

|

Université de Montréal

**Rôle du gène Polycomb *BMI1* dans le maintien et la
radiatorésistance des cellules souches cancéreuses**

par
Sabrina Facchino

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

Septembre, 2010

© Sabrina Facchino, 2010

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Rôle du gène Polycomb *BMI1* dans le maintien et la radiorésistance des cellules souches
cancéreuses

Présentée par :
Sabrina Facchino

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Elliot Drobetsky, président-rapporteur
Dr. Gilbert Bernier, directeur de recherche
Dr. Estelle Schmitt, membre du jury
Dr. David Fortin, examinateur externe
Dr. Richard Bertrand, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale la plus commune et létale chez l'adulte. Malgré les avancées fulgurantes dans la dernière décennie au niveau des thérapies contre le cancer, le pronostic reste inchangé. Le manque de spécificité des traitements est la cause première de la récurrence de cette tumeur. Une meilleure compréhension au niveau des mécanismes moléculaires et biologiques de cette tumeur est impérative. La découverte des cellules souches cancéreuses (CD133+) au niveau du GBM offre une nouvelle opportunité thérapeutique contre cette tumeur. Effectivement, les cellules CD133+ seraient responsables de l'établissement, le maintien et la progression du GBM. De plus, elles sont également la cause de la résistance du GBM faces aux traitements de radiothérapies. Ces cellules représentent une cible de choix dans le but d'éradiquer le GBM. L'oncogène BMI1 a été associé à plusieurs types de tumeurs et est également essentielle au maintien de différentes populations de cellules souches normales et cancéreuses. Une forte expression de BMI1 est observée au niveau du GBM et plus précisément, un enrichissement préférentiel de cette protéine est noté au niveau des cellules CD133+. L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer le rôle potentiel de BMI1 dans le maintien et la radiorésistance des cellules souches cancéreuses (CSC), CD133+ du GBM. La fonction principale de BMI1 est la régulation négative du locus INK4A/ARF. Ce locus est impliqué dans l'activation de deux voies majeurs anti-tumorales : P53 et RB. Or, la perte de BMI1 induit *in vitro* une diminution des capacités prolifératives, une augmentation de la différenciation et de l'apoptose, ainsi qu'une augmentation de la radiosensibilité des CSC du GBM indépendamment de la présence du locus INK4A/ARF. Effectivement, deux tumeurs sur trois possèdent une délétion de ce locus, ce qui suggère que BMI1 possède d'autre(s) cible(s) transcriptionnelle(s). Parmi ces nouvelles cibles ont retrouvé la protéine P21, un régulateur négatif du cycle cellulaire. De plus, la perte de BMI1 inhibe l'établissement d'une tumeur cérébrale lors d'études de xénotransgreffe chez la souris NOD/SCID. Également, une nouvelle fonction de BMI1 indépendante de son activité transcriptionnel a été démontrée. Effectivement, suite à l'induction d'un bris double brin (BDB) de l'ADN, BMI1 est rapidement recruté au niveau de la lésion et influence le recrutement des protéines de reconnaissance du dommage à l'ADN. La perte de BMI1 mène à un défaut au niveau de la reconnaissance et la réparation de l'ADN, alors que sa surexpression induit plutôt une augmentation de ces mécanismes et procure une radiorésistance. Ces résultats décrivent pour la première fois l'importance de BMI1 au niveau du maintien, de l'auto-renouvellement et la radiorésistance des CSC du GBM. Ainsi, ces travaux démontrent que la protéine BMI1 représente une cible thérapeutique de choix dans le but d'éradiquer le GBM, une tumeur cérébrale létale.

Mots-clés : glioblastome multiforme (GBM), cellules souches cancéreuses (CSC), BMI1, auto-renouvellement, dommage à l'ADN, radiorésistance

Abstract

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common and lethal primary brain tumor found in adults. Despite the advances made in the field of cancer therapy in the last decade, the median survival rate remains less than a year. Therefore, a better understanding of the molecular biology of GBM will reveal the mechanisms responsible for the initiation and progression of the tumor, and allow the development of new therapeutic strategies. GBM contains a minority cell population, characterized by tumor initiating cells expressing the stem cell marker, CD133. The CD133+ GBM cells are responsible for tumor initiation, maintenance, progression and resistance to chemo/radiotherapy. The CD133+ cells represent a valuable and specific therapeutic target against GBM. The Polycomb (PcG) group family of transcriptional repressors have been involved in a vast range of cancers. The PcG protein and oncogene BMI1 is the best-characterized PcG protein. The implication of BMI1 in normal and cancer stem cell survival, self-renewal and maintenance has been thoroughly investigated. BMI1 is highly expressed in GBM and more precisely; it is enriched specifically in CD133+ cell populations. The main goal of this thesis was to elucidate the potential role of BMI1 in GBM CD133 + cancer stem cell (CSC) maintenance and radioresistance. The main function of BMI1 is to repress the expression of the genes encoded by the INK4A/ARF locus, which is implicated in the activation of two major tumor suppressor pathways, P53 and RB. However, BMI1 depletion *in vitro* induces a reduction in proliferation potential, as well as an increase in differentiation, apoptosis, and radiosensitivity regardless of INK4A/ARF status. Indeed, two-thirds of all tumors possess a deletion of this locus, suggesting that BMI1 regulates other targets. P21, a cell cycle regulator, was identified as a new BMI1 target. Moreover, we have observed that the loss of BMI1 inhibits the establishment of a cerebral tumor in a xenograft mouse model. In addition to transcription related activity, we identified a new transcription independent function of BMI1. After the induction of a DNA double-strand-break, BMI1 is rapidly recruited to the damage site and influences the recruitment of DNA damage response proteins. Furthermore, defects in DNA damage recognition and repair are observed after BMI1 knockdown. Consistent with these results, BMI1 overexpression induces DNA damage response and increases radioresistance potential. These results emphasize for the first time the requirement of BMI1 for the maintenance, self-renewal, and radioresistance in GBM CSC, thus providing a potential target for future therapeutic strategies against GBM.

Keywords: GBM, CSC, BMI1, self-renewal, DNA damage, radioresistance.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	xii
Remerciements	xix
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION : SECTION 1	1
Les cellules souches neurales	1
1.1.1 Le système nerveux central (SNC)	3
a) Le développement du SNC chez le mammifère.....	3
b) Les différents types cellulaires qui constituent le SNC	5
1.1.2 Les cellules souches neurales.....	8
a) Définition et caractéristiques d'une cellule souche.....	8
b) Les cellules souches neurales : de l'embryon à l'adulte.....	10
c) Les différents mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement et le maintien des CSN.....	15
d) Les systèmes de cultures des CSN et leur maintenance à long terme <i>in vitro</i>	17
1.1.3 La théorie des cellules souches cancéreuses	19
INTRODUCTION : SECTION 2	22
Gène Polycomb : BMI1	22
1.2.1 La famille des gènes Polycomb	23
a) L'origine des gènes Polycomb.....	23
b) Les complexes PcG.....	24
c) Mécanisme d'action des PcGs	27

d) PcG et les cellules souches	31
1.2.2 L'oncogène BMI1	34
a) La protéine BMI1	34
b) Phénotype de la souris <i>Bmi1^{-/-}</i>	37
c) <i>Bmi1</i> et les cellules souches.....	37
d) <i>Bmi1</i> et le cancer	39
INTRODUCTION : SECTION 3	42
Glioblastome multiforme.....	42
1.3.1 Les tumeurs primaires du SNC	43
1.3.2 Le Glioblastome Multiforme (GBM).....	45
a) La hiérarchie selon l'OMS.....	45
b) Glioblastome multiforme primaire vs secondaire.....	46
c) Voies moléculaires altérées dans le GBM	48
.....	54
e) La cellule à l'origine de la tumeur	57
f) Les modèles animaux	58
g) Les stratégies thérapeutiques contre le GBM	60
INTRODUCTION : SECTION 4	63
Domage à l'ADN	63
1.4.1 Les différents types de lésions à l'ADN	64
1.4.2 Les différents mécanismes de reconnaissance du dommage à l'ADN	67
a) Reconnaissance des bris doubles brins (BDB) par ATM	67
b) Reconnaissance des bris simples brins (BSB) par ATR.....	69
c) Reconnaissances des autres types de dommages à l'ADN	72
1.4.3 Les différents mécanismes de réparation des dommages à l'ADN	73
a) Réparation d'un dommage à l'ADN au niveau des bases.....	73
b) Réparation d'un dommage au niveau des brins de l'ADN	75
1.4.4 Domage à l'ADN et GBM.....	77
CHAPITRE 2.....	85

ARTICLE #1	85
BMI1 sustains human glioblastoma multiform stem cell renewal.....	85
Abstract	87
Introduction	88
Materials and methods	90
Results	99
BMI1 and EZH2 are highly enriched in CD133 ⁺ GBM cells	99
<i>BMI1</i> is not amplified in GBM tumors	101
BMI1 knockdown inhibits colony growth and leads to CD133 ⁺ cells depletion	101
Cell density modulates CD133 ⁺ cell survival	103
BMI1 is required for brain tumor formation in xenografts	104
BMI1 regulates multiple cellular pathways	105
Discussion	107
What is the mechanism of BMI1 up-regulation in GBM tumors?.....	107
BMI1 in glioma subtypes	108
BMI1 prevents immunogenicity and differentiation of GBM stem cells	108
BMI1 prevents cell cycle exit and apoptosis of GBM stem cells	109
EZH2 in brain tumors.....	111
References	113
Figure Legends.....	121
CHAPITRE 3.....	142
ARTICLE #2.....	142
BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery	142
SUMMARY	144
INTRODUCTION.....	145
EXPERIMENTAL PROCEDURES	147
RESULTS	155
CD133 ⁺ cells can generate brain tumors and are radioresistant	155

BMI1 is a component of the DNA damage response machinery	155
ATM co-purification with BMI1 is partially dependent on ATM phosphorylation ..	157
BMI1 preferentially co-purifies with NHEJ proteins in CD133+ cells	158
BMI1 focal accumulation is independent of <i>ATM</i> , <i>Mdc1</i> or <i>NBS1</i>	159
BMI1 knockdown impairs DNA damage recognition and repair in GBM cells.....	160
Partial BMI1 knockdown impairs the radioresistance of GBM cells	160
BMI1 over-expression improves ATM recruitment, DNA repair and radioresistance	162
BMI1 activity in DNA DSB response is independent of P53	164
<i>Bmi1</i> is required for efficient DNA damage response/repair in mouse cells	164
DISCUSSION	166
BMI1 inactivation impairs DNA DSB response	166
What is the role of BMI1 in DNA DSB response?	167
BMI1 may allow DNA repair at the heterochromatin	168
Cancer, aging and DNA repair	169
ACKNOWLEDGMENT	171
REFERENCES	172
FIGURE LEGENDS	179
CHAPITRE 4.....	200
Discussion, perspectives et conclusions	200
Article 1 : BMI1 sustains Human Glioblastoma Multiforme stem cell renewal.....	202
BMI1 : un marqueur tumoral	202
BMI1 est requis pour le maintien des cellules souches cancéreuses (CD133+) du GBM indépendamment du locus INK4A/ARF	203
BMI1 régule diverses voies moléculaires au niveau des CSC du GBM.....	204
BMI1 est essentiel à l'établissement d'une tumeur <i>in vivo</i>	207
Article 2 : BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery.....	211
GBM et la radiorésistance	211

BMI1: un nouveau partenaire impliqué dans la réponse face aux BDB de l'ADN ...	211
BMI1 est requis dans le mécanisme de reconnaissance des BDB de l'ADN	213
BMI1 procure une radiorésistance indépendamment de P53.....	214
BMI1 : une double fonction dans les dommages à l'ADN	215
Rôle de BMI1 dans le dommage à l'ADN : les modèles	216
Conclusion globale.....	218
Références	220

Liste des tableaux

Tableau I.I	Tableau comparatif de différents types de CSN durant le développement et chez l'adulte.....	80
Tableau I.II	Résumé des différentes voies moléculaires impliquées au niveau des cellules souches normales et cancéreuses.....	81
Tableau I.III	Membres des complexes PcGs chez la drosophile, l'humain et la souris....	82
Tableau I.IV	Classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) par l'organisation mondiale de la santé (OMS).....	83
Tableau I.V	Énumération des différents types de tumeurs Neuroépithéliales.....	83
Tableau I.VI	Énumération et caractérisation de différentes maladies associées à des défauts au niveau de la reconnaissance ou de la réparation des dommages à l'ADN.....	84
Tableau VII	Énumération des différents types de dommage au niveau des bases de l'ADN, de leurs lésions communes associées, des mécanismes de réparation correspondant et les enzymes impliquées dans l'excision de la lésion.....	85
Tableau II.I	BMI1 knockdown induces an upregulation of critical cell death, growth arrest and cell differentiation pathways.....	127
Supp. Tableau II.I	BMI1 knockdown induces upregulation of critical cell survival, growth arrest and cell differentiation pathways.....	136

Liste des figures

Fig 1.1	Représentation schématique des différentes parties du tube neural durant le développement embryonnaire.....	5
Fig 1.2	Représentation des différents modes de divisions d'une cellule souche.....	9
Fig 1.3	Schéma représentant les différents types de cellules souches présentes durant la neurogénèse et chez l'adulte.....	15
Fig 1.4	Représentation des différents complexes PcGs chez les mammifères.....	27
Fig 1.5	Représentation schématique illustrant les différents modes de répression géniques induits par les PcGs.....	29
Fig 1.6	Représentation schématique illustrant les modes de recrutement hypothétiques des PcGs chez la drosophile et les mammifères.....	31
Fig 1.7	Schéma illustrant la cascade de la répression du locus INK4a/ARF par Bmi1 au niveau des cellules souches.....	36
Fig 1.8	Schéma illustrant les différentes cibles potentielles de Bmi1 impliqué dans le maintien des cellules souches.....	39
Fig 1.9	Représentation des altérations majeures au niveau de l'initiation et la progression des GBM primaire et secondaire.....	48
Fig 1.10	Schématisation de l'origine et des différents types de GBM et leurs altérations génétiques.....	53
Fig 1.11	Représentation des trois principales voies de signalisations les plus altérées au niveau du GBM.....	54
Fig 1.12	Schématisation des différentes voies moléculaires communes aux CSN et CSC neurales.....	57
Fig 11.3	Représentation schématique des différentes formes de dommages au niveau d'une base de l'ADN.....	66
Fig 1.14	Modélisation du mécanisme de reconnaissance du dommage double brin de l'ADN.....	69

Fig 1.15	Modélisation du mécanisme de reconnaissance du dommage simple brin de l'ADN par ATR.....	71
Fig 1.16	Schématisation du mécanisme de réparation de l'ADN par BER (Base Excision Repair).....	74
Fig 1.17	Modélisation du mécanisme de réparation des dimères de pyrimidine par NER (Nucleotide Excision Repair).....	75
Fig 1.18	Modélisation simplifiée des mécanismes de réparation des bris doubles brins de l'ADN : HR et NHEJ.....	77
Fig 2.1	Glioblastoma multiform tumors express BMI1 and EZH2.....	129
Fig 2.2	BMI1 and EZH2 are highly enriched in CD133 ⁺ cells.....	130
Fig 2.3	BMI1 or EZH2 knockdown reduces GBM cells clonogenic potential and leads to depletion of the CD133 ⁺ cell population.....	131
Fig 2.4	High cell culture density prevents CD133 ⁺ cell depletion upon BMI1 knockdown.....	132
Fig 2.5	BMI1 is required for intra-cranial GBM tumor formation.....	133
Fig 2.6	Engrafted tumors resemble the tumor of origin and retain PcG proteins expression.....	134
Fig 2.7	BMI1 promotes GBM tumor formation and stem cell renewal by blocking alternate tumor suppressor pathways.....	135
Suppl. Fig 2.1	BMI1 is co-expressed with SOX2 in GBM tumor.....	140
Suppl. Fig 2.2	BMI1 or EZH2 knockdown reduces GBM cells clonogenic potential.....	141
Suppl. Fig 2.3	Xenotransplant tumors exhibited histological features and markers expression of the original tumors.....	142
Fig 3.1	CD133 ⁺ GBM cells can generate brain tumors.....	186
Fig 3.2	BMI1 interacts with the DNA damage response machinery.....	187
Fig 3.3	BMI1 co-purifies with the NHEJ proteins.....	188
Fig 3.4	BMI1 focal accumulation is independent of ATM, NBS1 or Mdc1.....	189

Fig 3.5	BMI1 deficiency impairs the DNA damage response.....	190
Fig 3.6	BMI1 is required for GBM cells radiorésistance.....	191
Fig 3.7	BMI1 over-expression improves DNA DSB response, DNA repair efficiency and radioresistance of human NSCs.....	192
Fig 3.8	BMI1 function is independent of P53.....	193
Fig 3.9	Bmi1 deficiency results in defective DNA damage response.....	194
Suppl. Fig. 3.1	GBM cell lines status.....	197
Suppl. Fig. 3.2	BMI1 co-localizes with p-ATM, MDC1 and γ H2AX after irradiation...	198
Suppl. Fig. 3.3	Characterization of human neural stem cells.....	199
Suppl. Fig.3.4	BMI1 over-expression induces chromatin remodeling and compaction..	200
Fig 4.1	Modèle illustrant l'importance de BMI1 <i>in vivo</i> dans le GBM.....	210
Fig 4.2	Modèle représentant la régulation de différentes voies par BMI1 afin d'assurer le maintien et le potentiel tumorigénique des CSC du GBM.....	211
Fig 4.3	Modèles représentant différents modes de recrutements hypothétiques de BMI1 suite à l'induction d'un BDB de l'ADN.....	219

Liste des sigles et abréviations

Abréviation	Signification
3pK	MAPKAP kinase 3
53BP1	<i>53 binding protein</i>
9-1-1	RAD9-RAD1-HUS1
ADNsb	ADN simple brin
AP	site abasique de l'ADN
Ara-C	cytosine- β -D-arabinofuranoside
AT	Ataxia-telangiectasia
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and RAD3-related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
BDB	bris double brin
BER	<i>Base excision repair</i>
BLBP	<i>Brain lipid-binding protein</i>
BLM	<i>Bloom syndrome protein</i>
BMI1	<i>B cell-specific Moloney murine leukaemia virus Interaction site 1</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BP	progéniteur basal
BRCA1	BReast CAncer 1
BrdU	5-bromo-2-déoxyuridine
BSB	bris simple brin
CD133	pominin-1
CDK	<i>cyclin-dependent-kinase</i>
CDKI	<i>cyclin-dependent-kinase-inhibitor</i>
ChIP	Immunoprécipitation de la chromatine
Chk1/2	<i>Checkpoint kinase</i>

CKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CPD	<i>cyclobutane pyrimidine dimer</i>
CSC	cellule souche cancéreuse
CSH	cellule souche hématopoïétique
CSN	cellule souche neurale
Cyto.C	Cytochrome C
DDR	<i>DNA damage response</i>
Dll1	Delta-like 1
DNA-PKcs	<i>DNA protein kinase catalytic subunit DNA protein kinase catalytic subunit</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase</i>
DSB	<i>Double strand break</i>
E(Z)	<i>Enhancer of zeste</i>
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
EGFR	<i>Epithelial growth factor receptor</i>
EGL	couche germinale externe
ES	cellule souche embryonnaire
Esc	<i>Extra sex combs</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor</i>
GBM	Glioblastome multiforme
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acid Protein</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
GNER	<i>Global Nucleotide Excision Repair</i>
GNP	Progéniteur neural granulaire
H1K26	Lysine 26 de l'histone 1
H2A	Histone 2A
γ H2AX	Histone 2AX phosphorylée

H3	Histone 3
H3K14ac	Lysine 4 acétylée de l'histone 3
H3K27me3	Lysine 27 triméthylée de l'histone 3
H3K9me3	Lysine 9 triméthylée de l'histone 3
H4	Histone 4
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HGF/SF	<i>Hepatocyte growth factor/scatter factor</i>
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
HLA	antigènes des leucocytes humain
HMT	Histone Méthyltransferase
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i>
HR	Recombinaison homologue
hTERT	téломérase transcriptase inverse humaine
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
IAP	Protéines Inhibitrices de l'Apoptose
IL-2	Interleukine-2
IP	Immunoprécipitation
IR	Irradiation γ
LHX	<i>LIM/homeobox protein</i>
LIF	<i>leukemia-inhibitory factor</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
MB	Medulloblastome
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MDM2	Mouse double minute 2
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
miARN	micro-ARN
MRN	Mre11-Rad50-NBS1
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>

ncARN	ARN non-codant
NEP	progéniteur neuroépithélial
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i>
NOD/SCID	<i>Non-obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
NSC	<i>neural stem cell</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P15	INK4B, CDKN2B
P16	INK4A, CDKN2A
P18	INK4C, CDKN2C
P19	P14, ARF
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PAX	<i>Paired-box and homeobox</i>
Pc	Polycomb
PcG	<i>Polycomb group protein</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFr	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PH	Polyhomeotic
PH3	phospho-histone 3
Pho	Pleihomeotique
PhoRC	<i>Pho répressive complex</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinases</i>
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase related kinase</i>
PolII	ARN polymérase II
PRC	<i>Polycomb repressive complexes</i>
PRE	<i>Polycomb Response Element</i>
PSC	Posterior sex combs

Ptc	Patched
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
RCAS	réplication-competent avian sarcoma
RG	cellule glie-radiale
RNF2	Ring1B
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
S100 β	<i>S100 calcium binding protein B</i>
SET	(Su(var)-3-9, Enhancer of zeste, Thritorax)
SHH	Sonic Hedgehog
shRNA	<i>short-hairpin RNA</i>
Sirt1	Sirtuin 1
Smo	<i>Smoothened</i>
SNC	Système nerveux central
SSEA1	<i>Stage-specific embryonic antigen 1</i>
Suz12	<i>Supressor of zeste</i>
SGZ	zone sub-granulaire
SVZ	zone sub-ventriculaire
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCNER	<i>transcription-coupled nucleotid excision repair</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TK	Thymidine kinase
TOPBP1	<i>Topoisomerase-binding protein 1</i>
TrxG	<i>Trithorax group protein</i>
UV	ultra-violet
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFr	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WRN	<i>Werner syndrome ATP-dependent helicase</i>

XP	Xeroderma Pigmentosum
YY1	Ying yang 1
γ	gamma

À ma famille et mes amis

Remerciements

Je voudrais premièrement remercier mon directeur de thèse, Dr Gilbert Bernier, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Sans son aide précieuse, ses compétences scientifiques et sa patience cette thèse n'aurait pas pu aboutir. Il a su m'inculquer sa passion et son enthousiasme envers la recherche. Grâce à ces encouragements, j'ai pu accomplir tous ces travaux présentés dans le cadre de cette thèse qui ont mené à deux publications de haut calibre.

Je remercie le Dr Mohamed Abdouh pour sa grande compréhension, sa patience, sa disponibilité et sa contribution scientifique significative à mes travaux. Dr Abdouh a su me guider à travers le cheminement ardu du doctorat et me supporter dans les bons et mauvais moments. Je l'admire pour avoir su conserver sa patience lors de mes surplus énergétiques occasionnels. Je tiens également à remercier sincèrement mes collègues de travail. Je n'aurais pas pu passer à travers mon doctorat sans leur support et l'humour qu'ils ont apporté chaque jour au laboratoire.

Finalement, je tiens à remercier spécialement mes parents, ma famille et mes amis pour m'avoir épauler tout au long de mes études et pour avoir tenter mainte fois de comprendre mon projet de recherche. Je vous aime tous profondément.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION : SECTION 1

Les cellules souches neurales

Le chapitre 1 constitue une revue de la littérature et est divisé en 4 sections. La première section décrit le développement du système nerveux central et porte une attention particulière aux cellules souches neurales durant la neurogénèse et l'adulte. La seconde section résume le rôle et la fonction des gènes de la famille Polycomb et plus particulièrement de l'oncogène BMI1. La troisième section définit la biologie et la génétique du Glioblastome Multiforme. La dernière section est consacrée aux dommages à l'ADN et les mécanismes de reconnaissance et de réparation de ces lésions.

1.1.1 Le système nerveux central (SNC)

a) Le développement du SNC chez le mammifère

Le système nerveux central (SNC) est représenté par les parties du système nerveux qui se retrouvent enfermées dans des structures osseuses : le cerveau et la moelle épinière [1]. Au cours du développement, la gastrulation représente une des étapes primordiales de l'embryogénèse. La gastrulation se caractérise par la formation des trois couches germinales primaires soit le mésoderme, ectoderme et l'endoderme [2, 3]. De ces trois couches va se former l'organisme tel que l'on connaît. Du mésoderme vont se former les os, le système musculaire et la vascularisation du système hématopoïétique. Les parois des organes internes (les viscères) vont se former à partir de l'endoderme et finalement de l'ectoderme va se former le système nerveux et la peau [1, 4]. Le développement des différentes couches germinales est un processus dynamique qui est contrôlé, en partie, par la coordination de l'activation et répression spatiotemporelle des gènes de la voie Wnt, TGF β , Nodal et BMP [4, 5]. Suite à la gastrulation, le neuroectoderme va se former à partir de la région dorsale de l'ectoderme et va constituer la plaque neurale. À ce stade, la plaque neurale ne constitue qu'une simple couche de cellules aplaties. L'étape suivante, la neurulation, se traduit par la formation du tube neural. Brièvement, les cellules du mésoderme dorsal entourant la plaque neurale vont induire une invagination dans celle-ci, un sillon de la partie rostrale à la partie caudale de la plaque neurale. Par la suite, la région dorsale du sillon va se refermer et ainsi former le tube neural [6-10]. Le système nerveux en entier se forme à partir des parois du tube neural. De la région rostrale ou antérieure du tube neural va naître le cerveau. Au cours de la différenciation, processus durant le développement où les structures deviennent plus élaborées et spécialisées, à partir du tube neural antérieur va se former les trois vésicules primitives du cerveau: le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau médian) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). La vésicule la plus rostrale, le prosencéphale, se divise en trois vésicules

secondaires appelées la vésicule optique (formant la rétine et nerf optique), le diencephale (formant le thalamus et l'hypothalamus) et le télencéphale (formant le bulbe olfactif, le cortex cérébral, le télencéphale basal, le corps calleux et la substance blanche). À partir du mésencéphale vont se former le tectum, tegmentum et l'aqueduc cérébral, alors que vont naître du rhombencéphale le cervelet, le pont, la quatrième ventricule et le bulbe rachidien. Finalement, la région caudale du tube neural va permettre la formation de la moelle épinière. Ainsi naît de la différenciation des régions rostrale et caudale du tube neural le SNC [1, 11-13] (Figure 1).

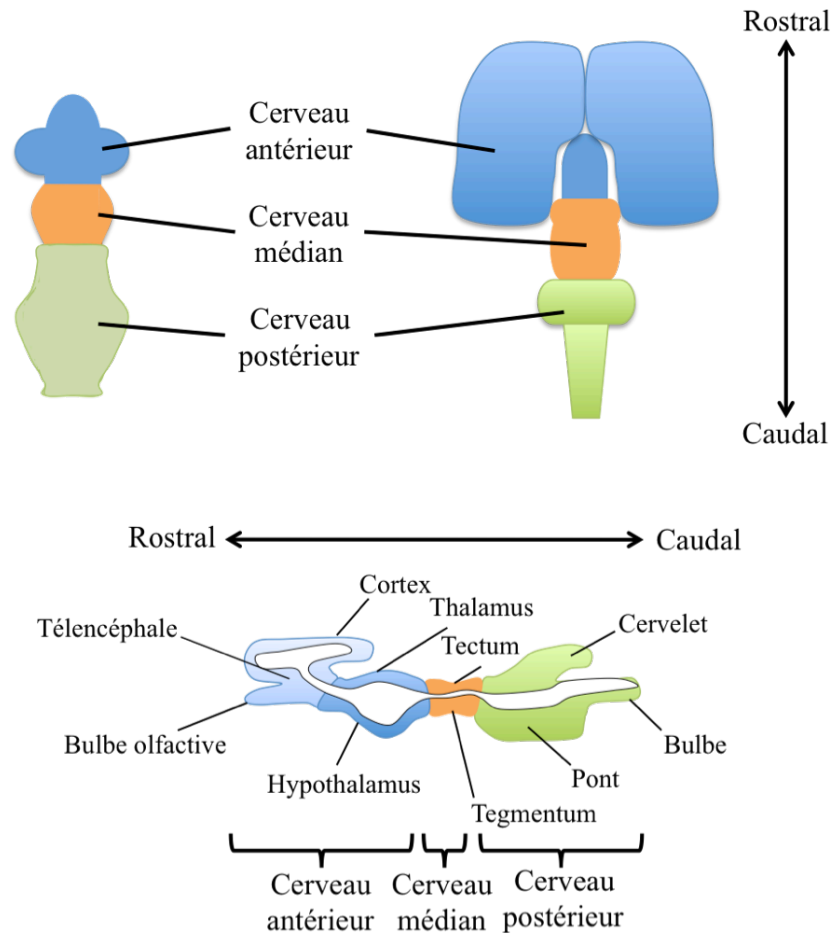


Figure 1 Représentation schématique des différentes parties du tube neural durant le développement embryonnaire. Adapté du livre de Bear M.F. (2007) Neurosciences: Exploring the brain. 3e édition ed., Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

b) Les différents types cellulaires qui constituent le SNC

Le cerveau constitue l'organe le plus sophistiqué et complexe que la nature ait inventé. Il est constitué principalement de deux groupes cellulaires soit les neurones et les cellules

gliales. L'une des plus grandes différences entre ces deux groupes outre leur fonction porte sur leur quantité. En effet, alors que l'on retrouve une quantité presque infinie de neurones dans le cerveau humain (un peu plus de 100 milliards), on y retrouve 10 fois plus de cellules gliales. Malgré leur plus faible population, les neurones restent les principaux acteurs du cerveau de par leur implication dans les fonctions cérébrales alors que les cellules gliales soutiennent plutôt les neurones en les isolant, les protégeant et les nourrissant [1].

La véritable nature du neurone a été mise en valeur pour la première fois grâce à la méthode de la coloration de Golgi en 1873 par Camillo Golgi [14]. Ainsi pour la première fois, il était possible d'observer l'organisation et la structure du neurone. Par la suite, le talent artistique de Santiago Ramon y Cajal a permis de mettre en évidence l'incroyable complexité que constitue les circuits neuronaux [15-18]. Les neurones du SNC peuvent être classés de plusieurs façons. Leur classification peut être basée sur le nombre de neurites (unipolaire, bipolaire et multipolaire), sur le nombre de dendrite (cellules pyramidales ou stellaires), sur les types connexions (neurones sensoriels, moteurs et interneurones), sur la longueur des axones (Golgi de type I ou II) et finalement selon les neurotransmetteurs qu'ils libèrent. La classification basée selon le type de neurotransmetteurs est la seule méthode qui permet de distinguer les neurones sur un aspect biochimique, alors que les autres types de classification se basent plutôt sur des aspects morphologiques du neurone. Par exemple, les neurones impliqués dans la contraction musculaire libèrent tous de l'acétylcholine. Ils sont par conséquent classés dans la catégorie des neurones cholinergiques [1].

On distingue parmi les cellules gliales deux types cellulaires soit les astrocytes et les oligodendrocytes/cellules de Schwann [1]. Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses dans le cerveau où ils comblent l'espace situé entre les neurones. Ces cellules représentent l'essentiel de l'environnement qui entoure les neurones. Les astrocytes jouent plusieurs fonctions afin d'assurer le bon fonctionnement des neurones [1]. Au cours du développement, les astrocytes apparaissent après la formation des neurones et jouent un

rôle dans la guidance axonale [19]. Au niveau du cerveau adulte, les astrocytes sont impliqués dans la régulation du flux sanguin du SNC, mais également dans la fonction de la barrière hémato encéphalique [20-23]. Ces cellules sont importantes au niveau de la fonction synaptique des neurones et l'homéostasie de l'environnement synaptique par la régulation des fluides, des ions, des transmetteurs, du pH, l'élimination des déchets métaboliques et par un apport en énergie [24-30]. Ils sont également activés durant la gliose, soit la cicatrisation du tissu neural suite à une lésion. Le biomarqueur de choix utilisé en immunofluorescence et/ou immunohistochimie dans le but d'identifier les astrocytes est la protéine GFAP (*glial fibrillary acid protein*) [31].

Le deuxième type de cellules classées parmi les cellules gliales sont les oligodendrocytes et les cellules de Schwann. Ces cellules sont impliquées dans l'isolation des axones par la formation de la gaine de myéline. La formation de la gaine de myéline favorise l'accélération de la propagation des impulsions nerveuses le long des axones. Les oligodendrocytes sont retrouvés au niveau du SNC et peuvent myéliser plusieurs axones à la fois. Les cellules de Schwann sont plutôt retrouvées au niveau du système nerveux périphérique et peuvent myéliser qu'une seule cellule à la fois [1].

Deux autres types de cellules minoritaires sont retrouvés au niveau du SNC : les cellules épendymaires et les cellules de la microglie. Les cellules épendymaires tapissent la surface des ventricules cérébraux. Ces cellules contribueraient à la migration cellulaire lors du développement du cerveau. Le deuxième type de cellules, la microglie, joue le rôle de phagocytes, c'est-à-dire qu'elles permettent l'élimination des débris procurés par les neurones et les astrocytes en dégénérescence [1].

1.1.2 Les cellules souches neurales

a) Définition et caractéristiques d'une cellule souche

Une cellule souche est définie par deux caractéristiques essentielles qui permettent de les distinguer des autres types cellulaires qui composent l'organisme. Premièrement, une cellule souche est une cellule non-spécialisée qui possède un pouvoir de prolifération illimité dans le temps [32]. Le concept d'auto-renouvellement est défini par la capacité d'une cellule souche à produire une (division asymétrique) ou deux (division symétrique) cellules souches filles identiques à la cellule mère. Cet auto-renouvellement permet à la cellule de se reproduire avec haute fidélité et de maintenir son potentiel développemental et répliatif. La capacité d'une cellule souche à s'auto-renouveler est un élément central au développement, mais également au maintien des tissus adultes. Plusieurs voies moléculaires sont impliquées dans la régulation et le maintien de l'auto-renouvellement, telles les voies Wnt, Notch et Hedgehog. La régulation de la structure de la chromatine par la famille Polycomb, la régulation du cycle cellulaire et l'inhibition des voies développementales sont également essentielles au processus d'auto-renouvellement [33]. La deuxième caractéristique qui définit une cellule souche est sa capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires. La différenciation implique la production d'une cellule fille plus spécialisée, une cellule progénitrice, qui est engagée dans la production de cellules tissus spécifiques. Contrairement aux cellules souches, les cellules progénitrices peuvent se répliquer seulement sur une courte période [32].

Les cellules souches peuvent subir trois types de divisions : symétrique, asymétrique et extinctive. La division symétrique ou expansion permet la production de deux cellules filles identique à la cellule mère et permet une amplification du pool de cellules souches. Le mode de division asymétrique ou de maintenance est caractérisé par la production d'une cellule souche fille et d'une cellule différenciée. Ces deux premiers types de division sont impliqués dans le processus d'auto-renouvellement. La division extinctive est le dernier

mode de division et s'illustre par la formation de deux cellules différenciées, ce qui mène à l'épuisement du pool de cellules souches [33] (Figure 2).

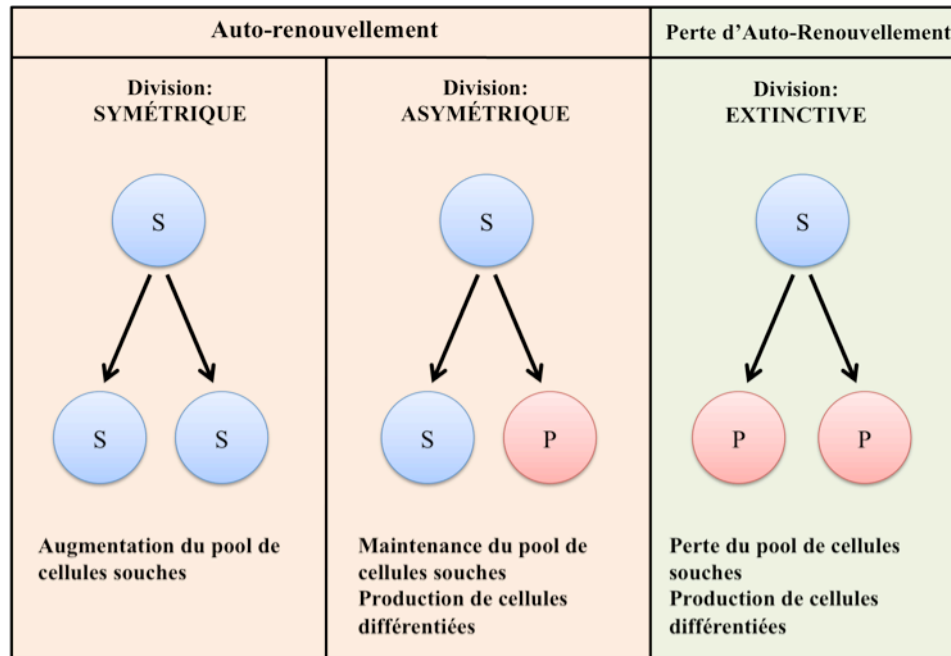


Figure 2 Représentation des différents modes de divisions d'une cellule souche. Modifié de Molofsky A.V. et al. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 : 700-707.

Le potentiel de différenciation d'une cellule souche diffère selon le stade développemental. Lors de la fécondation de l'oocyte par le spermatozoïde, le zygote ainsi formé est composé de cellules souches germinales. Ces cellules souches sont totipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent former toutes les cellules présentes dans un embryon, mais également les cellules contenues dans les tissus extra embryonnaires (le placenta). Au fur et à mesure que le développement embryonnaire avance, les cellules souches deviennent engagées vers des voies spécifiques et leur potentiel développemental est, par conséquent, modifié. Les cellules souches embryonnaires (ES) ont un potentiel de différenciation pluripotent. Elles peuvent donner naissance à toutes les cellules qui composent les trois feuillets primaires

embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme), mais ne peuvent produire de cellules extra embryonnaires. Plus tard dans le développement, on retrouve des cellules souches multipotentes qui sont encore une fois plus engagées, où elles vont pouvoir produire les différentes cellules présentes dans un même organe; par exemple les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et neurales (CSN). Ces cellules dites somatiques sont présentes au stade embryonnaire et adulte. Les cellules souches adultes sont essentielles à l'homéostasie des tissus, où elles permettent de remplacer les cellules d'un tissu lésé, vieillissant ou malade [34].

b) Les cellules souches neurales : de l'embryon à l'adulte.

Les cellules souches neurales (CSN) sont des cellules multipotentes présentes dans le cerveau en développement et adulte. Les CSN vont donner naissance aux neurones et cellules gliales durant le développement et ont un potentiel régénératoire limité au niveau du cerveau adulte. Le terme CSN englobe tous les différents types de cellules souches présentes dans le cerveau en développement et mature. Les différents types de cellules souches neurales interviennent à différents stades, mais également à différents endroits dans le cerveau en développement, soit une différence spatiotemporelle [35, 36]. Les études *in vitro* basées sur des protocoles de cultures impliquant différents facteurs de croissance et mitogènes ont permis l'identification de différentes populations de CSN, mais ont également mené à une meilleure compréhension des propriétés biologiques et moléculaires qui différencient ces CSN.

Chez le mammifère, la neurogénèse débute par l'induction du neuroectoderme, c'est-à-dire la formation de la plaque neurale et par la suite du tube neural. Ces événements correspondent respectivement au jour embryonnaire 7.5 et 8.5 (E7.5 et E8.5) chez la souris. À ce stade, ces structures sont composées d'une monocouche de CSN, soit les progéniteurs neuroépithéliaux (NEP) [37]. Les NEP sont des cellules allongées en contact avec la surface apicale et basale de la monocouche du neuroépithélium et ils expriment différents

marqueurs spécifiques, soit prominin-1 (CD133), Nestine, Sox1, n-Cadhérine, Forse-1 et Pax6. En culture, les NEP forment une rosette et sont dépendants du facteur de croissance exogène FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) [37, 38]. Différentes sous-populations de NEP ont été identifiées *in vitro* (NEP-primitif, NEP-précoce et R-NSC) à partir de la différenciation de cellules ES. Les NEP-primitifs, en culture, sont dépendants du facteur LIF (*leukemia-inhibitory factor*) et expriment le marqueur neural le plus précoce connu, soit SOX1. Cependant, ces cellules expriment toujours le marqueur OCT4, un vestige de l'identité des cellules ES. Ces cellules ne sont donc pas totalement engagées vers la neurogénèse. Elles peuvent être isolées entre les jours E5.5 et E7.5, donc avant la formation de la plaque neurale [39-41]. Les cellules NEP-précoces ont été élaborées à partir d'un protocole d'inhibition des SMAD au niveau de cellules ES humaines. Cependant cette population ne peut être maintenue en culture, puisqu'elle se différencie spontanément en cellules NEP plus tardives (R-NSC) [42]. Les cellules R-NSC croient, elles aussi, sous forme de rosette et sont dépendantes des facteurs de croissances SHH (Sonic Hedgehog) et Notch. Ces cellules correspondent probablement aux cellules NEP que l'on retrouve au niveau de la plaque neurale [43]. Les cellules NEP sont responsables de la production des premiers neurones au niveau du tube neural et par la suite donnent naissance aux cellules de la glie radiale et des progéniteurs basaux.

Suite à la production des premiers neurones, le neuroépithélium possède maintenant plusieurs couches cellulaires. Les cellules de la glie radiale (RG) origine de la différenciation des cellules NEP lors de l'initiation de la neurogénèse (entre E9.5 et E18.5 chez la souris) [37]. Les cellules RG représentent le type cellulaire principal du cerveau en développement où elles servent à la fois de cellules progénitrices et de supports aux neurones en migration [38]. Les cellules RG expriment toujours certains marqueurs NEP (Nestine et Prominin-1), mais également des marqueurs astrogliaux (GLAST, GFAP, BLBP et S100 β) [44-48]. Ces cellules représentent une population hétérogène possédant un potentiel de différenciation distinct dépendant de l'environnement spatiotemporel [49-51]. Par exemple, 60-70% des cellules RG isolées à partir du cerveau antérieur lors de la neurogénèse (E14.5 à E16.5) se différencient en neurones et vers la fin de la neurogénèse

(E18) les cellules RG forment préférentiellement des cellules gliales [52, 53]. Dans la plus part des cas, les cellules RG possèdent un pouvoir de différenciation unipotent (forment des neurones ou cellules gliales) ou bipotent (forment des neurones et des cellules gliales). Comparativement aux NEP, leur potentiel de différenciation est donc plus restreint [38]. En culture, les cellules RG peuvent être générées de façon efficace à partir des cellules ES et l'utilisation de différents protocoles. Les cellules RG doivent être cultivées en présence des facteurs de croissances FGF2 et EGF [54-56]. Tout comme les cellules NEP, les cellules RG peuvent également donner naissance aux progéniteurs basaux [38].

Les progéniteurs basaux (BP) prédominent au niveau de la zone sub-ventriculaire (SVZ) du télencéphale en développement [57, 58]. Ils sont générés au début de la neurogénèse par les NEP et plus tard par les cellules RG [59, 60]. Les BP ont un potentiel de différenciation unipotent, où ils permettent uniquement la production de neurones. Ainsi, ces cellules sont responsables de l'augmentation du nombre de neurones générés lors de la neurogénèse [53, 57]. Les BP n'expriment plus les facteurs de transcription essentiels à l'auto-renouvellement des cellules RG (Pax6 et Sox2), mais expriment maintenant TBR2, CUX1 et CUX2 [61, 62]. Les BP peuvent être isolés à partir du cerveau antérieur en développement basé sur l'expression du marqueur TIS21 [63].

Les CSN sont non seulement présentes lors du développement du cerveau, mais leur présence persiste également au niveau de régions strictes du cerveau adulte : la zone sub-ventriculaire (SVZ) du ventricule latéral et la zone sub-granulaire (SGZ) du gyrus dentatus au niveau de l'hippocampe. Les CSN adultes ont un potentiel de différenciation multipotent et sont responsables du maintien de la neurogénèse et gliogénèse au niveau du cerveau mature. Ces cellules dérivent des cellules RG qui se différencient au niveau du cerveau post-natal [64, 65]. Les CSN adultes sont une population de cellules hétérogènes qui se distinguent en fonction de leur emplacement. Au niveau de la SVZ, on retrouve trois types de CSN ou progéniteurs : type A, B et C. Les cellules de type B sont des CSN quiescentes et donnent naissance aux cellules de type C. Les cellules de type B partagent des caractéristiques structurales et expriment différents marqueurs (GFAP, GLAST etc.)

associés aux astrocytes. Elles expriment également des marqueurs de cellules souches (Nestine, Sox2 et CD133) [66]. Les cellules de type C prolifèrent de façon active et se différencient en cellule de type A. Les cellules de types A sont des neuroblastes immatures qui migrent en file indienne vers le bulbe olfactif où elles se différencient en interneurons [67-69]. Différentes études ont permis d'identifier les cellules de type B comme étant des CSN adultes. L'utilisation de traitements à base de cytosine- β -D-arabino-furanoside (Ara-C), un agent qui permet de tuer les cellules qui se divisent activement (ici les cellules de types C et A), ont permis de mettre en évidence l'activation des cellules de type B et la régénération de cellules de type C et par conséquent la formation de neuroblastes [66]. Une seconde étude a mis en évidence la nature de CSN des cellules de type B. Dans cette étude l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques exprimant TK (herpes-simplex virus thymidine kinase) sous le contrôle du promoteur de GFAP a permis de démontrer qu'en présence de GCV (Ganciclovir, un traitement qui permet d'éliminer les cellules qui expriment TK) on observe une diminution marquée de la production de neurones au niveau du cerveau adulte et également la perte de la formation de neurosphères en culture à partir des cellules extraites de la SVZ [70]. Il n'existe cependant aucun marqueur qui permettent d'identifier et différencier les divers progéniteurs primaires de la SVZ [49]. Les cellules de types B et C forment des niches à proximité de vaisseaux sanguins [71]. De plus, ces deux types de cellules ont la capacité de former des neurosphères en culture [72]. Toute fois, un nouveau candidat prometteur, *tailless*, un récepteur nucléaire orphelin semble être exprimé seulement au niveau des cellules de type B [73].

Un autre site majeur de neurogénèse chez le cerveau adulte de mammifère est la SGZ au niveau de l'hippocampe. La production de nouveaux neurones au niveau du gyrus dentatus est impliquée dans les processus de l'apprentissage et de la mémoire [74-76]. On retrouve au niveau de la SGZ deux types de cellules capables de prolifération : des astrocytes et des petites cellules au noyau basophile [77, 78]. Les astrocytes radiaux ou progéniteur de type I sont les précurseurs neuronaux primaires au niveau de la SGZ [79, 80]. Contrairement aux astrocytes qui expriment seulement le marqueur GFAP, les astrocytes

radiaux expriment les marqueurs GFAP, Nestine et Sox2 [81, 82]. Ces cellules sont également localisées à proximité des niches vasculaires [78]. Les astrocytes radiaux ne peuvent donner naissance directement aux neurones, ces cellules produisent plutôt un intermédiaire, soit les cellules de type D ou progéniteurs de type II et correspondent également aux petites cellules au noyau basophile. Ces cellules expriment toujours le marqueur Sox2 et perdent l'expression de GFAP [79-81]. Outre leur capacité à produire des précurseurs neuronaux, les astrocytes radiaux possèdent également certaines fonctions classiques aux astrocytes, telles le support des neurones et de l'activité synaptique [80]. La neurogénèse au niveau du gyrus dentatus est régulé par différents signaux physiologiques et environnementaux (stéroïdes, l'activation de récepteurs glutamate, l'inflammation, l'exercice, les antidépresseurs, etc.) [83-87] (Tableau I et Figure 3).

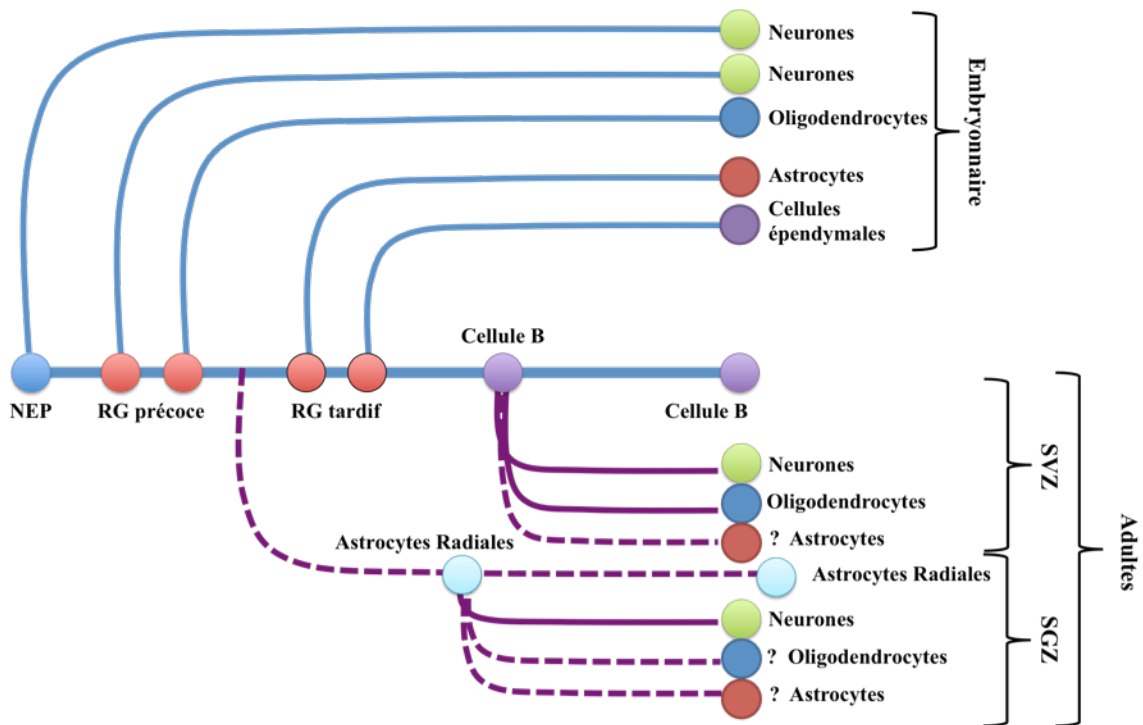


Figure 3 Schéma représentant les différents types de cellules souches présentes durant la neurogénèse et chez l'adulte. Modifié de Kriegstein A. et Alvarez-Buylla A. (2009) *Annu. Rev. Neurosci.* 32 : 149-184.

c) Les différents mécanismes moléculaires impliqués dans l'auto-renouvellement et le maintien des CSN

Plusieurs voies moléculaires sont responsables du maintien et de la régulation de l'auto-renouvellement des CSN chez le mammifère. La voie de signalisation Notch est un acteur critique de l'auto-renouvellement au niveau de plusieurs types de cellules souches [33]. L'activation de la voie Notch, au niveau des CSN embryonnaires ou adultes, peut promouvoir dans certain cas l'auto-renouvellement, alors que dans d'autres circonstances elle active plutôt la différenciation gliale [88-90]. Des mutations au niveau des différentes composantes de la voie Notch, incluant Dll1, le récepteur Notch1 et les facteurs de transcription Hes, induisent la perte de la population RG et des CSN adultes dû à une

réduction du pouvoir d'auto-renouvellement, ainsi qu'une neurogénèse prématurée chez l'embryon [88, 91-94]. La protéine Numb est également essentielle au maintien des CSN, cependant le rôle exact de cette protéine au niveau de la voie Notch chez le mammifère reste à déterminer [95]. La voie Notch est ainsi essentielle au maintien de la population CSN autant durant le développement que chez l'adulte. Tout comme la voie Notch, la voie de signalisation Wnt promeut l'auto-renouvellement des cellules souches au niveau de plusieurs tissus [33]. La signalisation Wnt par la voie canonique de β -caténine permet la détermination de l'identité et la prolifération des CSN. En effet, une diminution du niveau de la β -caténine provoque une réduction de la population de cellules NEP et RG, ainsi qu'une augmentation de la différenciation neuronale [96, 97]. Alors qu'une fluctuation des niveaux de β -caténine promeut l'auto-renouvellement des CSN embryonnaires et adultes [98-101]. Outre les voies de signalisation Notch et Wnt, la voie sonic hedgehog (Shh) est un autre déterminant de l'auto-renouvellement des CSN embryonnaire et post-natales. Des mutations au niveau des différentes composantes de la voie Shh, tel que le ligand Shh, la protéine Smo (Smothered) et les effecteurs Gli2/3, affectent la neurogénèse chez l'embryon et l'adulte [102, 103]. L'ablation conditionnelle de Smo, par l'utilisation du système inductible Cre sous le contrôle du promoteur de Nestine, induit la perte de la population de cellules de types B et C au niveau de la SVZ, démontrant ainsi l'importance de la voie Shh le maintien des cellules souches de la SVZ chez l'adulte [103]. Plusieurs autres groupes de gènes sont impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement des CSN. Entre autre, on retrouve la famille de gènes Polycomb, des répresseurs transcriptionnels qui médient leur action *via* des modifications de la chromatine [104]. L'implication des gènes Polycomb dans le maintien des cellules souches sera abordée plus loin. D'autres groupes de gènes promeuvent l'auto-renouvellement en régulant négativement la différenciation. Le récepteur nucléaire orphelin, Tlx, est requis pour le maintien de la population de CSN adulte, mais il n'est pas indispensable durant le développement. Ce gène médit son action *via* la répression des gènes impliqués dans la différenciation astrocytaire [105]. Tout comme *Tlx*, la délétion de *N-CoR* (un co-répresseur) mène à la perte de la population de CSN et à une différenciation astrocytaire prématurée. Contrairement à *Tlx*, la perte *N-CoR* affecte

également les CSN embryonnaires [106, 107]. D'autre part, les gènes de la famille Sox (*High-mobility-group DNA binding protein*) sont impliqués dans le maintien de l'état non-différentié de certains types de cellules souches. À titre d'exemple, Sox2 est exprimé au niveau des cellules ES et CSN [108, 109]. La surexpression de Sox2 empêche la différenciation neuronale des CSN et les forcent à rester dans un état non-différentié [109]. Sox10 procure un potentiel de multipotence en favorisant l'expression de gènes qui confèrent des compétences de différenciation neuronale et gliale [110]. Cependant, certains gènes Sox promeuvent plutôt la différenciation cellulaire [111]. La famille des gènes Sox régule l'auto-renouvellement de façon contexte dépendant en maintenant les cellules souches dans un état non-différentié et en conservant leur habileté à proliférer.

d) Les systèmes de cultures des CSN et leur maintenance à long terme *in vitro*

L'utilisation des systèmes *in vitro* est un moyen efficace qui facilite l'étude et la compréhension de différents mécanismes biologiques et moléculaires. Cependant, pour être représentatif, le système de culture utilisé doit refléter les conditions retrouvées *in vivo* afin de conserver l'état physiologique des cellules étudiées. L'identification de 2 éléments clés, soit FGF2 et EGF, ont permis la création de différents protocoles afin de cultiver et d'expandre à long terme les CSN [112, 113]. Les cultures en suspension (neurosphères) et en monocouche représentent les deux principaux systèmes de cultures des CSN. Tout d'abord, dans les deux cas, les cellules sont isolées à partir de tissus neuraux par microdissection et par trituration mécanique et/ou enzymatique (ex. trypsine, papaïne) [38]. Les neurosphères sont des colonies ou agrégats flottantes de CSN ou progéniteurs provenant de la prolifération d'une seule cellule souche. Elles sont cultivées dans des plaques de culture à faible adhérence dans un milieu sans sérum et en présence des mitogènes FGF2 et EGF [114]. Ces conditions de cultures favorisent la survie des CSN au détriment des cellules différenciées. Les neurosphères peuvent être dissociées afin d'assurer l'expansion de la population de CSN dans le temps par la formation de sphères secondaires. La deuxième technique est la culture en monocouche, où les cellules isolées des tissus

neuraux sont cultivées dans des plaques favorisant l'adhérence, c'est-à-dire enduit de polyornithine, laminine ou fibronectine [115]. Tout comme pour la culture sous forme de neurosphères, le milieu utilisé pour la culture en monocouche est enrichi en mitogènes (FGF2 et EGF) [54]. Chacune de ces techniques doivent respecter certains critères afin d'évaluer leur potentiel à maintenir l'auto-renouvellement des CSN : potentiel d'expansion à long terme, la clonalité, la stabilité du caryotype à long terme et la conservation du potentiel de différenciation multipotent [38]. Le potentiel d'expansion ou d'auto-renouvellement est directement lié aux conditions de cultures [116]. Sous forme de neurosphères le contenu en CSN est très hétérogène et l'expansion de la population de CSN est très rapide dans les premiers passages, cependant le potentiel d'auto-renouvellement se voit diminuer avec les passages subséquents [117, 118]. Au contraire, les CSN cultivés en monocouche sont plus homogènes ce qui suggère que ces conditions de culture favorisent la division symétrique à long terme [54, 119]. La clonalité est fondamentale associée à l'identification rétrospective de l'identité d'une CSN *in vitro*, où un clone cellulaire devrait dériver de la division d'une CSN isolée. Ce dernier critère est peu respecté puisque dans les deux systèmes la densité clonale est représentée par la mise en culture de 10 à 1000 cellules par puits [38]. Dans ces conditions les cellules ont tendance à former des agrégats et par conséquent la colonie ainsi formée ne provient pas de la prolifération d'une seule CSN. De plus, l'agrégation entre différentes neurosphères est souvent observée, ce qui mène à la perte de la clonalité au niveau de ces sphères [120, 121]. La culture à long terme mène souvent à la perte du caryotype et à la transformation des CSN en cellules malignes [122]. La culture de neurosphère se limite normalement à 10 passages. Il a tout de même été démontré dans une étude que le caryotype des CSN cultivées sous forme de neurosphères était toujours normal après 70 passages [123]. Les CSN humaines maintenues en monocouche semblent conserver un caryotype diploïde à long terme [119]. Finalement, la conservation du potentiel de différenciation multipotent semble être mieux maintenue à long terme lorsque les CSN sont cultivées sous forme de monocouche comparativement aux neurosphères. En effet, plusieurs études ont démontré que les CSN sous forme de neurosphères favorisent à long terme la gliogénèse au détriment de la neurogénèse.

