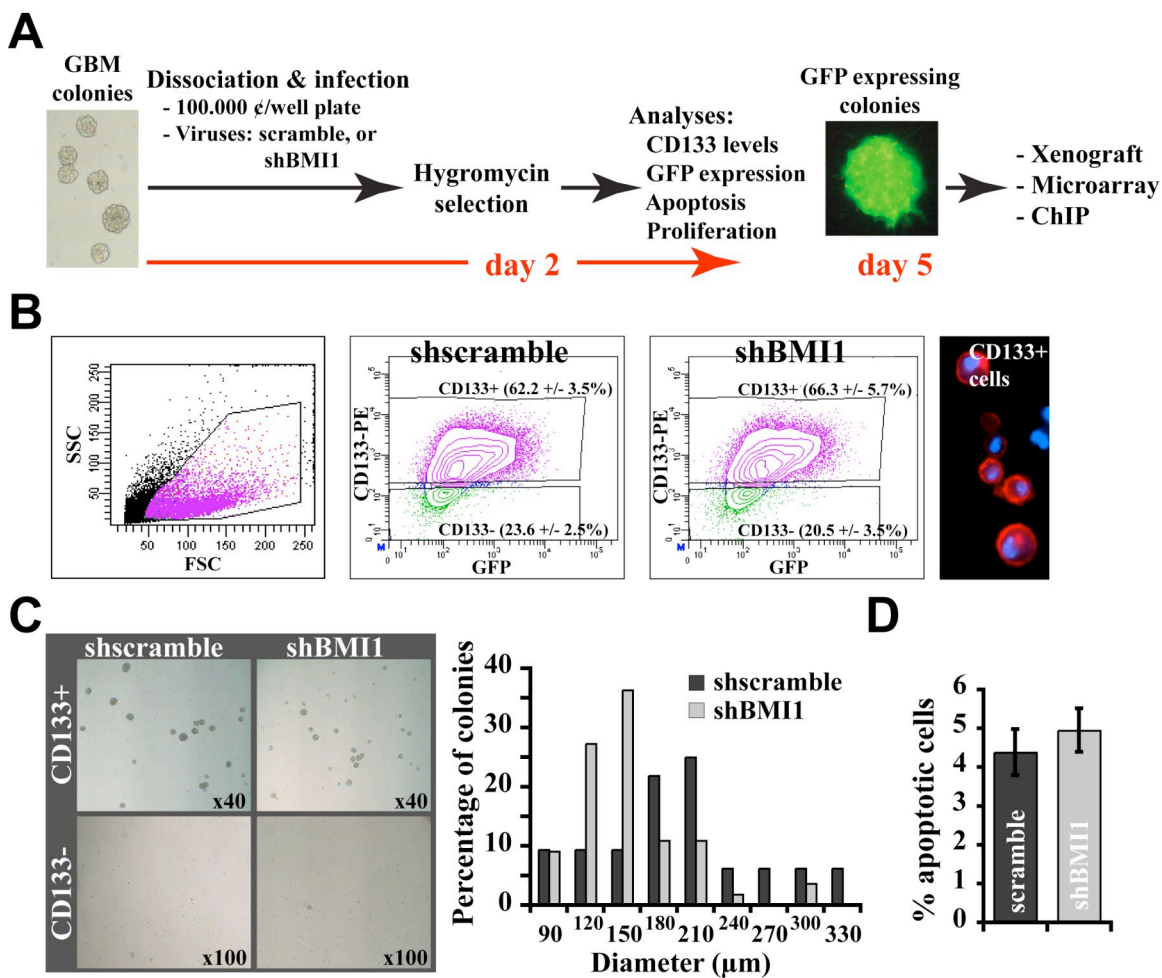


Figure 5.