Cependant, cette dernière observation est représentative de la situation observée durant le développement du cerveau, ce qui suggère que la programmation intrinsèque est conservée *in vitro* [124-126]. En conclusion, ces deux systèmes de cultures représentent des moyens efficaces dans l'étude des CSN, où l'essai neurosphère semble récapituler le comportement des CSN durant développement neuronal alors que le système en monocouche permet d'étudier et de maintenir certaines populations cibles de CSN présentes à des stades de développement spécifiques.

1.1.3 La théorie des cellules souches cancéreuses

Les cancers se développent originellement à partir d'une cellule normale qui acquiert des capacités de prolifération aberrantes et ultimement se transforme en cellule maligne. Une question centrale se pose : Quels sont les cellules qui se transforment pour donner naissance à une tumeur. La théorie des cellules souches cancéreuses propose la présence de cellules au sein d'une tumeur qui partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules souches, telles l'expression de différents marqueurs associés aux cellules souches et le potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation multipotent. Ces cellules seraient responsables du développement et du maintien de la tumeur [127]. Cette théorie suggère que l'hétérogénéité d'une tumeur reflète une hiérarchie cellulaire semblable au tissu d'origine, ce qui met en évidence le potentiel pluripotent de la cellule transformée d'origine [32]. Deux observations principales ont donné naissance à la théorie des cellules souches cancéreuses. Premièrement, hypothétiquement une tumeur se développe à partir de la prolifération d'une seule cellule, hors les cellules qui composent une tumeur ne sont pas identiques [128]. La cellule tumorigénique d'origine doit donc en théorie posséder un potentiel de différenciation multipotent. La deuxième observation contredit le modèle stochastique qui stipule que toutes les cellules présentes au niveau de la tumeur ont le pouvoir de former une seconde tumeur [129, 130]. En réalité, une grande quantité de cellules cancéreuses est nécessaire à la formation d'une tumeur secondaire, ce qui suggère que seule une population minoritaire de cellules au niveau de la tumeur est apte à former une deuxième tumeur. Finalement, selon la théorie des cellules souches cancéreuses, seule

une population exclusive et minoritaire de cellules cancéreuses possède l'habileté de soutenir la croissance d'une tumeur et peuvent donner naissance à des cellules plus différenciées [32]. L'origine des cellules souches cancéreuses reste encore à déterminer. Puisque les cellules souches leucémiques sont capable de reproduire les différentes lignées hématopoïétiques et qu'elles expriment certains marqueurs de cellules souches normales, les cellules souches cancéreuses seraient originaires d'une transformation au niveau d'une cellule souche normale [131, 132]. D'autres évidences suggèrent que les cellules souches cancéreuses dériveraient plutôt de la transformation de progéniteurs ou cellules différenciées qui réacquerraient des propriétés de cellules souches [133-135]. Pour terminer, tout comme les cellules souches normales, les cellules souches cancéreuses doivent s'auto-renouveler. Par conséquent, il est normal d'assumer que les cellules souches cancéreuses nécessitent également l'action de différents mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement. Effectivement, les voies telles Wnt, SHH, Notch et l'expression de la protéine Polycomb Bmi1 sont dérégulées dans plusieurs types de cancers [136-139] (Tableau II).

Le cerveau mature a longtemps été considéré comme étant un tissu quiescent. L'utilisation d'analogues de base tels le BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) et ³H-thymidine a permis de mettre en évidence, pour la première fois, des événements de neurogénèse chez les mammifères adultes [140-145]. Par la suite, l'observation de l'expression du marqueur de CSN, CD133, au niveau de cellules du cerveau adulte a permis de confirmer la présence de CSN au sein du SNC adulte [146]. La présence de cellules CD133 positives a également été observée au niveau de différentes tumeurs cérébrales [147, 148]. Il existe une grande variété de tumeurs cérébrales chez l'homme et ces tumeurs se développent à partir des zones germinale et post-natale précoce du SNC et également à partir des zones du cerveau adultes où la neurogénèse est toujours active (SVZ et SGZ) [148]. À titre d'exemple, les gliomes semblent se développer à partir de la SVZ, alors que le médulloblastome se développe à partir de la région granulaire externe du cervelet en développement [149-151]. Les tumeurs cérébrales semblent donc se développer à partir des régions du cerveau où la neurogénèse est toujours active et par conséquent où l'on retrouve les CSN. L'essai

neurosphère a permis de mettre en évidence la présence de CSN cancéreuses dans différents types de cancers du cerveau. Les cellules CD133-positives isolées à partir des tumeurs étaient capables de proliférer et de se différencier en cellules semblables aux cellules de la tumeur d'origine [147]. De plus, la production de tumeur secondaire chez la souris était possible seulement à partir de la fraction de cellules CD133 positives [152]. Différentes études récentes suggèrent également que les gliomes origines des cellules souches neurales, par des études aux niveaux de modèles animaux [153, 154]. Des travaux effectués par Quintana et al. s'opposent à la théorie que seule une population minoritaire au sein d'une tumeur possède un potentiel tumorigénique. Ils affirment que les essais de xéno greffe chez la souris immunodéficiente (NOD/SCID) sous-estiment le nombre de cellules impliquées dans la tumorigénèse. Par exemple, seulement 0,1% des cellules de mélanomes ont le potentiel de former une tumeur chez la souris NOD/SCID, alors que 25% des cellules provenant des mêmes mélanomes forment des tumeurs chez la souris NOD/SCID/IL-2^{-/-}. Les protocoles de xéno greffe affectent également la formation de tumeur. À titre d'exemple, l'utilisation de matrigel lors de l'injection favorise la formation de tumeur. Ils stipulent également que les cellules CD133⁺ et CD133⁻ mènent au développement néoplasique [155]. La guerre dans le but d'infirmer ou confirmer la théorie des CSC se poursuit encore aujourd'hui, où la publication récente de Boiko et al. contredisent l'étude de Quintana et al [156].

CHAPITRE 1

INTRODUCTION : SECTION 2

Gène Polycomb : BMI1

1.2.1 La famille des gènes Polycomb

a) L'origine des gènes Polycomb

La régulation stricte de l'expression génique est nécessaire à l'identité propre d'une cellule et ainsi qu'à la diversité et à la complexité d'un organisme multicellulaire. L'utilisation adéquate de l'information contenue dans le génome d'une cellule est régulée par une variété de protéines régulatrices qui peuvent s'associer spécifiquement au niveau de gènes cibles et/ou au niveau de régions génomiques. Plusieurs grandes familles de protéines impliquées dans la régulation génique médient leur action *via* des interactions au niveau de protéines présentes sur la chromatine plutôt que par des interactions directes avec l'ADN. Les principales protéines ciblées au niveau de la chromatine sont les histones et les modifications qu'elles acquièrent peuvent être transférées aux chromatides filles lors de la division cellulaire; une marque épigénétique. Ces modifications au niveau des résidus lysine de la queue des histones constituent le code des histones, où l'acétylation (ex. H3K14ac) est souvent associée à l'euchromatine, alors que la méthylation (ex. H3K9me³) est plutôt associée à l'état compact de la chromatine, l'hétérochromatine [157-159]. La perturbation de la structure de la chromatine peut entraîner l'expression inappropriée de gènes et également causer une instabilité génomique résultant à une transformation cellulaire pouvant mener au cancer. Les protéines impliquées dans la régulation de l'état de la chromatine sont donc des acteurs clés de la tumorigénèse [160]. On retrouve parmi les régulateurs épigénétiques la famille des gènes Polycomb (PcG) (Tableau III).

Originellement, les protéines PcG ont été identifiées chez la drosophile comme étant un des deux groupes régulateurs des gènes homéotiques (*HOM-C* ou *Hox*, l'homologue chez la souris). Les gènes PcG et Trithorax (TrxG) sont associés respectivement à la répression et l'activation transcriptionnelle des gènes *HOM-C*. Ces gènes sont exprimés le long de l'axe antéro-postérieur durant l'embryogénèse permettant ainsi l'établissement de l'identité axiale et la segmentation. La mutation des gènes *PcG* ou *TrxG* résulte en des défauts de

segmentation chez la drosophile [161-164]. La régulation des gènes *Hox* par les protéines PcG chez les vertébrés semble être essentiellement conservée, puisque la mutation de différents *PcG* résulte également en des malformations du squelette [165-168]. Cependant, les phénotypes observés chez les vertébrés sont moins pénétrant comparativement à la drosophile, ce qui peut s'expliquer par la redondance et la présence de plusieurs homologues de gènes *PcG* chez les vertébrés. Malgré l'absence d'homologie séquentielle, les gènes *PcG* semblent avoir été conservés au cours de l'évolution. Leur classification se base principalement sur la présence de domaines conservés. Ils représentent donc des analogues fonctionnels des gènes *PcG* retrouvés chez la drosophile (Tableau III). La surexpression, par exemple, de l'homologue murin de *Pc*, *M33*, chez la drosophile permet de rétablir le phénotype encouru par la perte de *Pc* [169].

b) Les complexes PcG

Au niveau moléculaire, les PcG forment de larges complexes multimériques qui peuvent être classés principalement en deux groupes appelés *Polycomb repressive complexes* (PRCs) [170-172]. Le complexe PRC1 premièrement isolé de la drosophile est composé d'un noyau de quatre protéines : Polycomb (Pc), Posterior sex combs (PSC), polyhomeotic (PH) et RING (Figure 4). Chacune de ces protéines possèdent plusieurs homologues chez le vertébré, ce qui en fait un complexe beaucoup plus varié (Tableau III). La diversité du PRC1 est également accrue par la présence d'interaction multiple avec différent partenaire (RYBP, MBLR, NSPc1, SCML2 et L(3)MBT) [173]. D'un point de vue fonctionnel, très peu de choses sont connues sur l'action individuelle des protéines du PRC1 en dehors du complexe. Les protéines de la famille CBX, homologue de *PC* chez la drosophile, possèdent un chromodomaine qui permet la liaison spécifique au résidu lysine 9 ou 27 triméthylé de l'histone H3 (H3K9 ou K27me³). Cette protéine est donc responsable de l'acheminement et de la liaison du complexe PRC1 à la chromatine [174-177]. RING1A ou B chez le mammifère et RING chez la drosophile ont tous en commun un domaine RING et démontrent une activité E3 ubiquitine ligase. Elles permettent la mono-ubiquitination de la

lysine 119 de l'histone H2A, ce qui favorise l'inhibition de la transcription par le maintien de l'état compact de la chromatine. La mise en évidence de la fonction de la mono-ubiquitination de l'histone H2A par RING du PRC1 a tout d'abord été démontrée chez le mammifère au niveau de l'inactivation d'un des chromosomes X et chez la drosophile au niveau de la régulation de la transcription du gène *Ubx*. La mono-ubiquitination est essentielle, puisque l'inhibition de l'activité de RING mène à la perte de la répression transcriptionnelle Psc-dépendante [178-181]. BMI1, l'homologue de PSC, possède également un domaine RING et permet d'accroître l'activité catalytique de RING1A/B [182, 183].

Le complexe PRC2 est constitué d'un noyau de trois protéines PSC: E(Z) (Enhancer of zeste), Esc (Extra sex combs) et Suz12 (Supressor of zeste) et la protéine Nurf55 chez la drosophile ou d'une combinaison de ces homologues chez le mammifère (Ezh2/1, Eed, Suz12 et RbAp48/46) (Tableau III, Figure 4). L'élément clé du PRC2 est la protéine E(Z) qui fait partie de la superfamille des protéines à domaine SET. Les protéines à domaine SET interviennent dans la méthylation des résidus lysines de différentes sous unités d'histones, se sont des histones méthyltransférases (HMT). Plus particulièrement, E(Z) permet principalement la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me³) et dans certain cas de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me³) [184-187]. La tri-méthylation de l'histone H3K27 est typiquement retrouvée au niveau des gènes ciblés par les PcG et est reconnu par le chromodomaine du complexe PRC1 [188]. Chez la drosophile, E(Z) est également responsable à plus de 50% des marques mono et di-méthylées de la lysine 27 de l'histone H3 à travers le génome [189]. En dehors du complexe, E(Z) ne possède aucune activité catalytique [185, 187, 188]. ESC et SU(Z)12 sont constitués respectivement d'un domaine WD40 et d'un domaine à doigt de zinc. Ces 2 sous-unités non-catalytiques du PRC2 favorisent l'activité HMT de E(Z) et la liaison du complexe aux nucléosomes [190]. Chez le mammifère la perte de EZH2, homologue de E(Z), a pour conséquence la perte des marques di et tri-méthylés de l'histone H3K27, alors que la mono-méthylation reste inchangée. Au niveau des cellules ES EZH2^{-/-}, la présence de EZH1 compense la perte de EZH2 par le maintien d'environ le tiers des gènes tri-méthylés comparativement à la

souche sauvage. En comparaison au PRC2/EZH2, le complexe PRC2/EZH1 possède une activité HMT plus faible *in vitro* [191, 192]. Cependant, la perte de EED, homologue de Esc, mène à une absence totale de toutes formes de méthylation de l'histone H3K27, d'où la dépendance de l'activité HMT de E(Z) avec les autres membres du complexes [186, 193, 194].

Chez la drosophile, un troisième PRC a été isolé : PhoRC. Ce complexe est constitué des protéines PHO/PHOL et SFMBT (Figure 4). La protéine PHO dont l'homologue chez le mammifère est YY1, est la seule protéine PcG capable de lier directement l'ADN. Les domaines répétés MBT de la protéine SFMBT permettent de lier spécifiquement les histones H3 et H4 mono ou di-méthylés (H3K9 et H4K20). Ce complexe combine une capacité de liaison à des séquences spécifiques d'ADN et une habileté à reconnaître les histones méthylées, ce qui permet des interactions sur une plus longue distance entre les protéines PcG liées localement et les histones méthylées de chromatines flanquantes [195-198].

Chez le mammifère, l'existence d'isoformes et la présence d'homologues fonctionnels pour la plupart des composantes du PRC1 ainsi que pour les protéines EED et EZH2 du PRC2 augmente considérablement la complexité de la formation des PRCs. Des évidences ont démontré la présence d'au moins 2 autres complexes PRCs chez les mammifères : PRC3 et PRC4 (Figure 4). Tout comme le PRC2, le complexe PRC3 est constitué des protéines PcG EZH2 et SUZ12, mais contient plutôt l'isoforme 3 ou 4 de EED. Dépendamment de l'isoforme de EED présent, le complexe possède une activité HMT dirigée contre l'histone H3K27 ou contre l'histone H1K26. Chacune de ces PRCs peuvent coexister dans la cellule, où ils jouent des rôles différents dans l'inhibition de gènes contenus dans des locus spécifiques [171]. PRC4 a été caractérisé au niveau de cellules ES et cancéreuses où l'on observe une forte expression de EZH2. Ce complexe contient l'isoforme 2 d'EED ainsi que la protéine SirT1, une histone déacétylase (HDAC) [199]. Cependant, la présence du PRC4 reste controversée. Certains spéculent que la présence du complexe PRC4 dans des cellules ES et son accumulation dans les cellules transformées pourrait influencer les événements associés aux dérèglements de gènes spécifiques menant aux transformations caractérisées

dans les cancers [200]. Le concept de deux complexes PcG statiques est une simplification qui ne rend clairement pas justice à la diversité d'interactions protéiques possible qu'il existe. Ainsi les différentes composantes des noyaux des PRCs peuvent s'assembler en sous-complexes fonctionnellement distincts dépendamment du contexte cellulaire.

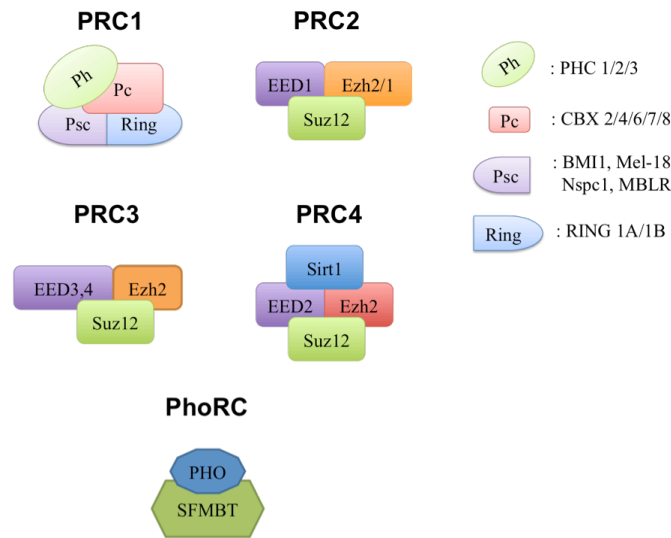


Figure 4 Représentation des différents complexes PcGs chez les mammifères.

c) Mécanisme d'action des PcGs

La régulation épigénétique consiste en des altérations de la structure de la chromatine médiées, principalement, par des modifications post-traductionnelles des queues d'histones et des méthylations de l'ADN. Ces modifications régulent l'expression des gènes en modulant la conformation de la chromatine et l'accès à l'ADN par les protéines régulatrices. Les protéines PcGs forment des complexes macromoléculaires et agissent comme des répresseurs transcriptionnels épigénétiques. Le mécanisme moléculaire précis par lequel les PcGs répriment la transcription reste encore mal compris.

L'activité H3 K27 méthyltransférase du complexe PRC2 et l'habileté du chromodomaine de PRC1 à lier la marque H3K27me³ a donné naissance à un modèle où la signature du PRC2 est nécessaire au recrutement du PRC1 aux gènes cibles. Dans toutes les espèces, la liaison des protéines PcGs corrèle fortement avec la présence de la marque H3K27me³

[201]. De façon plus séquentielle, PRC2 va tout d'abords tri-méthylé les histones H3K27 aux niveaux des régions chromosomiques contenant les gènes cibles [184-188]. Par la suite, PRC1 *via* son chromodomaine va reconnaître et lier les marques H3K27me³, ce qui pourrait permettre le rapprochement des nucléosomes voisins et ainsi permettre au PRC2 d'étendre sa marque sur d'autres régions chromosomales [176, 177, 202]. Le recrutement de PRC1 permettrait de bloquer directement le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base [203, 204]. Cependant, plusieurs travaux ont démontré qu'on pouvait observer le recrutement à la fois de différents complexes PRC1 ainsi que de certains facteurs de transcription [203, 205, 206]. L'activité ubiquitine ligase du PRC1 va permettre la mono-ubiquitination de l'histone H2AK119, une marque associée à la répression transcriptionnelle et également à la compaction de la chromatine [180, 207]. Finalement, EZH2 du PRC2 et Bmi1 du PRC1 peuvent tous deux servir de plateforme de recrutement pour DNMT1, une protéine ADN méthyltransférase. Le recrutement de DNMT1 va favoriser la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de gènes cibles et ainsi permettre la répression transcriptionnelle [208, 209] (Figure 5).

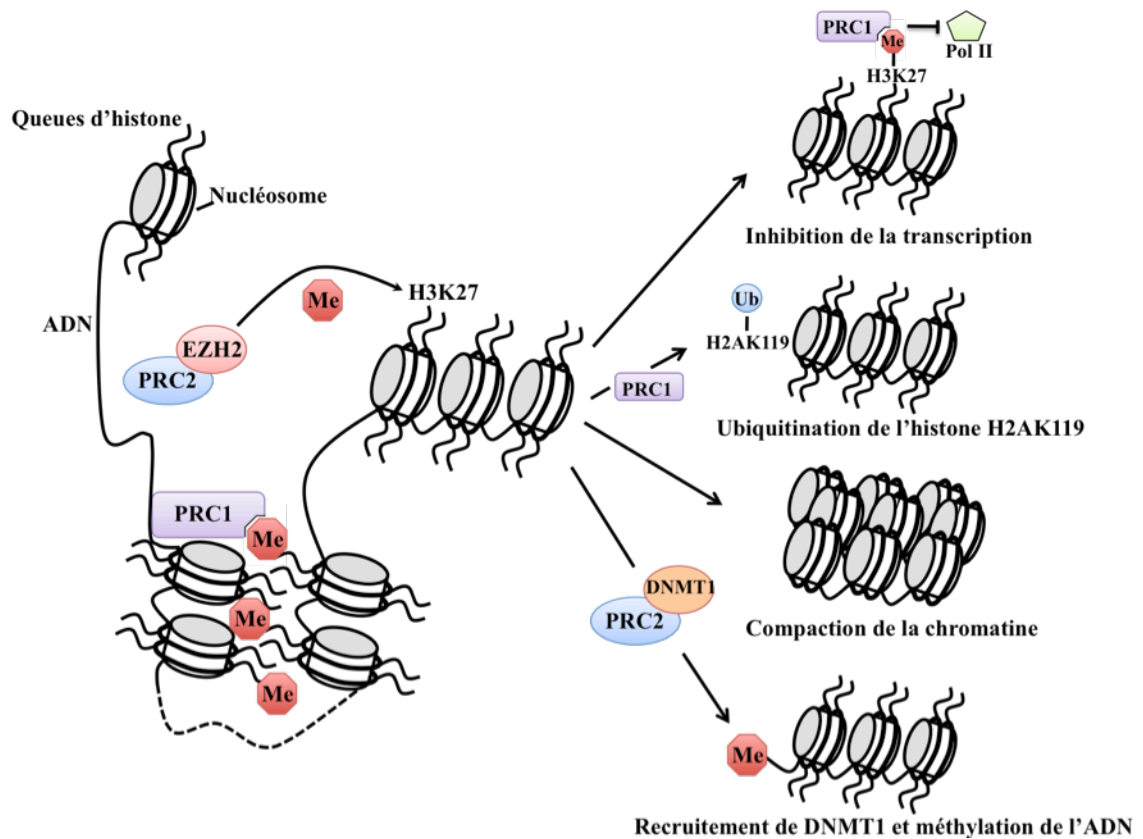


Figure 5 Représentation schématique illustrant les différents modes de répression géniques induits par les PcGs. Tiré de Sparmann A. et van Lohuizen M. (2006) *Nature* 6 : 846- 856.

Il est connu que la présence des complexes PcGs corrèle avec celle de la marque H3K27me³, mais le mécanisme de par lequel ces complexes sont recrutés spécifiquement aux niveaux des loci de gènes cibles reste encore mal compris. Des analyses fonctionnelles sur les régions régulatrices de plusieurs gènes cibles par les PcGs chez la drosophile ont permis l'identification d'éléments spécifiques nécessaires et suffisants à la répression médiée par les PcGs. Ces éléments sont appelés *Polycomb Response Element* (PREs) et ne sont pas définis par des motifs courts conservés qui sont pour la plupart reconnus par des protéines liant l'ADN [210-212]. Parmi les motifs connus, on retrouve

une séquence de liaison pour le complexe PHOR. PHO est la seule protéine PcG capable de lier l'ADN. Chez la drosophile, la mutation de PHO mène à un défaut de répression des gènes Hox. La fonction de PHOR a été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), où la perte de PHO ou PHO-like prévient le recrutement de PRC1 et PRC2 au niveau des séquences PREs des gènes Hox. Le complexe PHOR s'avère donc être une plateforme de recrutement pour les PRCs au niveau de PRE et par conséquent permet la répression de gènes spécifiques [213] (Figure 6). Malgré la présence pointilleuse des PRCs au niveau du domaine PRE, la marque H3K27me³ s'étend sur plus de 100kb du PRE. Cette anomalie évidente entre l'étendu de la méthylation de H3K27 et la localisation de la HMT, E(Z), au PRE pourrait s'expliquer par le modèle «boucle» [202, 206]. Ce modèle suggère que les protéines qui lient le PRE formeraient une boucle transitoire ce qui permettraient de contacter les nucléosomes voisins et par conséquent favoriser la tri-méthylation des histones H3K27.

Chez le mammifère, la quête à la découverte de séquences PRE et de protéines recruteuses a été peu fructueuse. Contrairement à la drosophile, le complexe PRC2 co-localise de façon plus restreinte avec la marque H3K27me³. Au niveau de sites génomiques, les protéines PcGs et la marque H3K27me³ sont localisées sur une région de moins de 5kb et enjambent, dans la plupart des cas, les régions promotrices [214, 215]. La protéine YY1, homologue de PHO, fait parti des candidats propices au recrutement du PRC2 [216]. En effet, la délétion de YY1 au niveau de myoblastes de souris induit une délocalisation du PRC2 et une perte de la tri-méthylation de H3K27 au niveau de gènes cibles [217]. Cependant, la co-localisation limitée entre YY1 et PRC2 au niveau de la chromatine de cellules ES chez la souris, suggère que l'action de recrutement de YY1 n'est pas générale [218]. Afin de déterminer les éléments impliqués dans le recrutement des PcGs au niveau des cellules ES chez la souris, une analyse génomique à large spectre a été effectuée. Cette étude a permis d'identifier une région candidate : les îlots CpG. Plus de 97% des régions liées par PRC2 correspondent à des îlots CpG [219]. Cette coïncidence suggère que les protéines liant les CpG seraient des aspirantes pour le recrutement des PcGs. Finalement, des interactions entre des ARN non-codant (ncARN) et le complexe PRC2 ont également été démontrées.

Les ncARNs pourraient favoriser le recrutement des PcGs au niveau de locus cibles [220-222] (Figure 6).

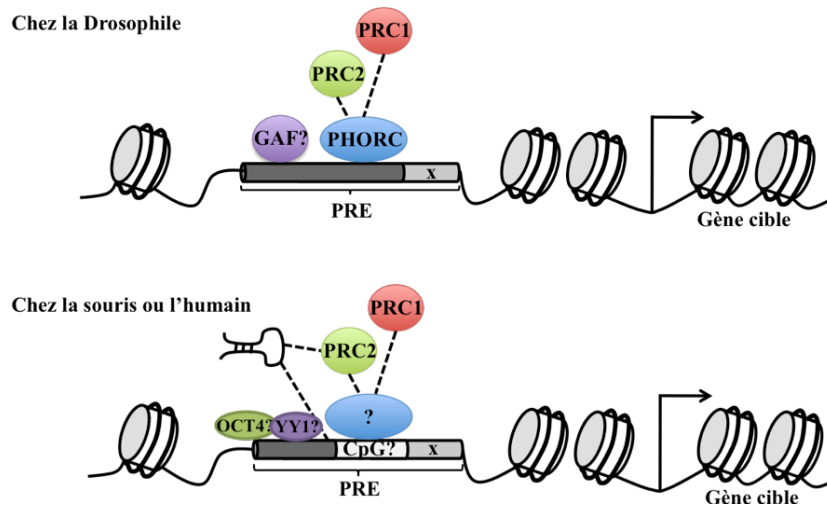


Figure 6 Représentation schématique illustrant les modes de recrutement hypothétiques des PcGs chez la drosophile et les mammifères. Tiré de Simon J.A. et Kingston R.E. (2009) *Nature Mol. Cell Biol.* 10 : 697- 708.

d) PcG et les cellules souches

Les protéines PcGs ont longtemps été considérées comme un système de mémoire cellulaire qui permet de bloquer de façon stable dans le temps les gènes Hox. Cependant des études de ChIP sur le génome ont permis d'identifier plus d'une centaine de gènes cibles par les PcGs chez la drosophile et le mammifère [214, 215, 218, 223]. Parmi les nouvelles cibles identifiées, on retrouve plusieurs facteurs de transcriptions impliqués dans diverses fonctions cellulaires et développementales. Au niveau des cellules souches embryonnaires (ES), les protéines PcGs permettent la répression d'un vaste groupe de protéines régulatrices impliquées dans les processus de différenciation cellulaire. On retrouve parmi ces cibles les facteurs de transcription à homéodomaine (Dlx, Irx, Lhx et Pax) et de

la famille Fox, Sox, Gata et Tbx. Les facteurs à homéodomaine sont impliqués dans différentes étapes précoces de la neurogénèse, hématopoïèse et l'établissement axial [214, 215, 224, 225]. L'activation de combinaisons discrètes de ces gènes est observée durant la différenciation cellulaire, ce qui indique une fonction cruciale des PcGs dans la régulation dynamique de l'identité et du destin des cellules souches. La présence de chacun des membres du PRC2 (EED, SUZ12 et EZH2) n'est pas essentielle à l'établissement de culture de cellules ES à partir d'embryon. La marque H3K27me³ n'est donc pas requise au niveau de l'auto renouvellement des cellules ES [191, 226]. Cependant l'absence de EED, par exemple, promouvoit la différenciation des cellules ES, mais ces dernières ne peuvent produire tous les types de cellules comparativement à la souche sauvage. Les PcGs sont probablement impliqués dans les processus de maintenance de l'identité et la pluripotence des cellules ES [214, 227]. Les protéines PcGs peuvent non seulement prévenir la différenciation *via* la répression de gènes spécifiques, mais peuvent également favoriser la différenciation en réponse à des signaux appropriés. Au cours de la différenciation, les cellules ES possédant des défauts fonctionnelles au niveau des PcGs ne peuvent réprimer de façon adéquate les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence. L'absence de Suz12 induit un défaut de différenciation [228]. L'expression de la protéine BMI1 est requise à la différenciation neuronale et la perte de RING1B au niveau de cellules souches neurales induit une différenciation préférentielle et prématurée en neurones et non en cellules gliales [229, 230]. Les protéines PcGs sont donc non seulement essentielles au niveau du maintien des cellules ES mais également au niveau de la différenciation adéquate de ces dernières.

Les complexes PRCs s'accumulent au niveau de locus afin de réprimer des protéines clés dans le but de maintenir la population de cellules ES. La distribution de la marque H3K27me³ corrèle avec la présence de PRC2 et couvre environ 20% des promoteurs géniques chez la cellules ES [214, 215]. Cependant, il est surprenant de constater que la plupart de ces promoteurs possèdent également la marque d'activation H3K4me³ résultant un domaine bivalent [174]. L'état bivalent de la chromatine permettrait une activation subséquente de gènes cibles normalement réprimés. Plusieurs régulateurs ciblés par les

PcGs sont activés lors de la différenciation et perdent la marque répressive H3K27me³. Cependant, le domaine bivalent ne mène pas seulement vers une activation génique, mais également vers une répression. Suite à un engagement spécifique de la cellule ES vers un destin fixe, les gènes bivalents qui n'ont pas été activés perdent leur marque H3K4me³ et conservent plutôt la marque répressive H3K27me³ [231]. Au niveau des fibroblastes embryonnaires humains, la perte de PcGs permet la réactivation de seulement une faible fraction des gènes ciblés par ces derniers [223]. L'habileté d'EZH2 et de BMI1 à recruter DNMT1 au niveau du promoteur et ainsi permettre la méthylation de l'ADN pourrait fournir une deuxième vague de régulation et ainsi bloquer de façon irréversible l'état réprimé de gènes spécifiques au niveau de cellules engagées [208, 209]. Il est également intéressant de constater qu'au niveau des cellules ES la plupart des gènes ciblés par les PcGs sont également liés par certains facteurs de transcription (OCT4, Nanog et SOX2) essentiels au maintien de ces cellules [215, 232]. La délétion du facteur OCT4, par exemple, mène à la perte de SUZ12 du PRC2 au niveau des gènes cibles [218]. Cette dernière observation suggère que ces facteurs de transcription pourraient servir au recrutement des PcGs au niveau de gènes spécifiques afin de conserver l'état pluripotent des cellules ES. Ainsi, les PcGs serviraient de système de « mémoire transcriptionnelle » maintenant un programme de répression établi par OCT4, SOX2 et Nanog au niveau des cellules ES [233].

Outre leurs fonctions au niveau des cellules ES, les PcGs sont également essentiels au niveau du maintien de différentes populations de cellules souches adultes. Les organismes multicellulaires dépendent des cellules souches adultes, puisqu'elles permettent de maintenir l'homéostasie de certains tissus (peau, intestin, système hématopoïétique etc.) en renouvelant les cellules différenciées âgées ou endommagées qui les composent [233]. BMI1 et MPH1 sont essentiels au maintien de la population de cellules souches hématopoïétiques et BMI1 est également important au niveau des cellules souches neurales et progéniteurs granulaires [137, 139, 234-237]. La surexpression d'EZH2 permet de prévenir l'épuisement de la population de cellules souches hématopoïétiques et bloque la différenciation des myoblastes musculaires [217, 238].

1.2.2 L'oncogène BMI1

a) La protéine BMI1

Bmi1 (*B cell-specific Moloney murine leukaemia virus Interaction site 1*), l'homologue de Psc chez la drosophile, fut le premier membre fonctionnel de la famille des PcGs à avoir été identifié chez la souris. Initialement, Bmi1 a été pointé comme étant un oncogène coopérant avec la protéine c-myc dans un modèle de leucémie murin [239, 240]. BMI1 est une protéine nucléaire d'environ 45kDa qui est largement exprimée à travers l'organisme (cellules ES, placenta, thymus, cœur, testicules, cerveau etc.) [240]. Cette protéine est composée d'un domaine RING en position N-terminale, d'un domaine central hélice-tour-hélice (HTH) et d'un domaine PEST en C-terminal. Le domaine RING de BMI1 permet de favoriser l'activité E3-ubiquitine ligase de la protéine RING1A/B, la portion centrale HTH serait un site potentiel de liaison à l'ADN et finalement la partie C-terminale est associée à une dégradation intracellulaire rapide [241]. Il existe une homologie séquentielle de 98% entre la protéine murine et humaine [242].

La liaison de la protéine Bmi1 au niveau de la chromatine est régulée de façon post-traductionnelle au cours des diverses phases du cycle cellulaire. La phosphorylation de Bmi1 en fin de phase S induit sa dissociation de la chromatine, alors que la forme hypophosphorylée de Bmi1 reste liée à la chromatine en phase G1 [243]. C'est la protéine MAPKAP kinase 3 (3pK), une protéine présente en aval des voies P38 et ERK, qui est responsable de la phosphorylation de Bmi1 et donc de sa dissociation de la chromatine en phase S [244].

D'un point de vue fonctionnel, Bmi1 est un régulateur négatif du locus suppresseur tumoral Ink4A/Arf [239] (Figure 7). Ce locus code pour deux protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose: p16^{INK4A} et p19^{ARF} [245-252]. Ainsi, *via* la régulation de ce locus, Bmi1 permet d'intégrer et d'inhiber deux voies majeures anti-tumorales. Le complexe cyclinD/cdk4/6 permet la phosphorylation de la

protéine pRB [253-255]. La forme hyperphosphorylée de pRB ne peut lier et inhiber le facteur de transcription E2F, ce qui favorise la progression du cycle cellulaire et la synthèse d'ADN [256]. La protéine p16^{INK4A} est impliquée dans la régulation de la voie pRB où elle permet l'inhibition du complexe cyclineD/cdk4/6. En effet, la liaison de p16^{INK4A} à cdk4/6 prévient l'interaction et l'activation de la kinase, cycline D et favorise ainsi la forme hypophosphorylée de pRB [257-261]. La forme hypophosphorylée de pRB lie et séquestre le facteur de transcription E2F et ainsi inhibe ce dernier [256]. La protéine pRB peut être également régulée par la voie P53, *via* les protéines P21 et MDM2. La protéine P21 est une CKI (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) qui, contrairement à P16^{INK4A}, permet d'inhiber directement l'activité kinase de cdk4/6 et par conséquent favorise l'activation de la voie pRB [262, 263]. Alors que, l'oncogène MDM2 inhibe la voie pRB en favorisant sa dégradation par le protéosome [264]. La protéine p19^{ARF} (p14^{ARF} chez l'humain), également encodée par le locus INK4A/ARF, est impliquée dans la régulation de la voie p53 *via* l'inhibition de la protéine MDM2 [265-274]. La protéine MDM2 peut inhiber P53 de différentes façons. Premièrement, il a été démontré que par sa liaison au domaine de transactivation de P53, MDM2 permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle de P53 [275-278]. Il a été démontré, par la suite, que la protéine MDM2 permettait également la poly-ubiquitination de p53 et par conséquent sa dégradation par le protéosome [279-283].

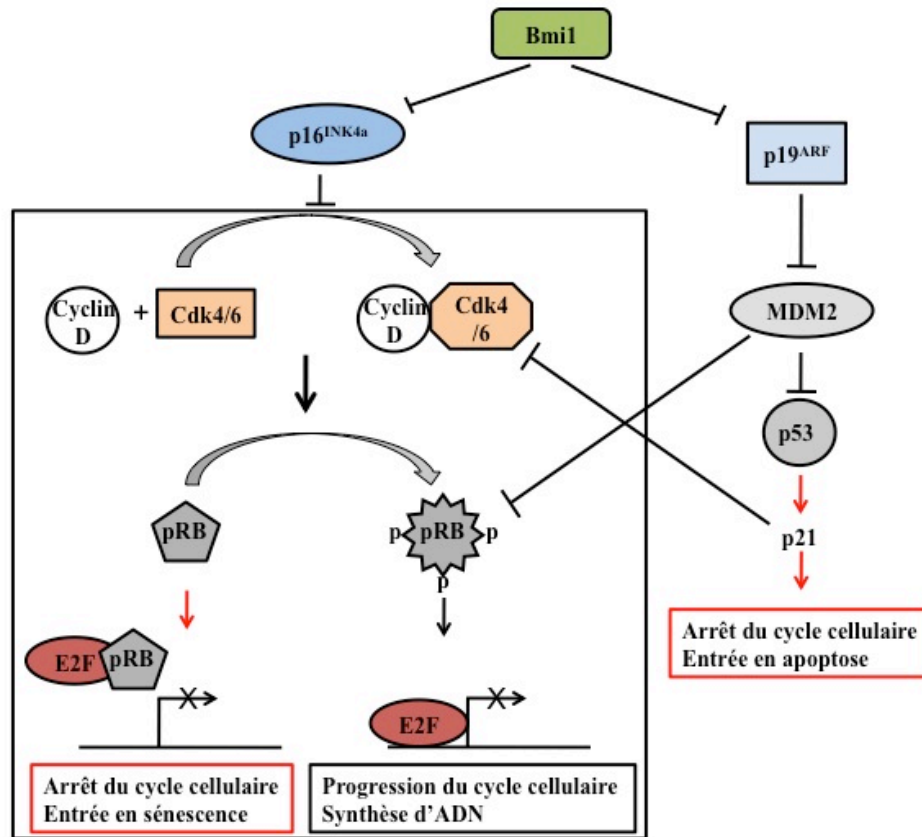


Figure 7 Schéma illustrant la cascade de la répression du locus INK4a/ARF par Bmi1 au niveau des cellules souches. Adapté de Park I.K. et al. (2004) *J. Clin. Invest.* 113 : 175-179.

b) Phénotype de la souris *Bmi1*^{-/-}

La délétion de *Bmi1* chez la souris n'est pas létale au niveau embryonnaire. À la naissance les progénitures mutantes sont comparables à la souche sauvage [168]. Dans les premières semaines suivant la naissance, les souris *Bmi1*^{-/-} développent des retards de croissances et souffrent d'infections pulmonaires et du tractus intestinal. Ces souris démontrent également des anomalies squelettiques, neurales et hématopoïétiques. Les défauts observés au niveau du système hématopoïétique sont dus à une hypoplasie sévère du thymus et de la rate et également à une réduction considérable de la population de cellules souches hématopoïétiques (CSH) au niveau de la moelle osseuse [168, 237]. Du point de vue neurologique, les souris développent divers problèmes tels l'ataxie et des tremblements [168]. Des analyses histologiques du cerveau des souris *Bmi1*^{-/-} révèlent une architecture structurale normale, malgré une taille plus petite. Cependant, une hypoplasie plus sévère au niveau du cervelet est observée et est caractérisée par une diminution de la couche des cellules granulaires [239]. L'espérance de vie des souris *Bmi1*^{-/-} est d'environ 30 jours et l'on observe chez ces souris un phénotype de vieillissement accéléré [168, 284]. Suite à la délétion de *Bmi1*, l'expression des gènes *p16*^{INK4A} et *p19*^{ARF} est augmentée au niveau des systèmes hématopoïétique et neural [239]. L'induction *p16*^{INK4A} et *p19*^{ARF} expliquerait les défauts de prolifération observés chez ces souris mutantes. La double mutation *Bmi1*^{-/-} et *INK4/ARF*^{-/-} restaure partiellement les phénotypes observés au niveau du système hématopoïétique et neural. L'hypoplasie du thymus et de la rate est renversée à 70%, le nombre de cellules CSH est rétabli et les dimensions du cervelet sont comparables à la souche sauvage. Malgré le rétablissement partiel des défauts de prolifération du système hématopoïétique et neural, ces souris doubles mutantes ne voient pas leur survie augmentée [239, 285, 286]. Cette dernière observation suggère que *Bmi1* aurait d'autres fonctions que la régulation du locus *INK4A/ARF*.

c) *Bmi1* et les cellules souches

Les cellules souches adultes sont essentielles au maintien des différents tissus d'un organisme à travers le temps, il est donc impérial de prévenir la sénescence au niveau de

ces cellules. La sénescence est un état où la cellule perd ses capacités prolifératives. *Via* la régulation de la voie RB par l'inhibition de p16^{INK4A}, Bmi1 permet de prévenir la sénescence. Bmi1 est fortement exprimé au niveau des CSH et cellules souches neurales (CSN) et sa perte induit une forte réduction du potentiel prolifératif et donc de l'auto-renouvellement de ces cellules [237, 285, 287]. Des expériences de repopulation ont permis de démontrer que la transplantation de CSH Bmi1^{-/-} ne permet de reconstituer seulement de façon transitoire le système hématopoïétique de souris irradiées. En effet, les cellules CSH Bmi1^{-/-} ne peuvent s'auto-renouveler et donnent plutôt naissance à des cellules progénitrices qui soutiennent l'hématopoïèse pour une période restreinte de 4 à 8 semaines. Bmi1 est donc essentiel au maintien et à l'auto-renouvellement des CSH [139, 237]. Les anomalies observées au niveau du cerveau et plus particulièrement au niveau du cervelet des souris Bmi1^{-/-} suggèrent également un défaut de prolifération des CSN [285]. Des études *in vitro* ont permis de démontrer l'importance de Bmi1 au niveau du maintien des CSN. Les CSN provenant de la zone sub-ventriculaire de souris adultes peuvent être isolées et cultivées sous forme de neurosphères. Une neurosphère est une colonie flottante composée de cellules souches et leurs progénitures. L'absence de Bmi1 résulte en la formation moins fréquente de neurosphères et ces dernières sont plus petites en comparaison aux neurosphères sauvages. Les CSN présentes dans les neurosphères Bmi1^{-/-} démontrent également des défauts de prolifération, de différenciation et par conséquent d'auto-renouvellement [286]. Bmi1 représente un facteur limitant et essentielle au maintien des CSH et CSN (Figure 8).

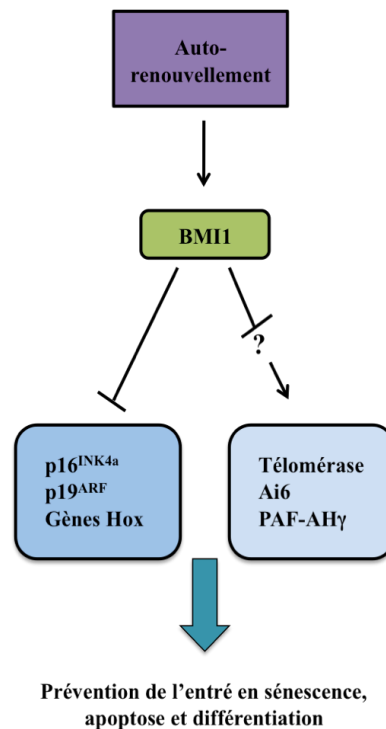


Figure 8 Schéma illustrant les différentes cibles potentielles de Bmi1 impliquées dans le maintien des cellules souches. Des signaux extrinsèques stimulent l'auto-renouvellement de la cellule souche ce qui induit l'expression de Bmi1. Par la suite, Bmi1 va induire la répression du locus INK4a/ARF et favoriser de façon indirecte l'activation de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches. Adapté de Park I.K. et al. (2004) *J. Clin. Invest.* 113 : 175-179.

d) Bmi1 et le cancer

Les protéines PcG ont été impliquées dans plusieurs types de cancers et parmi ces protéines, Bmi1 est la protéine PcG la plus souvent associée au développement néoplasique. Bmi1 a initialement été identifié comme étant un oncogène coopérant avec la

protéine c-myc dans un modèle de leucémie murin et par la suite au niveau des lymphomes B et T [240]. Depuis ce temps, l'expression de *Bmi1* a été associée à plusieurs types de cancers. Une forte expression de la protéine BMI1 est observée aux niveaux de divers cancers tels les cancers colorectaux, du foie, du sein, de la prostate, des poumons ou encore du cerveau. BMI1 est un acteur essentiel dans le maintien de la population de cellules souches cancéreuses de ces tumeurs [288-294]. Les cellules souches cancéreuses sont considérées comme les cellules responsables de la formation et du maintien de la tumeur [127]. Par exemple, la délétion de *Bmi1* au niveau de cellules souches leucémiques induit la perte du potentiel de ces cellules à former une leucémie secondaire chez le receveur [139]. La forte expression de BMI1 au niveau des tumeurs est rarement associée à une amplification génique, ce qui suggère plutôt un changement au niveau de sa régulation transcriptionnelle. Des études au niveau du médulloblastome, une tumeur cérébrale chez l'enfant, ont démontré que l'augmentation de l'expression de BMI1 est associée à l'activation de la voie Sonic Hedgehog (Shh) [137]. La forte expression de *Bmi1* au niveau de cellules souches cancéreuses favorise leur survie et leur expansion *via* la répression du locus INK/ARF. Des travaux effectués sur des cellules mammaires suggèrent également que *Bmi1* régulerait de façon indirecte l'expression de la télomérase et permettrait par conséquent l'immortalisation cellulaire. Cependant, la surexpression de *Bmi1* ne permet pas l'immortalisation des fibroblastes humains et échoue également à activer la télomérase de ces cellules. L'induction de la télomérase par *Bmi1* semble donc être une fonction spécifique à certains types cellulaires [290, 295]. Par ailleurs, la surexpression de *Bmi1* est également associée à la radiorésistance des cellules cancéreuses nasopharyngeales, où la perte de BMI1 au niveau de ces cellules mène à l'augmentation de l'apoptose P53-dépendante [296]. Dans cet article, les auteurs proposent pour hypothèse de départ un lien entre la surexpression de BMI1 au niveau des cellules cancéreuses nasopharyngeales et leur potentiel de radiorésistance. Ils démontrent que la déplétion de BMI1 dans ces cellules par l'utilisation de siRNA, permet d'induire l'apoptose suite à des traitements d'irradiation, *via* la voie P53. Cependant, les auteurs n'observent aucune augmentation au niveau des

transcrits P16 et P14 suite à la perte de BMI1, ce qui suggère que l'induction de l'apoptose n'est pas due à la perte de la répression du locus INK4A/ARF par BMI1.

Alors que la surexpression de BMI1 est observée au niveau de diverses tumeurs, la perte de Bmi1 chez la souris mène à une réduction globale de la survie, à une dégénérescence cérébrale et à une augmentation de la sénescence des cellules souches. Une expression soutenue dans le temps de BMI1 est donc bénéfique à la longévité, mais aux risques de développer des tumeurs agressives. Une régulation minutieuse de cette protéine est donc essentielle au maintien de l'homéostasie d'un organisme.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION : SECTION 3

Glioblastome multiforme

1.3.1 Les tumeurs primaires du SNC

Les cancers primaires du SNC représentent une population hétérogène et unique de néoplasme. Ils constituent 15 à 20% des cas de cancer chez l'enfant. L'organisation mondiale de la santé (OMS) classe les tumeurs du SNC en 9 catégories, parmi elles, les tumeurs primaires soit les tumeurs neuroépithéliales possèdent la plus grande incidence [297]. Parmi les tumeurs astrocytaires, on retrouve le glioblastome multiforme (GBM). Le GBM est la tumeur primaire la plus commune et létale chez l'adulte. Une description plus approfondie sur le GBM sera présentée plus loin (Tableau IV et V).

Le médulloblastome (MB) est une tumeur neuroépithéliale embryonnaire du cervelet, elle est la tumeur cérébrale la plus fréquente chez l'enfant. Près du tiers des cas sont incurables et les traitements disponibles sont associés à une haute toxicité qui cause des effets secondaires néfastes à long terme. Les cellules à l'origine de la tumeur restent à ce jour inconnues [298]. La localisation de la tumeur au niveau du cervelet ainsi que la morphologie des cellules présentes dans la tumeur laissent croire que les progéniteurs neuronaux granulaires (GNP) présents au niveau de la couche germinale externe du cervelet (EGL) seraient à l'origine de la tumeur. Les cellules du MB expriment différents marqueurs communs aux GNP (p75^{NTR}, TrkC, Zic1 et Math), alors que d'autres études démontrent la présence de marqueurs de CSN et la capacité de ces cellules à se différencier en neurones et cellules gliales suggérant donc que les CSN seraient plutôt à l'origine de la tumeur [147, 152, 299, 300]. Il a récemment été suggéré que certains sous-types de MB seraient dépendamment originaires des GNP ou des CSN [298, 301, 302]. D'un point de vue moléculaire, l'activation de la voie SHH joue un rôle essentiel dans la formation du MB et plusieurs mutations au niveau du récepteur Ptc ont été répertoriées [303]. Les mutations de *Ptc* observées au niveau du MB chez l'homme ont mené à la création d'un modèle animal, où les souris *ptc1* mutantes développent des MB [304]. La délétion de *ptc* spécifiquement au niveau des GNP ou des CSN permet la formation de MB chez la souris. Cette étude confirme que le MB peut se développer à partir des GNP et des CSN [301].

On retrouve parmi les tumeurs primaires cérébrales, les tumeurs épendymales. Les épendymomes sont des tumeurs du SNC qui se développent à partir des parois du système ventriculaire chez l'enfant et l'adulte. Le développement de la tumeur au niveau du carrefour ventriculaire empêche l'écoulement normal du liquide céphalo-rachidien et mène à l'augmentation de la pression intracrânienne dans la plupart des cas chez l'enfant, alors que chez l'adulte la pression se voit normalement augmenter du à l'effet de la masse de la tumeur en soi. Le patron d'expression génique des épendymomes diffère selon la localisation de la tumeur, qui peut être située dans la zone supratentorielle, au niveau de la fosse postérieure et au niveau de la moelle épinière. La présence de cellules souches cancéreuses a été démontrée au niveau des épendymomes. Ces cellules proviendraient de la transformation des cellules de la glie radiale (RG) et expriment différents marqueurs de CSN, tels que CD133, Nestin, RC2 et BLBP [305]. Un défaut au niveau de la division cellulaire pourrait être à l'origine de la transformation des cellules RG en cellules malignes. La dérégulation de certains facteurs de transcriptions (EMX2), des jonctions d'adhérences et des voies de signalisation tel que NOTCH peuvent entraîner des divisions cellulaires aberrantes [306]. À titre d'exemple, l'activation de la voie NOTCH par l'augmentation de l'expression de différents acteurs de cette voie (JAGGED1/2, HES1/5 et ERBB2) est observée au niveau des épendymomes supratentoriels [305, 307]. On répertorie plusieurs autres types de tumeurs neuroépithéliales qui ne seront pas discutés dans le cadre de cette thèse (Tableau V).

1.3.2 Le Glioblastome Multiforme (GBM)

a) La hiérarchie selon l'OMS

La classification de l'OMS est issue de deux grands concepts contradictoires, soit la théorie de Bailey et Cushing et l'hypothèse de Kernohan. La théorie des restes embryonnaires de Bailey et Cushing stipule que les tumeurs dériveraient de cellules embryonnaires capables de se différencier [308]. L'hypothèse de Kernohan propose plutôt que les gliomes se développeraient à partir de la dédifférenciation de cellules adultes [309]. Ainsi la classification de l'OMS a retenu respectivement de la théorie de Bailey et Cushing et de l'hypothèse de Kernohan, la notion de différenciation subjective et la valeur des composantes anaplasiques présentes dans les tumeurs. La classification de l'OMS définit également le grade en fonction de la présence de certains critères de malignité, tels les atypies nucléaires, les mitoses aberrantes, la néovascularisation et la présence de nécrose [310]. La gradation histologique est un moyen qui permet de prédire le comportement biologique d'un néoplasme. D'un point de vue clinique, la gradation d'une tumeur est un élément clé afin de déterminer la thérapie adéquate à utiliser. La classification des tumeurs du système nerveux central de l'OMS est constituée d'un système de gradation basé sur les niveaux de malignité des tumeurs [297]. Les lésions de grade I représentent les tumeurs bénignes qui possèdent un faible potentiel prolifératif et qui peuvent être traitées dans la plupart des cas par une résection chirurgicale. Les néoplasmes de grade II ont un caractère infiltrant, mais possèdent toujours un faible potentiel prolifératif. Malgré un taux de prolifération faible, l'aspect infiltrant de ces tumeurs augmente les chances de récurrences suite aux traitements. La désignation du grade III est attribuée aux lésions qui démontrent des évidences histologiques de malignité. Les traitements de radiothérapies et/ou chimiothérapies sont utilisés à titre d'adjuvant à la résection de la tumeur par chirurgie. Finalement, le grade IV est assigné aux tumeurs histologiquement malignes qui possèdent une activité mitotique active, un grand potentiel d'infiltration des tissus environnants et la

présence de sites nécrotiques et de néovascularisation. Une évolution rapide de la tumeur de grade IV est souvent observée suite aux traitements et dont la finalité est fatale [311].

b) Glioblastome multiforme primaire vs secondaire

Le glioblastome multiforme (GBM ou astrocytome de grade IV) est la tumeur du cerveau la plus fréquente et la plus maligne chez l'adulte, représentant plus de 50% des cas de tumeurs primaires du SNC [312]. L'espérance de vie, suite au diagnostic, est en moyenne de 12 mois. Il n'existe présentement aucun traitement efficace afin d'éradiquer cette tumeur agressive [313]. D'un point de vue cellulaire, le GBM est une tumeur hautement hétérogène, d'où le terme multiforme. On retrouve au sein de la tumeur un cocktail cellulaire, dont certaines sont des cellules différenciées avec une morphologie stellaire et exprimant des marqueurs astrocytaires (GFAP et S100) et d'autres sont des petites cellules rondes indifférenciées mélangées aux éléments stromaux, tels les cellules de la microvasculature, des astrocytes activés et la microglie [314].

On retrouve deux types distincts de GBM, soit primaires et secondaires. On les distingue par leur origine cellulaire et patron génétique. La différenciation de ces deux types de GBM a été mise en évidence, pour la première fois, en 1940 par le Dr. Scherer. Il affirma que les GBM secondaire se développaient à partir d'astrocytome récalcitrant et doit être différencié du GBM primaire dont l'origine reste inconnue [315]. Malgré cette observation, en 1979, l'OMS ne considérait toujours pas le GBM comme étant un gliome astrocytaire, mais plutôt comme étant une tumeur d'origine embryonnaire. L'introduction de l'immunohistochimie a permis par la suite de catégoriser le GBM comme étant un néoplasme astrocytaire [297]. La séparation entre les GBM primaire et secondaire reste cependant conceptuelle puisque aucune différence histologique n'est distinguable. L'accumulation de plusieurs évidences laisse croire que ces tumeurs sont toute fois des entités néoplasiques différentes et pourraient répondre par conséquent différemment face aux traitements de chimiothérapies et/ou radiothérapies [316-320]. On distingue premièrement les GBM primaire et secondaire en fonction de leur origine. Le glioblastome primaire constitue 90% des cas de GBM et apparaît rapidement *de novo* sans signes cliniques, alors que le GBM secondaire se

développe lentement par la progression d'un astrocytome récalcitrant de grade II (astrocytome diffus) ou III (astrocytome anaplasique) [321]. Une différence évidente est observée au niveau de la distribution des patients atteints GBM primaire ou secondaire en fonction de l'âge. L'âge moyen des patients atteints d'un GBM primaire ou secondaire est respectivement de 62 ans et 45 ans [316, 317]. Au niveau de la population, le développement du GBM primaire est plus prépondérant chez l'homme et le GBM secondaire chez la femme [316]. Aucune différence significative n'est observée au niveau de la survie des patients atteints d'un GBM primaire ou secondaire [316, 317]. D'un point de vue génétique, plusieurs distinctions sont notées entre le glioblastome primaire et secondaire (Figure 9). Les altérations géniques les plus fréquentes au niveau du GBM primaire sont l'amplification du gène *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (40%) et les mutations de la protéine *Phosphatase and TENsin homolog* (PTEN) (25%) [317, 322]. La voie de signalisation EGFR/PTEN/Akt/mTOR semble jouer un rôle clé dans le développement du glioblastome primaire. Une augmentation de la voie de signalisation EGFR/Akt/mTOR résulte en une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire par un blocage de l'apoptose. La protéine PTEN est impliquée dans la régulation de la migration cellulaire et l'invasion des tumeurs *in vivo* [323]. On observe au niveau du GBM secondaire plusieurs mutations du gène suppresseur de tumeur TP53 (65%) et une perte d'expression de p14^{ARF} (76%, un répresseur de l'activité de MDM2) dû à une délétion ou à la méthylation de son promoteur [317, 324, 325]. L'inactivation de la voie RB *via* la méthylation de son promoteur, ainsi que la délétion homozygote de p16^{INK4A} et la perte de l'hétérogénéité (LOH) du chromosome 10q sont également observées dans les deux types de GBM [324, 325]. De plus, 5 GBM secondaires sur 6 présentent des mutations somatiques au niveau du gène encodant pour la protéine isocitrate déhydrogénase 1 (IDH1) et son homologue IDH2 [326]. Ces mutations sont également observées dans plus de 70% des gliomes de grade II et III, mais absentes au niveau des gliomes de grade I. Cette dernière observation suggère que les mutations au niveau du gène *IDH1* permettent de distinguer les gliomes de bas grades (OMS II) du grade inférieur et qu'elles sont également impliquées dans la progression de la tumeur en GBM secondaire (Figure 9) [326].

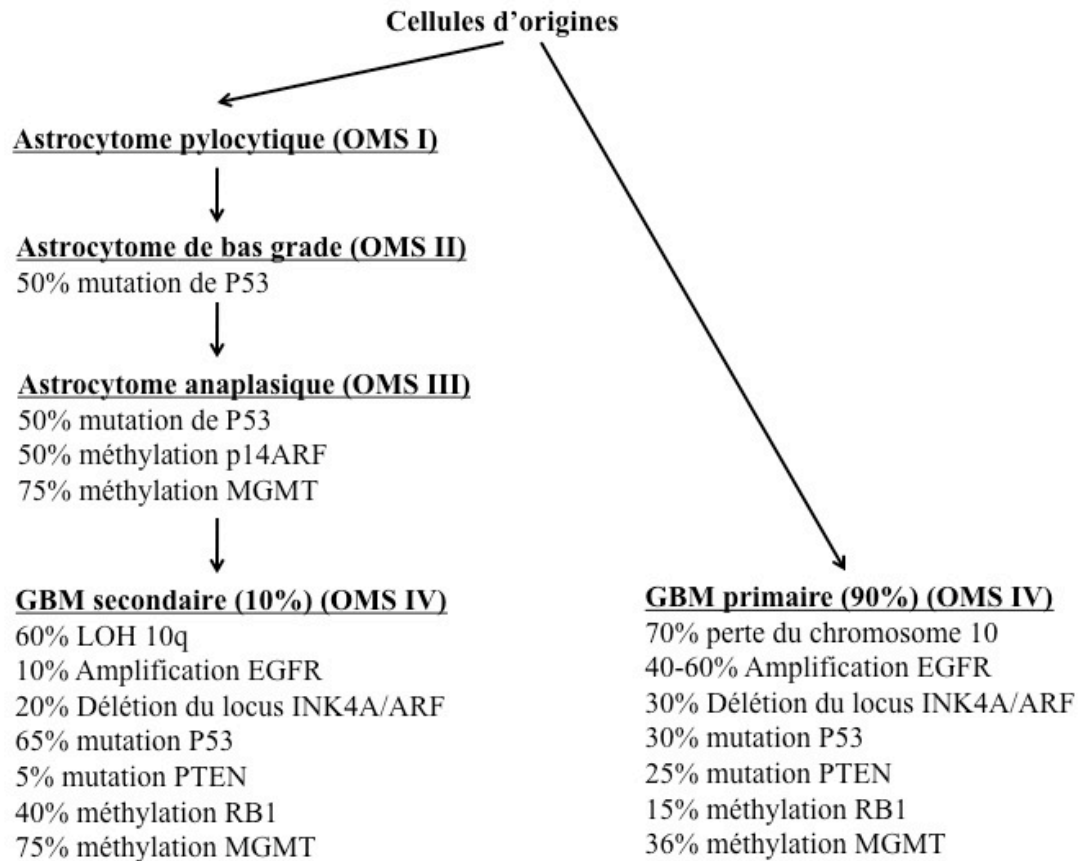


Figure 9 Représentation des altérations majeures au niveau de l'initiation et la progression des GBM primaire et secondaire. Adapté de Kanu O.O. et al. (2009) *Clin. Med. Oncol.* 3 : 39-52.

c) Voies moléculaires altérées dans le GBM

Le cancer est une maladie qui arbore des altérations génomiques multiples, tels que des changements au niveau des séquences d'ADN, des aberrations du nombre de copie, des réarrangements chromosomiques ou encore des modifications au niveau de la méthylation de l'ADN. Tous ces défauts conduisent au développement et à la progression néoplasique.

Ainsi, le cancer est le résultat de l'accumulation d'aberration au niveau de gènes qui contrôlent des voies biologiques critiques. Les avancées dans le domaine du séquençage du génome humain ont permis le profilage génétique de différentes maladies dans le but d'identifier les altérations présentes et éventuellement permettre la création de thérapies plus spécifiques et ciblées. Le regroupement *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) a pour objectif de cataloguer et découvrir les altérations génomiques majeures impliquées dans le développement néoplasique au niveau de grande cohorte de tumeurs humaines. Le GBM fut le premier cancer analysé par le TCGA, où plus de 500 spécimens primaires ont été analysés [327]. Cette étude a permis, par la combinaison d'altérations géniques, de diviser le GBM primaire en sous groupes (classique, mésenchymal, neural et proneural) (Figure 10). La création de sous groupes au niveau d'une même entité tumorale pourrait mener à des traitements plus ciblés selon les altérations biologiques et génétiques définies pour chacun des groupes. Cette étude a démontré qu'on retrouve principalement trois voies moléculaires altérées au niveau de GBM, soit les voies RTK/RAS/PI3K(88%), P53 (87%) et RB (77%) [327] (Figure 11). La stimulation de la prolifération par les voies moléculaires impliquant des facteurs de croissances sont constitutivement actives chez le GBM. L'augmentation de l'expression ou l'amplification géniques des récepteurs des facteurs de croissances (EGFR, ERBB2, PDGFRA, MET, etc.), ainsi que des mutations menant à une activation constitutive de ces récepteurs indépendamment de la présence de son ligand peuvent mener à cette stimulation proliférative. Alternativement, l'activation de voies intrinsèques en aval des récepteurs de croissances peut également mener à l'augmentation de la prolifération. À titre d'exemple, l'augmentation de régulateurs positifs (PI3K) ou la perte de régulateurs négatifs (PTEN) *via* des altérations géniques mène à l'activation de la voie PI3K/Akt [328]. Cette voie moléculaire est un régulateur critique du métabolisme, de la croissance et de la survie des cellules cancéreuses. La liaison du ligand au récepteur tyrosine kinase (ex. EGFR) mène à l'activation de cette voie et ultimement à l'activation de la protéine mTOR. Les effecteurs en aval de mTOR contrôlent une multitude de fonctions biologiques, tels l'adaptation à des conditions hypoxiques et la production de protéines [329]. Cependant, cette stimulation pro-proliférative n'est pas suffisante à la transformation

néoplasique et doit s'accompagner de la perte de voies clés qui contrôlent également la prolifération. Les deux voies majeures de suppression tumorales sont les voies P53 et RB. Ces deux voies moléculaires contrôlent directement l'entrée et la progression du cycle cellulaire. La protéine P53 permet l'activation de la transcription de P21, une CDKI (*cyclin-dependent kinase inhibitor*) qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par l'inhibition des cyclines D [330]. L'activation de la voie RB prévient l'entrée en phase S du cycle cellulaire *via* l'inhibition du facteur de transcription E2F, un facteur critique à l'initiation de la réplication de l'ADN [331]. L'inactivation de ces deux voies peut se faire directement *via* des mutations ou délétion au niveau de P53 et RB ou indirectement *via* des altérations de différents acteurs présents dans la voie moléculaire. À titre d'exemple, la délétion homozygote du locus INK4A/ARF est observée dans environ 50% des GBM; où P14^{ARF} (CDKN2A) est une kinase qui régule de façon positive la voie P53 *via* l'inhibition de MDM2 (un répresseur de P53) et où P16^{INK4A} permet l'activation de la voie RB par la répression de cyclines (CDK4 et 6) [252, 271]. L'oncogène c-Myc contribue également à l'augmentation de la prolifération au niveau des GBM. c-Myc est un facteur de transcription qui conduit à l'expression de protéines qui promeuvent la progression du cycle cellulaire (cyclines et cycline-kinase dépendantes) et bloque la transcription d'inhibiteurs du cycle cellulaire (CKI; *cyclin kinase inhibitor*) [332]. La cellule possède un mécanisme d'auto-défense qui permet de remédier à une stimulation excessive de la prolifération et à une augmentation de l'expression d'oncogènes (tel Myc) : la mort cellulaire programmée ou l'apoptose. Afin de surpasser cette limitation proliférative, les cellules tumorales acquièrent différentes aberrations génétiques qui mènent à l'inactivation des voies pro-apoptotiques et à l'activation préférentielle des voies anti-apoptotiques. L'inactivation de P53 *via* différentes mutations et délétions homozygotes est observée dans 35% des GBM. Outre l'activation de la transcription de P21, P53 permet également l'expression de gènes pro-apoptotiques, tels Bax ou encore Fas. [333, 334]. De plus, l'inactivation génétique de différentes caspases et d'autres acteurs pro-apoptotiques ont également été répertoriés au niveau du GBM [335]. L'augmentation de facteurs anti-apoptotiques est un autre moyen de contrer l'activation de l'apoptose. Par ailleurs, la surexpression du facteur de transcription

NKκB a été observée dans les GBM [336]. NKκB est un médiateur majeur anti-apoptotique. En effet, il favorise l'expression de diverses protéines qui permettent l'inhibition de l'apoptose. Parmi les cibles transcriptionnelles de NKκB, on retrouve la famille de Protéines Inhibitrices de l'Apoptose (IAP). Les IAP permettent de bloquer l'action des caspases activées et par conséquent, empêchent la progression de l'apoptose. NKκB permet également la transcription de Bcl-2 et Bcl-X_L. Ces protéines préviennent l'activation de l'apoptosome en bloquant la perméabilisation de la membrane mitochondriale [337].

L'angiogénèse florissante est une des principales caractéristiques des GBM et est un critère qui permet de distinguer les gliomes de haut grade à ceux de bas grade. La croissance d'une tumeur est limitée par la contrainte du soutien de la vascularisation dans l'apport en nutriments et l'élimination des déchets métaboliques. La tumeur doit donc soutenir une néovascularisation constante dans le but de favoriser son expansion [338]. L'expression de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales promeut l'établissement de la néovascularisation au niveau de la tumeur. VEGF est le facteur de croissance principal impliqué dans l'angiogénèse du GBM. Le VEGF sécrété par les cellules tumorales favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales présentes à proximité de la tumeur. Les cellules endothéliales exprimant le récepteur VEGFR vont ainsi permettre la formation de la microvasculature de la tumeur [339]. Les conditions d'hypoxie présentes au centre de la tumeur semblent jouer un rôle essentiel dans la création de nouveaux vaisseaux sanguins, puisqu'elles permettent l'augmentation de l'expression de VEGF *via* l'activation de la voie HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) et AKT/PI3K [340, 341]. Plusieurs autres médiateurs angiogéniques alternatifs sont surexprimés au niveau du GBM (tels le bFGF, l'angiopoïétine, le PDGF, IL-8 et HGF/SF) [342]. Finalement, de l'orchestration minutieuse de toutes ces altérations géniques menant à l'augmentation de la prolifération, l'inhibition de l'apoptose et l'activation de la néogénèse vasculaire, naît le caractère unique et agressif du GBM.

Une récente étude publiée par le groupe de recherche du Dr N. Hayes en collaboration avec le regroupement TCGA suggère un nouveau mode de classification des

GBM basé sur les altérations génétiques et moléculaires présentes dans la tumeur. Ainsi, quatre sous-classes de GBM sont proposés : classique, mésoenchymale, neurale et proneurale (Figure 10) [343]. La classification des GBM couramment utilisée (classification de l'OMS) se base sur les aspects histopathologiques des tumeurs et par conséquent ce système ne permet pas de cibler les traitements thérapeutiques en fonction du profil génétique de la tumeur en question. Ainsi, l'importance de cette nouvelle classification repose sur le fait que différentes approches thérapeutiques doivent être utilisées en fonction du profil génétique de la tumeur afin d'augmenter l'affinité et l'efficacité des traitements dans le but d'éradiquer cette dernière. À titre d'exemple, 97% des GBM primaires de la sous-classe classique démontrent des amplifications au niveau du gène EGFR, ainsi l'utilisation d'inhibiteur contre le récepteur EGF pourrait avoir un plus grand impact au niveau de cette sous-classe [343]. Finalement, la conjugaison de ces deux modes de classifications représente une approche prometteuse dans le but d'augmenter la spécificité et l'efficacité des traitements contre le GBM.

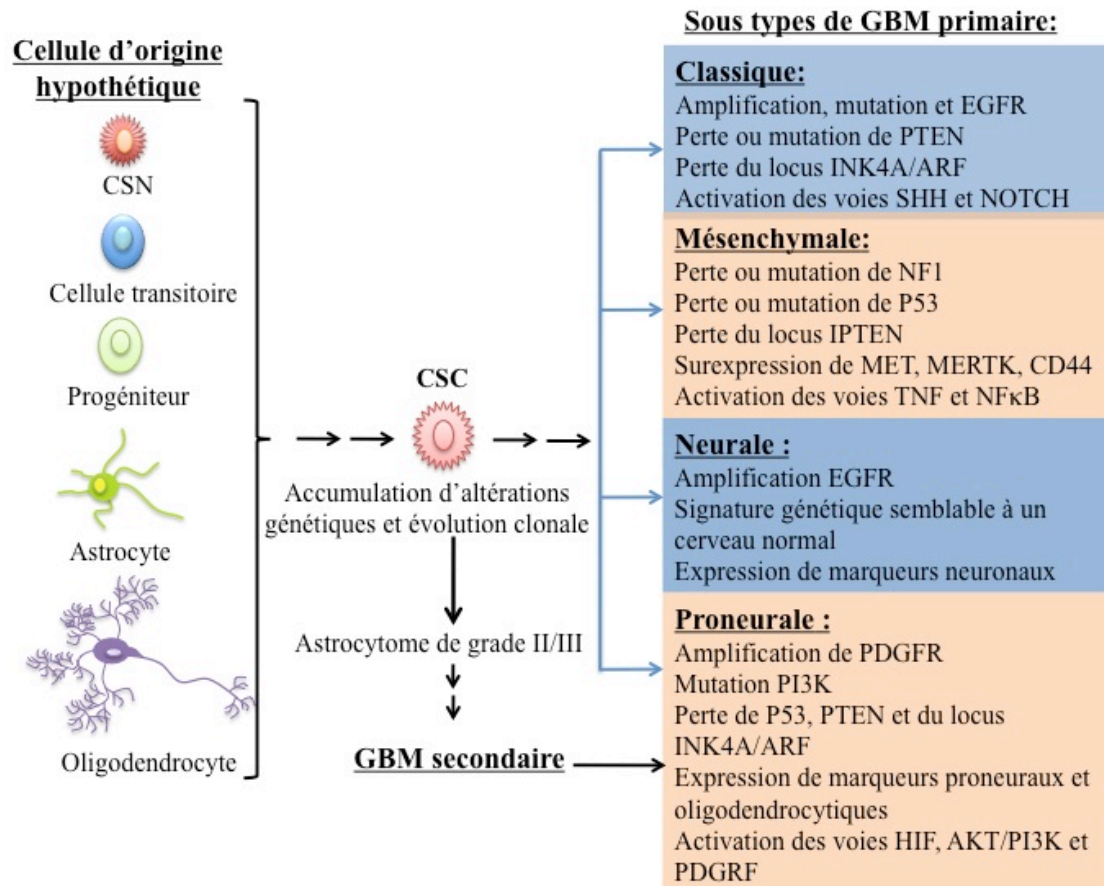


Figure 10 Schématisation de l'origine et des différents types de GBM et leurs altérations génétiques. Adapté de Van Meir E.G. et al. (2010) *CA Cancer J. Clin.* 60 : 166-193.

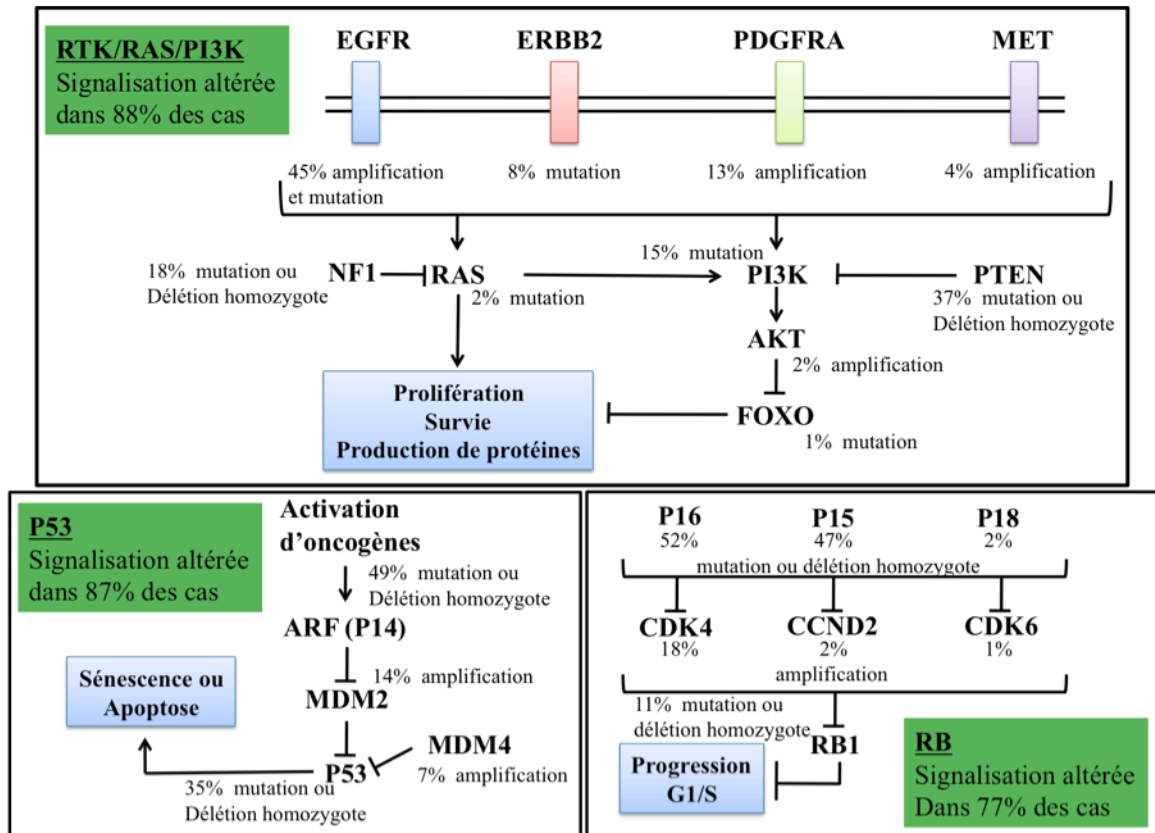


Figure 11 Représentation des trois principales voies de signalisations les plus altérées au niveau du GBM. Modifié de Van Meir E.G. et al. (2010) *CA Cancer J. Clin.* 60 : 166-193.

d) GBM et les cellules souches cancéreuses

L'hétérogénéité cellulaire présente au sein du GBM et le fait que seule une fraction minoritaire de cellules soit responsable du maintien de la tumeur suggèrent que les cellules à l'origine de la formation des GBM sont multipotentes. De plus, certaines propriétés biologiques des cellules du GBM, telles la résistance aux traitements de chimiothérapies et de radiothérapies ou encore le caractère infiltrant et la prolifération soutenue, supportent l'hypothèse de la présence de cellules souches cancéreuses au niveau de cette tumeur [344]. Les cellules souches cancéreuses (CSC) représentent une population minoritaire de cellules présente au sein de la tumeur et possèdent la capacité de s'auto-renouveler, de se différencier et de générer une tumeur secondaire identique à la tumeur d'origine lorsque celles-ci sont greffées *in vivo*. La présence de CSC au niveau du GBM a premièrement été mise en évidence par des études *in vitro*; où la dissociation d'un spécimen de GBM frais pouvait être cultivé sous des conditions de CSN et permettre ainsi la formation de neurosphères. Les neurosphères générées à partir d'un GBM peuvent être maintenues à travers divers passages et ont la capacité de se différencier en cellules neurales et gliales [152, 345, 346]. L'identification du marqueur de CSN, CD133, a subséquemment poussé son utilisation dans le but d'isoler des CSC CD133+ au sein du GBM. La présence de cellules CD133+ ayant la capacité à former des neurosphères *in vitro* a été décelée au niveau du GBM. Ces cellules peuvent également être différenciées en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Les études de transplantation au niveau du cerveau de souris immunodéficientes ont permis de mettre en évidence le caractère hautement tumorigénique des cellules CD133+ comparativement aux cellules CD133- *in vivo*; où aussi peu que 100 cellules CD133+ xéno-greffées permettent la formation d'une tumeur, alors qu'aucune tumeur n'est observée lorsque plus de 10^5 cellules CD133- sont utilisées [152]. Ainsi les cellules CD133+ soutiennent la formation d'une tumeur secondaire qui résume phénotypiquement la tumeur d'origine [345]. Les cellules CD133+ représentent une population minoritaire et leur fréquence varie entre 5 à 30% du nombre total des cellules présentes dans la tumeur [347]. Outre l'expression de CD133, plusieurs autres marqueurs caractéristiques des CSN sont exprimés par les CSC du GBM, tels Nestin, SSEA1,

Musashi, SOX2 et BMI1 [293]. L'utilisation du marqueur CD133 dans la délimitation de la population de CSC du GBM est cependant controversée. *Son et al.* affirment que la protéine SSEA1 serait un marqueur universel plus approprié afin de cibler les CSC du GBM, puisque 40% des tumeurs de GBM qu'ils ont isolé n'exprimaient pas la protéine CD133 [348]. Au niveau du cerveau adulte, les CSN se concentrent alentour des vaisseaux sanguins (niche vasculaire), ce qui leurs permet d'avoir accès aux nutriments et aux molécules signalétiques exogènes [78]. Tout comme les CSN, les CSC du GBM sont présentes au niveau des niches vasculaires, ce qui leur assure un apport en nutriment et oxygène, mais permet également la régulation de l'auto-renouvellement et la différenciation cellulaire [349]. Les CSC présentes dans la tumeur reçoivent non seulement des signaux de la niche, mais elles peuvent aussi la moduler en stimulant l'angiogénèse par la sécrétion de VEGF [350]. Finalement, les CSC dépendent également des voies moléculaires impliquées dans le maintien de l'auto-renouvellement des CSN normales (Figure 12). À titre d'exemple, l'inhibition des voies AKT/PI3K, Notch, SHH ou Wnt/ β -caténine affecte tous la formation et la prolifération des neurosphères de GBM *in vitro* [351]. Les CSC du GBM partagent non seulement des similitudes génétiques avec les CSN, mais aussi physiques de part leur habilités à s'auto-renouveler, se différencier, de part leur proximité des niches vasculaires et de part leur dépendance envers les mêmes voies moléculaires.

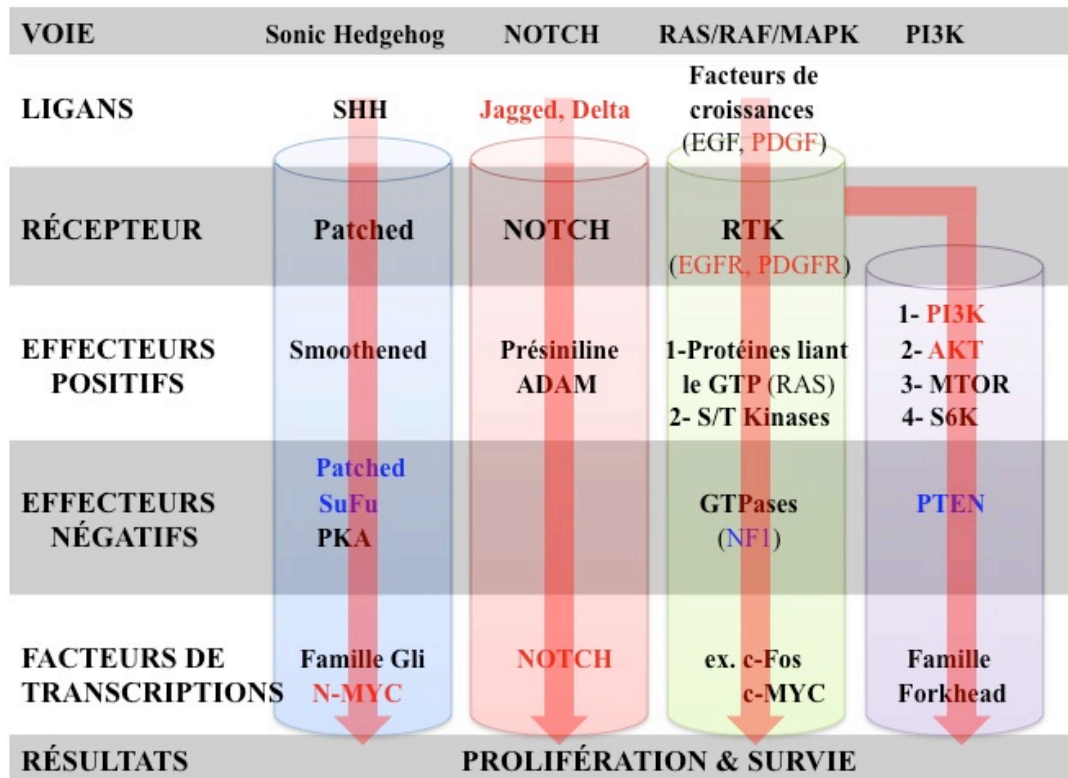


Figure 12 Schématisation des différentes voies moléculaires communes aux CSN et CSC neurales. Les amplifications, mutations activatrices et les activations autocrines communes sont en rouge. Les délétions et les mutations communes qui mènent à une perte de fonction sont en bleu. Adapté de Stiles C.D. et Rowitch D.H. (2008) *Neuron* 58 : 832-846.

e) La cellule à l'origine de la tumeur

Malgré l'identification des cellules CSC responsables du maintien du GBM, une grande question persiste : Quelle est la cellule à l'origine de la tumeur? Présentement deux écoles de pensées persistent. La première stipule que des CSN ou des cellules progénitrices neurales se transformeraient en CSC suite à l'accumulation d'aberrations génétiques. [352].

La seconde propose diverses mutations au niveau de cellules matures du cerveau (astrocytes, neurones et oligodendrocytes) soient responsable de la «dédifférenciation» des cellules, conduisant ainsi à la restauration d'une identité de cellule souche (Figure 10) [353]. L'introduction successive des gènes codant pour la télomérase transcriptase inverse (hTERT), le papillomavirus 16 E6/E7, Ras et l'activation de la voie Akt mènent à la formation de GBM à partir d'astrocytes humains [354]. Comparativement aux astrocytes, l'activation de Ras et d'Akt est suffisante à la transformation de cellules Nestine+ (cellules progénitrices neurales). Cependant, l'activation de Ras et d'Akt couplée à la perte du locus *INK4A/ARF* au niveau d'astrocytes permet le développement de GBM [355]. Par ailleurs, l'inactivation des voies RB et P53 mène à la dédifférenciation des astrocytes en progéniteurs glias ou CSN. Ces astrocytes transformées peuvent, subséquentement, produire un GBM lorsqu'ils sont infectés par des rétrovirus encodant EGF ou PDGF [353, 356]. Ces modèles démontrent que la combinaison d'altérations de différentes voies moléculaires est suffisante à la formation d'un gliome autant au niveau de cellules différenciées ou non différenciées. La production d'astrocytes et d'oligodendrocytes se maintient durant toute la vie, cependant des évidences suggèrent que ces cellules ne se divisent pas *in vivo* chez l'homme [357-359]. L'absence de division cellulaire diminue la probabilité qu'une même cellule accumule toutes les mutations nécessaires à sa transformation. Les capacités proliférative et migratoire des CSN ou des progéniteurs en font des candidats de choix dans la quête de l'origine cellulaire du GBM.

f) Les modèles animaux

Le profilage génétique a permis d'identifier les différents gènes et voies moléculaires altérées au niveau du GBM [327]. Cependant ces informations ne suffisent pas à l'identification des événements étiologiques. La modélisation du GBM chez la souris va permettre de pointer les aberrations génétiques responsables du développement de cette tumeur. De plus, les modèles animaux représentent un outil puissant non seulement dans l'étude de la biologie de la tumeur, mais également dans le développement de stratégies

thérapeutiques potentielles contre le GBM. Le modèle animal standard le plus utilisé dans l'étude du GBM et l'optimisation de thérapies est la xéno greffe de cellules de GBM humaines au niveau du cerveau de souris immunodéficientes. Ce système permet une reproductibilité au niveau de la localisation de la formation de la tumeur, du taux de croissances de cette dernière et la longévité de l'animal. Malgré ces avantages, dans la plus part des cas, cette technique ne permet pas de reproduire le caractère invasif de la tumeur et pose également problème au niveau des thérapies basées sur les réponses immunologiques [360]. De plus, cette méthode ne nous apprend très peu sur l'étiologie et la biologie de la tumeur, ce qui pourrait être utile dans l'élaboration de thérapies plus rationnelles contre cette maladie [361]. Dû aux limitations du modèle par xéno greffe, plusieurs laboratoires ont développé différents modèles de souris modifiées génétiquement, soit par des modifications géniques au niveau des cellules germinales (ex. système Cre/Lox) ou par transfert de gènes au niveau des cellules somatiques. Le transfert de gènes au niveau de cellules somatiques par l'utilisation du vecteur d'expression viral RCAS (réplication-competent avian sarcoma) permet de cibler l'expression du gène cible au niveau d'un type cellulaire spécifique [362]. L'expression du gène cible sera possible seulement au niveau des cellules exprimant le récepteur TVA. Deux modèles de souris transgéniques Gtv-a (cellules GFAP+) et Ntv-a (cellules Nestine+) permettent de diriger l'expression de TVA spécifiquement au niveau des astrocytes ou progéniteurs neuraux respectivement [355].

La stimulation transductionnelle des voies Akt et Ras est fréquemment observée au niveau du GBM. Le transfert au niveau des astrocytes ou progéniteurs neuraux des formes constitutivement actives d'Akt ou Ras par le système RCAS n'est pas suffisant au développement d'une tumeur, alors que leur combinaison mène à la formation d'un GBM uniquement à partir des progéniteurs neuraux [363]. La perturbation des voies régulatrices négatives du cycle cellulaire (INK4A/ARF, P53 et RB) n'est pas suffisante à la formation d'un gliome, mais peut avoir un effet oncogénique amplificateur lorsque jumelée à certaine voie de signalisation [364]. Ainsi, au niveau des astrocytes, la combinaison de l'activation de voies transductionnelles (Ras et Akt) jumelée à la perte de régulateurs négatifs du cycle cellulaire (INK4A/ARF) favorise la formation d'une tumeur [355]. Plusieurs autres

modèles animaux se basent sur cette combinaison afin de former un GBM. À titre d'exemple, la perte de NF1, un gène suppresseur tumoral qui mène à l'inactivation de la voie Ras, au niveau des cellules GFAP⁺ de souris mutantes pour P53 mène au développement de GBM [365]. Les souris hétérozygote pour PTEN, un régulateur négatif de la voie PI3K/Akt, où l'expression du récepteur EGF est amplifiée développent également des gliomes malins [366]. Ces modèles animaux démontrent que la combinaison de différentes altérations clés peut mener au développement du GBM chez la souris, ainsi l'origine du gliome n'est pas reliée à un événement unique. Ces modèles représentent des outils essentiels au développement de thérapies contre le GBM. À titre d'exemple, il est connu que les souris INK4A/ARF mutante où le récepteur EGF est amplifié développent des GBM. Cependant, *Bruggeman et al.* ont démontré, dans des études de xénogreffe, que la délétion de BMI1 au niveau de CSN INK4A/ARF^{-/-} et EGFr* (forme constitutivement active de EGFr) mène à la formation de gliomes de bas grade plutôt qu'à un GBM. Ainsi, la protéine PCG Bmi1 est essentielle au développement de GBM chez la souris et ce indépendamment de sa fonction régulatrice du locus INK4A/ARF. BMI1 est également surexprimé au niveau des GBM chez l'homme [367]. Ainsi ce modèle animal a permis d'identifier un candidat potentiel à considérer dans le développement de futures thérapies.

g) Les stratégies thérapeutiques contre le GBM

Depuis la dernière décennie, le pronostic des patients atteints du GBM reste inchangé et ce, malgré les avancées dans les domaines de la radio/chimiothérapies et de la neurochirurgie. Au point de vue chirurgical, les limitations sont dues au caractère infiltrant de la tumeur. De plus, différents laboratoires ont fait un lien entre la radio et chimiorésistance de la tumeur et les CSC présentes dans cette dernière [368-371]. À titre d'exemples, *Bao et al.* ont démontré que suite aux traitements d'irradiation gamma (γ), les CSC sont résistantes dues à une activation préférentielle des protéines impliquées dans la reconnaissance et la réparation des dommages à l'ADN. Les traitements d'irradiation γ mènent certes à la diminution de la tumeur à court terme, mais ils entraînent également un

enrichissement des CSC au sein de la tumeur, ce qui explique un regain rapide de la croissance de la tumeur suite aux traitements [368]. Cibler directement les CSC au niveau du GBM pourrait augmenter l'efficacité des traitements cytotoxiques conventionnels. Différentes stratégies sont proposées afin d'affecter la survie des CSC. Premièrement, s'attaquer à la niche vasculaire qui soutient les CSC. Il est connu que les CSC s'écritent des niveaux élevés de VEGF afin de promouvoir l'angiogénèse et par conséquent favoriser leur propre survie [372]. L'utilisation d'agents anti-angiogénique bloquant la création de la microvasculature de la tumeur serait à considérer dans les traitements contre le GBM. Récemment, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé l'utilisation d'un nouvel agent anti-angiogénique, le bevacizumab (Avastin), en guise de thérapie contre le GBM. Le bevacizumab est un anticorps dirigé contre le VEGF et permet sa neutralisation [373]. Une seconde stratégie consiste à cibler différentes voies de signalisations essentielles dans le maintien et la survie de CSC, tels les voie RTK/Akt, Notch, BMP/TGF- β , SHH/Gli, Wnt/ β -caténine, STAT3 et GSK3- β [374-380]. Il est connu, par exemple, que la protéine GSK3- β est impliquée au niveau de différentes voies de signalisation, tel que la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. La réduction du niveau de GSK3- β mène à l'induction de la différenciation des CSC du GBM et à une réduction de l'expression de marqueurs spécifiques de cellules souches (Sox2 et Myc). Plusieurs inhibiteurs pharmacologiques spécifiquement dirigés contre GSK3- β sont disponibles sur le marché [380]. Une autre stratégie thérapeutique possible contre le GBM consisterait à cibler de façon spécifique différents facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la population des CSC (Sox2, Oct4, Nanog, c-Myc, Olig 2 et BMI1) [367, 381-383]. Favoriser l'induction de la différenciation des CSC du GBM représenterait une autre approche dans le but d'éliminer les CSC de la tumeur. Il a été démontré que l'induction de l'expression de différentes protéines, tels BMP4, PTEN et Sox11 favorise la différenciation des CSC du GBM [332, 384, 385]. Enfin, une dernière approche consiste à l'utilisation des micro-ARN (miARN). Les miARN sont un groupe de petits ARN non-codant qui inhibent la traduction de certain ARNm *via* des modifications post-transcriptionnelles. Les miARN sont considérés comme des régulateurs cruciaux de la prolifération cellulaire et la

différentiation de cellules souches. miARN-21, par exemple, est fortement exprimé au niveau du GBM et son inhibition induit l'apoptose [386]. D'autres miARN (124, 137 et 451) sont significativement diminués au niveau du GBM et leur augmentation mène à la perte de la prolifération et à l'augmentation de la différenciation des CSC [387, 388]. Les miARN semblent être également une approche thérapeutique potentielle contre le GBM. Finalement, l'identification des CSC au niveau du GBM et leurs fonctions dans la progression et la résistance de la tumeur face aux thérapies conventionnelles ont permis d'améliorer la compréhension au niveau de la biologie de la tumeur et également à réévaluer les approches thérapeutiques courantes.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION : SECTION 4

Domage à l'ADN

1.4.1 Les différents types de lésions à l'ADN

Dans les cellules, l'ADN contenu dans le génome subit des dommages de façon extensive et continue. L'environnement intracellulaire constitue la source principale de ces atteintes envers l'ADN, par l'hydrolyse et l'exposition aux produits métaboliquement réactifs qui causent l'oxydation et l'alkylation de l'ADN [389]. On estime entre mille et plus d'un million le nombre de lésions par cellule et par jour [390]. Afin de maintenir son intégrité et prévenir le développement de maladies, la cellule a élaboré différents mécanismes sophistiqués de reconnaissance et de réparation des dommages à l'ADN.

Les sites abasiques (AP; apurinique/apyrimidique) représentent le type de dommages endogènes le plus fréquent avec une fréquence d'environ 10 000 événements par cellule par jour (Figure 13) [389]. Les sites AP peuvent être produits de façon spontanée par hydrolyse ou par l'action de toxines, la radiation et l'ADN glycosylase impliqué dans la voie de réparation BER. Les sites AP peuvent induire un blocage de la réplication et sont également la source de mutations [391-393]. La correction de ces lésions est essentielle afin d'assurer la conservation de l'intégrité et de la stabilité génomique de la cellule. Un défaut au niveau de la reconnaissance et de l'initiation de la réparation des sites AP est létal pour la cellule [394]. La déamination de la cytosine ou de l'adénine en uracile et en hypoxantine respectivement représente également un autre type de réaction d'hydrolyse portant atteinte à l'ADN. La production de ces deux dérivés mène à une erreur d'encodage lors de réplication et peut induire une mutation si non réparé [395-397].

L'oxydation et l'alkylation des bases azotés sont différents types de dommages qui affectent la structure de la base sans altérer la structure du brin d'ADN et peuvent ultimement mener à l'arrêt de la fourche de réplication dans certain cas. Ces types de lésions sont également hautement mutagéniques. La respiration aérobie est une source importante de production d'espèces réactives oxygénées (ROS). Les ROS ainsi que les UV sont les principales sources d'oxydation de l'ADN. Les rayons UV peuvent induire la formation de ROS par l'excitation de chromophores endogènes, tels par exemple les

NAD(P)H, les flavines, les cytochromes et les hèmes. Les ROS peuvent ultimement induire différentes lésions au niveau de l'ADN comprenant une vaste variété de bases oxydées (*ex.*, 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxoG), 5-hydroxycytosine (5-ohC), dihydrothymine (DHT), etc.) et des cassures simple-brin [398-401]. L'alkylation des bases constitue un autre type fréquent de lésion à l'ADN. De façon endogène, l'alkylation peut être causée entre autre par la présence de donneurs de groupement méthyle (*ex.*, S- adénosylméthionine). L'exposition à des agents chimiques exogènes, tels ceux utilisés en chimiothérapie, peut également induire une alkylation de l'ADN. La création d'une liaison covalente d'un groupement méthyle avec l'ADN mène à la formation d'une base méthylée cytotoxique (*ex.*, 3-méthyladénine (3-mA), O⁶-méthylguanine (O6-mG), etc.) [402-404].

La formation de dimères par la création de liaisons covalentes aberrantes entre des pyrimidines adjacentes représente des photo-produits de l'ADN (CPD (*cyclobutane pyrimidine dimer*) et (6-4 PD) 6-4 pyrimidine-pyrimidone) causé par l'absorption de rayons UV (UV-B et C). La formation de ces dimères de pyrimidine, hautement toxiques, provoque une distorsion au niveau du brin d'ADN et induit un blocage de la transcription et de la réplication (Figure 13). De plus, la présence d'une lésion non réparée lors de la réplication peut mener à la formation d'une mutation par l'incorporation du mauvais nucléotide [405-410].

Finalement, les bris doubles brins (BDB) de l'ADN constituent le type de dommage le plus important qui affecte l'intégrité génomique de la cellule. Effectivement, les BDB de l'ADN peuvent mener à la perte de matériel génétique et à des réarrangements chromosomiques. Ces bris de l'ADN sont souvent induits lors d'une exposition des cellules à une radiation ionisante, mais peuvent également subsister lors d'évènements endogènes, tels la méiose, la recombinaison V(D)J lors de la production d'anticorps et lors du raccourcissement des télomères [411-413].

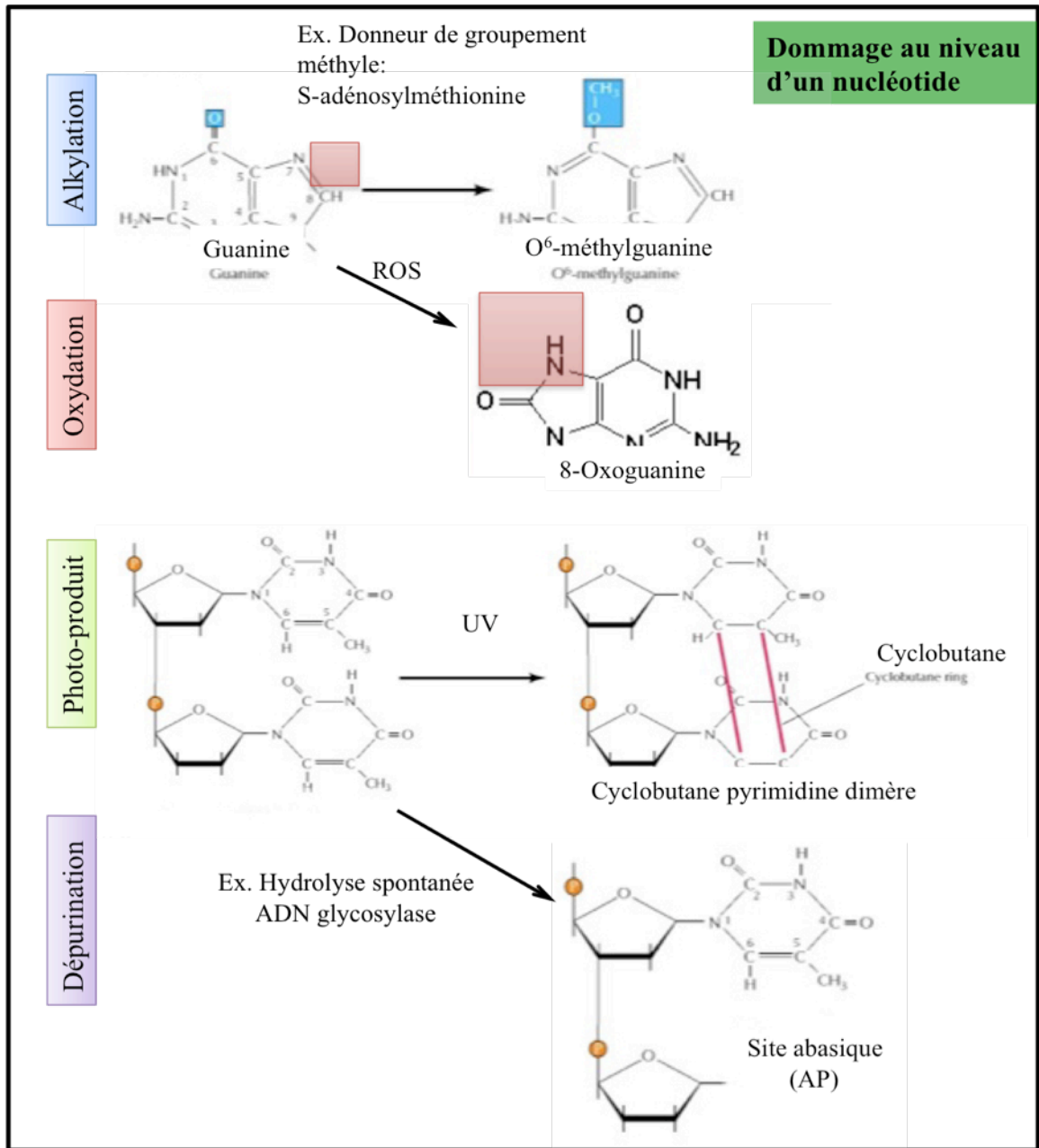


Figure 13 Représentation schématique des différentes formes de dommages au niveau d'une base de l'ADN.