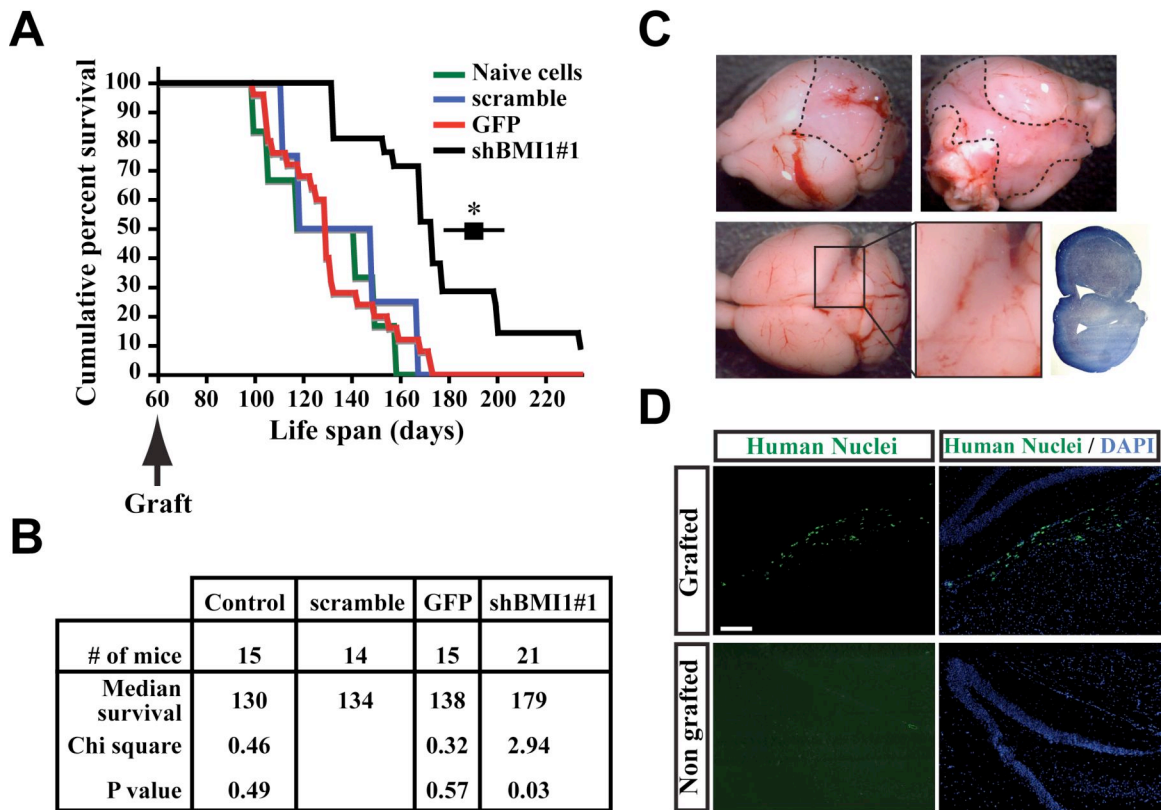


Figure 6.