1.4.2 Les différents mécanismes de reconnaissance du dommage à l'ADN

a) Reconnaissance des bris doubles brins (BDB) par ATM

La reconnaissance des BDB de l'ADN implique une orchestration minutieuse de plusieurs protéines indispensables. L'activation de la voie de reconnaissance du dommage à l'ADN (DDR) dépend de la présence de protéines PIKK (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*), soit ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia and RAD3-related*) et DNA-PKcs (*DNA protein kinase catalytic subunit*) [405-410, 414]. ATM est la protéine principale dans la reconnaissance des BDB, alors que la protéine ATR est plutôt impliquée dans la détection des BSB de l'ADN [411]. La protéine DNA-PKcs est la seule kinase à être spécifiquement activée par sa liaison au niveau des bouts de duplex ADN, tel au niveau des BDB. Une fois liée, cette protéine acquiert une activité sérine et thréonine kinase [415-418]. La voie DDR requiert des protéines pour la détection du dommage, des médiateurs et des effecteurs qui transmettent le signal [419]. Succinctement, suite au dommage, la protéine NBS1 est activée et induit la formation du complexe MRN, constitué des protéines MRE11 et RAD50. Le complexe MRN est le senseur primaire du dommage et est requis pour le recrutement et l'activation d'ATM *via* sa phosphorylation [420]. ATM activé (pATM) permet la phosphorylation subséquente de l'histone H2AX, une étape cruciale dans la détection du dommage. L'histone γ H2AX (H2AX phosphorylé) représente la première marque de reconnaissance d'un dommage à l'ADN [421]. Par la suite, la protéine médiatrice MDC1 est recrutée au niveau de la marque γ H2AX, où elle favorise l'accumulation d'ATM et par conséquent l'amplification de la marque γ H2AX sur une zone de plusieurs mégabases entourant le dommage [422]. L'ubiquitination de γ H2AX par la protéine RNF8, une ubiquitine E3-ligase, favorise le recrutement de la protéine BRCA1 qui va à son tour poly-ubiquitiner γ H2AX [423]. 53BP1, une autre protéine médiatrice, va alors à son tour lier la marque γ H2AX poly-ubiquitinée et favoriser l'accumulation de différentes

protéines du DDR, tel ATM [424]. Cet échafaudage de protéines a pour but d'amplifier le signal indiquant la présence d'un dommage et ainsi favoriser l'activation de protéines effectrices qui vont permettre l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation et/ou l'apoptose. La protéine pATM stimule l'arrêt du cycle cellulaire soit en phase G1-S, S ou G2-M *via* l'activation de *checkpoint* (Chk2 et P53) et la réparation *via* l'activation, par exemple, de la protéine Artemis [425, 426] (Figure 14). La protéine ATM joue un rôle primordial suite à l'induction d'un BDB, car elle permet d'alerter la cellule de la présence d'une lésion au niveau de l'ADN, mais également de coordonner l'activation des voies effectrices appropriées dans le but de remédier au dommage et ainsi éviter la transmission de modification du matériel génétique. L'activation enzymatique efficace d'ATM se fait à trois niveaux : la phosphorylation *via* le complexe MRN, l'acétylation *via* Tip60 et son auto-phosphorylation [427-429]. La mutation de ATM est responsable de la maladie autosomale récessive Ataxia-telangiectasia (AT), où les patients souffrent de dégénérescence cérébrale et sont prédisposés au développement de cancers. Les cellules dérivées de patients AT démontrent une hypersensibilité aux radiations, des défauts au niveau des *checkpoints* du cycle cellulaire et une instabilité chromosomique [430]. Plusieurs autres maladies sont associées à des défauts au niveau du mécanisme DDR (Tableau VI).

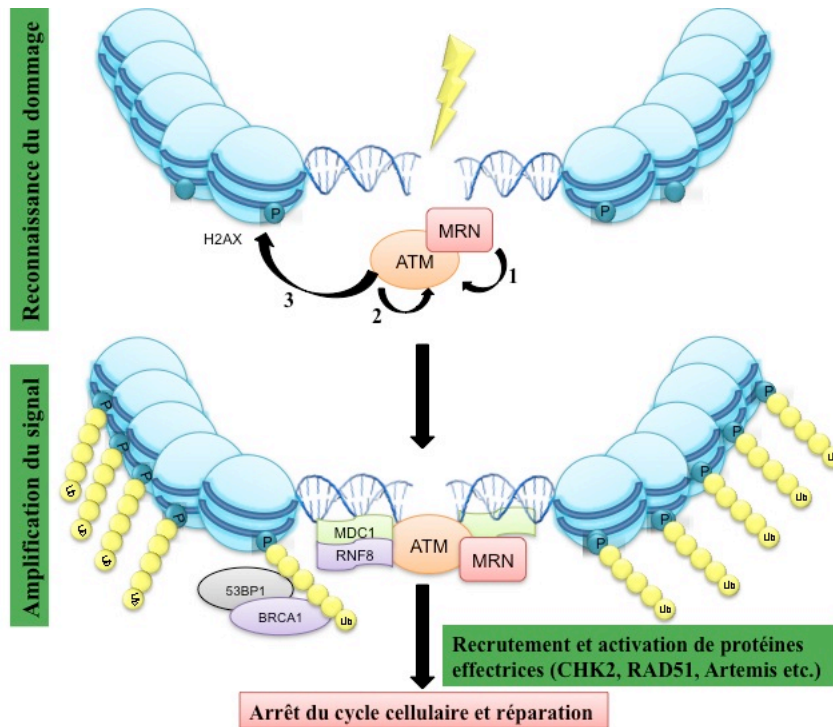


Figure 14 Modélisation du mécanisme de reconnaissance du dommage double brin de l'ADN. Suite à l'induction d'un bris double brin, (1) le complexe MRN recrute la protéine ATM. (2) Subséquemment, *via* son activité kinase ATM s'auto-phosphoryle. (3) pATM activée phosphoryle l'histone H2AX.

b) Reconnaissance des bris simples brins (BSB) par ATR

Les protéines ATM et ATR partagent plusieurs similarités biochimiques et fonctionnelles. Elles sont toutes deux de grosses kinases qui possèdent une forte homologie de séquence et elles ciblent plusieurs substrats communs impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation du dommage à l'ADN. Contrairement à ATM, chez les mammifères ATR est indispensable à la viabilité des cellules prolifératives [431, 432]. ATR est non seulement activé en présence de dommage au niveau de l'ADN, cette protéine est également activée lors de toutes les phases S du cycle cellulaire afin de réguler l'initiation de l'origine de

réplication et la prévention d'une entrée prématurée en mitose [432-440]. Durant la réplication cellulaire, ATR est également recruté au niveau des fragments d'Okazaki où l'on observe la présence ADN simple brin tapissé par la protéine RPA [441, 442]. Avant même son activation, plusieurs protéines interviennent afin de faciliter son recrutement. Tout d'abord, la protéine RPA (*replication protein A*) est recrutée et recouvre la plupart des formes d'ADN simple brin. Par la suite, le complexe RPA/ADNsb est reconnu par la protéine ATRIP (*ATR-interacting protein*). Ainsi *via* l'interaction RPA-ATRIP, la protéine ATR est recrutée au niveau du dommage [431, 443]. Suite au recrutement d'ATR, la co-localisation d'un deuxième complexe, 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1), est nécessaire à l'activation d'ATR. Le complexe 9-1-1 permet l'acheminement de la protéine TOPBP1 (*Topoisomerase-binding protein 1*) qui promeut l'activation d'ATR [444-446]. Une fois activée, ATR stimule l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation *via* la phosphorylation de différents effecteurs. La kinase CHK1 (checkpoint kinase 1) est le substrat d'ATR le plus connu. L'activation de CHK1 *via* sa phosphorylation va permettre l'arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition des protéines phosphatases CDC25 [447, 448]. ATR permet également l'activation de protéines impliquées dans différentes voies de réparation de l'ADN, tels WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*), BLM (*Bloom syndrome protein*) et XPA [449-451] (Figure 15). De façon primaire, ATR est une kinase qui répond aux stress réplcatifs, mais peut également être activée en réponse à un BDB de l'ADN. Suite à l'induction d'un BDB, ATM et ATR sont activées, cependant l'activation d'ATM est beaucoup plus rapide et indépendante du cycle cellulaire, alors que l'activation lente d'ATR est possible seulement en phases S et G2 [452]. Un deuxième niveau d'interférence entre ces deux protéines est médié *via* la protéine TOPBP1. Effectivement, TOPBP1 est un substrat d'ATM et cette phosphorylation fait de TOPBP1 un activateur plus efficace de ATR [453]. ATM et ATR partagent également différents substrats, tels BRCA1 et P53 [454-457]. Les maladies associées aux mutations d'ATR sont rares dû au fait qu'une inactivation homozygote d'ATR est létale très tôt durant l'embryogénèse. Les rares mutations hypomorphiques d'ATR induisent le syndrome de Seckel, où les patients démontrent des retards de croissance et une microcéphalie [458].

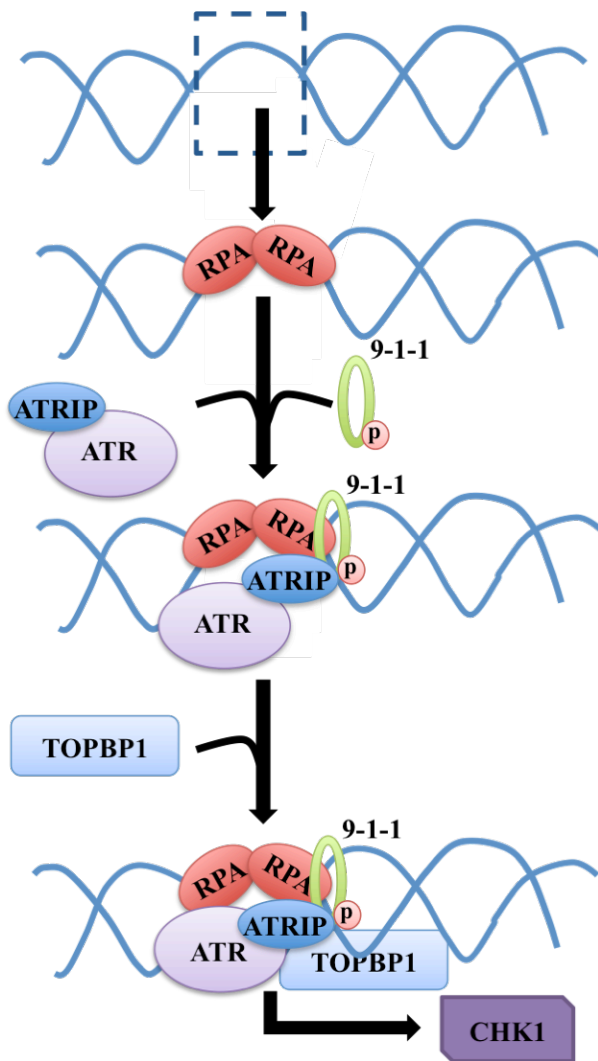


Figure 15 Modélisation du mécanisme de reconnaissance du dommage simple brin de l'ADN par ATR. Adapté de Cimprich K.A. et Cortez D. (2008) *Nature* 9 : 616-627.

c) **Reconnaissances des autres types de dommages à l'ADN**

La détection efficace des lésions de l'ADN causées par l'oxydation, l'alkylation, l'hydrolyse des nucléotides, la formation de dimères de pyrimidines et le mésappariement de bases est cruciale au maintien de l'intégrité génomique de la cellule, puisque ces types de lésions sont abondants. Dans la plupart des cas, la reconnaissance du dommage se fait en une seule étape et mène directement à la réparation adéquate. Les dommages au niveau d'une unique base (causés par l'oxydation, l'alkylation, l'hydrolyse des bases) sont spécifiquement reconnus par les protéines ADN glycosylases, qui sont également responsables de l'excision de la base endommagée [459, 460]. Différentes ADN glycosylases sont associées à l'excision des différents types de lésions et permettent par la suite l'activation de la voie de réparation adéquate (Tableau VII). À titre d'exemple, la protéine Ogg1 est l'ADN glycosylase responsable de la reconnaissance des purines oxydées 8-oxoG, alors que l'ADN glycosylase Nth1 reconnaît spécifiquement les pyrimidines oxydées chez l'humain [461-463]. La reconnaissance des dimères de pyrimidines dépend de leur localisation, c'est-à-dire s'ils sont présents au niveau de gènes transcriptionnellement actifs ou non. Lors de la transcription, les résidus dipyrimidines vont bloquer la progression de l'ARN polymérase II (polII) et induire une hyperphosphorylation de cette dernière. L'hyperphosphorylation de la polII va stimuler le recrutement d'une ubiquitine ligase, RSP5 et s'en suit une poly-ubiquitination de la polII. L'ajout d'ubiquitines provoque la destruction du complexe de polII et le recrutement du complexe CSB et CSA [464]. Au niveau de gènes inactifs, les dimères de pyrimidines sont directement reconnus par une ubiquitine ligase, UV-DDB1/2 qui induit par la suite le recrutement du complexe XPC-HR23B qui initie subséquentement l'activation de la réparation [465]. Finalement, les erreurs d'appariements causées par l'ADN polymérase sont qu'en t'à eux reconnues par l'hétérodimère MutS α et MutL α en collaboration avec la protéine PCNA [466] (Tableau VII).

1.4.3 Les différents mécanismes de réparation des dommages à l'ADN

a) Réparation d'un dommage à l'ADN au niveau des bases

La cellule possède différents modes de réparations qui dépendent du type de dommage présent au niveau de la base. Tout d'abord, les bases oxydées, alkylées ou hydrolysées sont tous reconnues par le même mécanisme de réparation, soit la réparation par excision de bases (BER). Brièvement, le dommage est premièrement reconnu par l'ADN glycosylase et cette dernière induit également une excision de la base azotée afin de former un site abasique de l'ADN (AP). Le résidu de sucre abasique au site AP est par la suite excisé par une 5' endonucléase, tel APE1 ou une AP-lyase. La formation d'un fragment d'ADN simple brin est observée et le recrutement de l'ADN polymérase β et l'ADN ligaseIII/XRCC1 permet le remplacement de la base [467, 468] (Figure 16). Un second mécanisme de réparation permet à la cellule d'éliminer la présence de dimères de pyrimidines causés par l'exposition aux UV ou à des agents mutagènes : la réparation par excision de nucléotides (NER). On distingue deux types de NER : TCNER (*transcription-coupled NER*) et GNER (*Global NER*). Ces deux mécanismes diffèrent seulement au niveau de l'étape de reconnaissance du dommage. Le TCNER est observé seulement au niveau des gènes transcriptionnellement actifs, alors que le GNER peut avoir lieu n'importe où sur l'ADN. Globalement, le mécanisme de réparation NER est divisé en cinq étapes de bases : (1) la reconnaissance du dommage, (2) le déroulement de l'ADN et l'incision flaquant le dommage, (3) l'excision du fragment, (4) la synthèse d'un nouveau fragment et (5) la ligation du fragment [468, 469] (Figure 17). Finalement, la réparation des erreurs d'appariements durant la réplication s'effectue *via* le mécanisme MMR (*DNA mismatch repair*). L'erreur d'appariement est premièrement reconnue par l'hétérodimère MutSa, qui permet le recrutement de l'hétérodimère MutLa. Le complexe MutSa/MutLa est transloqué sur l'ADN jusqu'à ce qu'il rencontre la protéine PCNA et ce nouveau complexe recrute à son tour une 5' ADN exonucléase, EXO1. Le complexe exonucléolytique effectue plusieurs rondes de dégradation séquentielle et ce jusqu'à se qu'il dégrade l'erreur

d'appariement. Suite à l'excision de l'erreur, la synthèse et la ligation d'un nouveau brin est possible [466].

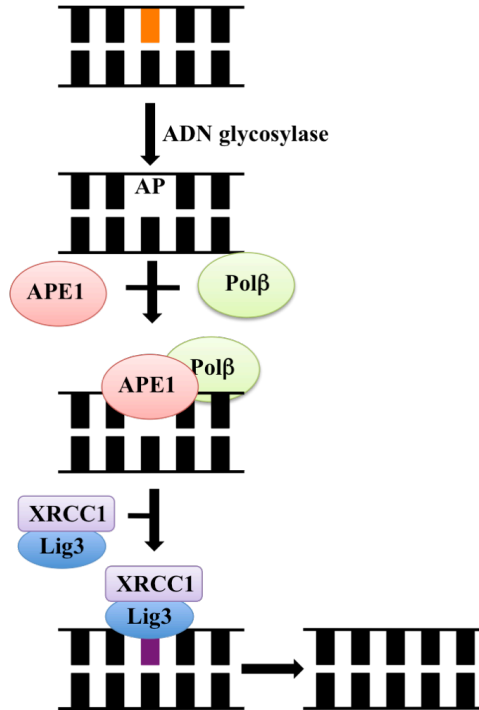


Figure 16 Schématisation du mécanisme de réparation de l'ADN par BER (Base Excision Repair).

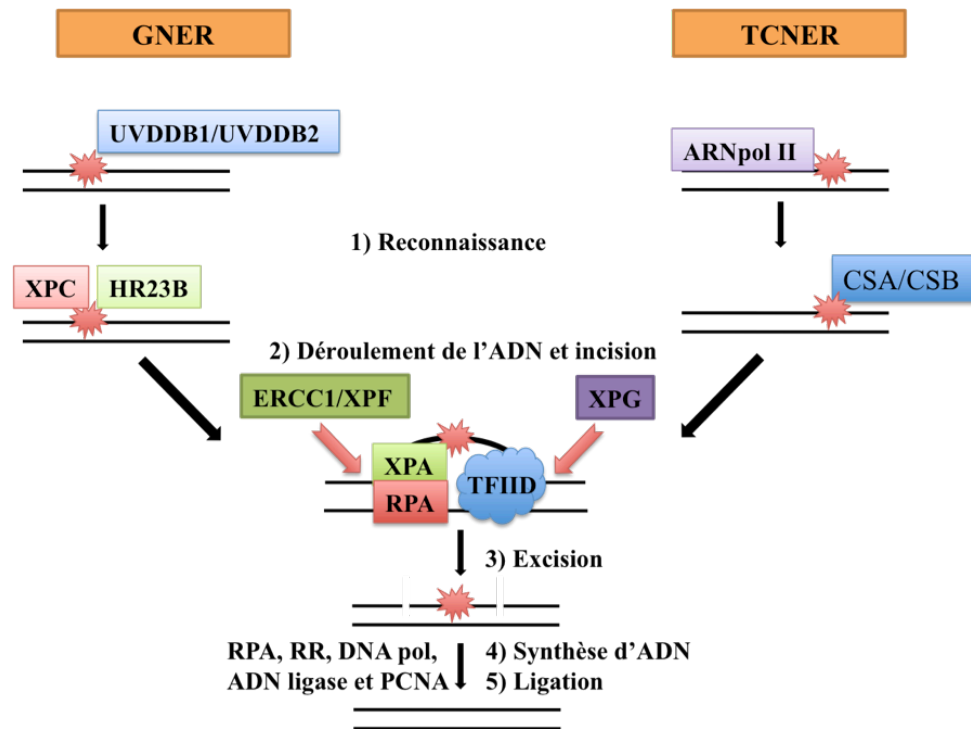


Figure 17 Modélisation du mécanisme de réparation des dimères de pyrimidine par NER (Nucleotide Excision Repair).

b) Réparation d'un dommage au niveau des brins de l'ADN

La réparation des bris doubles brins (BDB) de l'ADN est médiée par deux mécanismes distincts : la recombinaison homologue (HR) et le NHEJ (*non-homologous end-joining*). La HR est le moyen de réparation des BDB le plus fidèle, car elle utilise comme gabarit les brins homologues des chromatides sœurs. Puisque la HR nécessite la présence de chromatides sœurs, elle ne peut avoir lieu seulement durant la phase G2-S du cycle cellulaire. La première étape de cette recombinaison implique la formation de brins cohésifs en 3' au niveau du bris BDB, *via* l'activité nucléase du complexe MRN. L'extrémité simple brin formée est rapidement tapissée par la protéine RPA afin d'éviter la formation de structure secondaire. RPA est, par la suite, remplacée par la protéine RAD51, un élément central dans la HR. Les protéines BRCA2 et FANCN favorisent le

remplacement de RPA par RAD51. Par la suite, la protéine RAD51 permet la capture et l'invasion du brin homologue d'une chromatide sœur ce qui crée la formation d'une jonction d'Holliday. La synthèse d'ADN à l'aide du brin homologue permet la migration du brin néo synthétisé. La dernière étape de la HR consiste en la ligation des brins et la résorption de la jonction d'Holliday [468, 470-472] (Figure 18).

Les BDB peuvent également être réparés par la voie NHEJ, qui représente le mode principal de réparation de la cellule. La voie NHEJ ne dépend pas du cycle cellulaire, mais tout de même ce mécanisme est prédominant en phase G1. Il représente un moyen de réparation très peu fidèle, puisqu'il lie les extrémités chromosomales même si ces dernières ne proviennent pas du même chromosome. Le complexe hétérodimères de protéines de la famille Ku (Ku80/70) représente l'élément déclencheur de la voie NHEJ. Ce complexe permet le recrutement des protéines impliquées dans la réparation de la lésion, soit des nucléases (le complexe Artemis/DNA-PKc), des ADN polymérases (pol μ et λ) et des ligases (ligaseIV/XRCC4). L'ordre de recrutement de ces protéines au niveau du bris est aléatoire, ce qui rend ce système de réparation très flexible [468, 470, 473] (Figure 18). La protéine DNA-PKcs est essentielle à l'activité endonucléolytique de Artemis et permet également de stimuler l'activité ligase du complexe ligaseIV/XRCC4. De plus, la présence du complexe ligaseIV/XRCC4 stimule l'autophosphorylation de DNA-PKcs. Par conséquent, l'activité de la protéine DNA-PKcs est critique non seulement à l'étape nucléotique du NHEJ, mais également à la stimulation de l'étape de ligation [474-480]. La réparation des BDB par le mécanisme de réparation NHEJ semble être indépendante de la voie ATM, puisque cette voie est normale au niveau des cellules des patients AT. De plus, chez les cellules de ces patients seulement 10% des dommages ne sont pas réparés [426, 481]. Les mécanismes impliqués dans le choix du mode de réparation à privilégié restent encore mal compris. Les bris simple brin (BSB) représente un deuxième type de lésion liée au brin d'ADN et ils sont réparés grâce au mécanisme de réparation BER [482, 483]. Les maladies associées à des défauts de réparation sont énumérées dans le Tableau VI.

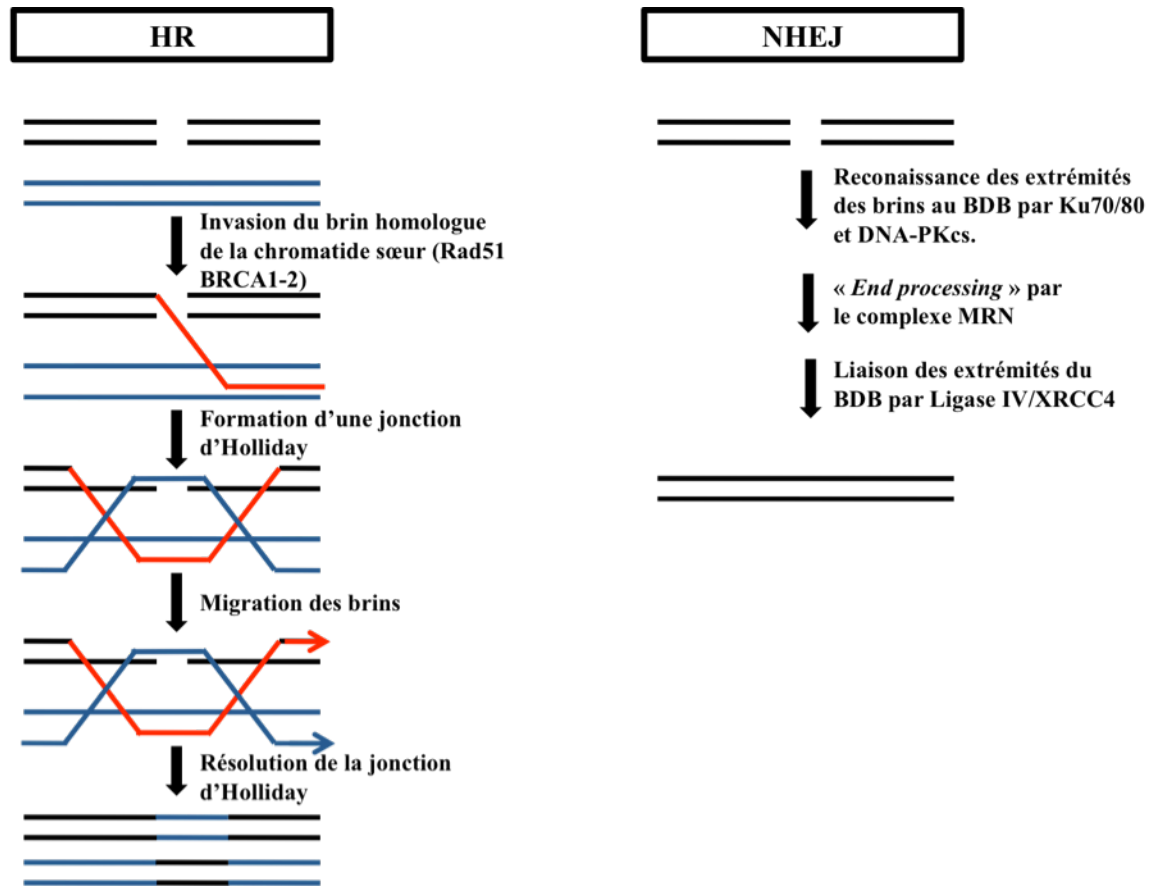


Figure 18 Modélisation simplifiée des mécanismes de réparation des bris doubles brins de l'ADN : HR et NHEJ.

1.4.4 Dommage à l'ADN et GBM

La radiothérapie représente un des traitements classiques les plus efficaces contre le GBM. Plusieurs études ont démontré que les patients qui ont subi des traitements de radiations survivent plus longtemps en comparaison avec les patients qui ont subi d'autres types de

soins. Cependant, suite aux traitements d'irradiation une récurrence de la tumeur est observée [484]. Une meilleure compréhension des mécanismes entourant la radiorésistance de la tumeur est primordiale dans le but de développer des agents capables de sensibiliser les cellules de la tumeur aux radiations. *Bao et al.* ont démontré que la radiorésistance de la tumeur est procurée par la population minoritaire de CSC CD133+ présente dans la tumeur. Suite aux traitements de radiations, un enrichissement de la population des cellules CD133+ est observé au niveau de la tumeur, ce qui permet une croissance subséquente de la tumeur. Les CSC du GBM ont un avantage de survie par rapport aux autres types cellulaires présents dans la tumeur. En effet, une activation préférentielle et accrue des mécanismes de reconnaissances des dommages à l'ADN et de réparation est observée au niveau des cellules CD133+. Par conséquent, les CSC du GBM reconnaissent et réparent les BDB de l'ADN induits par la radiation plus rapidement et efficacement que les cellules CD133- [368]. Suite aux traitements d'irradiation, une activation préférentielle des processus d'autophagie est également observée au niveau des cellules CD133+. L'inhibition de l'autophagie au niveau des cellules CD133+ engendre une sensibilisation de ces cellules face aux radiations γ . L'autophagie semble jouer un rôle important au niveau de la radiorésistance des CSC du GBM [485]. Par ailleurs, dans les cas de certains cancers, une forte expression de la protéine Sirt1, une histone déacétylase, est associée à la tumorigénèse, mais également à la résistance à la radiothérapie et chimiothérapie [486-489]. La délétion de Sirt1 au niveau des cellules CD133+ du GBM mène à la perte de la formation de neurosphères, du potentiel d'auto-renouvellement et du potentiel invasif de la tumeur, suite à une exposition aux rayons γ . De plus, la survie des souris greffées avec des cellules CD133+ où Sirt1 a été déplété et ayant subi des traitements de radiothérapie, est augmentée. Ainsi, la protéine Sirt1 semble jouer un rôle primordial au niveau de la radiorésistance des cellules CD133+ du GBM [490]. En conclusion, l'utilisation d'adjuvant permettant d'augmenter la radiosensibilité des CSC du GBM serait un atout aux traitements classiques d'irradiation.

Tableau I Tableau comparatif de différents types de CSN durant le développement et chez l'adulte.

	SOURCE	Croissance en culture	Facteur de croissance requis	Marqueurs spécifique
NEP-primitif	Cellules ES	Neurosphère	LIF	Nestin, SOX1 PAX6 SOX2 OCT4
NEP-précoce	Cellules ES	Monocouche	SHH et SB43152 (inhibiteurs des SMAD)	Nestin SOX1 PAX6
R-NSC	Cellules ES	Monocouche	Notch et SHH	Nestin SOX1 Forse1 N-cadhérine PAX6
RG	Cellules ES tissus neuronales embryonnaires	Monocouche	FGF2 et EGF	Nestin RC2 SOX2 BLBP GLAST PAX6
Cellule souche adulte:				GFAP GLAST SOX2
SVZ	SVZ adulte	Neurosphère	FGF2 et EGF	Nestin CD133
SGZ	SGZ adulte	Neurosphère et monocouche	FGF2 et EGF	

Tableau II Résumé des différentes voies moléculaires impliquées au niveau des cellules souches normales et cancéreuses. Modifié de Lobo N.A et al. (2007) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23 : 675-699

Voie Moléculaire	Cellules souches normales	Cancer
BMI1	<ol style="list-style-type: none"> 1) BMI1 est requis pour l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et neuronales. 2) BMI1 inhibe la transcription du locus INK4A/ARF 	<ol style="list-style-type: none"> 1) L'expression de BMI1 est augmentée au niveau de l'AML et du médulloblastome 2) Bmi1 est requis au niveau de l'auto-renouvellement des cellules souches leucémiques
SHH	<ol style="list-style-type: none"> 1) Impliquée au niveau de l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et l'expansion des progéniteurs 2) Essentielle au cours du développement embryonnaire 3) Impliquée dans le développement du cerveau post-natal et adulte 	<ol style="list-style-type: none"> 1) L'activation de SHH est impliquée dans la carcinogénèse de la peau et du cerveau 2) Les mutations de SHH cause le syndrome de Gorlin
Wnt/b-Caténine	<ol style="list-style-type: none"> 1) Impliquée dans le maintien et l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques 2) Impliquée dans la détermination de l'identité des cellules souches neuronales 3) Important lors de la régénération d'un tissu endommagé 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Surexprimée dans plusieurs types de cancers 2) L'accumulation de la b-caténine est observée au niveau du cancer du sein, mélanome, sarcome, différents types de leucémies et le cancer du cerveau.
NOTCH	<ol style="list-style-type: none"> 1) Médie l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et neuronales 2) Impliqué dans la différenciation 	<ol style="list-style-type: none"> 1) L'activation accrue de la voie de NOTCH est observée au niveau des leucémies, lymphome, cancers de la peau, du sein, du pancréas, poumon, colon et du cerveau
PTEN	<ol style="list-style-type: none"> 1) Impliqué dans la maintenance des cellules souches hématopoïétiques et neuronales 	<ol style="list-style-type: none"> 1) La perte de PTEN mène au développement de plusieurs types de cancers 2) Les mutations ou LOH sont observés au niveau du glioblastome multiforme
Télomérase	<ol style="list-style-type: none"> 1) Exprimée à de haut niveau chez les cellules souches hématopoïétiques 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Expression très élevée au niveau de la plus part des cellules néoplasiques 2) hTERT est impliquée dans la transformation tumorigénique 3) Augmentation de l'activité de la télomérase au niveau du glioblastome

Tableau III Membres des complexes PcGs chez la drosophile, l'humain et la souris

Protéine			Domaines protéiques	Fonctions
Drosophile	Humain	Souris		
PRC2				
ESC	EED	EED	Répétition motif WD40	
E(Z)	EZH1 EZH2	EZH1/ENX1 EZH2/ENX2	Domaine SET	Histone méthyltransférase
SU(Z)12	SUZ12	SUZ12	Doigt-zinc	
PRC1				
PC	CBX2/HPC1 CBX4/HPC2 CBX8/HPC3	CBX2/M33 CBX4/MPC2 CBX8/PC3	Chromodomaine	Liaison méthyl-lysine
PH	EDR1/HPH1 EDR2/HPH2 EDR3/HPH3	EDR1/MPH1/RAE28 EDR2/MPH2 EDR3	Doigt-zinc SPM	
RING	RING1A/RNF1 RING1B/RNF2	RING1/RING1A RNF2/RING1B	Domaine RING	Ubiquitine ligase
PSC	BMI1 RNF110/ZPF144/PCGF2 ZNF134	BMI1 RNF110/ZPF144/MEL18 ZNF134	Domaine RING	
PHO	YY1	YY1	Doigt-zinc	Liaison à des séquences spécifique d'ADN
PHO-like				Liaison à l'ADN
SCM	SCML1	SCMH1	Doigt-zinc SPM	
PCL	PHF1	PHF1/PCL1	Doigt-PHD	

Tableau IV Classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) par l'organisation mondiale de la santé (OMS).

Classification des tumeurs du SNC par OMS
1) Tumeur des tissus neuroépithéliaux
2) Tumeur des nerfs craniaux et spinaux
3) Tumeur des méninges
4) Néoplasme hématopoïétique
5) Tumeur de cellules germinales
6) Kystes
7) Tumeur de l'hypophyse
8) Invasion locale d'une tumeur régionale
9) Tumeur métastatique

Tableau V Énumération des différents types de tumeurs Neuroépithéliales

Tumeurs Neuroépithéliales
<p>Tumeur astrocytique Astrocytome, Astrocytome anaplasique, Astrocytome Pilocyrique, Glioblastome etc.</p>
<p>Tumeur Oligodendrogliale Oligodendrogliome, anaplasique</p>
<p>Tumeur Épendymale Épendymoma, Épendymoma anaplasique, myxopapillaire et subépendymoma</p>
<p>Gliome mixte Oligoastrocytome mixte, Oligoastrocytome anaplasique</p>
<p>Tumeur du plexus choroïde Papillome du plexus choroïde Carcinome du plexus choroïde</p>
<p>Tumeur neurale et mixte neurale-gliale Gangliocytoma, Ganglioglioma etc.</p>
<p>Tumeur de l'épiphyse Pinéalome et Pinéaloblastoma</p>
<p>Tumeur embryonnaire Neuroblastome, Rétinoblastome, médulloblastome</p>

Tableau VI Énumération et caractérisation de différentes maladies associées à des défauts au niveau de la reconnaissance ou de la réparation des dommages à l'ADN.

Syndrome	Gene	Voie affectée	Nature de la mutation	Phénotype de la maladie
Ataxia telangiectasia (AT)	Ataxia telangiectasia mutated (ATM)	Reconnaissance des BDB de l'ADN	Homozygote ou hypomorphique	Immunodéficience Déficience cérébrale Prédisposition au cancer
Syndrome de Seckel	Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR)	Voie de signalisation ATR	Hypomorphique	Retard développemental Microencéphalie Prédisposition au cancer
Ataxia telangiectasia-like disorder (ATLD)	MRE11	Voie de signalisation ATM NHEJ ATM-dépendent	Hypomorphique	Défauts semblables à l'AT
Syndrome de Nijmegen Breakage (NBS)	NBS1	Voie de signalisation ATM NHEJ ATM-dépendent	Hypomorphique	Défauts semblables à l'AT
Syndrome LIG4	LIG4	NHEJ Recombinaison V(D)J	Hypomorphique	Immunodéficience combinée Défaut développemental Microencéphalie Photosensibilité Prédisposition au cancer
RS-SCID Severe Combined ImmunoDeficiency with sensitivity to ionizing radiation	Artemis	NHEJ ATM-dépendent Recombinaison V(D)J	Homozygote ou Hypomorphique	Immunodéficience combinée sévère Prédisposition au cancer
FANCD1 Fanconi anaemia complementation group D1	BRCA2 (FANCD1) et autres gènes FANC	Recombinaison homologue Voie Fanconi anaemia	Hypomorphique	Anémie Aplasique Problèmes gastro-intestinaux Hypoplasie et absence de doigts Microencéphalie Prédisposition au cancer
Xeroderma pigmentosum (XP)	Gènes de la famille XP	GNER/TCNER	Homozygote	Sensibilité extrême au soleil Dommage cornéen Prédisposition au cancer
Syndrome de Cockayne (CS)	CSA/CSB	TCNER	Homozygote	Retard staturo-pondéral Dymorphie faciale Photosensibilité Troubles neurologiques
Trichothiodystrophie (TTD)	Les sous-unités de TFIIH	GNER/TCNER	Homozygote	Ichtyose Défauts similaires à CS

Tableau VII Énumération des différents types de dommage au niveau des bases de l'ADN, de leurs lésions communes associées, des mécanismes de réparation correspondant et les enzymes impliquées dans l'excision de la lésion [467].

Types de dommage au niveau de l'ADN	Exemples de lésions	Mécanisme de réparation	Enzymes impliquées dans l'excision de la lésion
Alkylation	O6-mG 3-mA	Inversion directe	Transférase: Agt ADN glycosylase: Aag
Oxydation	8-oxoG, 5-ohC, DHT	BER	ADN glycosylase: Ogg1, Nth1
Hydrolyse	Déamination (formation d'uracil et hypoxanthine) Sites abasiques (AP)	BER	ADN glycosylase: Ung Endonucléase: Ape1
Erreurs de réplication	Erreur d'appariement de bases	MMR	MutS, MutL
Dimérisation de pyrimidyme	CPD 6-4 PD	NER Inversion directe	XPA-XPF Photolyase

CHAPITRE 2

ARTICLE #1

BMI1 sustains human glioblastoma multiform stem cell renewal

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

Published online July 15, 2009

J Neurosci, (2009) 29 (28) : 8884-8896

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

Le chapitre 2 constitue le premier article scientifique où nous avons étudié l'implication de BMI1 dans la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses (CSC) du GBM. Cette étude démontre que BMI1 est essentiel au maintien de la population de CSC du GBM et est requis pour l'établissement d'une tumeur cérébrale *in vivo* chez la souris NOD/SCID.

Dr Mohamed Abdouh, assistant de recherche, et moi avons contribué de façon égale dans la réalisation de cette article scientifique. Dr Wassim Chatoo, étudiant au PhD, a participé dans les études de transplantation chez la souris. Dr Balasingam, neurochirurgien, nous a procuré les échantillons frais de tumeurs cérébrales de patients et le Dr Ferreira, pathologiste, nous a aidé au niveau des analyses histologiques des tumeurs.

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. Molecular analyses revealed that BMI1 prevents upregulation of genes involved in cell cycle arrest, apoptosis, differentiation and immunodetection. Notably, GBM-tumors dependency over BMI1 was independent of a functional *INK4A/ARF* locus. 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 1 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). 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 1x10⁵ cells were transplanted. 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. 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 – induced almost complete knockdown, oligo #3 from 1051 to 1069; AATGGACATACCTAATACT – hypomorphic, and oligo #2 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 AgeI, SmaI, and XbaI 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, 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), and mouse anti-Nestin (BD Transduction Laboratory). For immunofluorescence, the secondary antibodies used were FITC-conjugated donkey anti-mouse (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'-ACAACCTACGGGGTTGTGGAG -3'; (R) 5'-CGGAACCACCTGACTTCAAT -3', HLA-DPA1 (F) 5'-TTGGCTTTCCTGCTGAGTCT-3'; (R) 5'-CCCTGTTGGTCTATGCGTCT-3', HLA-DRA (F) 5'-AGACAAGTTCACCCCACCAG-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'-TGCCTGCAACCTTGAAGTTC-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-PAG 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 the FACS, 5 μ l of 7-AAD was added.

Chromatine immunoprecipitation (ChIP). ChIP was performed using the ChIP Assay kit (Upstate). Briefly, $1-1,5 \times 10^6$ 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'-GTCACCCTCCAGTGGTGTCT-3', HOXC13 site 1; (F) 5'-ACGTGAACCTGCAGCAGAA-3' and (R) 5'-CTTGGCCCTAGAGGACAGGT-3', HOXC13 site 2; (F) 5'-AGCAGAGCTCAGTGGGAGAG-3' and (R) 5'-AATTCAGGCCACCCCTTAG-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 frontal cortex, 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 3 mm to the right of the midline, 2 mm anterior 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

Recently, it has been shown in an orthotopic transplantation mouse model of glioma that *Bmi1* expression is important to promote gliomagenesis in an Ink4a/Arf-independent manner (Bruggeman et al., 2007). In mice injected with Ink4a/Arf-null murine astrocytes transformed by exposure to epidermal growth factor (EGF), *Bmi1* deletion extended median lifespan, without affecting tumor growth and cell proliferation. At the histological level, *Bmi1*-deficient tumors were less advanced in disease stage progression and apparently less invasive, with increased implantation latency after cell transplantation. These results, together with the work of Godlewski et al. (2008) using the U87 glioma cell line, suggest a possible crucial role for BMI1 in human GBM formation.

We have previously shown that in contrast to 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. Immunohistochemical analysis showed that GBM tumors (5 archival paraffin-embedded, and 4 newly resected tumors) highly expressed BMI1 and EZH2 (Fig 1 and data not shown). In these tumors, BMI1 was expressed in GFAP positive cells, showing 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). Immunofluorescence staining showed that BMI1 and EZH2 colocalized with CD133 in the tumor (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 grow and are maintained within vascular niches (Calabrese et al., 2007). BMI1 or EZH2-expressing tumor cells were found intimately associated with SSEA1 positive new vessels (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 line 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, GM-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 transferred into serum-containing media, the cells differentiated into neurons (MAP2 and NeuN positive) and astrocytes (GFAP positive) (Fig. 2A 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. Quantitative PCR showed that BMI1 (~8 times) and EZH2 (~3 times) were highly enriched in the CD133⁺

cell fraction (Fig. 2D). Using flow cytometry analysis, we also determine 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⁺ multipotent GBM cells.

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

High BMI1 expression in GBM tumors may be due to gene amplification. Using genomic DNA from four GBM samples and quantitative PCR amplification, we did not detect *BMI1* amplification, suggesting that high BMI1 expression is likely due to increased gene transcription (Fig. 2F). Characteristic gene expression alterations and chromosomal abnormalities have been identified in GBM tumors. Gene amplification in *PDGF* and *EGFR*, deletions in *INK4A/ARF*, *PTEN* and *RB*, and mutations in *P53* are hallmarks of gliomas transformation (Ohgaki and Kleihues, 2007, CGAR Network, 2008). In most of our tumor samples, we observed *EGFR* and *PDGFR* amplifications as well as bi-allelic *INK4A/ARF* deletions (Fig. 2F).

BMI1 knockdown inhibits colony growth and leads to CD133⁺ cells 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).

The viruses were used to infect 3 independent GBM cell lines cultured on matrigel in NSC media, where 5000 cells were plated per dishes. 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 of culture, 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. These cultures were serially passaged. We observed that the 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 gene expression (CD133/PROMININ, MUSASHI, SOX2 and LHX2) in colonies grown for 2 weeks in NSC media (as in panel 3C). Real-time PCR analysis revealed that BMI1 knockdown is accompanied by a dramatic reduction in stem cell gene expression, 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 level (Fig. 3G). These observations reveal that BMI1 knockdown results in apoptosis and differentiation of GBM cells, and that BMI1 is required to sustain 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 emitted the hypothesis that cell density may be important for cell viability. We cultured control and shBMI1-infected GBM cells at 2.5×10^4 cells/ml in NSC media. Under these conditions, CD133 protein expression was not affected by BMI1 knockdown, where the overall proportion of CD133⁺ was comparable in both cell populations (Fig. 4A and B). Cell sorting revealed that only CD133⁺ cells could form colonies, and that shBMI1-infected CD133⁺ cells generated smaller colonies than scramble-infected cells (Fig. 4C). We analyzed cells by FACS for Annexin-V staining and found that culturing shBMI1-infected cells at high density reduced apoptosis at levels that were comparable to controls (Fig. 4D). These culture conditions, which 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*, 1×10^5 GBM cells infected with either controls or shBMI1 viruses were injected stereotactically in the frontal cortex of non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice. At the time of injection, we analyzed the expression of CD133 by FACS in cells cultured at high density (2.5×10^4 cells/ml). Depending on the cell line, 20-65% of the cells expressed CD133 in both controls- and shBMI1-virus infected cells. 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 re-establish in culture as neurospheres in NSC media (data not show). No tumors were found in the brain of shBMI1-virus animals macroscopically or microscopically. In one animal that was sacrificed at day 32 post-

grafting for the presence of a thymic tumor, we could detect transplanted human GBM cells lining the cortical ventricular zone nearby the hippocampus (Fig. 5D). These cells did not however form a tumor mass.

Histological analysis of the hemorrhagic tumors in control animals revealed expression of the GFP transgene (carried by the lentivirus) and of a 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). Large invasive tumors crossing both brain hemispheres (but not hemorrhagic) were obtained (n = 3). We also observed a very large but not infiltrating tumor that was highly similar to the tumor of origin at the histological level (Supplementary Fig. 3). Our results revealed that BMI1 is required for GBM tumor development *in vivo*. Also, cultured GBM cells retain the capacity to generate brain tumors expressing BMI1 and EZH2 and resembling the tumor of origin.

BMI1 regulates multiple cellular pathways

To identify the molecular pathways underlying the observed effects of BMI1 downregulation, 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). Statistical analysis showed significant genes expression changes (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 data not shown). Notable observations were the massive upregulation of antigen presentation (HLA) molecules, Notch ligands and downstream targets, neural and glial (astrocyte and oligodendrocyte) differentiation markers, as well as cell cycle-control, cell death and stress response factors *i.e.* *P21^{Cip}*, *P18^{INK4C}*, *FOXO3*, *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). 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. 7A and B). Based on genetic studies, Bmi1 was proposed to control *p21^{Cip1}* expression in murine embryonic cortical progenitors (Fasano et al., 2007). Using human GBM cells, we provide here the first molecular evidence that this regulation 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 reported here that BMI1 and EZH2 are highly expressed GBM tumors, 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. This epigenetic regulation 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, high 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 as 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 neural stem cell-like phenotype. BMI1 may thus confer GBM cells immune evasion either by preventing stem cell differentiation or directly repressing 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* assays showing increased neural and glial cell differentiation. This possibility is further supported by downregulation of *CD133/PROMININ* and *MUSASHI* expression in BMI1 knockdown GBM cells. 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; Chatoo 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).

In our gene expression analyses, we used 2 *INK4A/ARF* deleted tumors. 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 glioma 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. 7). 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 as 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 cells 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.

- 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.
- Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S (2008) Targeting of the *Bmi-1* oncogene/stem cell

- renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 68:9125-9130.
- 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.
- 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

- isupregulated in proliferating, cultured human mantlecell 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 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 freshly isolated GBM sample with oligos against GAPDH, BMI1, MUSASHI, SOX2 and LHX2. **D.** Frozen GBM samples were immunolabeled with antibodies against BMI1 (red) and SSEA1 (green). DAPI (blue) stains nuclei. Arrowheads point to BMI1 cells surrounding 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-derived 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 oligos 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 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 as assessed by quantitative Real-Time PCR in GBM samples. Data are expressed relative to healthy human retina genomic DNA and calibrated to b-actin used as internal standard. An other internal standard was used which consisted to 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-regulate BMI1 and EZH2 expression. Left and middle panels; 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 in internal standard and is used for BMI1 and EZH2 levels quantification. Right panel; GBM cells were infected with one of two lentiviruses expressing shBMI1 or scramble, 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. ($n = 3$; $**P < 0.01$). **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 (#1, total; and #3, hypomorphic) 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 the shBMI1-#1-infected cells were depleted following the first passage. **E.** GBM cells cultured as in (**C**) were assayed for apoptosis as assessed by Annexin-V staining and FACS analysis. Data are expressed as the percentage of Annexin+/7-AAD- cells (Mean \pm 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 analysed by immunofluorescence by using antibodies against GFAP, or MAP2. Data are expressed as the percentages of positive cells over total 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 \pm s.d. ($n = 3$; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$).

Figure 4. High cell culture density prevents CD133⁺ cell depletion upon BMI1 knockdown. **A.** Experimental scheme used for studying the differential gene expression (Microarray), BMI1 binding to candidate genes (ChIP), and in vivo behavior of ShBMI1-

infected GBM cells. **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 analysed are 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 10 days culture. Phase contrast pictures are shown. **D.** GBM cells cultured as described in (A) were assayed for apoptosis as assessed by Annexin-V staining and FACS analysis. Data are expressed as the percentage of Annexin+/7-AAD- cells (Mean +/- s.d.; n = 5).

Figure 5. BMI1 is required for intra-cranial GBM tumor formation. **A.** Kaplan-Meier representation of the survival curves of mice injected intracranially with naive GBM cells, GBM cells infected with an empty virus, or a scrambled short hairpin, or a ShBMI1. * Median survival for this mouse strain was shown (mean +/- sd; 191 +/- 11 days*; Christianson et al., 1997. 158: 3578). **B.** Data summary from the Kaplan-Meier 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. Top panels; hemorag tumor (dashed lines). Lower panels; non-hemorag tumor. Cresyl violet coloration showed that GBM cells spread mainly in the grafted right hemisphere with some sprout 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 μ m.

Figure 6. Engrafted tumors resemble the tumor of origin and retain PcG proteins expression. Formalin-fixed paraffin-embedded sections of brain 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 (the transgene tracer). *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 μ m.

Figure 7. 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 oligos used are 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.* A model summarizing the cell cycle progression and survival regulatory molecular pathways targeted by BMI1 in GBM tumors. It focuses on the three major pathways involved in GBM. The dashed lines

represent the classical repression pathway of BMI1. The red lines represent possible new BMI1 functions, as suggested in this study. The crossed lines highlight the most common mutations and deletions found in GBM (CGAR Network, 2008).