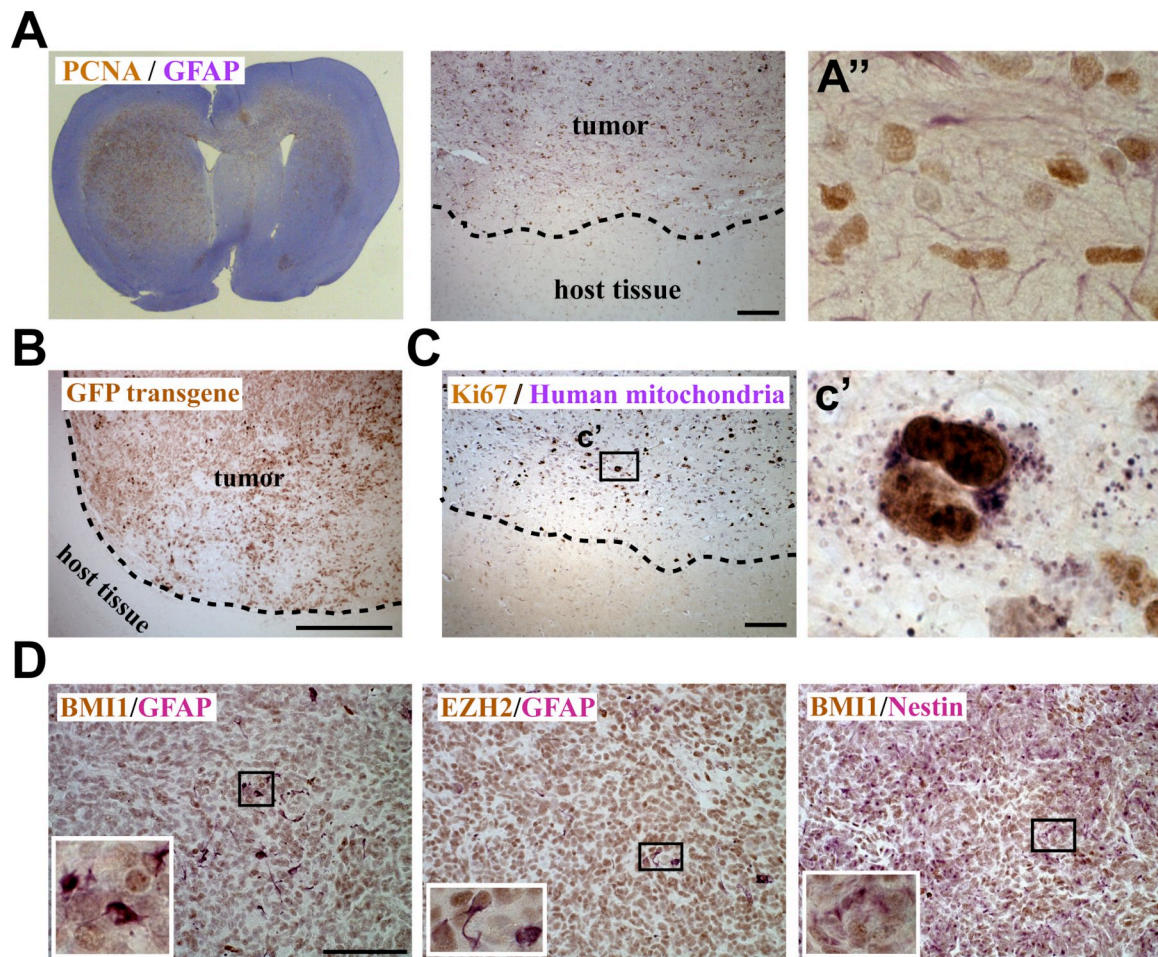


Figure 7.

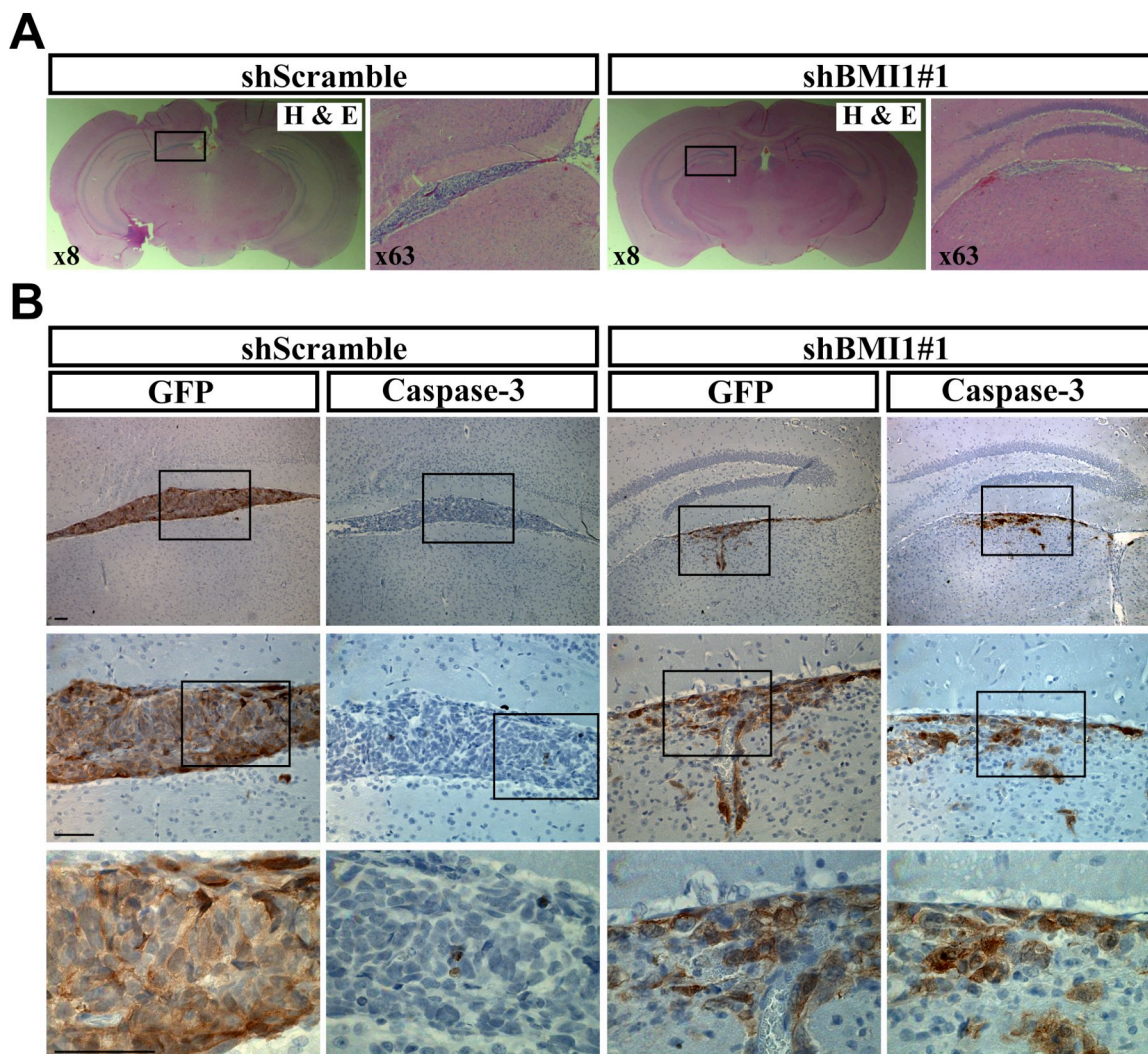
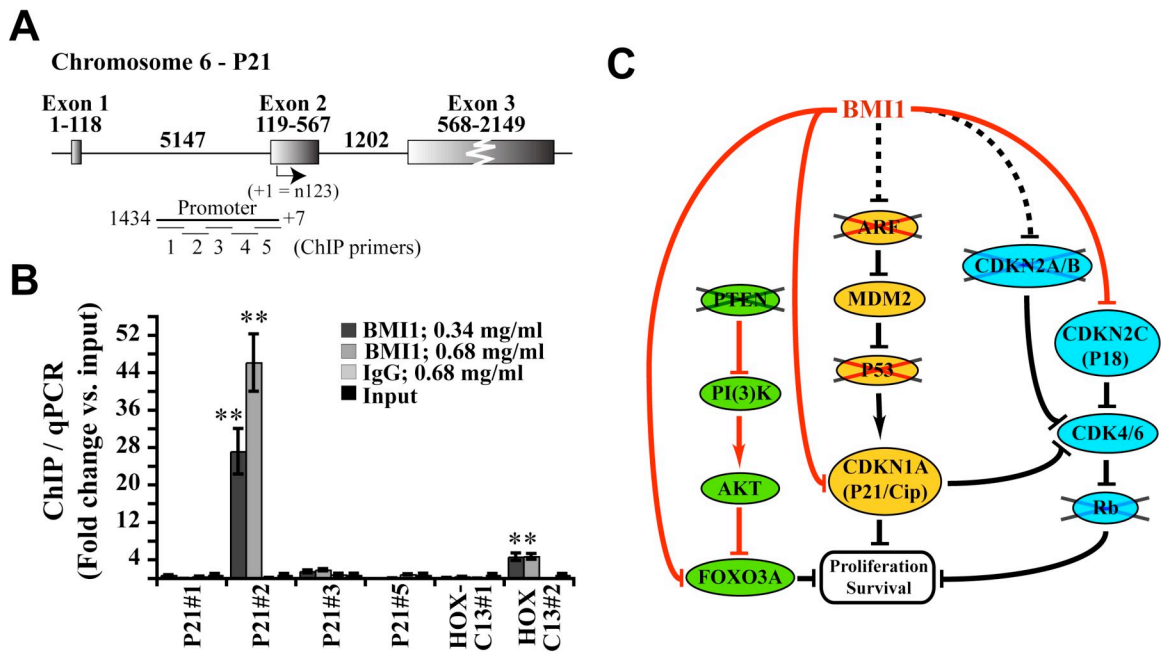


Figure 8.