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

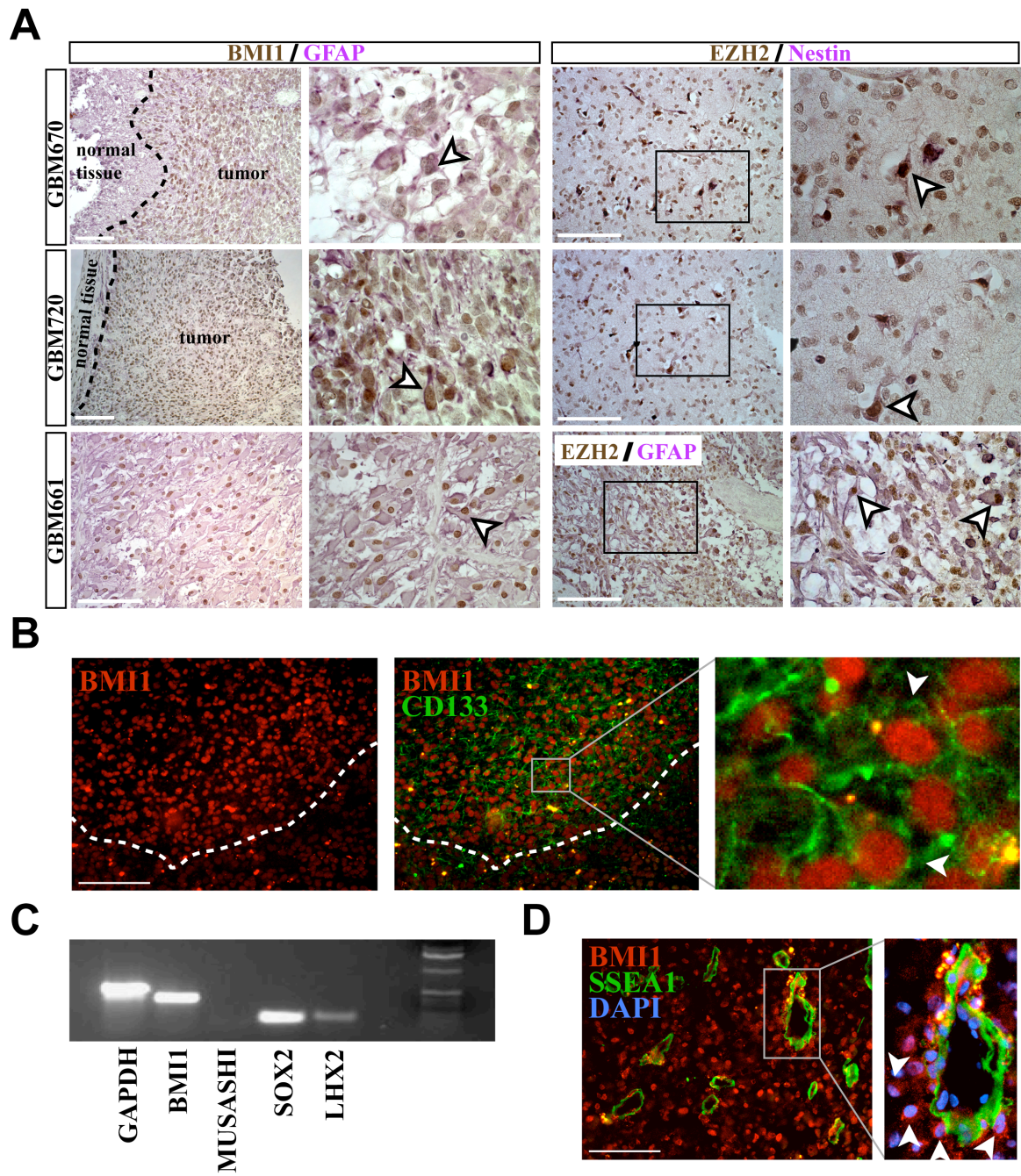


Figure 2

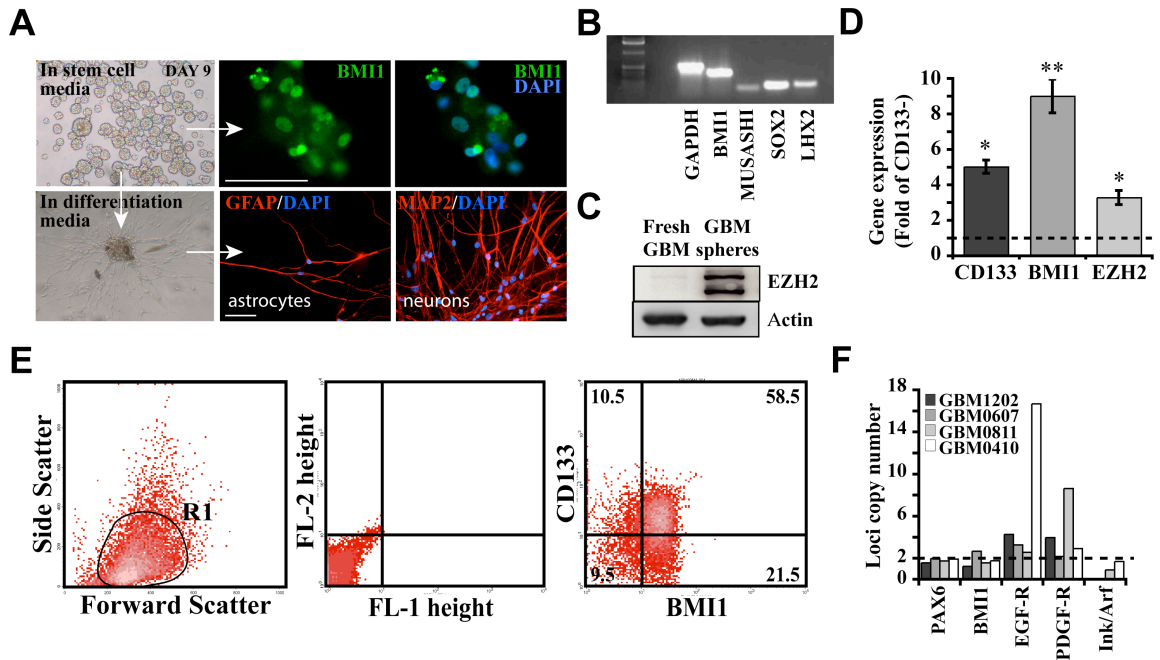


Figure 3

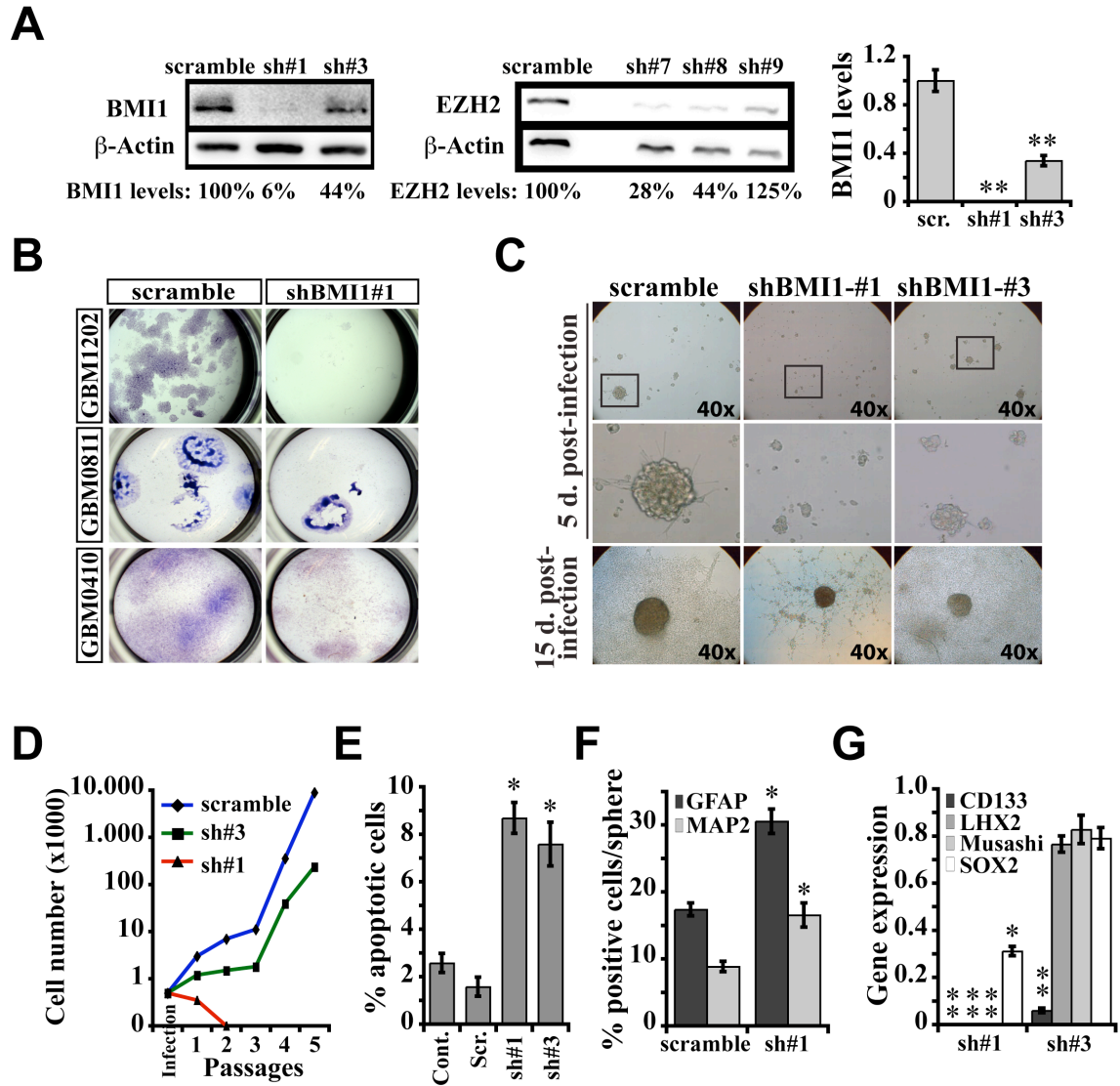


Figure 4

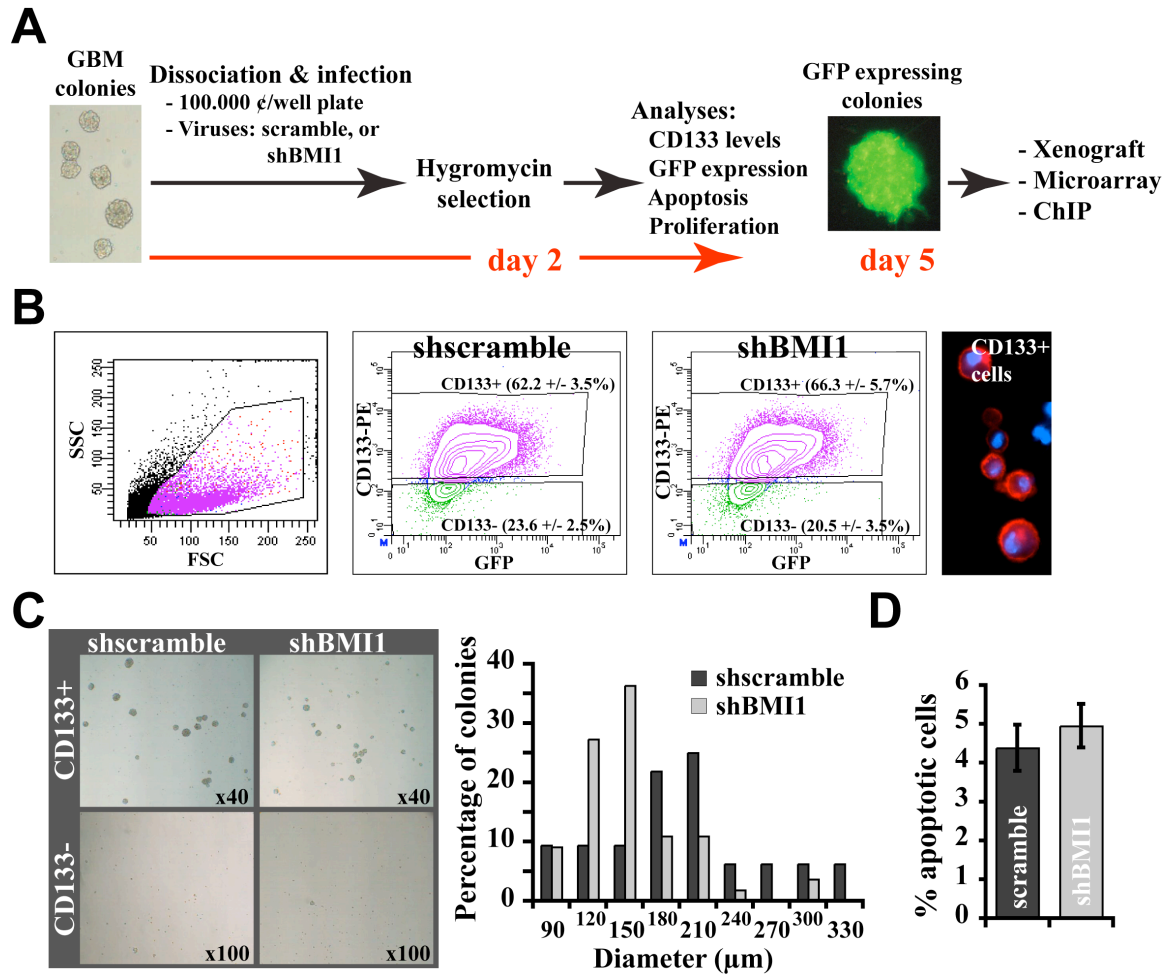


Figure 5

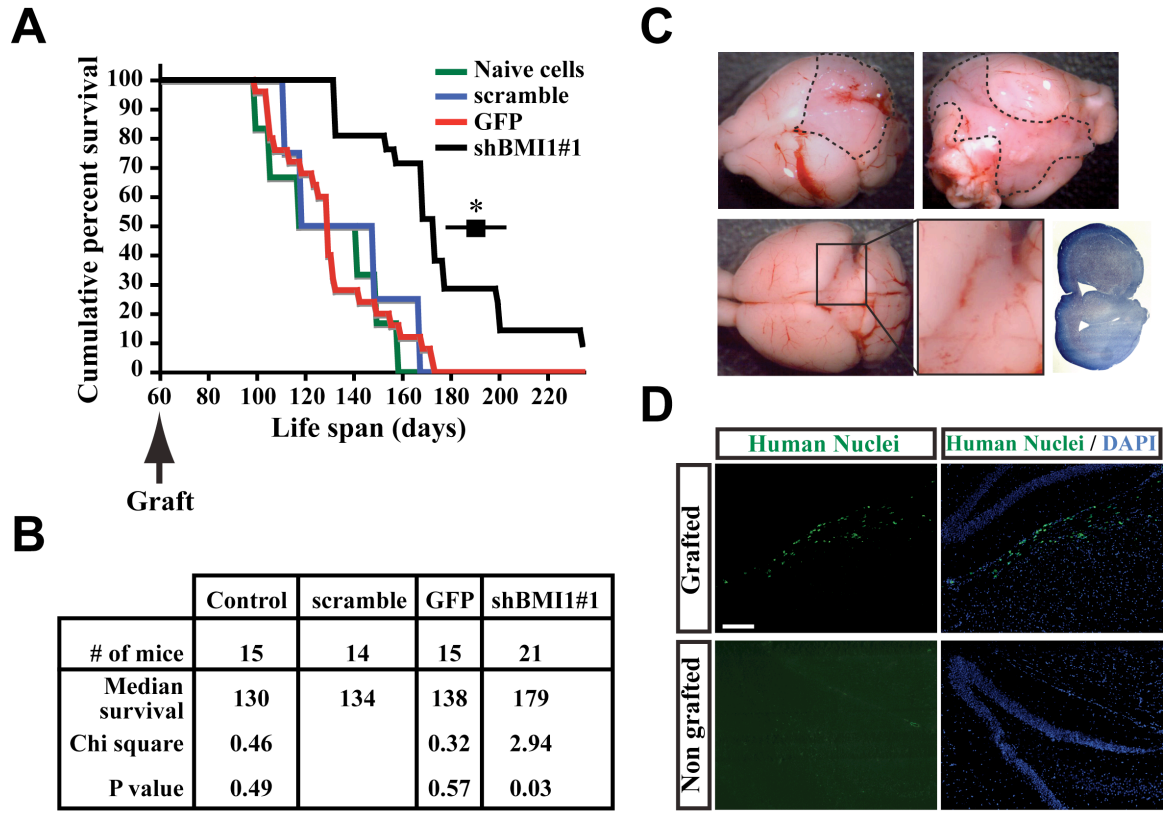


Figure 6

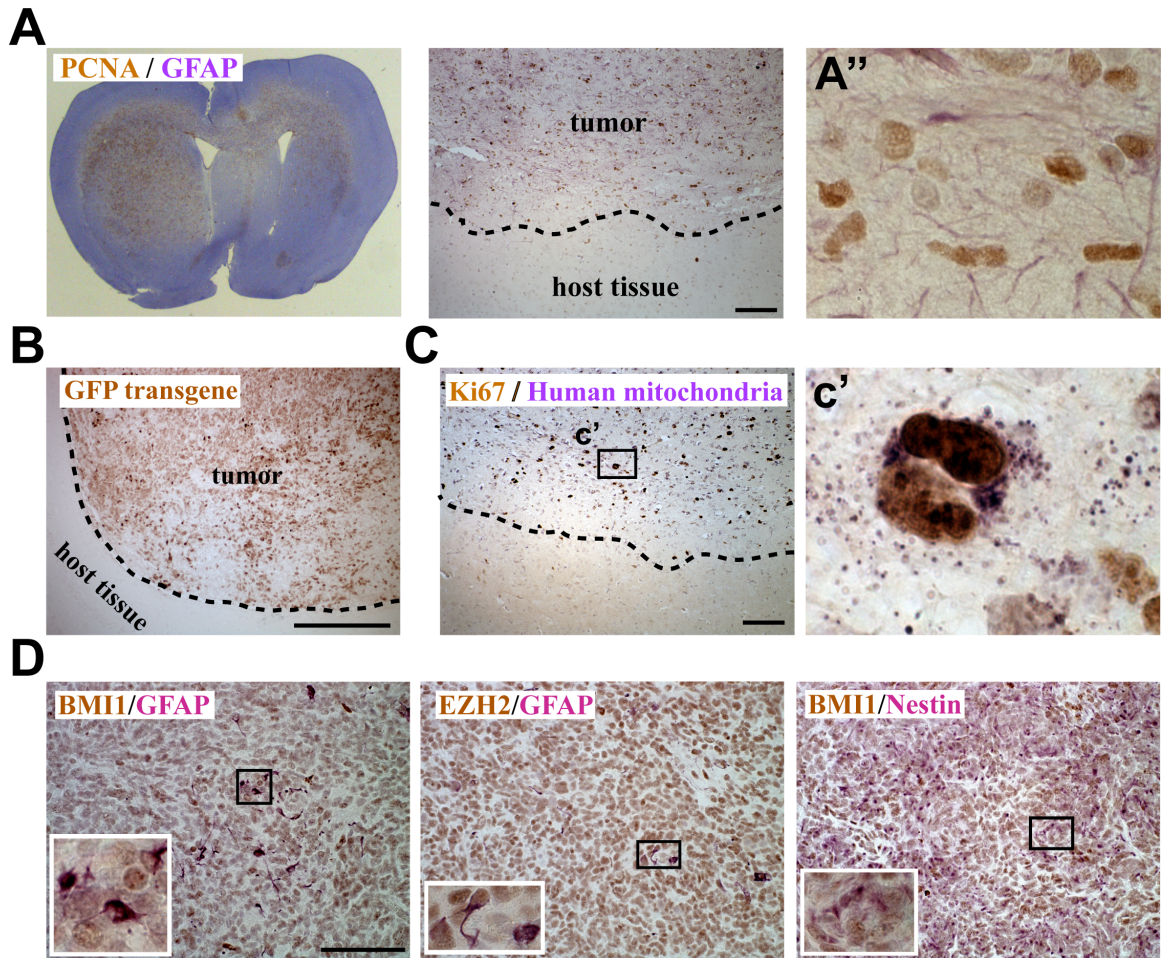
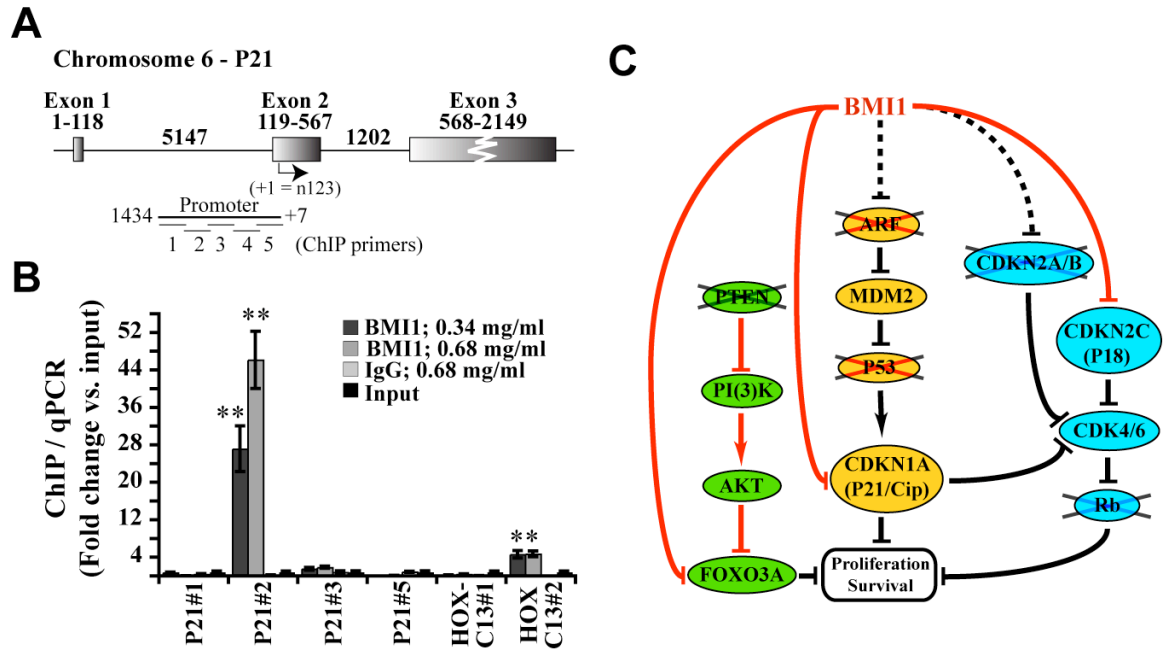


Figure 7



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.

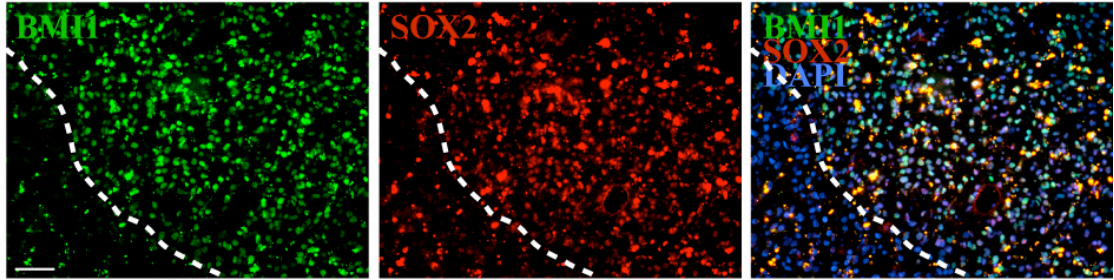
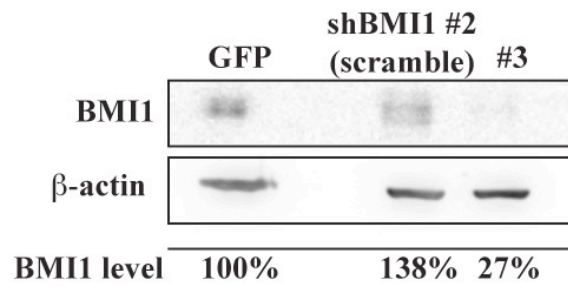
Supplementary Figure Legends

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. The shBMI1 #2 was used as a scramble in this study. Scale bar is 60 μ m.

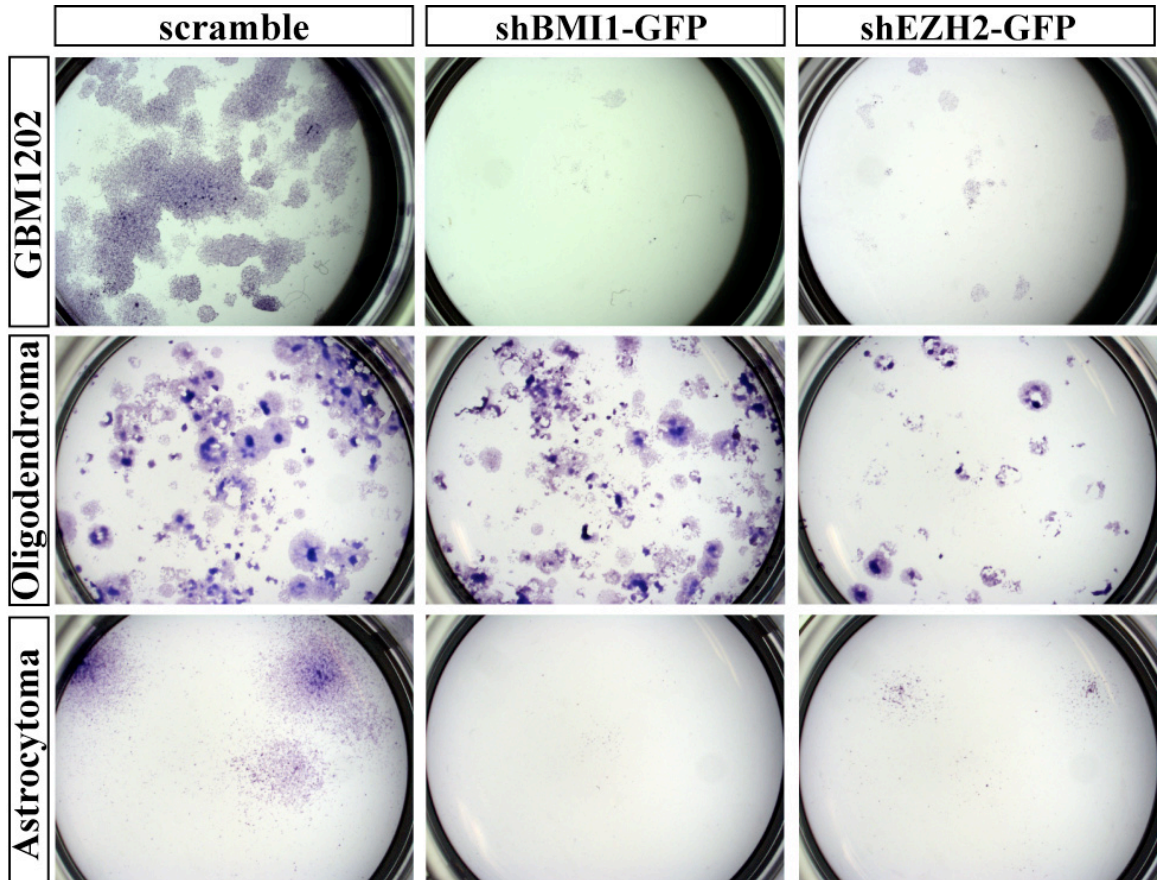
Supplementary Figure 2. BMI1 or EZH2 knockdown reduces GBM cells clonogenic potential. ShBMI1, ShEZH2 or scramble-infected GBM, oligodendroma or astrocytoma cells were plated on Matrigel substrate and allowed to grow for 10 days. Cultures were fixed and stained with Cresyl Violet, and phase contrast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

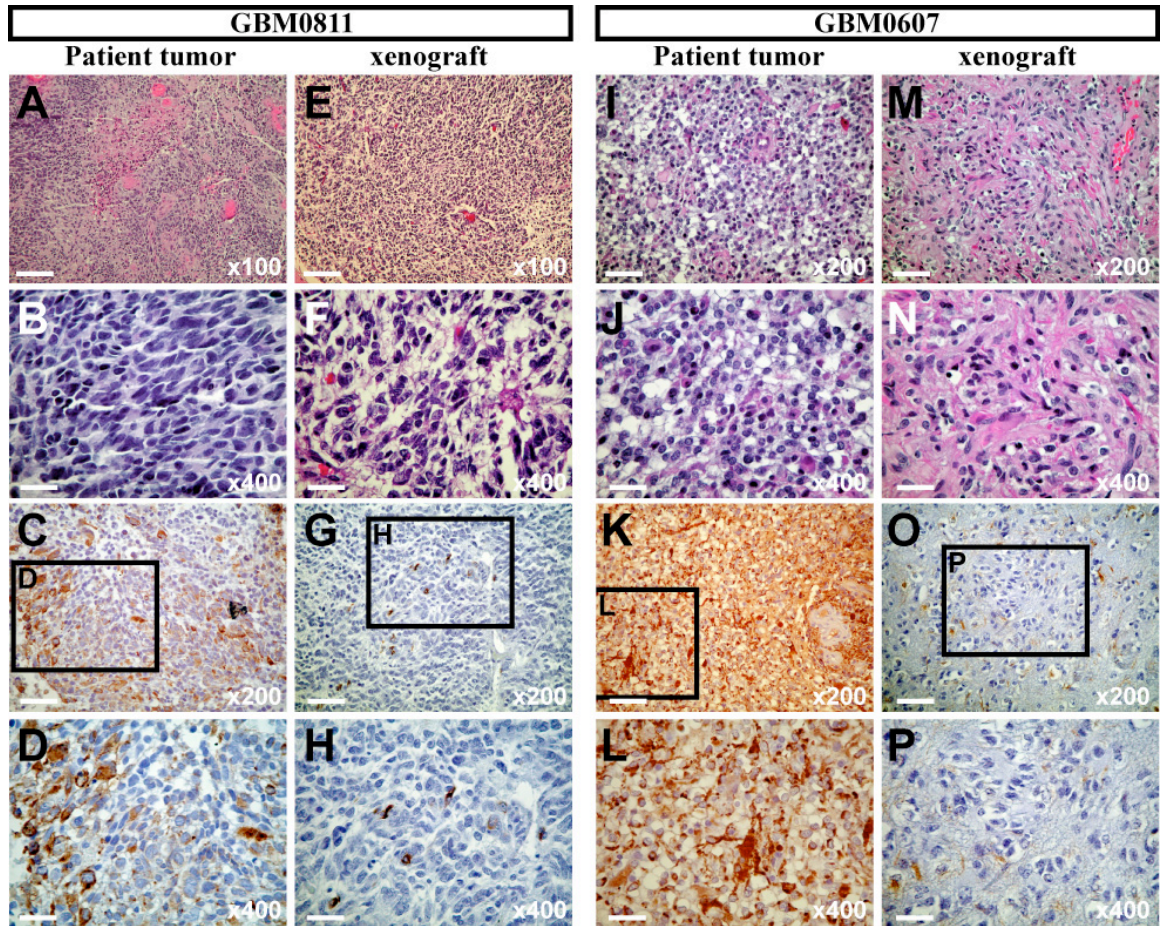
Supp. Figure 1

A**B**

Supp. Figure 2



Supp. Figure 3



CHAPITRE 3

ARTICLE #2

BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery

Sabrina Facchino¹, Mohamed Abdouh¹, Wassim Chatoo¹, and Gilbert Bernier^{1, 2},

Published online July 28, 2010

J Neurosci, (2010) 30 (30) : 10096-10111

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

² Department of Ophthalmology, Université de Montréal, Montréal, Canada, H3T 1J4

Le chapitre 3 représente un deuxième article scientifique qui illustre l'implication de BMI1 au niveau des mécanismes de reconnaissance et de réparation des dommages double brin de l'ADN. Cette étude attribue pour la première fois une fonction à la protéine BMI1 qui est indépendante de son activité transcriptionnel.

Dr Mohamed Abdouh, assistant de recherche, a participé dans les études d'immunoprécipitation, de FACS et dans l'écriture du manuscrit. Le Dr Wassim Chatoo, étudiant au PhD, a effectué les études au niveau des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF).

SUMMARY

Glioblastoma multiforme (GBM) is an aggressive brain tumor that is resistant to all known therapies. Within these tumors, a CD133-positive cancer-initiating neural stem cells (NSCs) population was shown to be resistant to gamma radiation through preferential activation of the DNA double-strand break (DSB) response machinery, including the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) kinase. The polycomb group protein BMI1 is enriched in CD133-positive GBM cells and required for their self-renewal in an *INK4A/ARF*-independent manner through transcriptional repression of alternate tumor suppressor pathways. We report here that BMI1 co-purifies with DNA DSB response and non-homologous end joining (NHEJ) repair proteins in GBM cells. BMI1 was enriched at the chromatin after irradiation and co-localized and co-purified with ATM and the histone γ H2AX. BMI1 also preferentially co-purified with NHEJ proteins DNA-PK, PARP-1, hnRNP U and histone H1 in CD133-positive GBM cells. BMI1 deficiency in GBM cells severely impaired DNA DSB response, resulting in increased sensitivity to radiation. In turn, BMI1 over-expression in normal NSCs enhanced ATM recruitment to the chromatin, the rate of γ H2AX foci resolution, and resistance to radiation. BMI1 thus displays a previously uncharacterized function in controlling DNA DSB response and repair. Pharmacological inhibition of BMI1 combined with radiation therapy may provide an effective mean to target GBM stem cells.

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and lethal primary brain tumor. Despite many advances made in cancer therapies, the median survival is less than 1 year after diagnosis (Holland, 2001; Maher et al., 2001). It was shown that CD133+ GBM cells share features with neural stem cells (NSCs), such as the expression of neuroepithelial markers and the ability to grow as floating neurospheres that can be differentiated into neuronal and glial cells. CD133+ cells can generate brain tumors resembling the tumor of origin in serial xenotransplantation experiments, thus supporting the cancer stem cell hypothesis (Reya et al., 2001; Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003; Galli et al., 2004; Singh et al., 2004). These data are in accordance with genetic experiments in mice suggesting that malignant astrocytomas originate from NSCs (Alcantara Llaguno et al., 2009; Wang et al., 2009). The CD133+ cell fraction is enriched after radiation and is responsible for the radioresistance of GBM tumors, possibly through preferential activation of the DNA damage response machinery (Bao et al., 2006, Tamura et al., 2010).

Gamma radiation induces a DNA double-strand break (DSB) that is recognized by two primary sensors: the auto-activated ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) kinase and NBS1 (O'Driscoll and Jeggo, 2006). NBS1 forms a complex (MRN) with Mre11 and Rad50 and recruits the complex to the break. The MRN complex is required for efficient phosphorylation and recruitment of ATM to the break (Lavin, 2007). These sensor proteins will phosphorylate H2AX to generate γ H2AX, which represents the first mark of DNA damage sensing. Following DNA damage recognition, mediator proteins such as BRCA1, MDC1 and 53BP1 amplify the signal, which is then transduced to downstream effectors (Lee and Paull, 2007; Iijima et al., 2008).

Polycomb group proteins form large multimeric complexes that repress gene expression through histones modification and chromatin compaction (Valk-Lingbeek et al., 2004). *Bmi1* is essential for post-natal mouse development and stem cells maintenance (van der Lugt et al., 1994; Jacobs et al., 1999a; Lessard et Sauvageau, 2003; Molofsky et al.,

2003; Park et al., 2003; Bruggeman et al., 2005; Molofsky et al., 2005; Zencak et al., 2005). *Bmi1* is also a cooperating oncogene with *c-myc* and is overexpressed in leukemias and neurological cancers (Haupt et al., 1991; van Lohuizen et al., 1991; Jacobs et al., 1999b; Leung et al., 2004; Bruggeman et al., 2007). Importantly, most *Bmi1* functions in development, stem cell maintenance and cancer have been attributed to transcriptional repression of the *Ink4a/Arf* locus (Sherr, 2001; Sharpless et al., 2004; Valk-Lingbeek et al., 2004).

We report here on a new function for BMI1 in DNA damage response. After gamma irradiation, BMI1 is redistributed on the chromatin where it co-localizes and co-purifies with ATM and γ H2AX. BMI1 also preferentially co-purifies with proteins of the non-homologous end joining (NHEJ) repair pathway in CD133+ cells. BMI1 inactivation impairs recruitment of the DNA DSB response machinery to the chromatin and renders GBM cells more radiosensitive, while BMI1 over-expression in normal NSCs improves DNA DSB response and cellular resistance to radiation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

GBM 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 mm filter mesh. After centrifugation, cells were resuspended in DMEM/F12 medium (Invitrogen) containing 0.25% glucose, N2 and B27 supplements, Heparin (2 mg/ml; Sigma), Gentamycin (25 mg/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.

MEFs Cultures

Cultures were established from day 14 embryos and maintained at 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 were grown on chamber glass slides, treated with 3 Gy of IR with a 0 min, 30 min and 6 hr incubation post IR.

Lentivirus and Infection Procedure

Sequence-specific oligonucleotides stretch shRNA designed to target the BMI-1 ORF (accession #: BC011652): were synthesized. Oligo#1 (nt 1061-1081) 5'-CCTAATACT TTCCAGATTGAT-3', oligo#2 (nt 500-518) 5'-GCAGAAATGCATCGAACAA-3', oligo #3 (nt 1051-1069) 5'-AATGGACATACCTAATACT-3', oligoScramble, nt 573-591) 5'-

GGTACTTCATTGA TGCCAC-3' Loop sequence: TTCAAGAGA. 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 cells prior to plating. Hygromycin selection (150 µg/ml) was added 48 h later. P53 shRNA lentiviral construct were purchased from sigma (TRCN0000003755).

Stereotactic Intracranial Cell Transplantation

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 µl aliquots were injected stereotactically into 60 day-old NOD-SCID mouse cortex, 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 3 mm to the right of the midline, 2 mm anterior 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.

Immunohistochemistry and Immunofluorescence Procedures

For immunohistochemistry, tissues were fixed by immersion in 10% buffered formalin and embedded in paraffin according to standard protocols. 5 to 7 µm thick sections were mounted on Super-Frost glass slides (Fisher Scientific). Slices were labeled using the Vectastain[®] ABC kit (Vector) according to the manufacturer instructions. DAB (Sigma) was used as the peroxidase substrate. 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 were as follow: BMI1 (US Biological), GFAP (DakoCytomation), and PH3 and γ H2AX (Upstate).

For immunofluorescence, neurospheres were first irradiated at 3Gy and incubated for 50 min. They were cryopreserved in CRYOMATRIX embedding medium (CEM) (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA) and cut at 8 μ m thick sections. Otherwise, cells were cultured in chamber slides before immunofluorescence analyses. Slices mounted on Super-Frost glass slides (Fisher Scientific) or cells were fixed for 15 min in paraformaldehyde 4% and washed 3 times in PBS 1X. Sections were blocked for 1 hour in PBS 1X + 1% BSA + 0.1% Tween, and 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). The following antibodies were used: BMI1 (US Biological), ATM-pSer1981 and MDC1 (Novus Biologicals), Mre11, pChk2, H3K9Ac and H3K27me3 (Cell Signaling), RNF8 and RNF2 (Abcam), 53BP1 (Cederlane), γ H2AX (Upstate), CD133-PE (Miltenyi Biotech), MAP2 (Chemicon), and GFAP (DakoCytomation).

Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Single-cell suspensions were fixed and permeabilized by using the Cytofix/Cytoperm Kit (BD biosciences) according to the manufacturer's instructions. Afterwards, cells were incubated with mouse anti-BrdU (Sigma) and rabbit anti-Ki67 (Chemicon). For the detection of phosphorylated histone H3, cells were immunostained with rabbit anti-PH3 (Upstate), and nuclei stained with propidium iodide just before cell acquisition in the FACS. The primary antibodies were visualized by using FITC-conjugated goat anti-rabbit, and PE-conjugated goat anti-mouse (Chemicon). For CD133 staining, dissociated cells were labeled with a mouse anti CD133-PE (AC133, Miltenyi). 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 Annexin V binding buffer, and stained with Cy5-Annexin V (Pharmingen). Just before cell acquisition in the FACS, 10 μ l of 7-AAD was added. For CD133⁺ cells purification, dissociated cells were labeled with a mouse anti CD133-PE and sorting was done using a FACSVantage flow cytometer (Becton-Dickinson) at a flow rate less than 3000 cells/second. After sorting, an aliquot of sorted cells was always re-analyzed to check for purity, which was usually greater than 95%.

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 μ g of total RNA and the MML-V reverse transcriptase (Invitrogen). 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'-GCTGGTCTCCAGGTA ACGAA-3', EZH2 (F) 5'-AGGACGGCTCCTCTAACCAT-3'; (R) 5'-CTTGGTGTGCACTGTGCTT-3', SIX3 (F) 5'-CCCACACAAGTAGGCAACTG-3'; (R) 5'-GTTACC-GAGAGGATGGAGGTG-3', PAX6 (F) 5'-GTGTCCAACGGATGTGTGAG-3'; (R) 5'-CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC-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.

Immuno-precipitation and LC-MS/MS

Cells were resuspended in the K solution (20mM sodium phosphate, 150mM KCl, 30mM sodium pyrophosphate 0,1% NP-40, 5mM EDTA, 10mM NaF, 0,1mM Na₃VO₄ into CompleteMini protease inhibitor cocktail solution (Roche Diagnostics)) and sonicated. Whole-cell extracts were immunoprecipitated with 2 μ g of IgG, BMI1 and p-ATM antibodies following Catch and Release v2.0 kit procedures (Millipore) and used in

Western blot experiments. For BMI1/Myc immunoprecipitation experiments, 293T cells were transfected with EFv-CVM-GFP or EFv-BMI1/Myc-CVM-GFP plasmids using Lipofectamin according to manufacturer instructions. 48 h later, transfected cells were irradiated (3Gy) or left untreated, and allowed to settle for 20 minutes. Whole cell extracts were collected in IP buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20; protease inhibitors CompleteTM (Roche Applied Science)). Following the determination of protein concentration, lysates were subjected to immunoaffinity purification. Briefly, protein extracts (4 mg) were incubated with continuous rotation for 3 h at 4°C with 50 µl of affinity matrix carrying mouse monoclonal anti-c-Myc IgG (clone 9E10; Covance). The matrix was washed four times with the wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20; protease inhibitors CompleteTM). The bound proteins were eluted by treating the beads twice with 1 bead volume (~50 µl) of c-Myc peptide solution (Covance) (400 µg/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) for 15 min and used in Western blot experiments. Detection and identification of immunoprecipitated proteins were carried out by Western blot (see below) and LC-MS/MS (liquid chromatography–tandem mass spectrometry). For LC-MS/MS analysis, proteins were revealed in silver stained gels, according to standard protocols. Protein bands cutting, trypsin-based in-gel protein digestions and subsequent LC-MS/MS procedures were carried out in the Innovation Centre at Génome Québec.

Chromatin Bound Assays

Cells were first lysed in 1% Triton-100/PBS solution and incubated 10min at room temperature. Cells were then centrifuged 30sec at 13000 rpm. Chromatin free proteins are in the supernatant, while chromatin bound proteins are in the pellet. Pellet is then resuspended in a NP-40 buffer (protease inhibitor solution, 50mM Tris-HCl pH7.6, 0.5% NP-40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM DTT, 1mM NaF, 0.5mM Na₃VO₄) for subsequent analyses.

Western Blot

The neurospheres were first irradiated at 3Gy incubated for 50 min or within a time laps (0, 30 min, 1 hr, 3 hr, 6 hr and 24 hr). Total protein extracts were prepared in the CompleteMini protease inhibitor cocktail solution (Roche Diagnostics) and sonicated. 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). Membranes were blocked for 1hour in 5% non-fat milk in TBS 1X containing 0.05% of Tween and incubated overnight with primary antibodies. The next day, membranes were washed 3 times in TBS 1X with 0.05% Tween and incubated 1 hr at room temperature with corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed using the Immobilon Western (Millipore). The following antibodies were used: BMI1 (US Biological), β actin, RNF8, RNF2, DNA-PKcs, NBS1 and Ku80 (Abcam), PARP1 and p53 (Santa Cruz), Histone H3, and γ H2AX (Upstate), ATM-pSer1981, ATM, and MDC1 (Novus Biologicals), 53BP1 (Cederlane), MRE11 (Cell Signaling), Myc (Covance), and α tubulin (Sigma).

Colony Forming Unit Assay (CFU)

After infection with the respective viruses for 48 hours, the selection was added. Two days later, cells were irradiated at different radiation doses (0, 1, 3, 5, 7, 10 Gy) and plated on a thin layer Matrigel substrat-treated 24 well plate (BD Bioscience) and allowed to grow to confluence. Cultures were fixed in PBS, 4% PFA, and stained with Cresyl Violet. After washing, phase contrast micrographs were taken.

MTT Test (Alamar Blue Assay)

The Alamar Blue is a non-toxic analog of MTT. It is a growth indicator based on the detection of metabolic activity. Cells were irradiated at different doses and incubated 24 hours at 37°C. AlamarBlue was added to the medium (100 μ L/mL of medium) and incubated for 6 hours. Fluorescence was monitored at 530-560nm of excitation and 590nm

emission wavelength in a 96 wells plate using a fluorescence multi-plate reader (Perspective Biosystems).

Neutral Comet Assay

DNA damage was assessed by whole single-cell gel electrophoresis assay according to the manufacturer protocole (TREVIGEN CometAssay).

ROS Levels Measurement

For ROS detection in cell homogenates, cells were homogenized by sonication in PBS-containing the CompleteMini protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). The dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA; Sigma) staining method was used for the quantification of ROS generation. 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. Data are normalized to the amounts of proteins per sample. For ROS detection in whole cell preparations, cells were incubated for 15 min in HBSS/DCF-DA (50 μ M). Cells acquisition was made in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson) at a flow rate of 300 cells/second. Results are expressed as the percentage of positive cells, and the mean fluorescence intensity (MFI) of the FL-1 channel.

Population Doubling

Cells were irradiated at different doses and incubated for 5 days, where the number of cells was quantified and normalized to non-irradiated controls.

ATM Inhibition

DMSO, 10uM ATM inhibitor (KU55933; KuDos pharma) or 20uM caffeine (Sigma) were added to the cell culture medium 60 min before cell irradiation.

BMI1 Over-expression

Full-length human *BMI1* cDNA (2611 base pairs) was cloned by RT-PCR from normal human retina RNA extracts. The DNA fragment was cloned into a lentiviral vector to generate the EF-1 α -*BMI1*.CMV-GFP construct (Chatoo et al., 2009).

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 figures.

Statistical analysis of colocalization level were performed by using Zeiss microscope and LSM software as follow:

Weighted colocalization coefficient: Sum of intensities of colocalizing pixels in 1 channel as compared to the overall sum of pixel intensities above threshold and in this channel.

$$\frac{\sum((GVC1 - MVC1) \times (GVC2 - MVC2))}{\sqrt{\sum(GVC1 - MVC1)^2 \times \sum(GVC2 - MVC2)^2}}$$

GV: gray value; MV: mean value; C: channel

Overlap coefficient (Mander): Insensitive to differences in signal intensity between the two channels and to bleaching.

$$\frac{\sum \text{GrayValueC1} \times \text{GrayValueC2}}{\sqrt{\sum \text{GrayValueC1}^2 \times \sum \text{GrayValueC2}^2}}$$

C: channel

RESULTS

CD133+ cells can generate brain tumors and are radioresistant

It has been reported that not all GBM cell lines express CD133/PROMININ (Beier et al., 2007; Pollard et al., 2009). In our hands however, all 6 established GBM cells lines grown as neurospheres in neural stem cell media were positive for CD133 (using either real-time PCR or FACS analyses, see Supplementary Fig.1 for INK/ARF and P53 status). When injected in the cortex of mice, CD133+ cells generated intracranial GBM-like tumors within 6-10 weeks in all treated animals (Fig. 1A). These tumors expressed BMI1 and the astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP). They were also positive for the cell proliferation markers phospho-histone H3 (PH3) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Fig. 1B and data not shown). In contrast, injection of more than 1×10^5 CD133- cells did not result in tumor formation in any of the treated animals (Fig. 1A). Upon irradiation, CD133+ cells rapidly activate γ H2AX, in contrast to CD133- cells (Fig. 1C). CD133+ cells were also enriched compared to CD133- cells 48 hours after irradiation at 5Gy (i.e. from ~10% to ~30% of the total cell population) (Fig. 1D). These results confirm previous work showing that CD133+ cells contains the tumor forming cell population in xenotransplant experiments, that CD133+ cells preferentially activate the DNA damage response, and that CD133+ cells are radioresistant compared to CD133- cells (Singh et al., 2004; Bao et al., 2006; Tamura et al., 2010).

BMI1 is a component of the DNA damage response machinery

We previously determined using magnetic micro beads purification that *BMI1* is expressed at levels ~9-fold greater in CD133+ cells compared to CD133- cells (Abdouh et al., 2009). Because CD133+ GBM cells are radioresistant compared to CD133- cells, and because some polycomb group proteins have been associated with the DNA damage repair machinery (Rouleau et al., 2007; Hong et al., 2008), we hypothesized that BMI1 is the

factor involved in GBM stem cell resistance to γ radiation. To test this, we irradiated GBM cells in which BMI1 activity was reduced by ~95% using a small hairpin RNA-encoding lentivirus against BMI1 (shBMI1#1) (Supplementary Fig. 2B) (Abdouh et al., 2009). One hour post-irradiation at 3Gy, we found that 80% of control virus- (shScramble) infected cells were strongly positive for γ H2AX foci, while only 20% of shBMI1-infected cells were weakly positive for γ H2AX foci (Fig. 2A). Similarly, activation of Chk2 (phospho-Chk2), a downstream target of the ATM kinase, was significantly impaired by BMI1 knockdown (Fig. 2A), thus suggesting defective DNA damage response. Since γ radiation leads to rapid activation and redistribution of DNA damage response proteins to the chromatin, this result prompted us to determine BMI1 localization following irradiation. In non-irradiated GBM cells, BMI1 signal was detected at discrete foci typical of polycomb bodies (Fig. 2B). Following irradiation, we observed robust BMI1 redistribution on the chromatin (Fig. 2B). Quantitative analysis of the total fluorescence intensity revealed a 2 folds increase in BMI1 fluorescence in irradiated cells (n = 15) compared to unexposed cells (n = 15). ATM is a central mediator of the DNA damage response following DNA DSBs. Quantitative confocal microscopy analyses revealed that BMI1 largely co-localizes with phosphorylated (p)-ATM (the activated form), MDC1 and γ H2AX in irradiated GBM cells (Fig. 2C and Supplementary Fig. 2A). Similar observations were made in human neural stem cells (NSCs) derived from human embryonic stem cells (Fig. 2C). To test if the increased in BMI1 fluorescence intensity is the result of an increase in total BMI1 protein level or BMI1 redistribution on the chromatin, we performed Western blot analyses on total cellular extracts and on cellular extracts that have been separated into soluble and chromatin bound fractions (Fig. 2D). These studies revealed that total BMI1 protein levels are not increased following radiation. Rather, BMI1 is enriched in the chromatin fraction following radiation, similarly as DNA-PK and PARP-1 (Fig. 2D) (Haince et al., 2008).

To test the possibility that BMI1 associates with DNA damage response proteins, we performed immunoprecipitation (IP) experiments on irradiated and non-irradiated GBM cells. IP of endogenous BMI1 protein led to visible co-precipitation of endogenous p-ATM only following irradiation (Fig. 2E). While no co-precipitation was observed with Mre11 or

RNF8 in either condition, BMI1 co-precipitated with 53BP1, RNF2 and γ H2AX with or without irradiation. Conversely, p-ATM IP led to a significant enrichment for BMI1, but this was radiation-independent (Fig. 2E). Notably, the relative enrichment for BMI1 was greater in the p-ATM IP than in the BMI1 IP. A possible interpretation of this result is that the p-ATM antibody has a greater affinity for its native target than the BMI1 antibody. Not surprisingly, ATM also co-precipitated with Mre11 and RNF8 following irradiation and with 53BP1, RNF2 and γ H2AX with or without irradiation (Fig. 2E). We performed comparable experiments in 293FT cells transfected with a vector expressing GFP or the BMI1 protein fused to a small Myc epitope tag (BMI1/Myc). Affinity purification of anti-Myc immuno-precipitated lysates led to a significant enrichment for BMI1 only in BMI1/Myc transfected cells, as revealed with anti-BMI1 or anti-Myc antibodies (Fig. 2F). BMI1 did not co-purify with Mre11, as observed with GBM cell extracts (Fig. 2F). Importantly, while p-ATM was not detected in the input, a robust signal was detected in the eluted fraction. Densitometry quantification revealed 3-fold enrichment after irradiation (Fig. 2F). A band of higher molecular weight, probably corresponding to a hyper-phosphorylated form of ATM, was also detected. These data indicate that BMI1 co-purifies with p-ATM, γ H2AX, RNF2 and 53BP1 in GBM cell lines. They also reveal a robust co-purification of BMI1 with p-ATM that is enhanced by radiation. The observed interaction between BMI1 or p-ATM and DNA damage response proteins in the absence of radiation possibly reflects the presence of endogenous DNA damages induced by replication errors, genomic instability or oxidative stress.

ATM co-purification with BMI1 is partially dependent on ATM phosphorylation

To further analyze the interaction between BMI1 and ATM, we assess if inhibition of ATM kinase activity would interfere with its association to BMI1. For this, we used an antibody that recognizes both p-ATM and non-phosphorylated ATM (ATM “total”). The specific ATM inhibitor (ATMi) that prevents auto-phosphorylation through competitive inhibition with the ATP binding domain of ATM was also used (Goodarzi et al., 2008; White et al.,

2008). 293FT cells were transfected with vectors expressing GFP or the BMI1/Myc fusion protein, exposed or not to ATMi, and irradiated. Using IP against the Myc epitope, we first observed that in basal conditions, ATM total co-purified with BMI1 with the same efficiency, with or without irradiation. In contrast, the co-purification of p-ATM with BMI1 increased significantly after irradiation (Fig. 3A). In second, we observed that ATMi interfered with the co-purification of ATM total with BMI1 only after irradiation (Fig. 3A). This suggests the possibility that BMI1 interacts (directly or indirectly) with non-phosphorylated ATM in the soluble nuclear fraction and with p-ATM in the chromatin bound fraction. After irradiation, the shuffling of BMI1 to the chromatin leads to its dissociation from non-phosphorylated ATM and preferential interaction with p-ATM.

BMI1 preferentially co-purifies with NHEJ proteins in CD133+ cells

To better understand the possible underlying molecular mechanism linking BMI1 to DNA DSB response/repair in brain cancer-initiating neural stem cells, we undertook an unbiased approach to identify proteins that preferentially interact with BMI1 in CD133+ cells after acute DNA damage. GBM cells were infected with a lentivirus expressing GFP or the BMI1/Myc fusion protein. Five days post-infection, the CD133+/GFP+ and CD133-/GFP+ cell populations were isolated by FACS and irradiated at 3Gy. With this system, both CD133+ and CD133- cells carried equal amount of the BMI1/Myc fusion protein. Cell extracts were immuno-precipitated with anti-Myc coupled beads and separated on a SDS-PAGE gel for silver staining. Four predominant bands present in the CD133+ fraction were excised and analyzed by mass spectrometry (Fig. 3B). After removal of contaminant cytoskeletal protein sequences, we found the presence of unique sequences (i.e. DNA-PK, PARP-1, hnRNP U (SAF-A) and histone H1 variants) in each of the 4 bands (Fig. 3B and C). Surprisingly, all identified proteins are part of the NHEJ repair machinery (Rosidi et al., 2008; Britton et al., 2009; Iliakis, 2009; Mitchell et al., 2009). To confirm these observations, we performed Western blot analyses on total (input), negative control (GFP-only virus) and experimental (GFP-BMI1/Myc virus) CD133- and CD133+ fractions using

specific antibodies. As expected, total BMI1 protein was more abundant in the CD133+ cell fraction (Fig. 3D-input) (Abdouh et al., 2009). However, after immuno-precipitation with the anti-Myc antibody (which only precipitate the BMI1/Myc transgenic protein), equal amounts of BMI1/Myc were present in the CD133- and CD133+ fractions (Fig. 3D-IP fractions). Notably, although DNA-PK and PARP-1 were more abundant in the CD133+ fraction of the total input (compared to the CD133-negative fraction), this difference was even more striking after BMI1/Myc immuno-precipitation (Fig. 3D). Furthermore, although Ku80 (another component of the NHEJ repair complex) and γ H2AX were equally abundant in the total input fraction, they were highly enriched after immuno-precipitation of BMI1/Myc in the CD133+ fraction (Fig. 3D). From this we conclude that BMI1 preferentially associate with NHEJ repair proteins and the histone γ H2AX in CD133+ GBM cells after DNA DSB induction.

BMI1 focal accumulation is independent of *ATM*, *Mdc1* or *NBS1*

To test if BMI1 focal accumulation is dependent or not on other DNA DSB response proteins, we assess its localization in *ATM*, *Mdc1* or *NBS1* deficient cells. We found that focal accumulation of BMI1 20 min post-irradiation was highly comparable between wild type or genetically deficient *ATM* or *Mdc1* fibroblasts or *NBS1* lymphocytes (Fig. 4A-C). Likewise, inhibition of ATM activity using ATMi or the non-specific inhibitor caffeine did not prevent BMI1 focal accumulation (Supplementary Fig. 2C). To determine who is first recruited after DNA damage, we evaluated BMI1, MDC1, H2AX, ATM and MRE11 focal accumulation kinetics. Time-course experiments revealed that BMI1 focal accumulation is very rapid and occurs ~2.5 min after irradiation, apparently before or at the same time as the earliest response factors (Fig. 4D). We concluded that BMI1 foci formed rapidly and this occurs very early after DNA damage induction and is independent of *ATM*, *Mdc1* or *NBS1* activity.