Supplementary Materials

Supplementary table. BMI1 knockdown induces upregulation of critical cell survival, growth arrest and cell differentiation pathways

Target ID	Definition	Array	P-value	qPCR	P-value
HLA cluster					
HLA-DRB4	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4.	4.291	6.3E-05	1.945	0.0001
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1.	3.186	7.6E-05	3.575	0.0080
HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha.	2.659	2.7E-04	4.53	0.0368
HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha.	2.281	6.6E-05	2.885	0.0134
HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta.	2.119	3.3E-05	n.d.	
CD74	CD74 antigen (class II antigen-associated) (CD74).	2.089	1.5E-04	n.d.	
HLA-DRB3	major histocompatibility complex, class II, DR beta 3.	1.744	4.59E-05	n.d.	
HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1.	1.604	7.44E-05	n.d.	
HLA-DQB1	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1.	1.444	1.72E-04	n.d.	
HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha.	1.398	4.20E-04	n.d.	
RFX2	regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)	1.351	4.16E-05	n.d.	
HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C.	1.237	6.51E-03	n.d.	
HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B.	1.213	4.67E-03	n.d.	
HOX cluster					
HOXB5	homeo box B5.	2.331	3.40E-04	n.d.	
HOXB2	homeo box B2.	2.134	3.33E-04	n.d.	
HOXA9	homeo box A9.	1.962	2.46E-04	n.d.	
HOXB7	homeo box B7.	1.715	2.10E-03	n.d.	
HOXB8	homeo box B8.	1.621	3.02E-04	n.d.	
HOXB4	homeo box B4.	1.520	4.04E-04	n.d.	
HOXD10	homeo box D10.	1.420	2.65E-04	n.d.	
HOXB3	homeo box B3.	1.321	6.80E-04	n.d.	
HOXA5	homeobox A5.	1.275	6.13E-05	n.d.	
HOXD13	homeobox D13.	1.257	8.65E-06	n.d.	
HOXD11	homeobox D11.	1.239	1.12E-03	n.d.	
HOXA2	homeobox A2.	1.225	1.67E-06	n.d.	
Notch signaling pathway					

DLL1	delta-like 1 (Drosophila).	2.507	7.1E-05	n.d.
LFNG	lunatic fringe homolog (Drosophila).	2.428	1.8E-05	n.d.
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1.	2.274	1.1E-07	n.d.
DLK1	delta-like 1 homolog (Drosophila).	2.232	6.7E-05	n.d.
DLL3	delta-like 3 (Drosophila).	2.228	1.4E-04	n.d.
ADAM9	ADAM metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma).	1.980	6.31E-05	n.d.
HES6	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila).	1.695	3.45E-04	n.d.
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila).	1.505	3.53E-03	n.d.
ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19 (meltrin beta).	1.457	1.82E-03	n.d.
HES5	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila).	1.391	3.02E-02	n.d.
JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome).	1.346	5.42E-05	n.d.
DNER	delta-notch-like EGF repeat-containing transmembrane.	<u>0.488</u>	3.28E-03	n.d.