BMI1 knockdown impairs DNA damage recognition and repair in GBM cells

We tested the impact of BMI1 knockdown on the recruitment of the DNA damage response machinery in GBM cells. We found that focal accumulation of p-ATM was reduced in shBMI1 glioma cells after irradiation, and comparable or even more pronounced effects were observed for MRE11, RNF8, γ H2AX, 53BP1 and MDC1 (Fig. 5A). Interestingly, we observed that the effect on DNA damage response proteins focal accumulation was proportional to BMI1 knockdown level in individual cells. Quantitative confocal microscopy analysis revealed that globally, BMI1 knockdown resulted in over than 50% reduction in p-ATM signal intensity (Fig. 5B). To evaluate the rate of DNA repair after BMI1 knockdown, we performed a time course experiment using a distinct construct that reduces BMI1 activity by ~75% (shBMI1#2) (Supplementary Fig. 2B). While most γ H2AX foci were resolved 6 hours post-irradiation in control-virus (scramble) infected cells, numerous γ H2AX foci were still present in shBMI1-infected cells (Fig. 5C). Also, the initiation of γ H2AX foci appearance was delayed at 15 min in BMI1 knockdown cells, altogether suggesting delayed DNA damage recognition and repair. Furthermore, the basal level of γ H2AX foci was higher in non-irradiated shBMI1-infected cells (5 days post-infection), suggesting DNA damage accumulation or genomic instability (Fig. 5C). BMI1 has been shown to control reactive oxygen species (ROS) concentrations in mouse tissues and neurons (Chatoo et al., 2009; Liu et al., 2009). The persistence of DNA damages observed in shBMI1-infected GBM cells could thus be the consequence of increased ROS concentrations. We measured ROS concentrations, using either FACS analysis or total cellular extracts, in 2 distinct GBM cell lines infected with control or BMI1 knockdown lentiviruses. We did not observe changes in ROS concentrations after BMI1 knockdown in these cell lines (Fig. 5D).

Partial BMI1 knockdown impairs the radioresistance of GBM cells

In response to a DNA DSB, cells typically arrest in various phases of the cell cycle in order to repair their DNA, thus preventing the accumulation of mutations or the generation of

chromosomal aberrations at mitosis. In contrast, cells deficient for genes involved in DNA damage response undergo mitosis independently of the presence of damages (Huen et al., 2007; Stewart et al., 2009). Because complete inactivation of BMI1 in glioma cells impairs CD133+ stem cell renewal and viability (Abdouh et al., 2009), we used a hypomorphic shBMI1 construct that reduces BMI1 activity by ~50% (shBMI1#3) (Supplementary Fig. 2B). With this construct, GBM cells proliferate at a close to normal rate and maintain *CD133/PROMININ* expression, although at reduced levels (data not shown). Scramble and shBMI1-infected GBM cells were analyzed for cell cycle arrest 1, 3 and 16 hours post-irradiation at 3Gy. In normal growth conditions, both cell populations displayed comparable cell cycle kinetics (Fig 6A and B). In response to radiation, control GBM cells arrested in G2/M, and then re-established a normal cell cycle kinetic after 16 hours (Fig. 6A). In contrast, most shBMI1#3-virus infected GBM cells did not reach the G2/M cell cycle phase (only 0.36%), even 16 hours post-irradiation (Fig. 6A). The same but less dramatic phenotype was observed in a second independent GBM cell line (data not shown). Although we observed a reduced number of progenitors in shBMI1#3-virus treated cells 16 hours post-irradiation (as revealed by reduced Ki67 labeling), a comparable fraction of cells (about 10%) were BrdU positive in both cell populations. Because most shBMI1#3-virus treated cells do not undergo mitosis 16 hours post-irradiation, the best interpretation of these results is that the cells remained blocked in S-phase. We also evaluated cell death rate. Consistently with the above observations, the proportion of AnnexinV-positive cells was higher in shBMI1-infected GBM cells before (scramble: 4,8%; shBMI1#3: 7,2%) and 1 hour post-irradiation (scramble: 6,2%; shBMI1#3: 12,1%). When normalized, this revealed a 29% increase in cell death for the scramble population and a 68% increase in cell death for the shBMI1#3 population. Thus, even partial BMI1 knockdown severely affects cell cycle progression and viability of GBM cells after irradiation.

To further characterize the impact of BMI1 deficiency, control and shBMI1-infected GBM cells from 3 independent primary cell lines were irradiated at various doses and analyzed for cell viability (MTT assay), population doubling, and colony forming unit (CFU) capacity on matrigel. Cells with reduced BMI1 activity were hypersensitive to

radiation, where 1Gy resulted in a similar metabolic effect as 7-10Gy in control cells, as evaluated using the MTT assay (Fig. 6C). Population doubling analysis also revealed reduced cell survival and expansion capability (Fig. 6D). The CFU capacity of irradiated shBMI1 cells was also reduced compared to controls, and remaining colonies were composed of large cells with a flattened morphology, highly reminiscent of senescent cells (Fig. 6E and F). This reveals that a ~50% reduction in BMI1 activity is sufficient to significantly impair GBM cell radioresistance.

BMI1 over-expression improves ATM recruitment, DNA repair and radioresistance

If BMI1 is a critical factor in cancerous NSCs radioresistance, it is predicted that *BMI1* over-expression alone would be sufficient to increase the radioresistance of normal NSCs. To test this, we derived NSCs from human embryonic stem cells (Supplementary Fig. 3). These NSCs express *BMI1* at about 1/4 the level found in GBM cells. They were also positive for *EZH2*, *SIX3* and *PAX6*. When plated on a laminin substrate and exposed to serum, NSCs could be induced to differentiate into neurons and astrocytes (Supplementary Fig. 3). NSCs were infected with a GFP-only or GFP/BMI1 lentivirus. Quantification analysis revealed a 2.5 fold increase in BMI1 levels in GFP/BMI1 infected NSCs (Supplementary Fig. 4). We also observed focalization of BMI1 on the chromatin after irradiation in both control and BMI1-overexpressing NSCs (Supplementary Fig. 4A). BMI1 over-expression resulted in condensation of the chromatin, as visualized with DAPI or H3K27^{me3}, a mark of heterochromatin (Supplementary Fig. 4C and D). In control cells, the heterochromatin was mostly located at the nuclear periphery (with a ring-like shape). In BMI1-over-expressing cells, the heterochromatin was redistributed in the central nuclear region (Supplementary Fig. 4C and D), consistent with the reported ability of polycomb group proteins to compact nucleosomes (Francis et al., 2004). This variation was not due to an increased in H3K27^{me3} expression levels, as revealed by Western blot analysis (data not shown) and most likely reflects remodeling of the chromatin. Global histone acetylation was also less intense in BMI1-over-expressing cells, as revealed with an antibody against

H3K9^{Ac} (Supplementary Fig. 4D).

After irradiation, we observed that while γ H2AX foci were almost exclusively observed on the euchromatin in control cells, they were observed on both the heterochromatin and euchromatin in BMI1-over-expressing cells (Fig. 7A and data not shown), suggesting recruitment of the DNA damage response machinery to the heterochromatin. To test this, we analyzed the recruitment of p-ATM, which is critically required for repair of the heterochromatin but not of the euchromatin (Goodarzi et al., 2008). In BMI1-over-expressing but not in control cells, p-ATM co-localized with H3K27^{me3} (Fig. 7B). Notably, γ H2AX and p-ATM signals were also consistently more intense in BMI1 over-expressing than in control cells (Fig. 7C). In contrast, normal focal accumulation of RNF8 was prevented, suggesting possible competitive inhibition (Fig. 7C) (Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Stewart et al., 2009).

To evaluate the kinetics of DNA repair, we measured the rate of γ H2AX disappearance, as described previously (Ahnesorg et al., 2006; Goodarzi et al., 2008). In contrast to control cells where γ H2AX signal peaked 6 hours post-irradiation, γ H2AX signal peaked ~3 hours post-irradiation in BMI over-expressing cells and disappeared at 6 hour (Fig. 7D), suggesting improved DNA repair. In absence of radiation, the basal level of γ H2AX signal was also less intense in BMI over-expressing cells, suggesting increased genomic stability (Fig. 7D).

We exposed NSCs to increasing doses of radiations to evaluate their viability. Using the MTT assay, we found that BMI1-over-expressing NSCs remained metabolically active even when exposed to high doses of radiation, in contrast to control NSCs (Fig. 7E). Using AnnexinV staining, we found that before treatment, BMI1-over-expressing NSCs presented lower basal levels of apoptosis than control NSCs. 16 hours post-irradiation at 16Gy, BMI1-over-expressing NSCs also displayed much lower apoptosis levels than control NSCs (Fig. 7F), revealing overall increased radioresistance.

BMI1 activity in DNA DSB response is independent of P53

BMI1 deficiency can result in P53 activation (Alajez et al., 2009; Chatoo et al., 2009). In nasopharyngeal cancer, BMI1 inactivation was shown to renders cells more sensitive to P53-dependent apoptosis after irradiation (Alajez et al., 2009). Because the status of P53 is highly variable among our different GBM cell lines, we evaluated this in normal human NSCs, which are wild type for *P53*. In these cells, P53 stabilization was observed after irradiation (Fig. 8B). In contrast, P53 stabilization after irradiation was observed in only one of the four GBM cell lines tested (Supplementary Fig.1). P53 inactivation in NSCs using shP53-puro did not affect DNA DSB response, as visualized by normal focal accumulation of BMI1, MDC1, H2AX, 53BP1 and p-ATM 20 min post-irradiation (Fig. 8C). However, P53 inactivation completely prevented NSCs apoptosis induced by radiations (Fig. 8E). As previously observed in GBM cells, inactivation of BMI1 in NSCs using shBMI1#1 (95% knockdown) or shBMI1#3 (50% knockdown) impaired normal DNA DSB response and resulted in increased cellular apoptosis before and after irradiation (Fig. 8C and E). Evaluation of the DNA repair kinetics using the comet assay further revealed that BMI1 knockdown in NSCs delayed the normal DNA repair process (Fig. 8D). Finally, inactivation of P53 in BMI1-deficient NSCs (shP53-puro/shBMI1-hygro) did not improve or restore DNA DSB response and cell viability (Fig. 8C and E). This shows that abnormalities observed in DNA DSB response and cell viability after BMI1 inactivation in NSCs are P53-independent. We cannot exclude however that in GBM cells where P53 is functional, reduced cell viability observed after BMI1 knockdown is partially P53-dependent.

***Bmi1* is required for efficient DNA damage response/repair in mouse cells**

To test if our observations were verifiable in the context of a null mutation, we analyzed *Bmi1* knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Jacobs et al., 1999a; Chatoo et al., 2009). *Bmi1* deficiency resulted in a DNA damage response that was less robust than in wild type MEFs, as revealed by the reduced number of γ H2AX foci 30 min post-irradiation

at 3Gy (Fig 9A). Notably, while γ H2AX foci were almost resolved in wild type MEFs 6 hours post-irradiation, they were still abundant in *Bmi1*^{-/-} MEFs, suggesting delayed DNA repair (Fig 9A). We also observed the presence of γ H2AX foci in non-irradiated *Bmi1*^{-/-} MEFs, suggesting increased DNA damage in basal conditions. We compared the number of p-ATM foci at 30 min, but no obvious difference were observed between wild type and *Bmi1*^{-/-} MEFs (data not shown). These results show that *Bmi1* genetic deficiency also results in inefficient DNA damage response/repair in MEFs.

DISCUSSION

Here we provided evidences that BMI1, a previously established transcriptional repressor, has additional activities in DNA DSB response and repair. BMI1 co-localized with p-ATM and γ H2AX and was enriched on the chromatin after irradiation. This was found to be independent of *ATM*, *Mdc1* or *NBS1* function. BMI1 co-precipitated with DNA DSB response proteins in 293FT and GBM cells, and preferentially associated with NHEJ repair proteins in CD133+ GBM cells. BMI1 deficiency in GBM cells or NSCs impaired the DNA DSB response and decreased radioresistance. *Bmi1* function in DNA damage response/repair was also required in mouse cells. Gain-of-function experiments revealed that BMI1 possesses chromatin-remodeling activities and is sufficient to increase NSCs radioresistance. This work uncovers a novel and evolutionarily conserved function for BMI1 in DNA DSB response and repair.

BMI1 inactivation impairs DNA DSB response

One may argue that our results are based on knockdown experiments, raising the possibility of unspecific off target effects. However, we observed a consistent alteration on the recruitment of the DNA damage response machinery using 3 shRNA directed against different regions of *BMI1* cDNA sequence. These effects were also directly proportional to BMI1 knockdown levels. Results obtained are also consistent with the abnormalities we observed in *Bmi1*^{-/-} MEFs, where the altered kinetics of DNA repair was nearly identical to the one obtained using the shRNA against BMI1 (compare Fig.5C to 9A). Furthermore, the gain-of-function experiment resulted in the opposite effect, i.e. increased recruitment of DNA DSB response proteins and improved kinetics of DNA repair. One may also argue that the observed effects on GBM cells, human NSCs or MEFs are due to a cell culture artifact linked to BMI1 function in repressing transcription at the *INK4A/ARF* locus or P53 activity. However, the impact of BMI1 knockdown on DNA DSB response and repair was

not distinct between cell lines carrying or not a functional *INK4A/ARF* locus (Supplementary Fig.1). Furthermore, co-inactivation of P53 in NSCs depleted of BMI1 did not improve DNA DSB response or cell viability.

What is the role of BMI1 in DNA DSB response?

Our loss- and gain-of-function experiments reveal a consistent dosage effect, where BMI1 levels apparently directly correlate with DNA DSB response efficiency and cell viability after irradiation. It is also noteworthy that cultured GBM cells express BMI1 at high levels (Abdouh et al., 2009). This suggests the possibility that BMI1 operates as a recruitment platform for the DNA DSB response machinery. In this context, differential BMI1 expression would explain the preferential activation of the DNA damage response machinery (i.e. p-ATM, p-Chk1 and p-Chk2) in CD133+ cells compared to CD133- cells, since total level of (non-activated) ATM, Chk1 and Chk2 proteins is not different between CD133+ and CD133- (Bao et al., 2006). This is also supported by our gain-of-function experiments where BMI1 over-expression improves p-ATM recruitment to the chromatin. In our protein purification experiments however, where we observed preferential association of BMI1 with NHEJ proteins in CD133+ cells, it is noteworthy that BMI1/Myc fusion protein levels are identical between CD133- and CD133+ cells. Hence, preferential co-purification of Ku80 and γ H2AX (which are equally abundant in both cell populations) cannot be attributed to differential BMI1/Myc levels. This suggests an additional possibility where the affinity of BMI1 for DNA repair proteins is distinct in stem cells, possibly through specific post-translational modifications of BMI1. Other key proteins, such as DNA-PK and PARP-1, are also more abundant in CD133+ cells, showing that CD133+ cells are primed for efficient DNA damage response and repair (see model in Fig. 9).

BMI1 is part of the polycomb repressive complex 1 (PRC1), which can mono-ubiquitylate histone H2A through its E3 mono-ubiquitin ligase activity contained in RNF2/RING1A. Mono-ubiquitylation of γ H2AX by the PRC1 is thus a possibility. We observed co-precipitation of BMI1 with γ H2AX. We also observed “competitive inhibition” of BMI1

with RNF8 recruitment to DNA DSBs in BMI1 over-expressing NSCs. RNF8 is an E3 mono-ubiquitin ligase that can target γ H2AX (Huen et al., 2007; Kolas et al., 2007; Stewart et al., 2009). BMI1 also displays chromatin-remodeling activity (Francis et al., 2004). Likewise, we observed global chromatin remodeling after BMI1 over-expression. Considering these observations it is thus plausible that BMI1 requirement in DNA DSB response is primarily mediated through its action on the chromatin, locally and/or genome wide, rather than through its association with DNA DSB response proteins (Escargueil et al., 2008). Observed abnormalities in the recruitment of DNA DSB response proteins at the break site after BMI1 inactivation would be the consequence of an aberrant chromatin structure. It is also possible that BMI1 combines all these activities at once i.e. global chromatin remodeling, γ H2AX ubiquitylation, and physical recruitment of DNA DSB response and repair proteins at break sites.

BMI1 may allow DNA repair at the heterochromatin

Early ATM activation is apparently normal in *Bmi1*^{-/-} MEFs. This is in contrast with GBM cells and human NSCs, where it is reduced 20 min post-irradiation. This may be explained by species differences. Alternatively, strong BMI1 dependency in DNA damage response may distinguish stem cells from other cell types. The high heterochromatin content of GBM cells may also affect the DNA damage response (Goodarzi et al., 2008). This suggests an interesting possibility where BMI1 recruits p-ATM to the heterochromatin. ATM will then phosphorylate the heterochromatin remodeling factor KAP-1, allowing for DNA relaxation and repair at otherwise uneasily accessible heterochromatin domains. This possibility is supported by the co-localization of BMI1 and p-ATM, their co-purification, and by the “ectopic” localization of p-ATM (and γ H2AX foci) on the heterochromatin of irradiated NSCs that over-expressed BMI1 (Fig. 7A and B). In normal conditions, ATM recruitment and DNA repair at the heterochromatin occurs later than at the euchromatin (Goodarzi et al., 2008). Repair of the heterochromatin is thus the limiting step of the

process. We found that in NSCs over-expressing BMI1, the focal accumulation of p-ATM was more robust and DNA repair was faster than in control cells, thus indirectly supporting the above possibility. Finally, the chromatin remodeling activity of BMI1 may be coupled to its capacity to recruit ATM to the heterochromatin. Further studies will be required to address how exactly BMI1 is required for proper DNA DSB response, how BMI1 is recruited at DNA DSB sites, and what additional function it may play at the break site?

Cancer, aging and DNA repair

The seemingly opposite biological process of cancer and aging are matter of intensive investigation. While cancer is linked to uncontrolled cellular proliferation, aging is accompanied by reduced organ regenerative capacities and degeneration, in part owing to decreased stem cell capacities and cellular dysfunction (Maslov and Vijg, 2009). A common link to these biological processes may be DNA repair. Un-repaired mutations in DNA or genetic instability can lead to cancer. In turn, substantial evidence suggests that aging is driven by the accumulation of somatic mutations in genomic (and mitochondrial) DNA (Ruzankina and Brown, 2007). Notably, deficiency in DNA DSB repair results in NSC genetic instability, apoptosis and exhaustion with aging (Sii-Felice et al., 2008a; Sii-Felice et al., 2008b). Our results show that high BMI1 levels in normal or cancerous NSCs promotes efficient DNA damage response/repair and radioresistance. Notably, *Bmi1*-null mice show a complex phenotype that includes reduced lifespan, cerebellar degeneration, stem cell senescence, abnormal reactive oxygen species metabolism, premature CNS aging (van der Lugt et al., 1994; Lessard and Sauvageau, 2003; Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003; Bruggeman et al., 2005; Molofsky et al., 2005; Zencak et al., 2005; Chatoo et al., 2009) and MEFs radiosensitivity (this study). This phenotype shares multiple similarities with DNA damage recognition/repair syndromes ataxia-telangiectasia (*ATM* mutated) and ataxia-telangiectasia-like disorder (*MRE11* mutated) (O'Driscoll and Jeggo, 2006; Lavin, 2007). Thus high *BMI1* activity is beneficial to promote longevity but at the possible cost of aggressive radioresistant tumors.

In conclusion, the prototypical stem cell factor BMI1 encompasses at least 2 distinct functions that are required for normal and cancerous NSCs self-renewal. First, it prevents stem cell senescence, apoptosis or differentiation by repressing the transcription and activation of tumor suppressor genes (Lessard and Sauvageau, 2003; Molofsky et al., 2003; Park et al., 2003; Bruggeman et al., 2005; Molofsky et al., 2005; Fasano et al., 2007; Abdouh et al., 2009). Second, it is required and sufficient to recruit the DNA damage response machinery to DNA DSB sites in response to radiation, thus promoting NSCs survival. Preferential co-purification with NHEJ proteins in CD133⁺ cells also suggests that BMI1 may play a direct role in DNA repair. Cancerous cells, including glioma, are apparently more sensitive to BMI1 depletion than normal cells. This may be explained by an acquired dependency over BMI1 anti-apoptotic activity through transcriptional (i.e. tumor suppressor genes repression) and non-transcriptional (i.e. DNA repair) activities. This preferential sensitivity could be exploited to specifically target cancerous neural stem cells in radiation therapy.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported in part by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada and Canadian Institutes of Health Research. W.C. is a Scholar from the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal. G.B is supported by the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Abdoun M, Facchino S, Chato W, Balasingam V, Ferreira J, Bernier G (2009) BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci* 29:8884-8896.
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124:301-313.
- Alajez NM, Shi W, Hui AB, Yue S, Ng R, Lo KW, Bastianutto C, O'Sullivan B, Gullane P, Liu FF (2009) Targeted depletion of BMI1 sensitizes tumor cells to P53-mediated apoptosis in response to radiation therapy. *Cell Death Differ* 16:1469-1479.
- Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF (2009) Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 15:45-56.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444:756-760.
- Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, Aigner L, Brawanski A, Bogdahn U, Beier CP (2007) CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 67:4010-4015.
- Britton S, Froment C, Frit P, Monsarrat B, Salles B, Calsou P (2009) Cell nonhomologous end joining capacity controls SAF-A phosphorylation by DNA-PK in response to DNA double-strand breaks inducers. *Cell Cycle* 8:3717-3722.

- Bruggeman SW, Hulsman D, Tanger E, 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.
- 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 (2005) Ink4a and Arf differentially affect cell proliferation and neural stem cell self-renewal in Bmi1-deficient mice. *Genes Dev* 19:1438-1443.
- CGAR (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061-1068.
- 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* 29:529-542.
- Escargueil AE, Soares DG, Salvador M, Larsen AK, Henriques JA (2008) What histone code for DNA repair? *Mutat Res* 658:259-270.
- 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.
- Francis NJ, Kingston RE, Woodcock CL (2004) Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306:1574-1577.
- 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.
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Lobrich M, Jeggo PA (2008) ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell* 31:167-177.
- Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L, Lopez BS (2004) Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell* 14:611-623.

- Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG (2008) PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* 283:1197-1208.
- 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* 65:753-763.
- 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 U S A* 100:15178-15183.
- Holland EC (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2:120-129.
- Hong Z, Jiang J, Lan L, Nakajima S, Kanno S, Koseki H, Yasui A (2008) A polycomb group protein, PHF1, is involved in the response to DNA double-strand breaks in human cell. *Nucleic Acids Res* 36:2939-2947.
- Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, Chen J (2007) RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 131:901-914.
- Iijima K, Ohara M, Seki R, Tauchi H (2008) Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J Radiat Res (Tokyo)* 49:451-464.
- Iliakis G (2009) Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol* 92:310-315.
- Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M (1999a) The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397:164-168.
- Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M (1999b) *Bmi-1* collaborates with *c-Myc* in tumorigenesis by inhibiting *c-Myc*-induced apoptosis via *INK4a/ARF*. *Genes Dev* 13:2678-2690.

- Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, Panier S, Mendez M, Wildenhain J, Thomson TM, Pelletier L, Jackson SP, Durocher D (2007) Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 318:1637-1640.
- Lavin MF (2007) ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26:7749-7758.
- Lee JH, Paull TT (2007) Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26:7741-7748.
- Lessard J, Sauvageau G (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423:255-260.
- 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.
- Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira, II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T (2009) Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* 459:387-392.
- 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.
- Maslov AY, Vijg J (2009) Genome instability, cancer and aging. *Biochim Biophys Acta*.
- Mitchell J, Smith GC, Curtin NJ (2009) Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 and DNA-dependent protein kinase have equivalent roles in double strand break repair following ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75:1520-1527.
- Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardoll 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.

- 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.
- O'Driscoll M, Jeggo PA (2006) The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7:45-54.
- 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.
- Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, Bayani J, Head R, Lee M, Bernstein M, Squire JA, Smith A, Dirks P (2009) Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4:568-580.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111.
- Rosidi B, Wang M, Wu W, Sharma A, Wang H, Iliakis G (2008) Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* 36:1610-1623.
- Rouleau M, McDonald D, Gagne P, Ouellet ME, Droit A, Hunter JM, Dutertre S, Prigent C, Hendzel MJ, Poirier GG (2007) PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. *J Cell Biochem* 100:385-401.
- Ruzankina Y, Brown EJ (2007) Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing. *Br J Cancer* 97:1189-1193.
- 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.
- Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:731-737.

- Sii-Felice K, Barroca V, Etienne O, Riou L, Hoffschir F, Fouchet P, Boussin FD, Mouthon MA (2008a) Role of Fanconi DNA repair pathway in neural stem cell homeostasis. *Cell Cycle* 7:1911-1915.
- Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F, Mathieu C, Riou L, Barroca V, Haton C, Arwert F, Fouchet P, Boussin FD, Mouthon MA (2008b) Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *EMBO J* 27:770-781.
- 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.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401.
- Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M, Oldreive C, Wildenhain J, Tagliaferro A, Pelletier L, Taubenheim N, Durandy A, Byrd PJ, Stankovic T, Taylor AM, Durocher D (2009) The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136:420-434.
- Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, Van Lohuizen M (2004) Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118:409-418.
- van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, te Riele H, van der Valk M, Deschamps J, Sofroniew M, van Lohuizen M, et al. (1994) Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. *Genes Dev* 8:757-769.
- 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* 65:737-752.
- Wang Y, Yang J, Zheng H, Tomasek GJ, Zhang P, McKeever PE, Lee EY, Zhu Y (2009) Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural

stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer Cell* 15:514-526.

- White JS, Choi S, Bakkenist CJ (2008) Irreversible chromosome damage accumulates rapidly in the absence of ATM kinase activity. *Cell Cycle* 7:1277-1284.
- Yu X, Zhan X, D'Costa J, Tanavde VM, Ye Z, Peng T, Malehorn MT, Yang X, Civin CI, Cheng L (2003) Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther* 7:827-838.
- 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* 25:5774-5783.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. CD133+ GBM cells can generate brain tumors

(A) Kaplan-Meier representation of the survival curves of NOD/SCID mice injected with purified GBM CD133- and CD133+ cells. Mice were grafted at post-natal day 30 with 8 000, 15 000 or 50 000 CD133+ cells, or 100 000 CD133- cells. All mice grafted with CD133- cells were still alive 20 weeks after transplantation. Cell line used: GBM8011. (B) Representative image of NOD/SCID mouse brain bearing secondary tumors following engraftment of CD133+ GBM cells (top left panel). Formalin-fixed paraffin-embedded sections of NOD/SCID mouse brain injected with 15 000 CD133+ GBM cells were labeled with antibodies against BMI1, GFAP and PH3. Slides were counterstained with hematoxylin. Cell line used: GBM0811. (C) CD133+ and CD133- cells were sorted and irradiated at 3Gy. 1hr post-IR, cells were fixed and stained for γ H2AX. The total number of γ H2AX positive cells was scored. Results are expressed as the percentage of γ H2AX positive cells over total DAPI stained nuclei. Data are mean \pm SEM (n = 3, ** P <0.01). Cell lines used: GBM1202 and GBM0811. (D) Untreated or 5 Gy-irradiated GBM neurospheres were dissociated and stained with an anti-CD133-PE antibody. Cultures were analyzed 48hrs post-IR. The R1 gate delineates the cell population analyzed. Values are the percentages of CD133+ cells in the respective culture conditions. Cell line used: GBM0811. Scale bar; 100 μ m (B) and 10 μ m (C).

Figure 2. BMI1 interacts with the DNA damage response machinery

(A) BMI1 depletion alters DNA damage response. CD133+ GBM cells were sorted and infected with scramble or shBMI1#1 viruses 5 days before IR at 3Gy. 1hr post-IR, cells were fixed and stained for γ H2AX and pChk2. Total γ H2AX and pChk2 positive cells were scored. Results are expressed as the percentage of positive cells over DAPI stained nuclei. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 3, P^{***} <0.01). Cell lines used: GBM2802 and GBM1202. (B) BMI1 is redistributed on the chromatin after radiation. GBM neurospheres

were irradiated (3Gy) or left untreated (control). 1hr post-IR, the spheres were sectioned and labeled with a BMI1 antibody (n = 6 independent cultures). Cell lines used: GBM1202, GBM0410, GBM0811, GBM2802, GBM0611 and GBM2002. (C) hNSC or GBM cells were irradiated (3Gy, 20 min), and labeled with BMI1, MDC1, p-ATM, or γ H2AX antibodies. Note that for cell permeabilization, we used Tween-20 for GBM cells and Triton-100 for hNSCs. BMI1 co-localizes with p-ATM, MDC1 and γ H2AX. Quantitative confocal microscopy analyses were performed with a Zeiss microscope and LSM software. Data are presented as Colocalization coefficients (Cc) and Overlap coefficients (Over. coef). Cell lines used: GBM0811, GBM0611 and GBM2002. (D) BMI1 re-localizes to the chromatin after irradiation. GBM cells were irradiated (3Gy; +) or left untreated (control; -). 5 min post-IR, cell cultures were fractionated into chromatin free and chromatin bound protein fractions. These fractions were subjected to immunoblot with BMI1, DNA-PKc, PARP-1, histone H3, and β actin antibodies. Cell lines used: GBM 0811, GBM0611 and GBM2802. (E) BMI1 and p-ATM co-precipitate. GBM cells were irradiated (3Gy, +) or left untreated (-). 1hr post-IR, protein extracts were subjected to IP using anti-IgG, BMI1 and pATM antibodies. Immunoblot analysis using pATM, 53BP1, Mre11, RNF8, RNF2, BMI1, γ H2AX antibodies were performed. IgG was used as control antibody for non-specific interactions (n = 3). The bands appearing after IgG IP in RNF8 blot correspond to immunoglobulin heavy chain. Cell lines used: GBM0811, GBM2802 and GBM2002. (F) 293FT cells were transfected with EFv-CMV-GFP (GFP) or EFv-BMI1/Myc-CMV-GFP (BMI1/Myc-GFP) plasmids. Transfected cells were irradiated (3Gy) or left untreated. 20min post-IR, whole-cell homogenates were IP with an anti-Myc antibody and subjected to immunoblot with p-ATM, Mre11, Myc and BMI1 antibodies. Inputs represent 1/20 of cell homogenates. Note the presence of a possible hyper-phosphorylated form of p-ATM (*).

Figure 3. BMI1 co-purifies with the NHEJ proteins

(A) 293T cells were transfected with the EFv-CMV-GFP (GFP) or EFv-BMI1-Myc-CMV-GFP (BMI1-Myc) plasmids. Transfected cells were exposed to an ATM kinase inhibitor

(ATMi; 10 μ M) or DMSO for 1 hr, and irradiated (3Gy) or left untreated. 20 min post-IR, whole-cell homogenates were IP with an anti-Myc antibody and subjected to Western blot analyses. The asterisk marks a notable reduction in total ATM IP upon cells exposure to ATMi. Cell lines used: GBM0611 and GBM0811. (B-D) GBM cells were infected with the EFv-CMV-GFP (GFP)- or EFv-BMI1-Myc-CMV-GFP (BMI1-Myc)-carrying lentiviruses. Infected cells were sorted into CD133- and CD133+ fractions, and irradiated (3Gy, 20 min). Protein extracts were subjected to IP using an anti-Myc antibody. (B) Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and revealed by silver staining. Indicated protein bands were excised from the gel, digested with trypsin, and analyzed by LC-MS. (C) List of proteins immunoprecipitated with BMI1-Myc as identified by LC-MS. (D) Immunoprecipitates were resolved in SDS-PAGE and analyzed by Western blot. Note the preferential co-purification of BMI1 with NHEJ proteins in CD133+ cells.

Figure 4. BMI1 focal accumulation is independent of *ATM*, *NBS1* or *Mdc1*

Analysis of human fibroblasts deficient for ATM (A), MEFs deficient for Mdc1 (B) or immortalized human lymphocytes deficient for NBS1 (C). Wild type or mutants cells were irradiated at 5Gy and labeled with a BMI1 antibody. Focal accumulation of BMI1 was observed in *ATM*^{-/-}, *Mdc1*^{-/-} and *NBS1*^{-/-} cells. (C) Western Blot analysis confirmed NBS1 deficiency in *NBS1*-mutant cells. (D) GBM cells irradiated at 3 Gy were fixed at different time-point post-IR and labeled with BMI1, p-ATM, MDC1, γ H2AX and Mre11 antibodies. Note that the recruitment of BMI1 precedes that of p-ATM, MDC1 or Mre11. Cell lines used: GBM0811 and GBM2002.

Figure 5. BMI1 deficiency impairs the DNA damage response

(A) BMI1 depletion impairs recruitment of DNA damage response machinery. GBM cells were infected with scramble or shBMI1#1 viruses and irradiated at 3Gy. 1hr post-IR, cells were fixed and co-labeled with BMI1 and p-ATM, Mre11, RNF8, γ H2AX, 53BP1 or MDC1 antibodies. Panel represents a deconvolution images acquired with a Leica DMRE fluorescence microscope and the OpenLab 3.1.1 software, with the exception of the MDC1

data, which was acquired with a Zeiss confocal microscope and the LSM software. Cell lines used: GBM0811, GBM2002, GBM2802 and GBM0611. (B) BMI1 depletion impairs the recruitment of pATM. GBM cells were processed as in (A) and pATM signal intensity was quantified using ImageJ software. Data are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) +/- sd. For each samples, 50 cells were analyzed. Cell line used: GBM2802. (C) BMI1 depletion affects the kinetic of DNA repair. GBM cells infected with the scramble or shBMI1#2 virus were fixed at different time-points post-IR and labeled with the γ H2AX antibody. The total number of γ H2AX positive cells was scored and presented as the percentage of γ H2AX positive cells over total DAPI stained nuclei. Data are mean \pm SEM (n = 3, * P <0.05, ** P <0.01). Cell lines used: GBM0811 and GBM2802. (D) GBM cells were infected with the scramble or shBMI1#1 virus, and ROS levels were determined by using the dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCF-DA) tracer on: (1) cell homogenate. Excitation and emission wavelength were 485 nm and 530 nm, respectively, or (2) whole cells by FACS analysis which gives the percentage of positive cells, and the respective MFI. Note that BMI1 knockdown had no effect on ROS levels.

Figure 6. BMI1 is required for GBM cells radioresistance

(A and B) scramble or shBMI1#3 virus-infected GBM cells were irradiated (3 Gy) and analyzed by FACS 1hr, 3hr, or 16hr later. Single cell suspensions were processed for PH3 labeling (A) or Ki67 labeling and BrdU incorporation (B). In (A), PI was added just before FACS acquisition. Values are the percentages of PH3 positive cells. Cell lines used: GBM2802 and GBM0611. In (B), BrdU was added to cell cultures 90 minutes before analysis. Cell line used: GBM2802. Values are the percentages of cells in the respective quadrants. Data are representative of two independent experiments. (C-F) GBM cells infected with scramble or shBMI1#3 lentivirus were irradiated with 5 different radiation doses. BMI1 depleted GBM cells show increased radiation sensitivity as determined by (C) MTT assay (cell lines used: GBM2802, GBM0410 and GBM0811), (D) population doubling (cell lines used: GBM2802 and GBM0811) and (E and F) CFU assay. In ((E) middle panel), arrowheads indicate surviving colonies. Arrowheads in (Eii) indicate

senescent cells. The EC50 of each cell line was determined using various radiation doses and represented in (F) when the number of colonies with more than 5 cells was equivalent to 50% of the total number of colonies in non-irradiated controls. Data are mean \pm SEM (n = 3, * P <0.05, ** P <0.01). Scale bars in E: 1 mm (left and middle panels); 50 μ m (right panels).

Figure 7. BMI1 over-expression improves DNA DSB response, DNA repair efficiency and radioresistance of human NSCs

(A and B) Human NSCs over-expressing BMI1-GFP (BMI1tg) or GFP (GFPTg) were irradiated (3Gy), fixed 1hr post-IR and co-stained with either γ H2AX or pATM and H3K27^{me3} antibodies. γ H2AX or p-ATM co-localized with H3K27^{me3} at discrete foci (arrowheads) only in BMI1tg cells. (C) BMI1 over-expression enhances the DNA damage response and inhibits RNF8 focal accumulation. NSCs were treated as in (A and B) and labeled with γ H2AX, pATM and RNF8 antibodies. Deconvolution images were acquired with a Leica DMRE fluorescence microscope and the OpenLab 3.1.1 software. (D) BMI1 over-expression accelerates the kinetic of DNA repair. Cells were isolated at different time-points post-IR (3Gy) and protein extracts were immunoblotted with p-ATM, γ H2AX and β actin antibodies. β actin was used as loading control. (E) BMI1tg or GFPTg NSCs were irradiated at different doses and analyzed for metabolic activity using the MTT assay 24hrs post-IR. Data are mean \pm SEM (n = 3, * P <0.05, ** P <0.01). (F) BMI1tg cells are radioresistant compared to GFPTg cells. Cell cultures were analyzed for the level of apoptosis using the AnnexinV/7-AAD labeling before and 16 hours post-IR.

Figure 8. BMI1 function is independent of P53

(A) NSCs cells were transfected with lentiviruses expressing shP53 or shScramble. Western blot analyses were performed using antibodies against P53 or β -Actin. β -Actin was used as an internal standard to quantify P53 protein expression levels. (B) P53 stabilization is observed 6 to 24hrs post-irradiation. NSCs were irradiated (5Gy) or left untreated. 1 hr, 6 hrs, and 24 hrs post-IR, whole-cell homogenates were subjected to

Western blot analyses with P53 and β -Actin antibodies. (C-E) NSCs cells were sequentially infected with shP53 virus, and scramble or shBMI1 viruses. Infected cells were irradiated (5Gy) or left untreated. (C) 20 min post-IR, cells were fixed and stained for BMI1, MDC1, γ H2AX, 53BP1 and p-ATM. BMI1 depletion affects the recruitment of DSB response proteins independently of P53 status. (D) 1hr, 12 hr, and 24 hr post-IR, cells were analyzed for DNA damage by the Neutral Comet Assay. Data are presented as the tail moment index as analyzed by the Comet Assay IV program (π Perceptive instrument). (E) Cell cultures were analyzed for the level of apoptosis using the AnnexinV/7-AAD labeling before and 16hrs post-IR.

Figure 9. *Bmi1* deficiency results in defective DNA damage response

(A) WT and *Bmi1*^{-/-} MEFs were irradiated at 3 Gy and labeled at different time-points (0 min, 30 min, 6 hr) post-IR with γ H2AX antibody. Data are expressed as the percentage of γ H2AX positive cells over total hematoxylin-stained nuclei. Results are mean \pm SEM (n = 3, **P*<0.05). (B) A working model placing BMI1 as a component of the DNA DSB response machinery. (C) BMI1 may be implicated in DNA DSB repair by preferentially interacting with NHEJ proteins in CD133+ GBM cells.

Figure 1

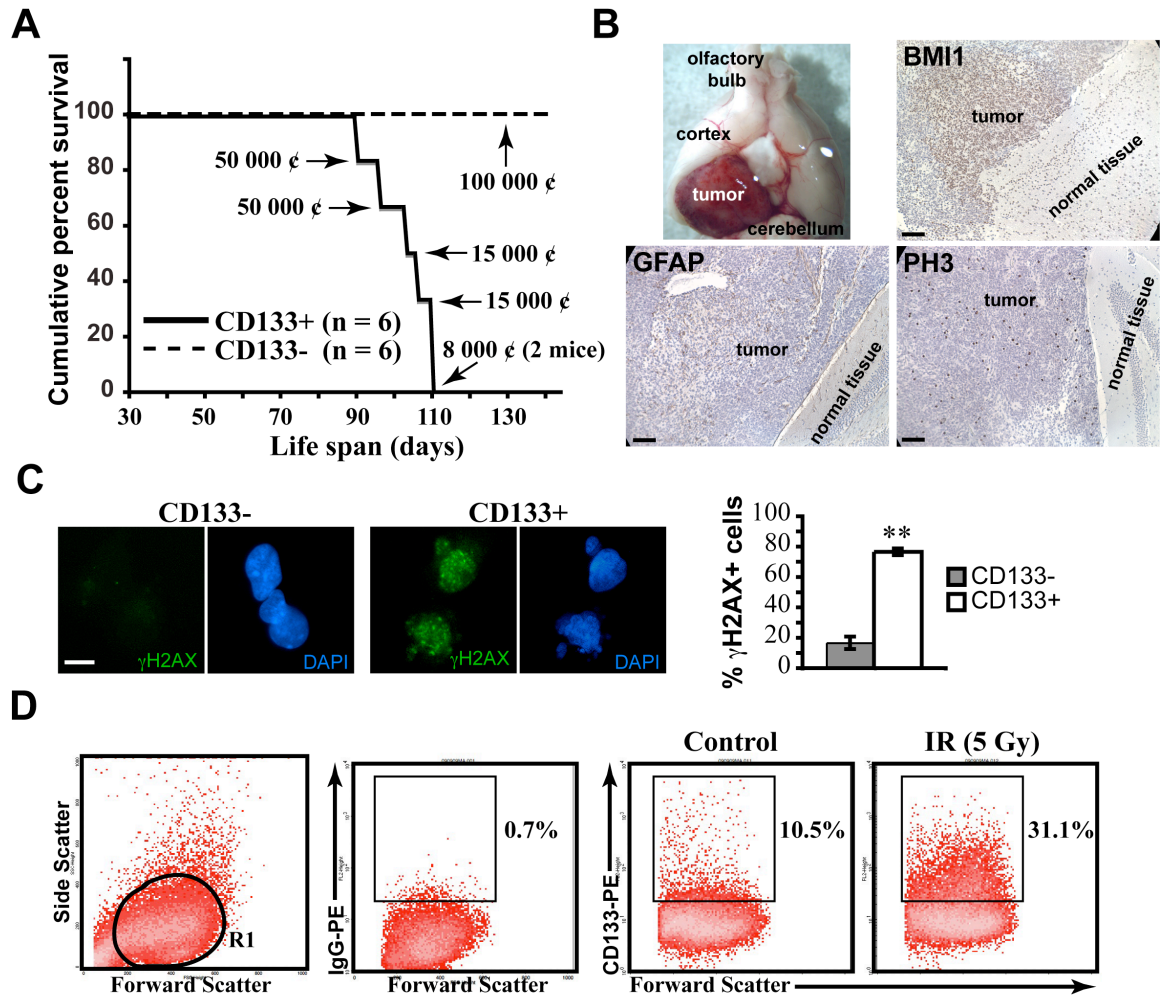


Figure 2

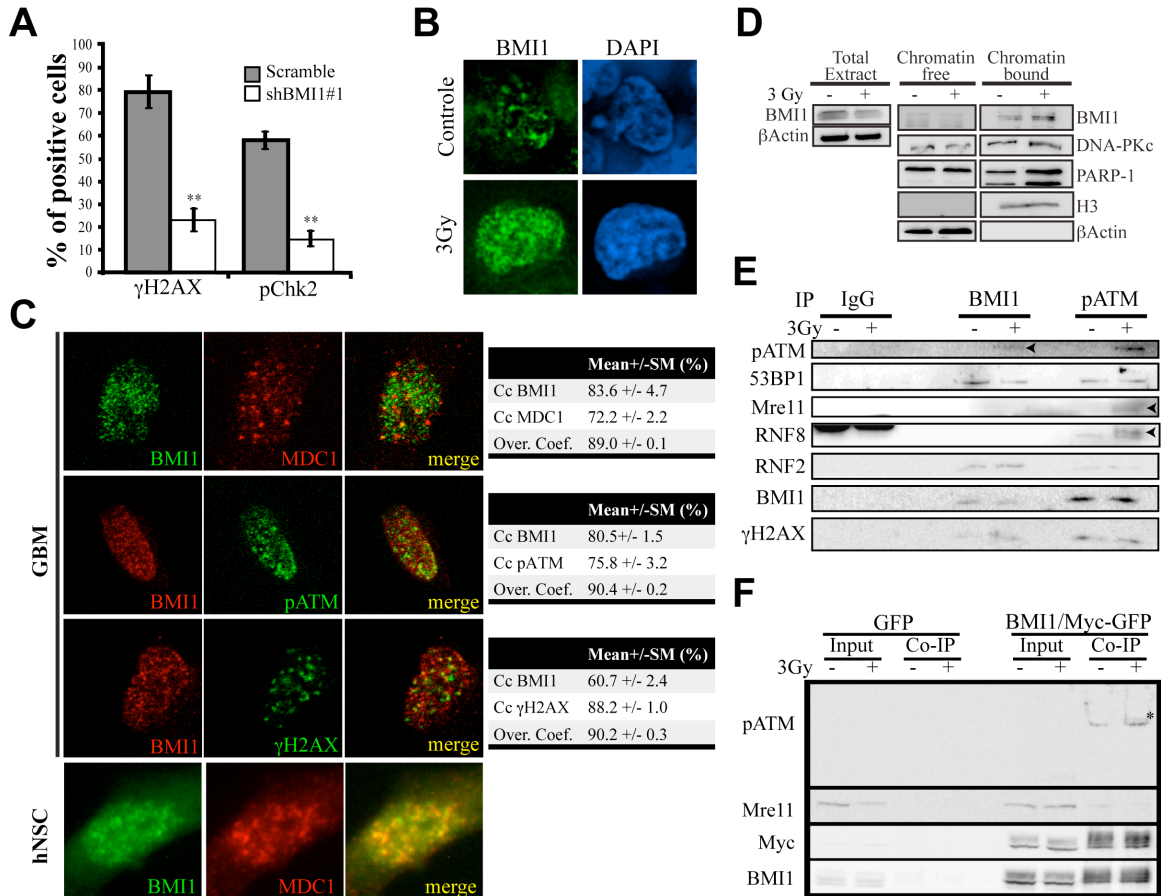


Figure 3

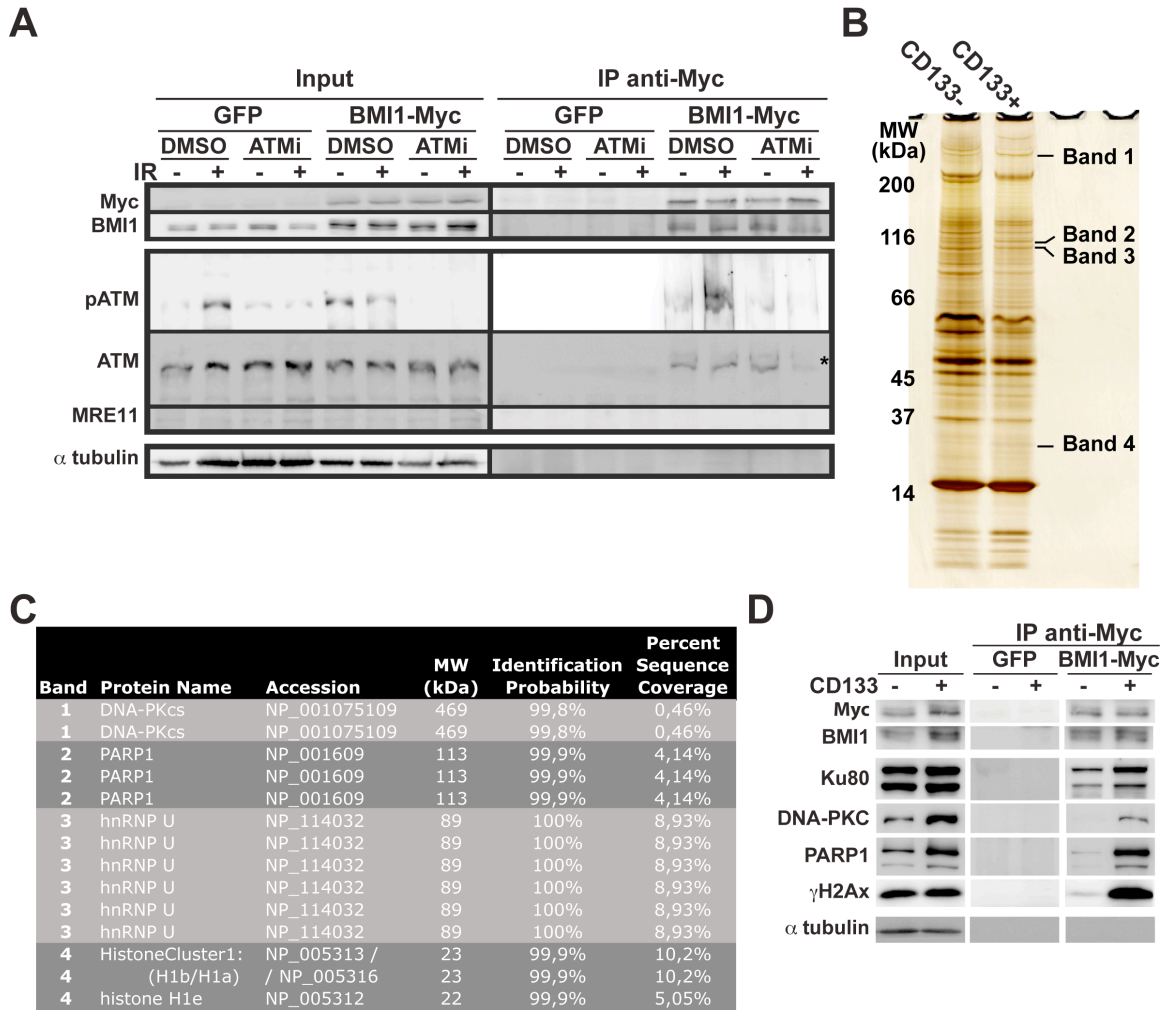


Figure 4

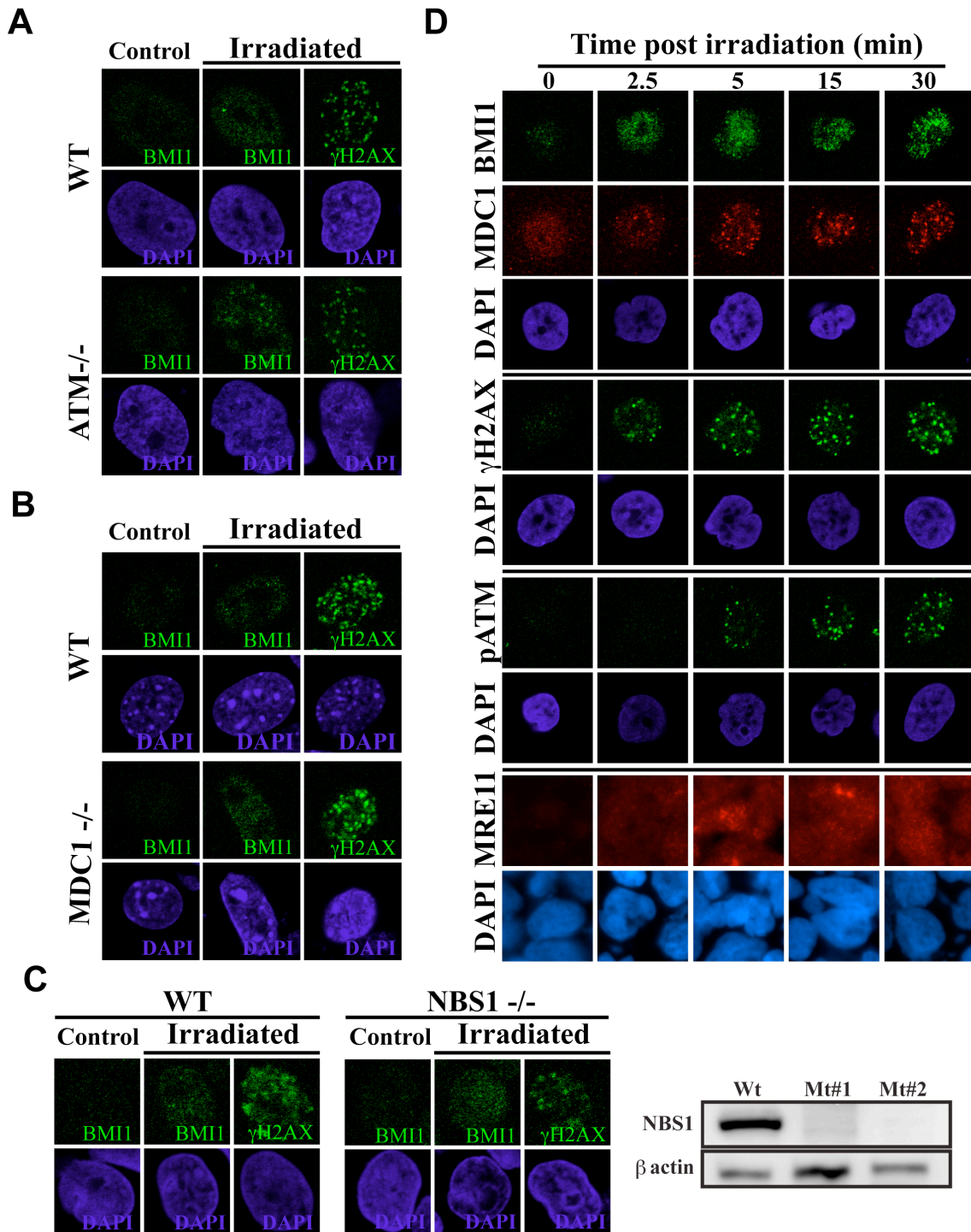


Figure 5

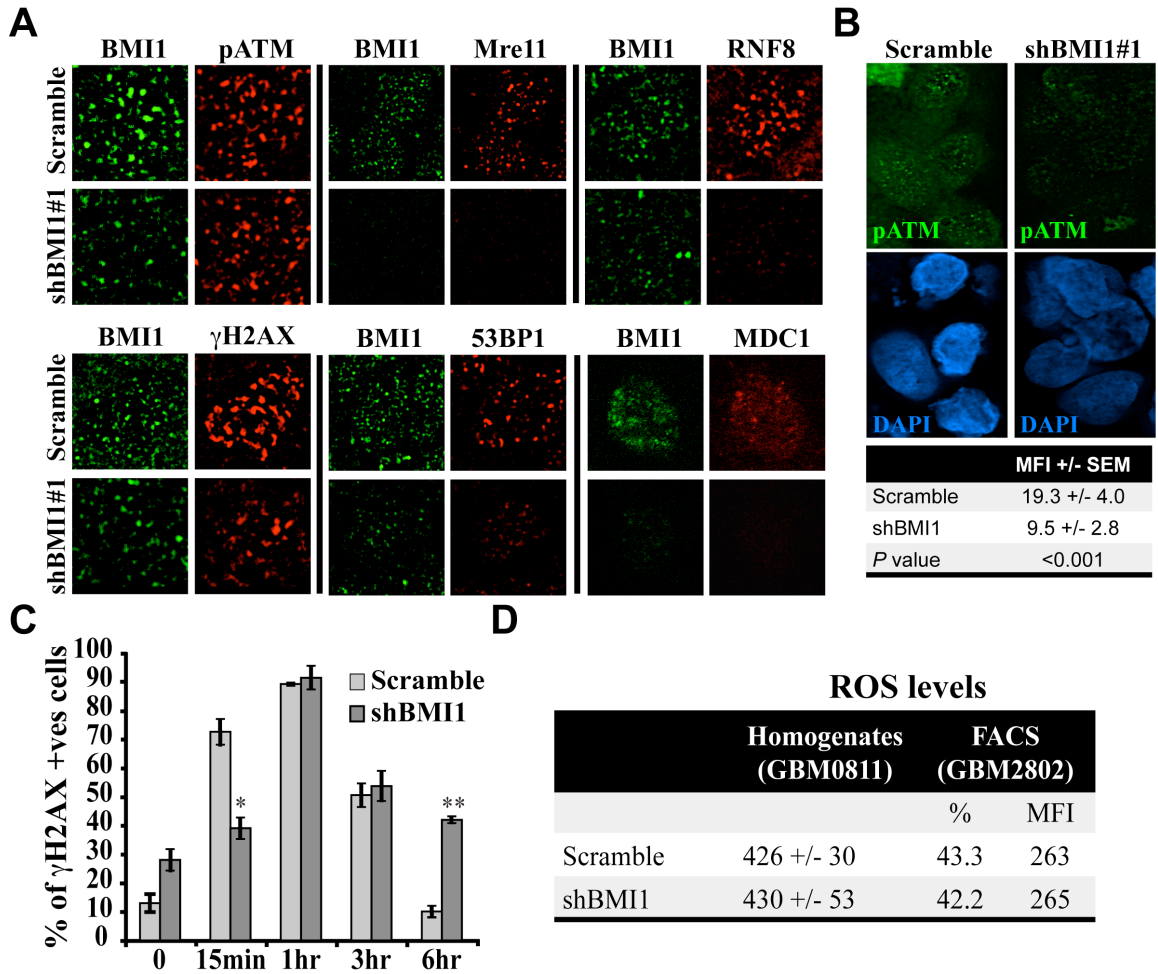


Figure 6

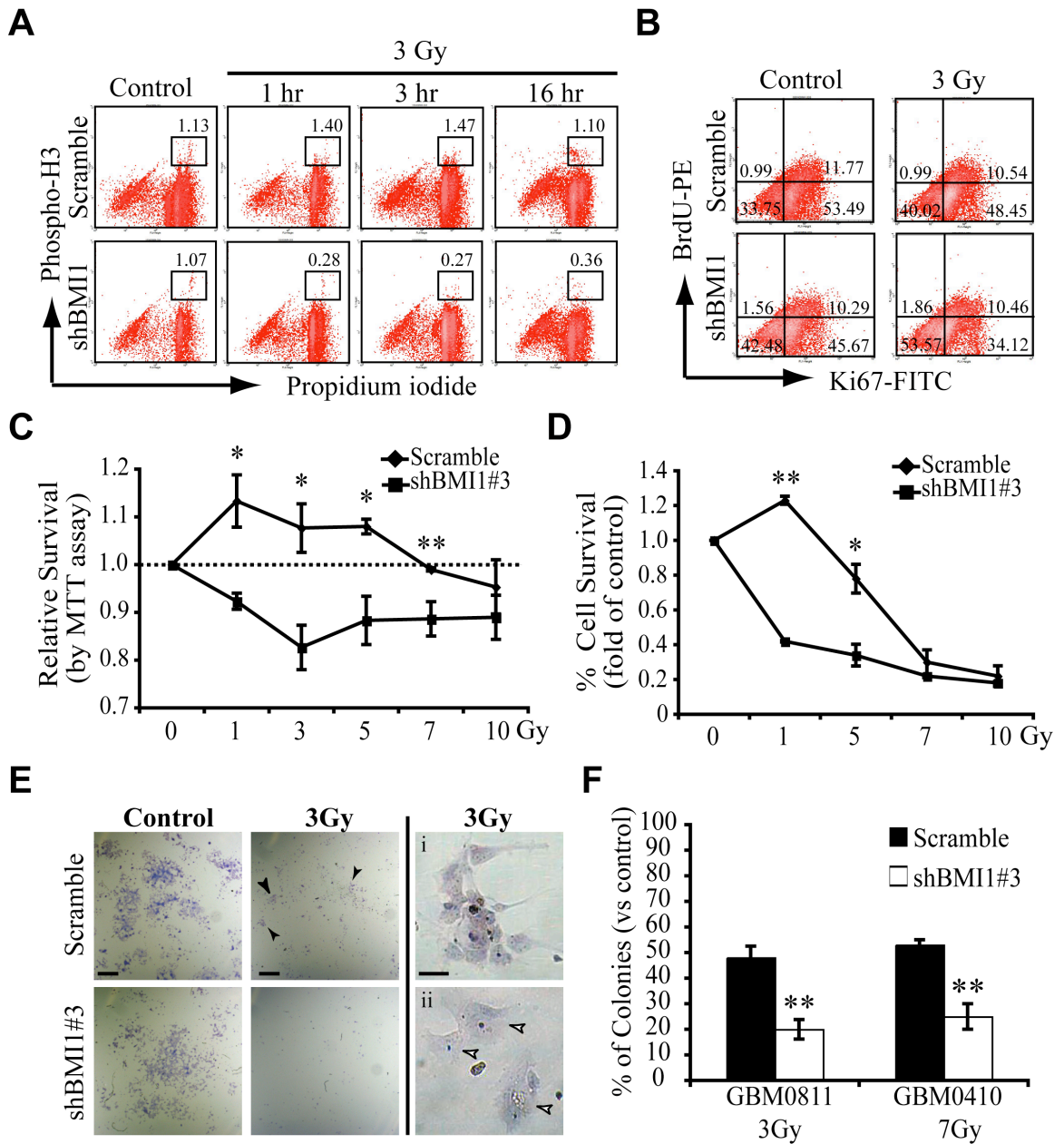


Figure 7

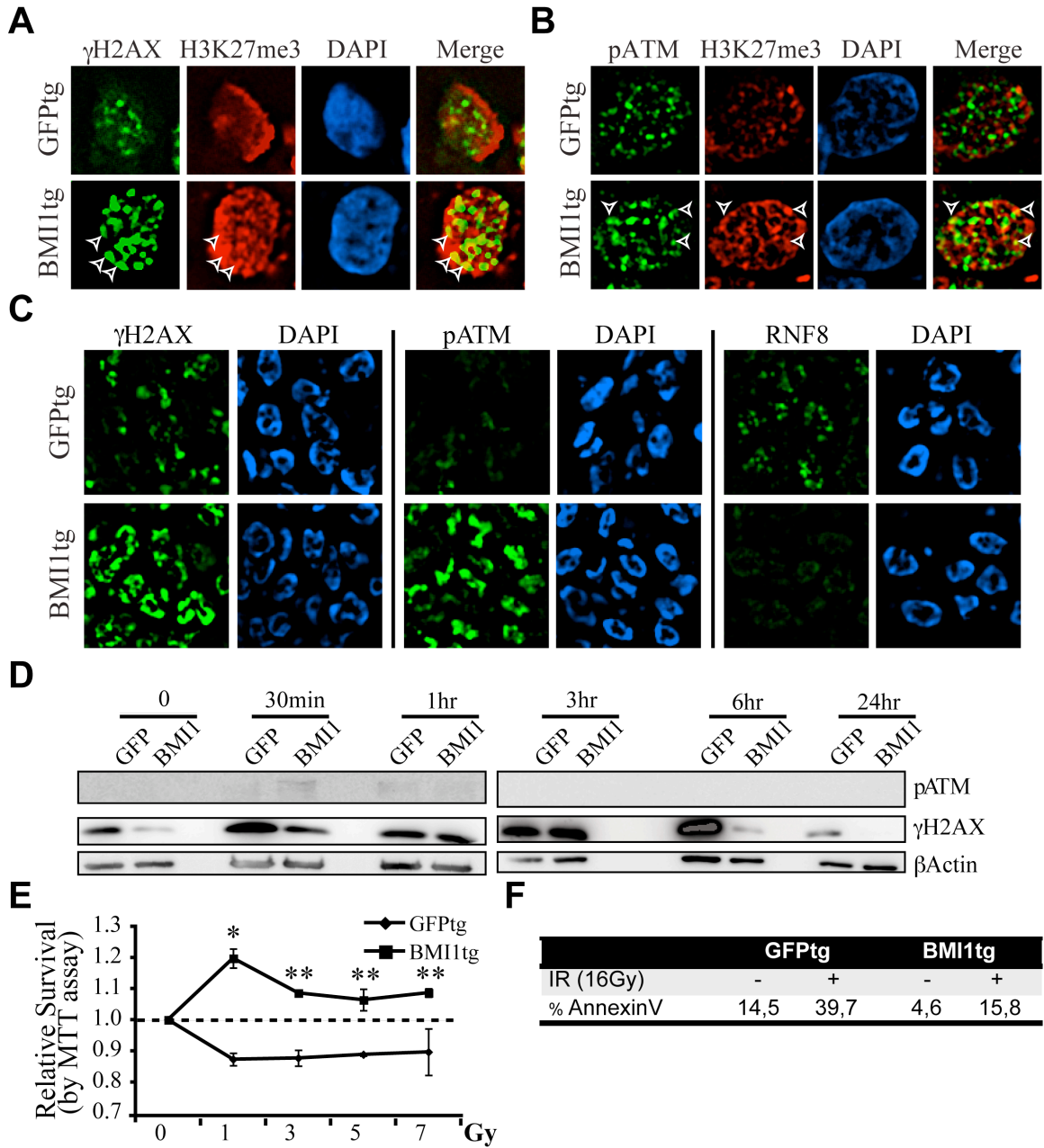


Figure 8

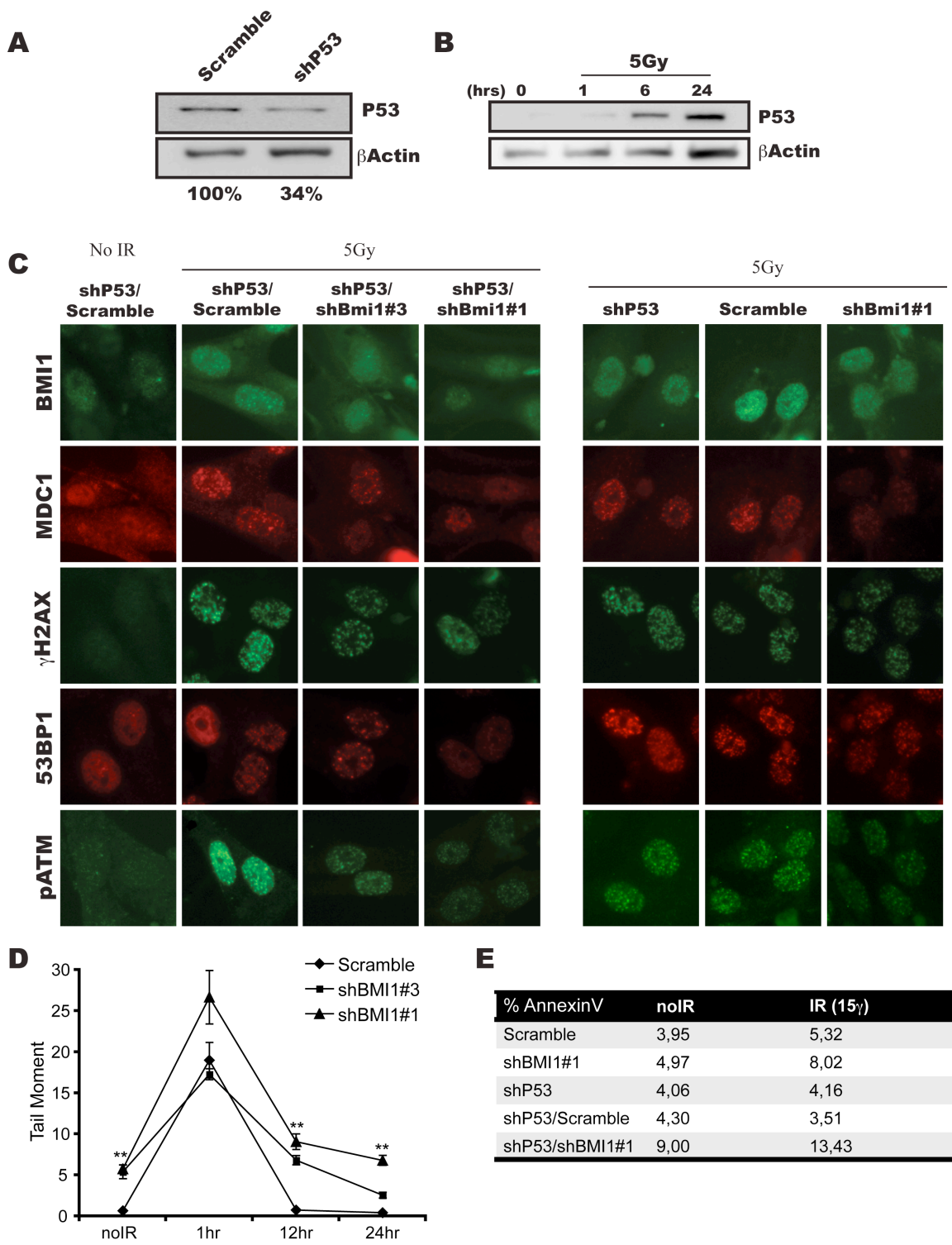
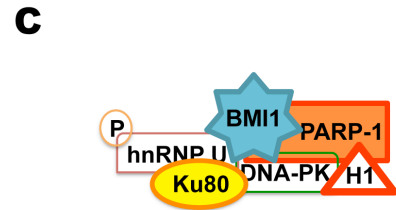
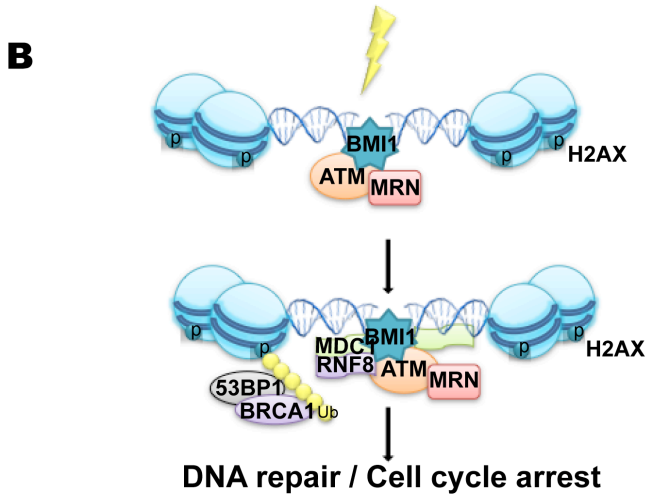
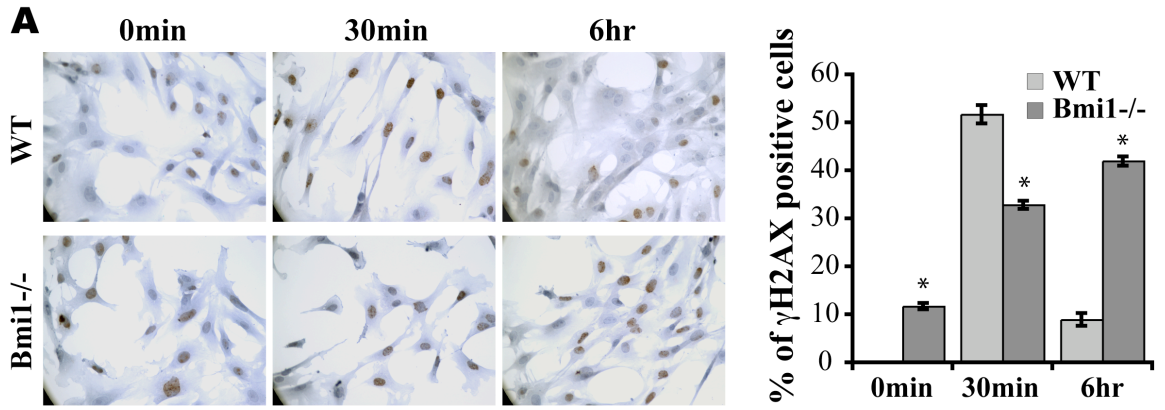


Figure 9



SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

SFigure 1. GBM cell lines status. (A) Inventory of the GBM cell lines where the INK/ARF, P53 status and BMI1 dependency for DNA DSB response are represented. ND. Not determined. (B) Western Blot analysis testing the stabilization capacity of P53 6hr post-radiation in 4 different GBM cell lines.

SFigure 2. BMI1 co-localizes with p-ATM, MDC1 and γ H2AX after irradiation. (A) Quantitative confocal microscopy analyses performed 20min post-IR reveal extensive colocalization. Multiple labeled cells are shown. (B) shRNA downregulation of BMI1 expression. Western blot analysis performed on shBMI1 or scramble-infected 293FT cells using anti-BMI1 and β actin antibodies. β Actin was used as an internal standard to quantify BMI1 expression levels (upper 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 SD ($n = 3$; $**P < 0.01$) (lower panel). (C) ATMi(10uM), caffeine (20uM) or DMSO-treated glioma cells were irradiated at 5Gy and labeled with a BMI1 antibody. Focal accumulation of BMI1 was observed in both ATMi and caffeine-treated cells.

SFigure 3. Characterization of human neural stem cells. Human embryonic stem (hES) cells (A) were differentiated into embryonic body (B) and then into hNSC (C) (for detailed procedures, refer to the Supplementary Methods section). hNSC cultured in medium enriched with serum were able to form astrocytes and neurons as shown by using GFAP (D) and MAP2 (E) labeling. (F) hES cells, GBM and hNSC cells were analyzed by Real-Time PCR for the expression of *BMI1*, *EZH2*, *SIX3* and *PAX6* transcripts. Data are expressed as fold change over gene expression measured in hES cells that was set at 1. Results are mean \pm SEM, and are representative of 3 independent experiments.

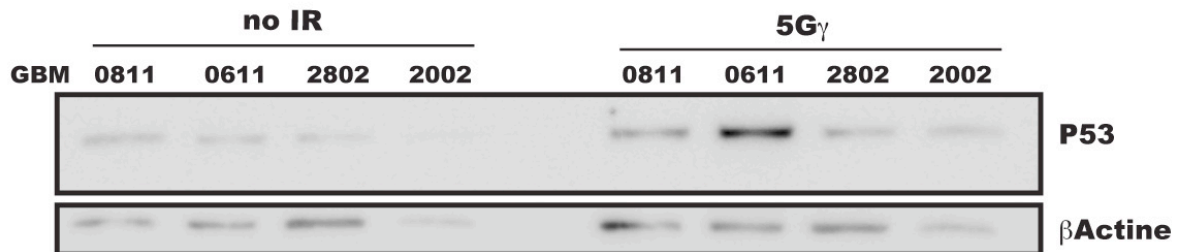
Figure 4. BMI1 over-expression induces chromatin remodeling and compaction. (A) In NSCs, BMI1 focal accumulation on the chromatin was observed upon irradiation. (B) Infected hNSC (GFPtg or BMI1tg) and GBM were analyzed by Real-time PCR for the expression of BMI1. (C-D) BMI1 over-expression resulted in condensation of the chromatin, as visualized with DAPI or H3K27_{me3}, a mark of heterochromatin. In control cells, the heterochromatin was mostly located at the nuclear periphery (with a ring-like shape). In BMI1-over-expressing cells, the heterochromatin was redistributed in the central nuclear region. Global histone acetylation was also less intense in BMI1 overexpressing cells, as revealed with an antibody against H3K9_{Ac}.

SFigure 1

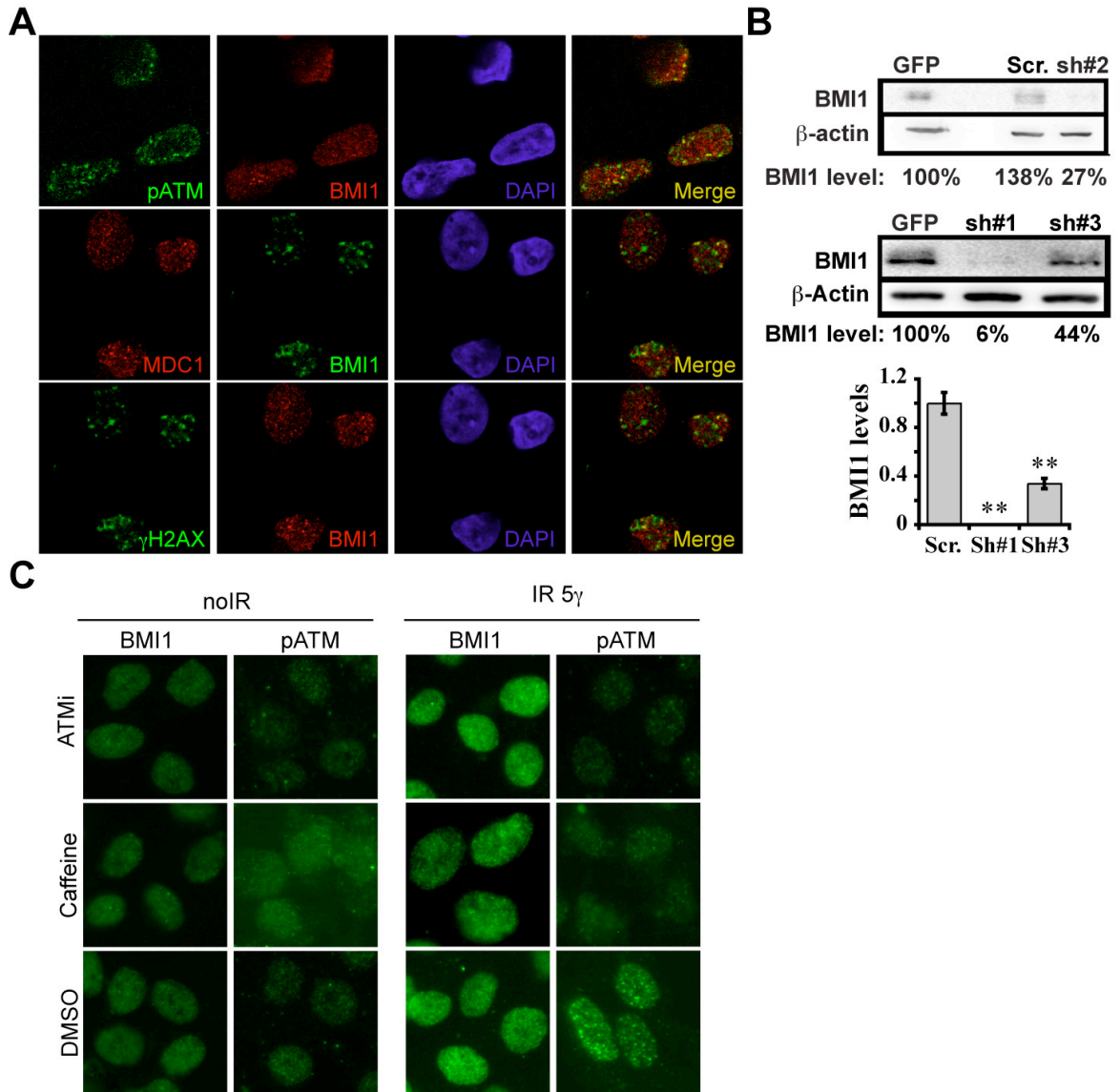
A

GBM cell lines	INK/ARF status	P53 stabilization post-IR
1202	-	NA
0410	-	NA
0811	+	-
2802	+	-
0611	-	+
2002	-	-

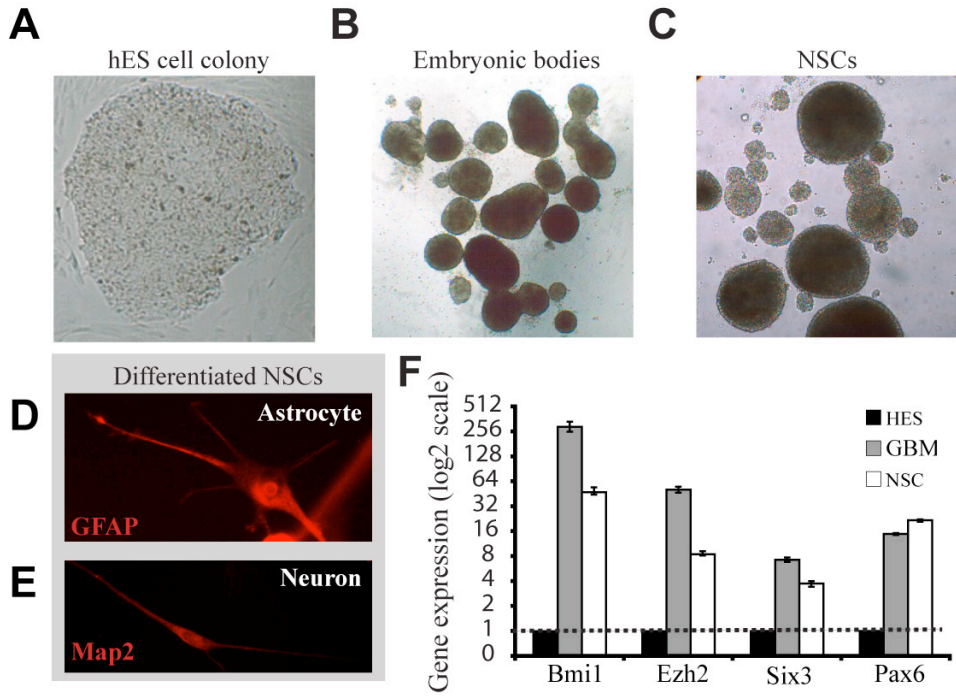
B



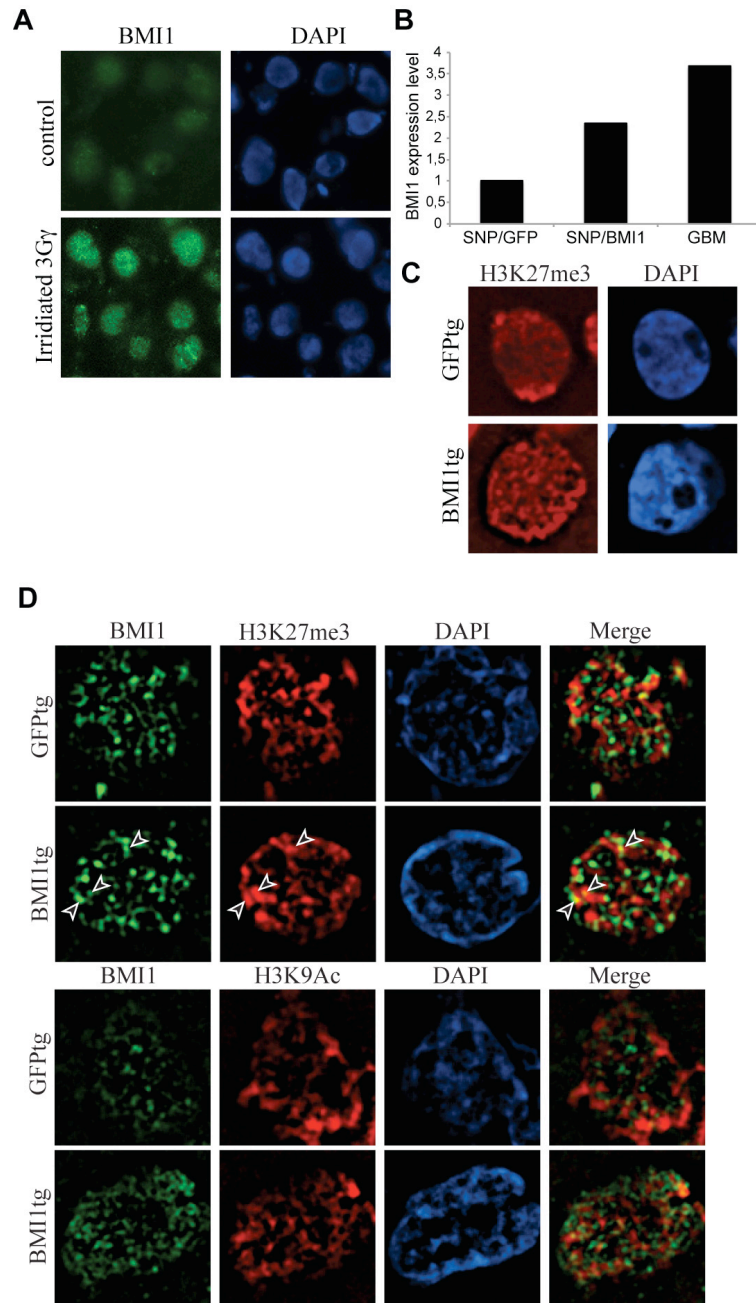
SFigure 2



SFigure 3



SFigure 4



CHAPITRE 4

Discussion, perspectives et conclusions

Le chapitre 4 représente la discussion des résultats présentés dans cette thèse, ainsi que l'élaboration de perspectives et de modèles afin de mieux comprendre la fonction de BMI1 dans le maintien et la radiorésistance des cellules souches cancéreuses du GBM.

Article 1 : BMI1 sustains Human Glioblastoma Multiforme stem cell renewal**BMI1 : un marqueur tumoral**

La protéine BMI1 appartenant à la famille des gènes Polycomb fut initialement identifiée comme une protéine oncogène [239, 240]. Cette protéine est essentielle au maintien des CSH et CSN normales mais également cancéreuses [237, 285, 287]. La surexpression de BMI1 a été observée au niveau de diverses tumeurs chez l'homme [288-290, 293, 491]. Le GBM est une tumeur du cerveau constitué d'une population minoritaire de CSC, soit des cellules CD133+ [147, 152, 492]. L'analyse de l'expression de BMI1 au niveau de plusieurs échantillons de GBM de patient, démontre dans tous les cas une forte expression de BMI1 au niveau de la tumeur. De plus, le patron d'expression de BMI1 permet de distinguer la démarcation entre le tissu sain et tumoral. L'expression de cette protéine PcG au niveau des astrocytes présents dans la tumeur confirme la transformation néoplasique, puisque normalement ces cellules n'expriment pas BMI1 chez l'homme [284]. Nos résultats démontrent également un enrichissement de BMI1 au niveau des cellules CD133+ comparativement aux cellules CD133-. Cependant, aucune amplification génique de *BMI1* n'a été observée à travers les divers échantillons analysés, ce qui suggère plutôt une régulation transcriptionnelle de BMI1. Au niveau du médulloblastome, la forte expression de BMI1 a été associée à l'activation de la voie SHH [137]. Il est connu que la voie SHH est activée dans les GBM [377], il serait donc intéressant, en perspective, d'évaluer l'activation de cette voie au niveau des cellules CD133+ par rapport aux cellules CD133-. Ainsi, l'oncogène BMI1 représente un marqueur de la tumorigénicité du GBM.

BMI1 est requis pour le maintien des cellules souches cancéreuses (CD133+) du GBM indépendamment du locus INK4A/ARF

L'oncogène BMI1 est essentiel au maintien et à la propagation de différents types de cancers [137, 139, 493]. *Lessard et al.* ont démontré l'importance de Bmi1 au niveau des CSC hématopoïétique. En outre, ils démontrent que la perte de Bmi1 dans les CSC hématopoïétique inhibe la capacité de ces cellules à former une leucémie secondaire chez la souris hôte [139]. Tout comme les CSC hématopoïétique, les cellules CD133+ du GBM sont responsables du maintien et de la croissance de la tumeur et elles sont également suffisantes à l'établissement d'une tumeur secondaire chez la souris [152]. L'expression préférentielle de BMI1 au niveau des cellules CD133+ mène à poser l'hypothèse que BMI1 serait essentiel au maintien des CSC du GBM et par conséquent à la progression de la tumeur.

Afin d'étudier la fonction de BMI1 au niveau des CSC du GBM, nous avons établi différentes lignées cellulaires primaires à partir d'échantillon tumoral de patients. Puisque les lignées cellulaires présentes sur le marché ne reflètent pas fidèlement la biologie de la tumeur d'origine, l'utilisation de lignées primaires est privilégiée dans notre étude [494]. À ce niveau un autre choix s'impose, soit le type de culture à considérer. Différentes études vantent les avantages de la culture sous forme de neurosphères, alors que d'autres préfèrent plutôt la culture adhérente. *Reynolds et al.* mettent en évidence les lacunes présentes dans une étude qui met de l'avant les avantages de la culture adhérente des CSC du GBM. Entre autre, il dénonce les bénéfices de cette méthode au niveau de l'efficacité de l'établissement de la culture. Effectivement, 100% des tumeurs isolées permettent l'établissement d'une culture sous forme de neurosphères, alors que seulement 2 tumeurs sur 6 peuvent être cultivées en condition adhérente [495]. Les conditions de cultures sous forme de neurosphères utilisées dans nos études permettent de conserver le caractère biologique des CSC du GBM. Entre autres, elles expriment toujours les marqueurs de cellules souches (CD133, SOX2, Musashi, LHX2 et Nestine), elles possèdent un potentiel de différenciation multipotent (donnent naissance à des neurones et astrocytes) et elles peuvent être

maintenues à travers une multitude de passages, elles sont donc capables d'auto-renouvellement. De plus, l'augmentation de la stringence des conditions de culture par l'utilisation de plaques à très faible adhérence nous a permis d'optimiser le nombre de cellules souches par cultures en comparaison aux plaques non-adhérentes.

Différentes études ont illustré l'importance de BMI1 au niveau du maintien des cellules souches neurales *via* la régulation du locus INK4A/ARF chez la souris. Cependant, l'ablation du locus INK4A/ARF au niveau des souris *Bmi1*^{-/-} ne permet pas de rétablir le phénotype afin qu'il soit comparable à une souris de type sauvage [239, 285, 286]. En outre, *Bruggeman et al.* ont démontré l'importance de *Bmi1* en absence du locus INK4A/ARF dans le développement d'un GBM chez la souris [367]. La perte du locus INK4A/ARF est observée dans plus de 50% des GBM chez l'homme et nos résultats démontrent une forte expression de BMI1 dans tous les échantillons analysés, ce qui suggèrent que la protéine BMI1 possède d'autres fonctions que la régulation de ce locus. Nos résultats suivent également la tendance, puisque indépendamment du statut du locus INK4A/ARF, la délétion de BMI1 au niveau des CSC du GBM mène à une diminution de la capacité de prolifération, à une répression des marqueurs de cellules souches et à une augmentation des niveaux de différenciation et d'apoptose. Bref, l'ablation de BMI1 mène à la perte de la population de CSC du GBM même en absence du locus INK4A/ARF.

BMI1 régule diverses voies moléculaires au niveau des CSC du GBM

La déplétion de BMI1 au niveau des CSC du GBM affecte plusieurs aspects caractéristiques aux cellules souches. Premièrement, les CSN possèdent une faible activité immunogéniques, c'est-à-dire qu'elles n'induisent pas ou très faiblement de réactions face au système immunitaire. Ce phénotype est en partit dû au fait que ces cellules n'expriment pas à leur surface les protéines codées par les gènes HLA, antigènes des leucocytes humain [496-498]. De plus, le caractère malin et invasif du GBM est également associé à cette propriété des CSN. Effectivement, diverses études ont pointé des défauts au niveau de l'expression des HLA, mais également au niveau des processus d'acheminement de ces protéines à la surface de la cellule [499, 500]. L'augmentation de l'expression de diverses

protéines de HLA de classe I et II est observée suite à la perte de BMI1 au niveau des CSC du GBM. Ces résultats suggèrent une fonction de BMI1 dans l'évasion des CSC du GBM face au système immunitaire. Cependant, nos observations ne permettent pas de conclure un rôle direct de BMI1 dans la régulation transcriptionnelle des gènes HLA. Des études d'immunoprécipitations et/ou des études fonctionnelles à l'aide de gènes rapporteurs (ex. essais Luciférase) seraient nécessaires afin de confirmer une régulation directe. De façon indirecte, BMI1 pourrait maintenir ce phénotype en favorisant l'inhibition des processus de différenciation.

Suite à la perte de BMI1, nous avons observé une dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans les processus de neurogénèse et gliogénèse. L'augmentation de ces transcrits corrèle avec l'induction de la différenciation en neurones et astrocytes observée au niveau des neurosphères de GBM où la protéine BMI1 a été déplétée. La perte d'expression de divers marqueurs de cellules souches (CD133, Musashi et LHX2) soutient également l'augmentation de la différenciation observée. Ces résultats supportent l'hypothèse où BMI1 est essentiel au maintien et à l'auto-renouvellement de la population de CSC du GBM. Au niveau des cellules ES, les protéines PcGs ont été associées à la répression de plusieurs gènes impliqués dans les voies de différenciations [215, 232]. BMI1 pourrait également jouer une fonction semblable au niveau des CSC du GBM *via* la régulation directe de divers processus spécifiques à la neurogénèse et la gliogénèse.

Afin de maintenir son potentiel d'auto-renouvellement, la cellule souche doit conserver son état indifférencié à travers une multitude de divisions cellulaires. La régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose par la protéine BMI1 est intimement liée à son action au niveau du locus INK4A/ARF [239]. Cependant, suite à la perte de BMI1, nous observons une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose, malgré l'absence du locus INK4A/ARF. Ce locus permet l'activation de deux voies majeures anti-tumorales : la voie P53 et la voie RB [287]. En outre, la perte du locus INK4A/ARF est observée dans 50% des tumeurs de GBM et la protéine P53 est mutée dans 35% des cas [327]. L'activité tumorigénique de BMI1 doit subséquemment être associée à d'autres niveaux dans la

régulation des voies anti-tumorales. Une récente méta-analyse a permis d'identifier 3 voies oncogéniques majeures altérées au niveau du GBM : les voies RAS/PI3K/AKT, ARF/MDM2/P53 et P16/P18/P15/RB [327]. Les aberrations présentes dans ces différentes voies prônent toutes la survie et la progression du cycle cellulaire. Suite à la déplétion de BMI1 au niveau des CSC du GBM *INK4A/ARF^{-/-}*, nous observons la dérégulation de plusieurs transcrits associés à ces 3 voies majeures. Tout

d'abord, plusieurs études pointent l'importance de la régulation de la protéine P21 par *Bmi1* au niveau des CSN [501, 502]. La protéine p21 régule négativement la progression du cycle cellulaire *via* l'inhibition des complexes cycline/kinase cycline-dépendante (Cdk2-CyclineE, Cdk2-CyclineA et Cdk1-Cycline B) et *via* l'activation de la voie RB en réprimant l'activité de CDK4/CDK6. Au niveau des CSN, P21 permet leur maintien en prévenant une prolifération excessive ce qui mène à leur épuisement. La cellule doit donc réguler de façon minutieuse l'expression de P21 afin de trouver le juste milieu entre l'arrêt et une activation exhaustive de la prolifération [503, 504]. Suite à la perte de BMI1, nous notons une augmentation du transcrit *P21* et nous démontrons également pour la première fois que BMI1 régule directement la transcription de la protéine P21 en se liant à son promoteur. La protéine P53 est le principal régulateur transcriptionnel positif de P21 et possède plusieurs sites d'interaction au niveau du promoteur de P21 [505]. Suite à une analyse minutieuse des sites d'interactions de BMI1 au niveau de la séquence promotrice de *P21*, nos résultats suggèrent que la liaison de BMI1 se fait à des sites d'instincts par rapport à ceux de P53. Les travaux de *Subkhankulova et al.* confirment également l'interaction directe de *Bmi1* au niveau du promoteur de *p21* chez la souris [506]. Ainsi, BMI1 permet l'intégration et la répression des 2 voies majeures anti-tumorales (P53 et RB) au niveau des CSC du GBM, non par la régulation du locus *INK4A/ARF*, mais plutôt par la régulation de P21 et favorise par conséquent le maintien de la prolifération et de l'état indifférencier de ces cellules.

Diverses études ont pointé que l'augmentation de l'expression de la protéine P18 mène à la compensation de la délétion de la protéine P16 du locus *INK4A/ARF* au niveau du GBM [507, 508]. Les protéines P16 et P18 bloquent la progression du cycle cellulaire en

favorisant l'activation de la voie RB. De plus, la co-délétion de P16 et P18 augmente le potentiel tumorigénique du GBM [508]. Nous observons une augmentation du transcrit de *P18*, suite à la délétion de BMI1 au niveau des CSC du GBM INK4A/ARF-/- . Ainsi, afin de maintenir les CSC du GBM dans le cycle cellulaire, BMI1 assure la répression de la voie RB de 3 façons, soit *via* la régulation des protéines P16, P18 et P21.

La voie PI3K/AKT promeut l'activité métabolique, la croissance et la survie des cellules ultimement *via* l'activation de la protéine mTOR. Cette voie moléculaire est fortement activée au niveau du GBM [329]. La protéine FoxoA3 est négativement régulée par la voie PI3K/AKT et favorise l'entrée en apoptose [509]. Nos résultats démontrent que l'expression de FoxoA3 est dérégulée subséquemment à la perte de BMI1 au niveau du GBM. En perspective, il serait intéressant de vérifier si BMI1 permet la répression directe de FoxoA3 et également de P18. BMI1 favorise donc la survie cellulaire *via* l'inhibition de l'activation de l'apoptose par la protéine FoxoA3, mais également *via* la répression de l'expression de P21.

En conclusion, BMI1 favorise le maintien de la survie, de l'état indifférencié, de la prolifération et par conséquent le maintien de l'auto-renouvellement de la population de CSC du GBM par l'intégration et la régulation de différentes voies moléculaires. L'oncogène BMI1 favorise également le potentiel tumorigénique et invasif de la tumeur par le contrôle de l'activité immunogénique.

BMI1 est essentiel à l'établissement d'une tumeur *in vivo*

Les résultats présentés ci-haut prouvent l'importance de BMI1 au niveau de la population de CSC du GBM. Cependant, cette dépendance des CSC envers BMI1 apporte une limitation importante pour les études *in vivo*, puisque les CSC sont essentielles à l'établissement et à la progression de la tumeur. Nous démontrons qu'une modification au niveau du mode de culture permet de surpasser cette limitation. Effectivement, l'augmentation de la densité cellulaire permet de renverser l'induction de l'apoptose et la perte des CSC du GBM, suite à la délétion de BMI1, à des niveaux comparable aux CSC de

GBM sauvages ou contrôles. L'augmentation de la densité cellulaire diminue probablement la strigence des conditions environnementales des cellules et ainsi permet la création d'un micro-environnement cellulaire favorisant la survie. De plus, ces conditions privilégient le contact cellule-cellule, qui peut également être associé à l'échange de signaux pro-survie.

Afin d'étudier l'importance de BMI1 dans l'établissement tumoral *in vivo*, nous avons opté pour le modèle de xéno greffe chez la souris immunodéficiente (NOD/SCID). Ce modèle va permettre d'étudier de façon reproductible et rapide la formation de tumeurs. L'injection de CSC de GBM sauvage ou contrôle au niveau du cerveau frontale de souris NOD/SCID permet la formation de tumeur et affecte la survie des souris environ 2 mois suivant la greffe. Les tumeurs formées sont phénotypiquement et génétiquement comparables aux tumeurs d'origines. Notre système permet donc la formation de tumeur chez la souris reflétant les propriétés de la tumeur d'origine du patient. Cependant, suite à la déplétion de BMI1 la présence de tumeur n'est pas décelable histologiquement, ce qui corrèle également avec la survie des souris à des niveaux comparables à la souris NOD/SCID sauvage.

Nos résultats démontrent que les cellules où BMI1 est déplété possèdent un haut niveau de caspase-3 activé comparativement aux cellules contrôles 10 jours suivant l'injection. L'activation de la caspase-3 reflète l'entrée en apoptose et par conséquent la mort cellulaire. L'induction de l'apoptose explique l'absence de tumeur observée suite à la perte de BMI1. De plus, la localisation des cellules déplétées pour BMI1 est restreinte au site d'injection, alors que les cellules contrôles sont beaucoup plus étendues, 10 jours suivant la greffe. Cette dernière observation pourrait également refléter une diminution des capacités invasives due, à titre d'exemple, à une augmentation de l'adhésion à la matrice extracellulaire. Une récente étude démontre que la perte de BMI1 au niveau des CSN mène à l'augmentation de l'adhésion cellulaire *via* l'induction du récepteur β 1-Intégrine [510]. Une seconde étude établit un lien direct entre l'augmentation de la β 1-Intégrine et l'activation de l'apoptose *via* l'induction de la voie ERK et NF κ B au niveau du Medulloblastome [511]. Ainsi l'induction de la β 1-Intégrine suite à la déplétion de BMI1 expliquerait l'augmentation de l'apoptose observé et la diminution de la propagation des

cellules injectées (Figure 1). L'activation de l'apoptose *via* la mitochondrie par ERK représente également un candidat important à l'induction alternative de l'apoptose, puisque la voie P53 est altérée dans plus de 85% des GBM [327]. Il serait donc intéressant, en perspective, d'examiner l'activation de la voie ERK et NF κ B, ainsi que les niveaux de la β 1-Intégrine. De plus, la création d'un système inductible permettant la déplétion stable de BMI1 suite à l'établissement de la tumeur permettrait de confirmer directement la nécessité de BMI1 dans la maintenance et la progression du GBM *in vivo*.

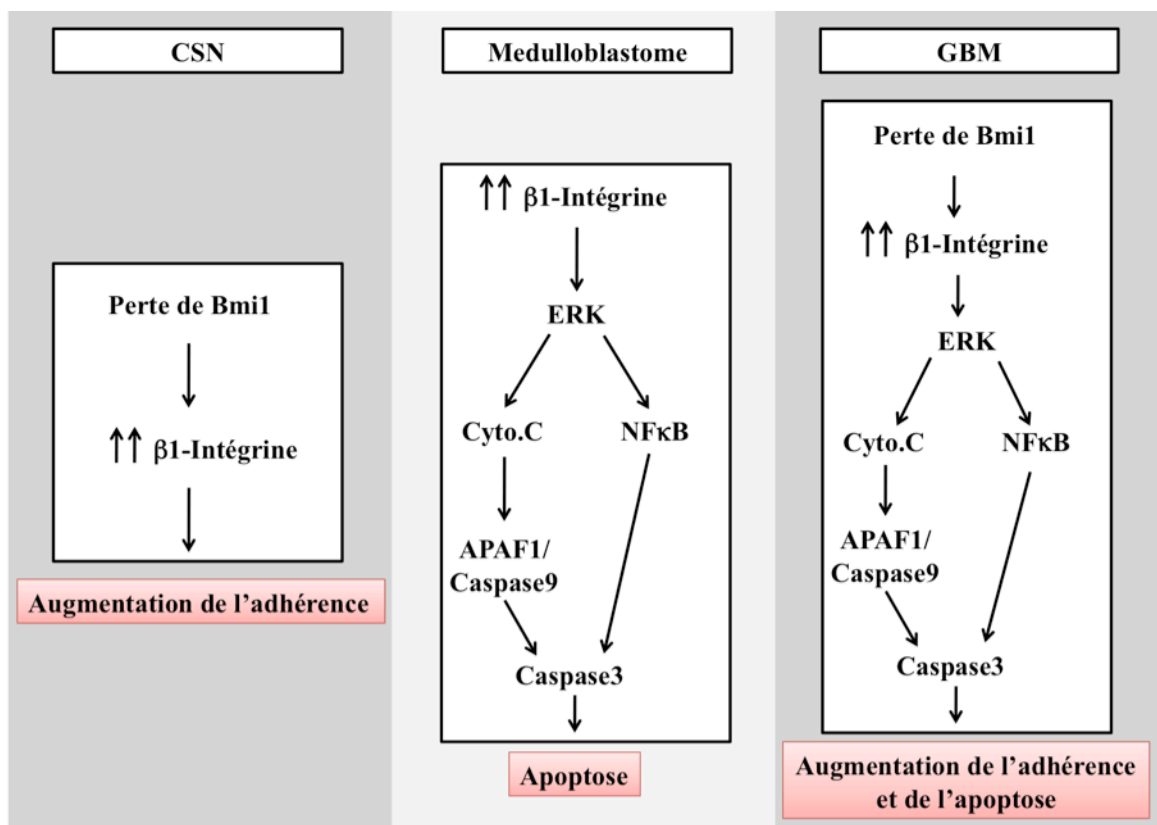


Figure 1 Modèle illustrant l'importance de BMI1 *in vivo* dans le GBM par l'intégration des modèles de Bruggeman *et al.* au niveau des CSN et de Bhoopathi *et al.* chez le Medulloblastome [510, 511].

En conclusion, les résultats de ce premier article illustrent l'importance de BMI1 dans le maintien de la population des CSC du GBM autant *in vitro* que *in vivo*. Cette étude met également à jour des nouvelles fonctions et cibles transcriptionnelles de BMI1. Elle ouvre également un nouvel horizon dans le développement de thérapies contre le GBM. Effectivement, nous démontrons que BMI1 représente un candidat potentiel de choix dans le but d'éradiquer les cellules responsables de l'initiation, du développement et de la progression de la tumeur, soit les CSC (Figure 2).

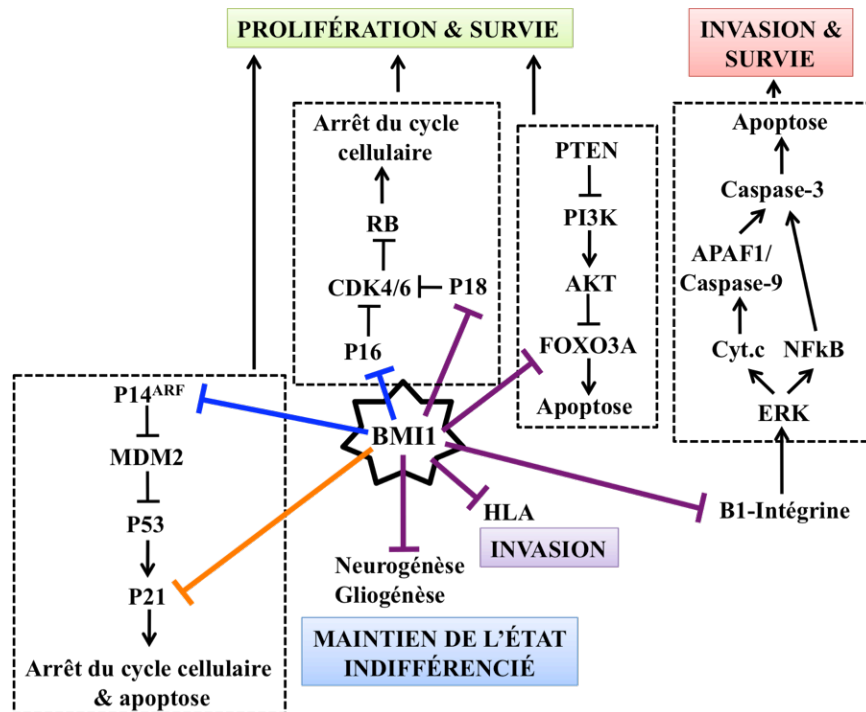


Figure 2 Modèle représentant la régulation de différentes voies par BMI1 afin d'assurer le maintien et le potentiel tumorigénique des CSC du GBM. En bleu : les voies connues régulées par BMI1. En orange : nouvelle cible régulée par BMI1. En mauve : les cibles potentielles de BMI1.

Article 2 : BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery

GBM et la radiorésistance

Le GBM est une tumeur du cerveau incurable chez l'adulte. Outre les limitations au point de vue chirurgical, le GBM est résistant face aux traitements de radiothérapies. La population de CSC du GBM, les cellules CD133+, est responsable de la radiorésistance et par conséquent de la récurrence et la progression de la tumeur. Suite aux traitements d'irradiation, un enrichissement des cellules CD133+ est observé au niveau de la tumeur. Ces cellules exercent leur résistance face aux radiations γ *via* une activation préférentielle de la machinerie de réponse aux bris doubles brins (BDB) de l'ADN [368]. Les mécanismes entourant l'activation préférentielle de la reconnaissance et la réparation des dommages au niveau de cellules CD133+ du GBM restent encore inconnus. L'enrichissement de BMI1 dans ces cellules et l'implication de certains PcG dans la réparation de l'ADN mènent à poser l'hypothèse que BMI1 est impliqué dans la radiorésistance des cellules CD133+ face à la radiation γ .

BMI1: un nouveau partenaire impliqué dans la réponse face aux BDB de l'ADN

Les cellules CD133+ active rapidement la machinerie de reconnaissance des dommages à l'ADN suite aux traitements de radiation γ comparativement aux cellules CD133-. L'apparition plus précoce de la première marque de reconnaissance d'un dommage, γ H2AX, au niveau des cellules CD133+ témoignent de cette activation plus efficace. Cependant, la perte de BMI1 au niveau des cellules CD133+ altère l'efficacité de la reconnaissance, où une diminution de 4 fois des cellules positives pour la marque γ H2AX est observée. Une diminution comparable est également présente pour la protéine Chk2 activée (pChk2), un effecteur de la voie de reconnaissance du BDB de l'ADN. Nos résultats

suggèrent l'implication de BMI1 dans la réponse aux dommages à l'ADN.