Cell death and growth

GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma.	2.386	5.1E-06	n.d.
EMP1	epithelial membrane protein 1.	2.226	4.5E-05	n.d.
NALP1	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 1.	2.078	2.2E-05	n.d.
GAS1	growth arrest-specific 1.	2.061	3.4E-04	n.d.
FOXO3A	forkhead box O3A.	1.592	6.88E-06	2.865 0.029
PEA15	phosphoprotein enriched in astrocytes 15.	1.532	1.24E-07	n.d.
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha.	1.444	4.57E-05	n.d.
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1).	1.349	2.6E-05	3.555 0.0315
CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18).	1.320	8.6E-04	6.840 0.0125
DIP	death-inducing-protein.	1.320	1.51E-05	n.d.
GAS6	growth arrest-specific 6, transcript variant 2.	1.318	6.18E-06	n.d.
PDCD6	programmed cell death 6.	1.303	1.84E-06	n.d.
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta.	1.299	9.40E-03	n.d.
FASTK	Fas-activated serine/threonine kinase, transcript variant 1.	1.277	2.00E-05	n.d.
QSCN6L1	quiescin Q6-like 1.	1.217	1.1E-04	n.d.
PCNA	proliferating cell nuclear antigen.	<u>0.765</u>	1.1E-03	<u>0.538</u> 0.023
DEK	DEK oncogene (DNA binding).	<u>0.627</u>	6.02E-06	n.d.

Neuronal development and differentiation

GABBR2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2.	6.352	2.2E-05	n.d.
NXPH1	neurexophilin 1.	3.031	1.2E-04	n.d.
EPHA4	EPH receptor A4.	2.259	9.5E-08	n.d.
ENC1	Ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain).	2.181	5.0E-04	n.d.
FHL1	four and a half LIM domains 1.	2.168	1.4E-04	n.d.

COBL	cordon-bleu homolog (mouse).	2.158	3.5E-03	n.d.	
SEMA6A	sema domain, (semaphorin) 6A.	2.035	9.1E-08	n.d.	
FGF13	fibroblast growth factor 13 (FGF13).	1.243	4.18E-04	n.d.	
Astrocyte phenotype					
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3.	2.419	5.60E-05	n.d.	
GFAP	glial fibrillary acidic protein.	2.006	5.90E-07	n.d.	
METRN	meteorin, glial cell differentiation regulator.	1.439	3.60E-03	n.d.	
ROD1	ROD1 regulator of differentiation 1.	<u>0.674</u>	1.55E-06	n.d.	
Oligodendrocyte phenotype					
OMG	oligodendrocyte myelin glycoprotein.	2.042	2.1E-08	n.d.	
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha.	2.017	9.2E-05	n.d.	
Stem cell identity					
NUMBL	numb homolog (Drosophila)-like.	<u>0.707</u>	1.3E-06	n.d.	
CD133	prominin 1 (PROM1).	<u>0.687</u>	5.7E-07	<u>0.01</u>	0.0001
BMI1	polycomb group ring finger 4 (PCGF4).	<u>0.325</u>	6.0E-14	<u>0.01</u>	0.0002

GBM cells (from two independent tumors) were infected or not with scrambled virus or shBMI1#3. Cells were maintained in culture at high density (2.5×10^4 cells/ml) in neural stem cell media. No relevant differences in gene expression were detected between non-infected and scrambled shRNA-expressing cells. Data were analyzed using the FlexArray software and were expressed as fold change (Array column) over values in scrambled shRNA-infected cells. Data were validated by Real-Time PCR (qPCR column) for some transcripts.

Values underlined are for genes whose expression were downregulated.

n.d., Not determined.

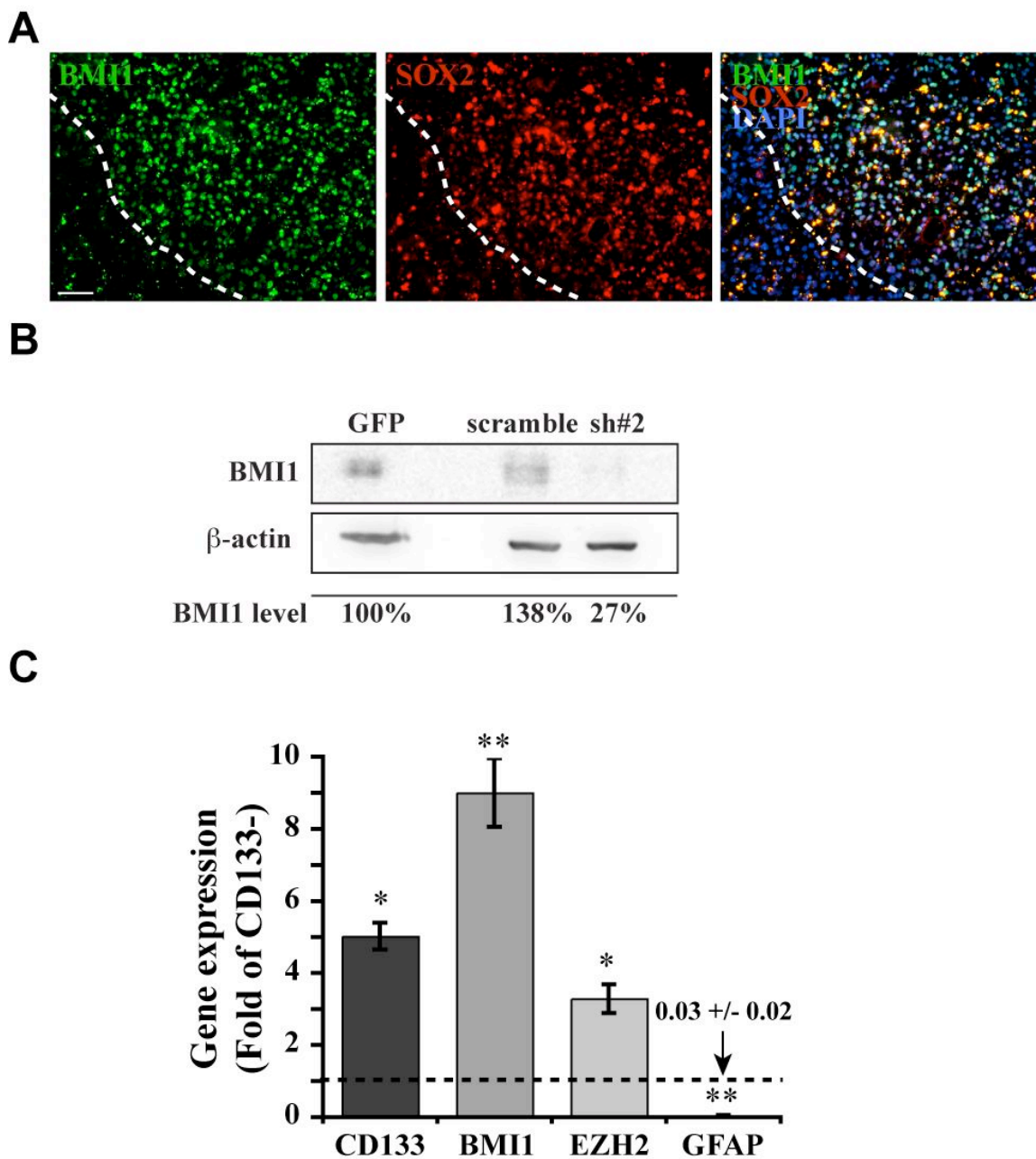
Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1. BMI1 is co-expressed with SOX2 in GBM tumors. **A.** Frozen GBM sample was immunolabeled with antibodies against BMI1 (green) and SOX2 (red). DAPI (blue) stain nuclei. Dashed line delineates the border of the tumoral tissue. **B.** Western blot analysis performed on two shBMI1-, or empty virus-infected 293T using anti-BMI1 and anti- β -actin antibodies. β -actin was used as an internal standard and is used for BMI1 level quantification. **C.** CD133⁻ and CD133⁺ purified GBM cells with CD133-coupled magnetic beads were analyzed by Real-Time PCR for the expression of *PROMININ (CD133)*, *BMI1*, *EZH2* and *GFAP* transcripts. Data are expressed as fold change over gene expression in negative cells (CD133⁻) which was set at 1. Results are Mean \pm s.d. (n = 3; *P<0.05; **P<0.01). Scale bar is 60 μ m.

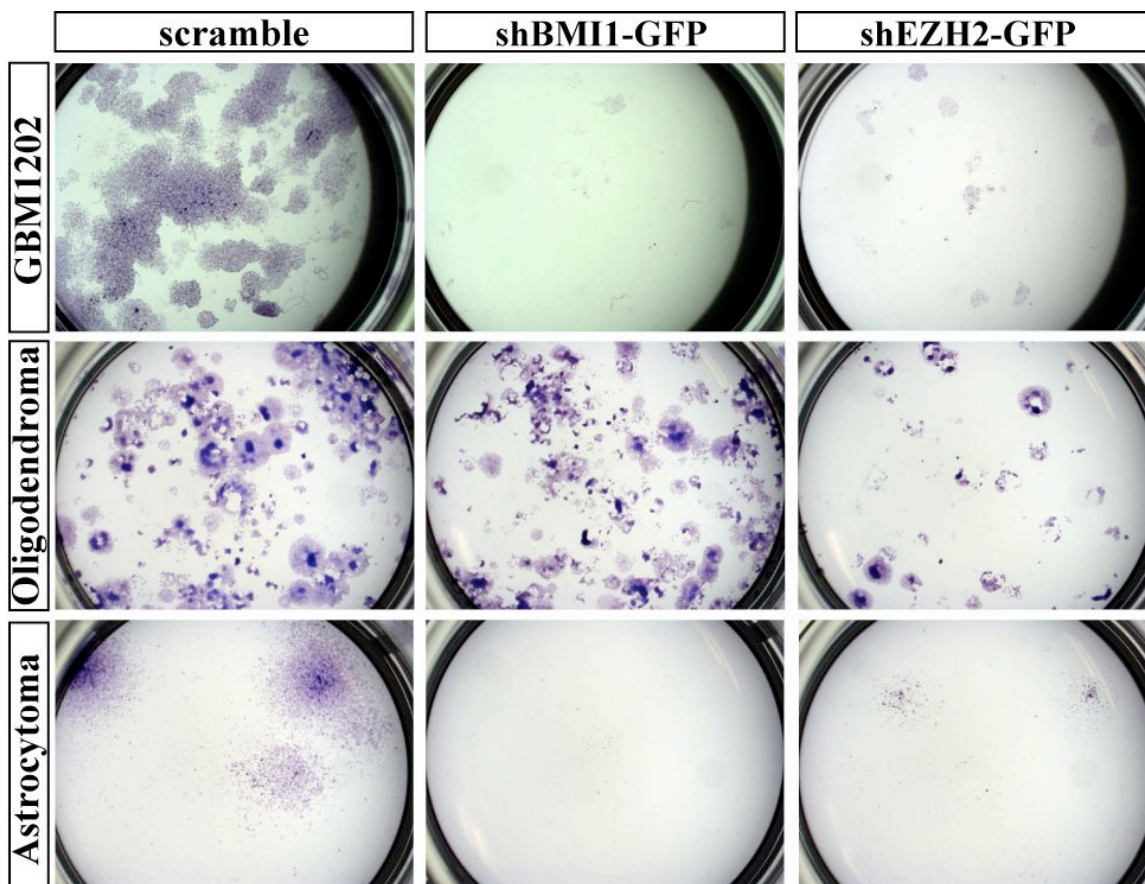
Supplementary Figure 2. BMI1 or EZH2 knockdown reduces GBM cells clonogenic potential. ShBMI1, ShEZH2 or scramble-infected GBM, oligodendroma or astrocytoma cells were plated on Matrigel substrat and allowed to grow for 10 days. Cultures were fixed and stained with Cresyl Violet, and phase contrast micrographs were taken.

Supplementary Figure 3. Xenotransplant tumors exhibited histological features and markers expression of the original tumors. Formalin-fixed paraffin-embedded sections of tumors or mice brain injected with scrambled-virus-infected GBM cells were stained with hematoxylin/eosin (**A, B, E, F, I, J, M, N**), or immunolabeled with anti-GFAP antibodies (**C, D, G, H, K, L, O, P**). Scale bars; 100 μ m (**A, E**), 50 μ m (**C, G, I, K, M, O**), 25 μ m (**B, D, F, H, J, L, N, P**).

Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 3.