Suite à un BDB à l'ADN, les protéines impliquées dans la reconnaissance du dommage à l'ADN (DDR) forment des foyers aux bris. Normalement, BMI1 est présent au niveau de foyers discrets dans le noyau, *PcG bodies*. Cependant, suivant l'induction de dommages par radiation γ , BMI1 est rapidement relocalisé et forme des foyers semblables aux protéines du DDR. L'augmentation de l'intensité de BMI1 observée après l'irradiation pourrait être associée à une augmentation des niveaux protéiques de BMI1 due à une induction de sa stabilité ou sa transcription. Or, nous n'observons aucune augmentation du niveau protéique de BMI1 suite à l'irradiation. Néanmoins, la fraction de BMI1 liée à la chromatine est accrue après l'irradiation. Ces résultats confirment une redistribution de la protéine BMI1 suite à l'induction de BDB. Normalement, la distribution de BMI1 est régulée à travers le cycle cellulaire par l'induction de modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation. Ainsi, la forme hypo-phosphorylée de BMI1 est associée à la chromatine, alors que la phosphorylation induit sa dissociation [243]. En perspective, il serait important d'analyser la présence de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, acétylation, etc.) avant et après l'irradiation, afin de mieux comprendre les mécanismes entourant son recrutement.

Le mécanisme de reconnaissance du BDB de l'ADN s'effectue en plusieurs vagues précises de recrutement des différentes protéines du DDR et résulte en la formation d'un imposant complexe. Le complexe MRN (Mre11, Rad50 et NBS1) et la protéine ATM sont les premiers acteurs de la vague de recrutement et sont essentielles à l'incorporation des protéines subséquentes [419]. Nos résultats démontrent que le recrutement de BMI1 est indépendant de la présence d'ATM, du complexe MRN et également de la présence de MDC1, une protéine en amont d'ATM et MRN. BMI1 est donc essentiel à la reconnaissance du dommage et sa relocalisation est indépendante des protéines présentes dans les étapes primaires du DDR.

BMI1 est requis dans le mécanisme de reconnaissance des BDB de l'ADN

Les différentes protéines du DDR co-localisent et forment des foci aux sites de bris, suite à l'induction d'un dommage. Nos résultats démontrent non seulement une redistribution de BMI1 au niveau de la chromatine après des traitements de radiations, mais également une co-localisation avec diverses protéines du DDR aux sites de dommages. BMI1 semble donc être impliqué dans la voie DDR. L'altération des différentes protéines du DDR mènent inévitablement à des défauts au niveau de la reconnaissance du dommage et subséquemment affectent la réparation du bris. Des mutations au niveau des protéines primaires du DDR, tel le complexe MRN ou ATM, affectent le recrutement de toutes les protéines qui les succèdent. Nos résultats montrent que la perte de BMI1 mène à un défaut de recrutement des différentes protéines du DDR (de ATM à 53BP1). Ces défauts observés au niveau du DDR se traduisent par une diminution prononcée de la résorption dans le temps des foci γ H2AX, donc un défaut de réparation du dommage est observé au niveau des CSC du GBM, mais également au niveau de MEF *Bmi1*^{-/-}. BMI1 est par conséquent important dans la vague de recrutement des protéines du DDR aux bris. Nous observons également, par des études de co-immunoprécipitation, une interaction entre BMI1 et pATM. Cependant, la technique utilisée ne permet pas de conclure la présence d'une interaction directe. L'utilisation d'un essai d'interaction *in vitro* à partir de protéines purifiées permettrait de confirmer la présence d'une interaction directe.

Au contraire, la surexpression de BMI1 au niveau des CSN humaines normales augmente le recrutement des différentes protéines du DDR et favorise la résolution des foci γ H2AX. Toutes ces observations suggèrent que l'implication de BMI1 au niveau du mécanisme de reconnaissance des BDB est essentielle et qu'il jouerait le rôle d'une plateforme de recrutement pour les différentes protéines du DDR au niveau du dommage. Ainsi, l'enrichissement de BMI1 au niveau des cellules CD133⁺ expliquerait le recrutement préférentiel des protéines du DDR dans ces cellules en comparaison aux cellules CD133⁻, puisque le niveau protéique total des protéines du DDR ne diffère pas entre ces populations cellulaires [368].

BMI1 procure une radiorésistance indépendamment de P53

Les cellules CD133+ sont radiorésistantes, car elles activent fortement les mécanismes de reconnaissance et de réparation des BDB de l'ADN. Nous avons démontré que BMI1 est essentiel au maintien et à la survie des cellules souches cancéreuses. Afin d'étudier l'effet de BMI1 au niveau de la radiorésistance et par conséquent au niveau de la survie des cellules CD133+, nous avons diminué de 50% les niveaux protéiques de BMI1 ce qui n'affecte en aucun cas la survie de ces cellules. Cette perte de BMI1 sensibilise les cellules et affecte leurs survies lorsqu'elles sont exposées à des doses croissantes d'irradiation γ . À l'inverse, la surexpression de BMI1 augmente la survie des CSN face à des doses accrues d'irradiation γ et elle est couplée à une diminution des niveaux d'apoptose comparativement aux cellules contrôle. Nos résultats démontrent que BMI1 procure une radiorésistance aux cellules souches neurales et cancéreuses en favorisant le recrutement de protéines impliquées dans la reconnaissance des BDB de l'ADN.

Alajev N.M. et al. ont démontré que BMI1 favorise la radiorésistance et la survie principalement par l'inhibition de P53 *via* le locus INK4A/ARF au niveau d'un modèle de cancer nasopharyngéale. Ainsi, leurs observations démontrent que la perte de P53 couplée à la perte de BMI1 permet de renverser le phénotype des cellules BMI1^{-/-}, où les cellules meurent par apoptose [296]. La voie P53 menant à l'apoptose est cependant altérée dans plus de 87% des GBM et la protéine P53 est également mutée dans 35% des cas [327]. De plus, 2 tumeurs sur 3 utilisées dans nos études présentent une délétion du locus INK4A/ARF. Ces données suggèrent que l'atteinte de la survie des cellules CD133+ du GBM, suite à la perte de BMI1 et aux traitements d'irradiation, n'est pas due à l'activation de l'apoptose *via* la voie P53. Tout comme au niveau du GBM, la perte de BMI1 dans les CSN humaines affecte leurs survies et mène à l'augmentation des niveaux d'apoptose suite aux traitements d'irradiation γ . Cependant, la perte de P53 dans ces cellules ne permet pas de renverser le phénotype, ainsi des hauts niveaux d'apoptose sont toujours observés. BMI1 favorise donc la radiorésistance indépendamment de sa fonction au niveau de la voie apoptotique P53-dépendante. Les défauts au niveau de la reconnaissance des BDB suite à la

perte de BMI1 mènent à l'altération subséquente de la réparation. L'accumulation de dommages dans le temps peut provoquer une instabilité génomique qui, ultimement, peut induire la mort cellulaire. De plus, la diminution du nombre de cellules positives pour pChk2 en absence de BMI1 suggère un défaut probable au niveau de l'arrêt de la progression du cycle cellulaire. Ainsi suite à l'induction de BDB, la cellule arrête sa progression à travers le cycle cellulaire afin de réparer les dommages. Au contraire, les cellules déficientes pour un gène impliqué dans la reconnaissance des dommages à l'ADN progressent à travers le cycle cellulaire et entrent en mitose indépendamment de la présence de bris [512, 513]. Suite à l'induction de dommages, les CSC du GBM s'accumulent en phase G2/M et rétablissent leur progression dans le cycle cellulaire après 16 heures. Cependant, aucune accumulation n'est observée au niveau des cellules déficientes pour BMI1, ce qui indique un défaut au niveau des *checkpoints*. L'entrée en mitose en présence de BDB peut mener à une catastrophe mitotique et ainsi induire également l'apoptose.

BMI1 : une double fonction dans les dommages à l'ADN

La protéine BLM est une hélicase essentielle à la réparation des BDB de l'ADN *via* la recombinaison homologue. Cependant, cette protéine est rapidement recrutée au site du dommage et ce indépendamment des autres protéines du DDR. Son recrutement est également indépendamment de son activité hélicase. Sa présence avant l'activation de la réparation favoriserait subséquemment la recombinaison homologue au détriment de la réparation par le NHEJ [514]. Tout comme BLM, la protéine BMI1 semble également avoir une double fonction. Premièrement, elle est rapidement recruté suite à l'induction d'un dommage et favorise le recrutement des autres protéines du DDR. Deuxièmement, nos résultats démontrent également une interaction préférentielle entre BMI1 et différentes protéines du mécanisme de réparation NHEJ (DNA-PKc, Ku80 et PARP1). Ainsi BMI1 favoriserait la reconnaissance des bris et par la suite la réparation de l'ADN *via* la voie NHEJ.

Rôle de BMI1 dans le dommage à l'ADN : les modèles

1) Recrutement de BMI1 suite à l'induction d'un dommage

Suite à l'induction de dommages au niveau de l'ADN, BMI1 est rapidement recruté au niveau de la chromatine et forme des foci au site du bris, mais le mécanisme par lequel il est recruté reste à déterminer. Afin de répondre à cette question, quatre modèles sont proposés. Le premier modèle suggère la présence d'une protéine (x) au niveau du BDB qui favoriserait le recrutement de BMI1. Puisque les protéines DNMT1 et DMAP1 peuvent former un complexe avec BMI1 et que suite à un BDB, ces protéines sont rapidement recrutées au niveau du dommage, elles pourraient par conséquent faciliter la liaison de BMI1 aux bris [209, 515, 516]. Nos résultats suggèrent également une interaction entre BMI1 et la protéine PARP1, une protéine rapidement recrutée au niveau du dommage [517, 518]. Toutes ces protéines représentent des candidats potentiels pouvant recruter BMI1 au niveau d'un BDB de l'ADN (Figure 3a).

Les protéines primaires du DDR (ATM et le complexe MRN) et plusieurs autres protéines (DNA-PKc, PARP1, etc.) possèdent une affinité pour les extrémités de l'ADN double brin « nues », c'est-à-dire qui ne sont pas protégées par la structure du télomère, telles les cassures doubles brins. Ces protéines sont rapidement recrutées au niveau du bris indépendamment de la séquence d'ADN du brin. L'oncogène BMI1 pourrait à son tour posséder une affinité pour l'ADN double brin « nu », ce qui expliquerait son recrutement rapide aux lésions (Figure 3b).

L'induction d'un BDB provoque des changements locaux au niveau de la dynamique de la chromatine. Les changements de la structure de la chromatine pourraient permettre l'exposition de sites reconnus par BMI1 et ainsi favoriser son recrutement (Figure 3c). Outre les modifications structurelles directement associées à la chromatine, plusieurs protéines interagissant avec la chromatine voient également leurs interactions avec celle-ci modifiées. À titre d'exemple, la protéine HP1 est libérée de la chromatine suite à l'induction d'un bris. Cette protéine est associée à l'hétérochromatine et interagit plus spécifiquement avec l'histone H3 au niveau de la lysine 9 méthylée (H3K9me) [519]. Or, le complexe PRC1, dont fait parti BMI1, a également été associé à la marque H3K9me

[520]. Ainsi, la mobilisation de HP1 au dommage favoriserait le recrutement de BMI1 au niveau de l'histone H3K9me (Figure 3d).

2) BMI1 et le recrutement des protéines du DDR

Suite à la surexpression de BMI1, une amplification de l'hétérochromatine périphérique est observée et une augmentation de la localisation d'ATM au niveau de l'hétérochromatine est également notée. Ces résultats suggèrent une implication de BMI1 dans le recrutement d'ATM au niveau de l'hétérochromatine. Une récente étude a démontré que la protéine ATM est spécifiquement requise au niveau de l'hétérochromatine en réponse au dommage à l'ADN [521]. Or, la grande taille de la protéine ATM (~350 kDa) représente un obstacle dans le but d'atteindre le site de cassure au niveau de régions hautement compactées de l'ADN, l'hétérochromatine. BMI1 étant une petite protéine présente au niveau de l'hétérochromatine pourrait par conséquent favoriser l'acheminement d'ATM au site de cassure. En second lieu, indépendamment de l'état de compaction de la chromatine, nos résultats suggèrent que le recrutement des protéines du DDR est régulé par BMI1 de façon dose-dépendante. De manière générale, BMI1 semble agir comme une plate-forme de recrutement pour les protéines du DDR. Cependant, le recrutement de la protéine RNF8, une E3 ubiquitine ligase, se voit altéré suite à la surexpression de BMI1 au niveau des CSN. L'ubiquitination de γ H2AX par RNF8 est une étape indispensable pour l'amplification du signal et ainsi le recrutement des protéines effectrices. Or, malgré la perte de RNF8, le recrutement des protéines subséquentes n'est pas affecté (données non publiées). Ces observations suggèrent la présence d'un mécanisme d'ubiquitination alternatif. Les études d'immunoprécipitation démontrent que l'interaction entre BMI1 et la protéine RNF2 persiste après l'induction de dommages à l'ADN. Ainsi la présence de la E3 ubiquitine ligase, RNF2, couplée à BMI1 au niveau des lésions pourrait favoriser l'ubiquitination de γ H2AX se qui expliquerait la perte de la dépendance envers RNF8.

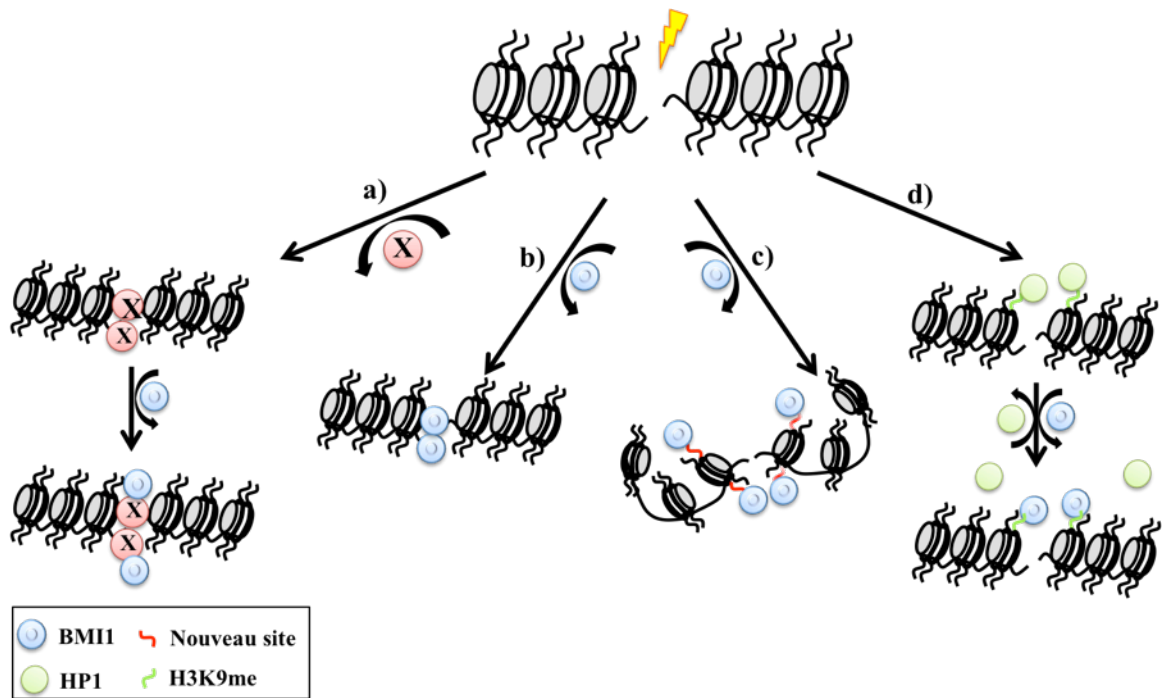


Figure 3 Modèles représentant différents modes de recrutements hypothétiques de BMI1 suite à l'induction d'un BDB de l'ADN.

En conclusion, ce deuxième article met en évidence une nouvelle fonction de la protéine BMI1, soit son implication dans les mécanismes de reconnaissance et de réparation des BDB de l'ADN au niveau des cellules souches neurales humaines normales et cancéreuses. Cette étude démontre non seulement une nouvelle fonction de BMI1, mais lui attribue pour la première fois une fonction qui est indépendante de son activité transcriptionnelle. L'oncogène BMI1 représente une cible thérapeutique de choix contre le GBM, puisque les CSC présentes dans la tumeur dépendent de ce dernier afin d'assurer leur résistance face à la radiothérapie. Ainsi, la réduction du niveau de BMI1 dans les GBM couplée à la radiothérapie permettrait d'éradiquer les cellules responsables de la maintenance de la tumeur.

Conclusion globale

En résumé, les résultats présentés dans cette thèse illustre l'importance que possède BMI1 au niveau des cellules souches cancéreuses du GBM. D'une part, nous démontrons

que BMI1 est essentiel à la maintenance et à la survie des CSC du GBM *via* la répression de différentes voies moléculaires anti-tumorales. D'autre part, nos observations mettent en évidence l'implication de BMI1 au niveau de la reconnaissance et la réparation de l'ADN. Ainsi, BMI1 représente un oncogène de choix au niveau du GBM, puisqu'il assure le maintien, la survie, la progression et la radiorésistance de la population de CSC présentes dans la tumeur. Nos observations ont mené à une meilleure compréhension de la biologie du GBM, ce qui pourrait ultimement favoriser le développement de thérapies plus spécifiques contre cette agressive tumeur.

Les résultats présentés dans cette thèse encouragent fortement l'élaboration de moyens thérapeutiques futurs afin de cibler cette oncogène au niveau du GBM. Successivement à notre publication, une récente étude dirigée par le groupe du Dr Hendzel confirme également l'importance de la protéine BMI1 au niveau des mécanismes de reconnaissance et de réparation des dommages au niveau de l'ADN [522]. Les auteurs associent l'importance de BMI1 à son domaine RING qui permet le recrutement de BMI1 au dommage, mais également qui favorise l'interaction et l'activité E3-ubiquitine ligase de la protéine RING2 (RNF2). Ainsi BMI1 permet la mono-ubiquitination de γ H2AX via son interaction avec la protéine RNF2 et le recrutement subséquent des protéines du DDR. Les auteurs démontrent également que la fonction de BMI1 au bris est indépendantes de l'activité du complexe Polycomb PRC2 [522]. Par conséquent, il semble logique de cibler l'interaction et/ou l'activité de BMI1-RNF2 dans la poursuite du développement thérapeutique contre le GBM. Parmi les inhibiteurs possibles, les petites molécules de la famille des Indan-1,3-diones représentent des candidats de choix. Effectivement, une récente étude a démontré que l'utilisation de quatre composés différents de cette famille permettait d'inhiber l'activité E3-ubiquitine ligase du complexe BMI1-RNF2 au niveau de l'ubiquitination de la protéine Top2 α [523]. En perspective, il serait intéressant d'exploiter cette famille de petites molécules afin d'évaluer leur activité inhibitrice potentiel au niveau de la protéine BMI1 dans le GBM.

Références

1. Bear, M.F., *Neurosciences: Exploring the brain*. third édition ed. 2007, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
2. Hooiveld, M.H., et al., *Novel interactions between vertebrate Hox genes*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(7): p. 665-74.
3. Stern, C.D., et al., *Head-tail patterning of the vertebrate embryo: one, two or many unresolved problems?* Int J Dev Biol, 2006. **50**(1): p. 3-15.
4. 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.
5. Wittler, L. and M. Kessel, *The acquisition of neural fate in the chick*. Mech Dev, 2004. **121**(9): p. 1031-42.
6. Keller, R., et al., *Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of Xenopus*. Dev Dyn, 1992. **193**(3): p. 218-34.
7. Smith, J.L. and G.C. Schoenwolf, *Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation*. J Exp Zool, 1989. **250**(1): p. 49-62.
8. Smith, J.L. and G.C. Schoenwolf, *Neurulation: coming to closure*. Trends Neurosci, 1997. **20**(11): p. 510-7.
9. Voiculescu, O., et al., *The amniote primitive streak is defined by epithelial cell intercalation before gastrulation*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1049-52.
10. Colas, J.F. and G.C. Schoenwolf, *Towards a cellular and molecular understanding of neurulation*. Dev Dyn, 2001. **221**(2): p. 117-45.
11. Martinez, S. and L. Puelles, *Neurogenetic compartments of the mouse diencephalon and some characteristic gene expression patterns*. Results Probl Cell Differ, 2000. **30**: p. 91-106.
12. Pombero, A. and S. Martinez, *Telencephalic morphogenesis during the process of neurulation: an experimental study using quail-chick chimeras*. J Comp Neurol, 2009. **512**(6): p. 784-97.
13. Vieira, C., et al., *Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(1): p. 7-20.

14. Golgi, C., *Sulla struttura della sostanza grigia del cervello*. Gazzetta Medica Italiana (Lombardia), 1873. **33**: p. 244-246.
15. Ramón y Cajal, S., *Die Retina der Wirbelthiere*, ed. Bergmann. 1894.
16. Ramón y Cajal, S., *Comparative study of the sensory areas of the human cortex*. 1899.
17. Ramón y Cajal, S., *Die Structur des Chiasma Opticum: nebst einer allgemeinen Theorie der Kreuzung der Nervenbahnen*, ed. H.A. Barth. 1899.
18. Ramon, Y.C.S., *Structure and connections of neurons*. Bull Los Angel Neuro Soc, 1952. **17**(1-2): p. 5-46.
19. Powell, E.M. and H.M. Geller, *Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension*. *Glia*, 1999. **26**(1): p. 73-83.
20. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(1): p. 41-53.
21. Araya, R., et al., *BMP signaling through BMPRIA in astrocytes is essential for proper cerebral angiogenesis and formation of the blood-brain-barrier*. *Mol Cell Neurosci*, 2008. **38**(3): p. 417-30.
22. Gordon, G.R., S.J. Mulligan, and B.A. MacVicar, *Astrocyte control of the cerebrovasculature*. *Glia*, 2007. **55**(12): p. 1214-21.
23. Iadecola, C. and M. Nedergaard, *Glial regulation of the cerebral microvasculature*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(11): p. 1369-76.
24. Araque, A., et al., *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner*. *Trends Neurosci*, 1999. **22**(5): p. 208-15.
25. Perea, G., M. Navarrete, and A. Araque, *Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information*. *Trends Neurosci*, 2009. **32**(8): p. 421-31.
26. Brown, A.M. and B.R. Ransom, *Astrocyte glycogen and brain energy metabolism*. *Glia*, 2007. **55**(12): p. 1263-71.
27. Obara, M., M. Szeliga, and J. Albrecht, *Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses*. *Neurochem Int*, 2008. **52**(6): p. 905-19.
28. Sattler, R. and J.D. Rothstein, *Regulation and dysregulation of glutamate transporters*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(175): p. 277-303.

29. Seifert, G., K. Schilling, and C. Steinhauser, *Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(3): p. 194-206.
30. Simard, M. and M. Nedergaard, *The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 877-96.
31. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.
32. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 675-99.
33. 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.
34. McKay, R., *Stem cells--hype and hope*. Nature, 2000. **406**(6794): p. 361-4.
35. 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.
36. Temple, S., *The development of neural stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 112-7.
37. Gotz, M. and W.B. Huttner, *The cell biology of neurogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 777-88.
38. Conti, L. and E. Cattaneo, *Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities?* Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(3): p. 176-87.
39. Pevny, L.H., et al., *A role for SOX1 in neural determination*. Development, 1998. **125**(10): p. 1967-78.
40. Tropepe, V., et al., *Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism*. Neuron, 2001. **30**(1): p. 65-78.
41. Smukler, S.R., et al., *Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences*. J Cell Biol, 2006. **172**(1): p. 79-90.
42. Chambers, S.M., et al., *Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 275-80.
43. Elkabetz, Y., et al., *Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage*. Genes Dev, 2008. **22**(2): p. 152-65.

44. Weigmann, A., et al., *Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12425-30.
45. Hartfuss, E., et al., *Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia*. Dev Biol, 2001. **229**(1): p. 15-30.
46. Campbell, K. and M. Gotz, *Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development*. Trends Neurosci, 2002. **25**(5): p. 235-8.
47. Gotz, M., *Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells*. Neuroscientist, 2003. **9**(5): p. 379-97.
48. Malatesta, P., E. Hartfuss, and M. Gotz, *Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage*. Development, 2000. **127**(24): p. 5253-63.
49. Kriegstein, A.R. and M. Gotz, *Radial glia diversity: a matter of cell fate*. Glia, 2003. **43**(1): p. 37-43.
50. Pinto, L., et al., *Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes--lineage and transcriptome analysis*. Mol Cell Neurosci, 2008. **38**(1): p. 15-42.
51. Li, H., et al., *Spatiotemporal heterogeneity of CNS radial glial cells and their transition to restricted precursors*. Dev Biol, 2004. **271**(2): p. 225-38.
52. Malatesta, P., et al., *Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate*. Neuron, 2003. **37**(5): p. 751-64.
53. Noctor, S.C., et al., *Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases*. Nat Neurosci, 2004. **7**(2): p. 136-44.
54. Conti, L., et al., *Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell*. PLoS Biol, 2005. **3**(9): p. e283.
55. Bibel, M., et al., *Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1034-43.
56. Nat, R., et al., *Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures*. Glia, 2007. **55**(4): p. 385-99.

57. Haubensak, W., et al., *Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3196-201.
58. Miyata, T., et al., *Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells*. Development, 2004. **131**(13): p. 3133-45.
59. Englund, C., et al., *Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex*. J Neurosci, 2005. **25**(1): p. 247-51.
60. Sessa, A., et al., *Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex*. Neuron, 2008. **60**(1): p. 56-69.
61. Nieto, M., et al., *Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex*. J Comp Neurol, 2004. **479**(2): p. 168-80.
62. Zimmer, C., et al., *Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons*. Cereb Cortex, 2004. **14**(12): p. 1408-20.
63. Attardo, A., et al., *Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2388.
64. Gage, F.H., *Neurogenesis in the adult brain*. J Neurosci, 2002. **22**(3): p. 612-3.
65. Alvarez-Buylla, A. and D.A. Lim, *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. Neuron, 2004. **41**(5): p. 683-6.
66. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell, 1999. **97**(6): p. 703-16.
67. Belluzzi, O., et al., *Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb*. J Neurosci, 2003. **23**(32): p. 10411-8.
68. Carleton, A., et al., *Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb*. Nat Neurosci, 2003. **6**(5): p. 507-18.
69. Lois, C. and A. Alvarez-Buylla, *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. Science, 1994. **264**(5162): p. 1145-8.

70. Morshead, C.M., et al., *The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(1): p. 76-84.
71. Shen, Q., et al., *Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 289-300.
72. Doetsch, F., et al., *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells*. Neuron, 2002. **36**(6): p. 1021-34.
73. Liu, H.K., et al., *The nuclear receptor tailless is required for neurogenesis in the adult subventricular zone*. Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2473-8.
74. Shors, T.J., et al., *Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning*. Hippocampus, 2002. **12**(5): p. 578-84.
75. Shors, T.J., et al., *Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories*. Nature, 2001. **410**(6826): p. 372-6.
76. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.
77. Cameron, H.A., et al., *Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat*. Neuroscience, 1993. **56**(2): p. 337-44.
78. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J Comp Neurol, 2000. **425**(4): p. 479-94.
79. Filippov, V., et al., *Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes*. Mol Cell Neurosci, 2003. **23**(3): p. 373-82.
80. Fukuda, S., et al., *Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus*. J Neurosci, 2003. **23**(28): p. 9357-66.
81. Seri, B., et al., *Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus*. J Comp Neurol, 2004. **478**(4): p. 359-78.
82. Steiner, B., et al., *Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis*. Glia, 2006. **54**(8): p. 805-14.
83. Gould, E., et al., *Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus*. J Neurosci, 1992. **12**(9): p. 3642-50.

84. Gould, E., H.A. Cameron, and B.S. McEwen, *Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus*. J Comp Neurol, 1994. **340**(4): p. 551-65.
85. Kempermann, G., H.G. Kuhn, and F.H. Gage, *Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus*. J Neurosci, 1998. **18**(9): p. 3206-12.
86. Monje, M.L., H. Toda, and T.D. Palmer, *Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1760-5.
87. Santarelli, L., et al., *Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants*. Science, 2003. **301**(5634): p. 805-9.
88. 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.
89. Morrison, S.J., et al., *Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells*. Cell, 2000. **101**(5): p. 499-510.
90. Tanigaki, K., et al., *Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate*. Neuron, 2001. **29**(1): p. 45-55.
91. Mizutani, K., et al., *Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors*. Nature, 2007. **449**(7160): p. 351-5.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Petersen, P.H., et al., *Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis*. Nature, 2002. **419**(6910): p. 929-34.
96. Machon, O., et al., *Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium*. Neuroscience, 2003. **122**(1): p. 129-43.

97. 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.
98. Lie, D.C., et al., *Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1370-5.
99. Woodhead, G.J., et al., *Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation*. J Neurosci, 2006. **26**(48): p. 12620-30.
100. Chenn, A. and C.A. Walsh, *Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors*. Science, 2002. **297**(5580): p. 365-9.
101. Lee, H.Y., et al., *Instructive role of Wnt/beta-catenin in sensory fate specification in neural crest stem cells*. Science, 2004. **303**(5660): p. 1020-3.
102. Lai, K., et al., *Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo*. Nat Neurosci, 2003. **6**(1): p. 21-7.
103. Machold, R., et al., *Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 937-50.
104. 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.
105. Shi, Y., et al., *Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells*. Nature, 2004. **427**(6969): p. 78-83.
106. Horlein, A.J., et al., *Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 397-404.
107. Hermanson, O., K. Jepsen, and M.G. Rosenfeld, *N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes*. Nature, 2002. **419**(6910): p. 934-9.
108. Avilion, A.A., et al., *Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function*. Genes Dev, 2003. **17**(1): p. 126-40.
109. Graham, V., et al., *SOX2 functions to maintain neural progenitor identity*. Neuron, 2003. **39**(5): p. 749-65.
110. Kim, J., et al., *SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells*. Neuron, 2003. **38**(1): p. 17-31.

111. Kan, L., et al., *Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis*. Dev Biol, 2004. **269**(2): p. 580-94.
112. Laywell, E.D., V.G. Kukekov, and D.A. Steindler, *Multipotent neurospheres can be derived from forebrain subependymal zone and spinal cord of adult mice after protracted postmortem intervals*. Exp Neurol, 1999. **156**(2): p. 430-3.
113. 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.
114. Singec, I., et al., *Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology*. Nat Methods, 2006. **3**(10): p. 801-6.
115. Johe, K.K., et al., *Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system*. Genes Dev, 1996. **10**(24): p. 3129-40.
116. Dictus, C., et al., *Comparative analysis of in vitro conditions for rat adult neural progenitor cells*. J Neurosci Methods, 2007. **161**(2): p. 250-8.
117. 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.
118. Gritti, A., R. Galli, and A.L. Vescovi, *Clonal analyses and cryopreservation of neural stem cell cultures*. Methods Mol Biol, 2008. **438**: p. 173-84.
119. Sun, Y., et al., *Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture*. Mol Cell Neurosci, 2008. **38**(2): p. 245-58.
120. Jessberger, S., G.D. Clemenson, Jr., and F.H. Gage, *Spontaneous fusion and nonclonal growth of adult neural stem cells*. Stem Cells, 2007. **25**(4): p. 871-4.
121. Mori, H., et al., *Observational examination of aggregation and migration during early phase of neurosphere culture of mouse neural stem cells*. J Biosci Bioeng, 2007. **104**(3): p. 231-4.
122. Smith, R., V. Bagga, and R.A. Fricker-Gates, *Embryonic neural progenitor cells: the effects of species, region, and culture conditions on long-term proliferation and neuronal differentiation*. J Hematother Stem Cell Res, 2003. **12**(6): p. 713-25.
123. Feroni, C., et al., *Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo*. Cancer Res, 2007. **67**(8): p. 3725-33.

124. Goffredo, D., et al., *Setting the conditions for efficient, robust and reproducible generation of functionally active neurons from adult subventricular zone-derived neural stem cells*. Cell Death Differ, 2008. **15**(12): p. 1847-56.
125. Delaunay, D., et al., *Early neuronal and glial fate restriction of embryonic neural stem cells*. J Neurosci, 2008. **28**(10): p. 2551-62.
126. Pinto, L. and M. Gotz, *Radial glial cell heterogeneity--the source of diverse progeny in the CNS*. Prog Neurobiol, 2007. **83**(1): p. 2-23.
127. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
128. Park, C.H., D.E. Bergsagel, and E.A. McCulloch, *Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay*. J Natl Cancer Inst, 1971. **46**(2): p. 411-22.
129. Bruce, W.R. and H. Van Der Gaag, *A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo*. Nature, 1963. **199**: p. 79-80.
130. Hamburger, A.W. and S.E. Salmon, *Primary bioassay of human tumor stem cells*. Science, 1977. **197**(4302): p. 461-3.
131. Fialkow, P.J., J.W. Janssen, and C.R. Bartram, *Clonal remissions in acute nonlymphocytic leukemia: evidence for a multistep pathogenesis of the malignancy*. Blood, 1991. **77**(7): p. 1415-7.
132. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
133. Cozzio, A., et al., *Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3029-35.
134. Huntly, B.J., et al., *MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors*. Cancer Cell, 2004. **6**(6): p. 587-96.
135. Wagner, K., et al., *Absence of the transcription factor CCAAT enhancer binding protein alpha results in loss of myeloid identity in bcr/abl-induced malignancy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6338-43.
136. Taipale, J. and P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 349-54.

137. Leung, C., et al., *Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas*. Nature, 2004. **428**(6980): p. 337-41.
138. Androutsellis-Theotokis, A., et al., *Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 823-6.
139. Lessard, J. and G. Sauvageau, *Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 255-60.
140. Altman, J., *Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats*. J Comp Neurol, 1969. **136**(3): p. 269-93.
141. Altman, J. and G.D. Das, *Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats*. J Comp Neurol, 1965. **124**(3): p. 319-35.
142. Kaplan, M.S. and D.H. Bell, *Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent-radioautographic study of granule cells in the hippocampus*. Exp Brain Res, 1983. **52**(1): p. 1-5.
143. Bayer, S.A., *Neuron production in the hippocampus and olfactory bulb of the adult rat brain: addition or replacement?* Ann N Y Acad Sci, 1985. **457**: p. 163-72.
144. Rakic, P., *Limits of neurogenesis in primates*. Science, 1985. **227**(4690): p. 1054-6.
145. Taupin, P. and F.H. Gage, *Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals*. J Neurosci Res, 2002. **69**(6): p. 745-9.
146. Tamaki, S., et al., *Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain*. J Neurosci Res, 2002. **69**(6): p. 976-86.
147. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
148. Read, T.A., et al., *The neurobiology of neurooncology*. Ann Neurol, 2006. **60**(1): p. 3-11.
149. Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, and M.S. Berger, *Neural stem cells and the origin of gliomas*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 811-22.
150. Wechsler-Reya, R. and M.P. Scott, *The developmental biology of brain tumors*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 385-428.
151. Barami, K., et al., *Relationship of gliomas to the ventricular walls*. J Clin Neurosci, 2009. **16**(2): p. 195-201.

152. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
153. Liu, H.K., et al., *The nuclear receptor tailless induces long-term neural stem cell expansion and brain tumor initiation*. Genes Dev, 2010. **24**(7): p. 683-95.
154. Alcantara Llaguno, S., et al., *Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model*. Cancer Cell, 2009. **15**(1): p. 45-56.
155. Quintana, E., et al., *Efficient tumour formation by single human melanoma cells*. Nature, 2008. **456**(7222): p. 593-8.
156. Boiko, A.D., et al., *Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271*. Nature, 2010. **466**(7302): p. 133-7.
157. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
158. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. Science, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
159. Turner, B.M., *Cellular memory and the histone code*. Cell, 2002. **111**(3): p. 285-91.
160. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
161. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature, 1978. **276**(5688): p. 565-70.
162. Struhl, G., *A gene product required for correct initiation of segmental determination in Drosophila*. Nature, 1981. **293**(5827): p. 36-41.
163. Ringrose, L. and R. Paro, *Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 413-43.
164. 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.
165. 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.

166. Core, N., et al., *Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice*. Development, 1997. **124**(3): p. 721-9.
167. del Mar Lorente, M., et al., *Loss- and gain-of-function mutations show a polycomb group function for Ring1A in mice*. Development, 2000. **127**(23): p. 5093-100.
168. 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.
169. 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.
170. Levine, S.S., I.F. King, and R.E. Kingston, *Division of labor in polycomb group repression*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(9): p. 478-85.
171. Lund, A.H. and M. van Lohuizen, *Polycomb complexes and silencing mechanisms*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(3): p. 239-46.
172. 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.
173. Kerppola, T.K., *Polycomb group complexes--many combinations, many functions*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(12): p. 692-704.
174. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
175. Bernstein, E., et al., *Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(7): p. 2560-9.
176. Fischle, W., et al., *Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1870-81.
177. Min, J., Y. Zhang, and R.M. Xu, *Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1823-8.
178. 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.

179. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
180. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 873-8.
181. Wang, J., et al., *Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene*. Nat Genet, 2001. **28**(4): p. 371-5.
182. 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.
183. Li, Z., et al., *Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(29): p. 20643-9.
184. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
185. 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.
186. 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.
187. Muller, J., et al., *Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex*. Cell, 2002. **111**(2): p. 197-208.
188. 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.
189. Ebert, A., et al., *Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in Drosophila*. Genes Dev, 2004. **18**(23): p. 2973-83.
190. 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.
191. Shen, X., et al., *EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency*. Mol Cell, 2008. **32**(4): p. 491-502.
192. Margueron, R., et al., *Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms*. Mol Cell, 2008. **32**(4): p. 503-18.

193. 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.
194. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, *Polycomb complexes and epigenetic states*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(3): p. 266-73.
195. Fritsch, C., et al., *The DNA-binding polycomb group protein pleiohomeotic mediates silencing of a Drosophila homeotic gene*. *Development*, 1999. **126**(17): p. 3905-13.
196. Brown, J.L., et al., *The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1*. *Mol Cell*, 1998. **1**(7): p. 1057-64.
197. Brown, J.L., et al., *The Drosophila pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing*. *Development*, 2003. **130**(2): p. 285-94.
198. 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.
199. 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.
200. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
201. Schuettengruber, B., et al., *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 735-45.
202. Schwartz, Y.B., et al., *Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, 2006. **38**(6): p. 700-5.
203. Dellino, G.I., et al., *Polycomb silencing blocks transcription initiation*. *Mol Cell*, 2004. **13**(6): p. 887-93.
204. Francis, N.J. and R.E. Kingston, *Mechanisms of transcriptional memory*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(6): p. 409-21.
205. Breiling, A., et al., *General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins*. *Nature*, 2001. **412**(6847): p. 651-5.

206. Papp, B. and J. Muller, *Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins*. *Genes Dev*, 2006. **20**(15): p. 2041-54.
207. 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.
208. Vire, E., et al., *The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation*. *Nature*, 2006. **439**(7078): p. 871-4.
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. 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.
211. Ringrose, L. and R. Paro, *Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity*. *Development*, 2007. **134**(2): p. 223-32.
212. Ringrose, L., et al., *Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in Drosophila melanogaster*. *Dev Cell*, 2003. **5**(5): p. 759-71.
213. Wang, L., et al., *Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes*. *Mol Cell*, 2004. **14**(5): p. 637-46.
214. Boyer, L.A., et al., *Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells*. *Nature*, 2006. **441**(7091): p. 349-53.
215. Lee, T.I., et al., *Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells*. *Cell*, 2006. **125**(2): p. 301-13.
216. Thomas, M.J. and E. Seto, *Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?* *Gene*, 1999. **236**(2): p. 197-208.
217. Caretti, G., et al., *The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation*. *Genes Dev*, 2004. **18**(21): p. 2627-38.
218. 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.
219. Ku, M., et al., *Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(10): p. e1000242.

220. Rinn, J.L., et al., *Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
221. Zhao, J., et al., *Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome*. Science, 2008. **322**(5902): p. 750-6.
222. Pandey, R.R., et al., *Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation*. Mol Cell, 2008. **32**(2): p. 232-46.
223. Bracken, A.P., et al., *Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1123-36.
224. 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.
225. Showell, C., O. Binder, and F.L. Conlon, *T-box genes in early embryogenesis*. Dev Dyn, 2004. **229**(1): p. 201-18.
226. 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.
227. Chamberlain, S.J., D. Yee, and T. Magnuson, *Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency*. Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1496-505.
228. Pasini, D., et al., *The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(10): p. 3769-79.
229. Cui, H., et al., *Bmi-1 regulates the differentiation and clonogenic self-renewal of I-type neuroblastoma cells in a concentration-dependent manner*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34696-704.
230. Roman-Trufero, M., et al., *Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B*. Stem Cells, 2009. **27**(7): p. 1559-70.
231. Pietersen, A.M. and M. van Lohuizen, *Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 201-7.
232. Boyer, L.A., et al., *Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells*. Cell, 2005. **122**(6): p. 947-56.

233. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 846-56.
234. 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.
235. 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.
236. Molofsky, A.V., et al., *Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
237. 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.
238. Kamminga, L.M., et al., *The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2170-9.
239. 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.
240. 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.
241. Cohen, K.J., et al., *Transformation by the Bmi-1 oncoprotein correlates with its subnuclear localization but not its transcriptional suppression activity*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5527-35.
242. Levy, L.S., P.A. Lobelle-Rich, and J. Overbaugh, *flvi-2, a target of retroviral insertional mutagenesis in feline thymic lymphosarcomas, encodes bmi-1*. Oncogene, 1993. **8**(7): p. 1833-8.
243. 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.
244. 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.
245. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.

246. 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.
247. 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.
248. Ruas, M. and G. Peters, *The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1378**(2): p. F115-77.
249. Serrano, M., et al., *Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality*. Cell, 1996. **85**(1): p. 27-37.
250. Sharpless, N.E., *Ink4a/Arf links senescence and aging*. Exp Gerontol, 2004. **39**(11-12): p. 1751-9.
251. Sharpless, N.E., *INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus*. Mutat Res, 2005. **576**(1-2): p. 22-38.
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. Dowdy, S.F., et al., *Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins*. Cell, 1993. **73**(3): p. 499-511.
254. Ewen, M.E., et al., *Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins*. Cell, 1993. **73**(3): p. 487-97.
255. Kato, J., et al., *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Genes Dev, 1993. **7**(3): p. 331-42.
256. Chellappan, S.P., et al., *The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein*. Cell, 1991. **65**(6): p. 1053-61.
257. Russo, A.A., et al., *Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 237-43.
258. Tanaka, H., et al., *Disruption of the RB pathway and cell-proliferative activity in non-small-cell lung cancers*. Int J Cancer, 1998. **79**(2): p. 111-5.
259. Shapiro, G.I., et al., *Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines*. Cancer Res, 1995. **55**(3): p. 505-9.

260. Otterson, G.A., et al., *Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB*. *Oncogene*, 1994. **9**(11): p. 3375-8.
261. Lukas, J., et al., *Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16*. *Nature*, 1995. **375**(6531): p. 503-6.
262. Slebos, R.J., et al., *p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(12): p. 5320-4.
263. Horton, L.E., Y. Qian, and D.J. Templeton, *G1 cyclins control the retinoblastoma gene product growth regulation activity via upstream mechanisms*. *Cell Growth Differ*, 1995. **6**(4): p. 395-407.
264. Sdek, P., et al., *MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein*. *Mol Cell*, 2005. **20**(5): p. 699-708.
265. 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.
266. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. *Cell*, 1998. **92**(6): p. 713-23.
267. Llanos, S., et al., *Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(5): p. 445-52.
268. Korgaonkar, C., et al., *ARF function does not require p53 stabilization or Mdm2 relocalization*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(1): p. 196-206.
269. Zhang, Y. and Y. Xiong, *Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53*. *Mol Cell*, 1999. **3**(5): p. 579-91.
270. Weber, J.D., et al., *Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(7): p. 2517-28.
271. Weber, J.D., et al., *Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(1): p. 20-6.
272. Stott, F.J., et al., *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2*. *EMBO J*, 1998. **17**(17): p. 5001-14.

273. 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.
274. Zhang, Y., Y. Xiong, and W.G. Yarbrough, *ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways*. Cell, 1998. **92**(6): p. 725-34.
275. Oliner, J.D., et al., *Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 857-60.
276. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1237-45.
277. Finlay, C.A., *The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(1): p. 301-6.
278. Chen, J., V. Marechal, and A.J. Levine, *Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 4107-14.
279. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
280. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
281. Honda, R., H. Tanaka, and H. Yasuda, *Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53*. FEBS Lett, 1997. **420**(1): p. 25-7.
282. Fuchs, S.Y., et al., *Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination*. Oncogene, 1998. **17**(19): p. 2543-7.
283. Li, M., et al., *Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2*. Science, 2003. **302**(5652): p. 1972-5.
284. Chatoo, W., et al., *The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity*. J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 529-42.
285. 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.
286. 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.

287. 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.
288. 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.
289. 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.
290. 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.
291. 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.
292. 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.
293. 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.
294. Fan, C., et al., *Bmi1 promotes prostate tumorigenesis via inhibiting p16(INK4A) and p14(ARF) expression*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(11): p. 642-8.
295. 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.
296. Alajez, N.M., et al., *Targeted depletion of BMI1 sensitizes tumor cells to P53-mediated apoptosis in response to radiation therapy*. Cell Death and Differentiation, 2009. **16**(11): p. 1469-79.
297. Kleihues, P., P.C. Burger, and B.W. Scheithauer, *The new WHO classification of brain tumours*. Brain Pathol, 1993. **3**(3): p. 255-68.
298. Gilbertson, R.J. and D.W. Ellison, *The origins of medulloblastoma subtypes*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 341-65.
299. Pomeroy, S.L., et al., *Neurotrophins in cerebellar granule cell development and medulloblastoma*. J Neurooncol, 1997. **35**(3): p. 347-52.

300. Salsano, E., et al., *Expression of MATH1, a marker of cerebellar granule cell progenitors, identifies different medulloblastoma sub-types*. *Neurosci Lett*, 2004. **370**(2-3): p. 180-5.
301. Yang, Z.J., et al., *Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(2): p. 135-45.
302. Schuller, U., et al., *Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(2): p. 123-34.
303. Ahn, S. and A.L. Joyner, *In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog*. *Nature*, 2005. **437**(7060): p. 894-7.
304. Fan, X. and C.G. Eberhart, *Medulloblastoma stem cells*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(17): p. 2821-7.
305. Taylor, M.D., et al., *Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(4): p. 323-35.
306. Poppleton, H. and R.J. Gilbertson, *Stem cells of ependymoma*. *Br J Cancer*, 2007. **96**(1): p. 6-10.
307. Gilbertson, R.J., et al., *ERBB receptor signaling promotes ependymoma cell proliferation and represents a potential novel therapeutic target for this disease*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(10): p. 3054-64.
308. Bailey, P. and H. Cushing, *Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1925. **11**(1): p. 82-4.
309. Kernohan, J.W., R.F. Mabon, and et al., *A simplified classification of the gliomas*. *Mayo Clin Proc*, 1949. **24**(3): p. 71-5.
310. Kleihues, P. and L.H. Sobin, *World Health Organization classification of tumors*. *Cancer*, 2000. **88**(12): p. 2887.
311. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. *Acta Neuropathol*, 2007. **114**(2): p. 97-109.
312. Kanu, O.O., et al., *Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways*. *Clin Med Oncol*, 2009. **3**: p. 39-52.

313. Legler, J.M., et al., *Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(16): p. 1382-90.
314. Hadjipanayis, C.G. and E.G. Van Meir, *Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies*. Trends Mol Med, 2009. **15**(11): p. 519-30.
315. Peiffer, J. and P. Kleihues, *Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research*. Brain Pathol, 1999. **9**(2): p. 241-5.
316. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(6): p. 479-89.
317. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
318. Godard, S., et al., *Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6613-25.
319. Furuta, M., et al., *Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme*. Oncogene, 2004. **23**(40): p. 6806-14.
320. Tso, C.L., et al., *Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups*. Cancer Res, 2006. **66**(1): p. 159-67.
321. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
322. Watanabe, K., et al., *Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas*. Brain Pathol, 1996. **6**(3): p. 217-23; discussion 23-4.
323. Mellinghoff, I.K., et al., *Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors*. N Engl J Med, 2005. **353**(19): p. 2012-24.
324. Nakamura, M., et al., *p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas*. Brain Pathol, 2001. **11**(2): p. 159-68.
325. Nakamura, M., et al., *Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas*. Lab Invest, 2001. **81**(1): p. 77-82.
326. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.

327. CGAR, *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
328. Van Meir, E.G., et al., *Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(3): p. 166-93.
329. Mizoguchi, M., et al., *Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas*. Brain Pathol, 2004. **14**(4): p. 372-7.
330. el-Deiry, W.S., *Regulation of p53 downstream genes*. Semin Cancer Biol, 1998. **8**(5): p. 345-57.
331. Vernell, R., K. Helin, and H. Muller, *Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 46124-37.
332. Zheng, H., et al., *p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1129-33.
333. Miyashita, T., et al., *Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1799-805.
334. Owen-Schaub, L.B., et al., *Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3032-40.
335. Li, Y.C., et al., *Genomic alterations in human malignant glioma cells associate with the cell resistance to the combination treatment with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(9): p. 2716-29.
336. Brennan, C., et al., *Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7752.
337. Sethi, G., B. Sung, and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 21-31.
338. Argyriou, A.A., E. Giannopoulou, and H.P. Kalofonos, *Angiogenesis and anti-angiogenic molecularly targeted therapies in malignant gliomas*. Oncology, 2009. **77**(1): p. 1-11.
339. Plate, K.H., et al., *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 845-8.
340. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4604-13.

341. Machein, M.R. and K.H. Plate, *VEGF in brain tumors*. J Neurooncol, 2000. **50**(1-2): p. 109-20.
342. Kargiotis, O., J.S. Rao, and A.P. Kyritsis, *Mechanisms of angiogenesis in gliomas*. J Neurooncol, 2006. **78**(3): p. 281-93.
343. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
344. Altaner, C., *Glioblastoma and stem cells*. Neoplasma, 2008. **55**(5): p. 369-74.
345. Galli, R., et al., *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7011-21.
346. Ignatova, T.N., et al., *Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro*. Glia, 2002. **39**(3): p. 193-206.
347. Dirks, P.B., *Brain tumour stem cells: the undercurrents of human brain cancer and their relationship to neural stem cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2008. **363**(1489): p. 139-52.
348. Son, M.J., et al., *SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(5): p. 440-52.
349. Gilbertson, R.J. and J.N. Rich, *Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(10): p. 733-6.
350. Calabrese, C., et al., *A perivascular niche for brain tumor stem cells*. Cancer Cell, 2007. **11**(1): p. 69-82.
351. Cheng, L., S. Bao, and J.N. Rich, *Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma*. Biochem Pharmacol, 2010. (e-pub)
352. Hadjipanayis, C.G. and E.G. Van Meir, *Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy*. J Mol Med, 2009. **87**(4): p. 363-74.
353. Bachoo, R.M., et al., *Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis*. Cancer Cell, 2002. **1**(3): p. 269-77.
354. Sonoda, Y., et al., *Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6674-8.

355. Holland, E.C., et al., *A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3675-85.
356. Dai, C., et al., *PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo*. Genes Dev, 2001. **15**(15): p. 1913-25.
357. Lee, J.C., M. Mayer-Proschel, and M.S. Rao, *Gliogenesis in the central nervous system*. Glia, 2000. **30**(2): p. 105-21.
358. Roy, N.S., et al., *Identification, isolation, and promoter-defined separation of mitotic oligodendrocyte progenitor cells from the adult human subcortical white matter*. J Neurosci, 1999. **19**(22): p. 9986-95.
359. Armstrong, R.C., et al., *Pre-oligodendrocytes from adult human CNS*. J Neurosci, 1992. **12**(4): p. 1538-47.
360. Finkelstein, S.D., et al., *Histological characteristics and expression of acidic and basic fibroblast growth factor genes in intracerebral xenogeneic transplants of human glioma cells*. Neurosurgery, 1994. **34**(1): p. 136-43.
361. Holland, E.C., *Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(2): p. 120-9.
362. Holland, E.C. and H.E. Varmus, *Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1218-23.
363. Holland, E.C., et al., *Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 55-7.
364. Stiles, C.D. and D.H. Rowitch, *Glioma stem cells: a midterm exam*. Neuron, 2008. **58**(6): p. 832-46.
365. Zhu, Y., et al., *Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma*. Cancer Cell, 2005. **8**(2): p. 119-30.
366. Koul, D., *PTEN signaling pathways in glioblastoma*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(9): p. 1321-5.
367. 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.

368. Bao, S., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 756-60.
369. Chekenya, M., et al., *The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling*. *Oncogene*, 2008. **27**(39): p. 5182-94.
370. Johannessen, T.C., et al., *Highly infiltrative brain tumours show reduced chemosensitivity associated with a stem cell-like phenotype*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2009. **35**(4): p. 380-93.
371. Liu, G., et al., *Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma*. *Mol Cancer*, 2006. **5**: p. 67.
372. Bao, S., et al., *Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 7843-8.
373. Miletic, H., et al., *Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms*. *Expert Opin Ther Targets*, 2009. **13**(4): p. 455-68.
374. Eyler, C.E., et al., *Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition*. *Stem Cells*, 2008. **26**(12): p. 3027-36.
375. Kanamori, M., et al., *Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme*. *J Neurosurg*, 2007. **106**(3): p. 417-27.
376. Wick, W., U. Naumann, and M. Weller, *Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(3): p. 341-9.
377. Becher, O.J., et al., *Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas*. *Cancer Res*, 2008. **68**(7): p. 2241-9.
378. Grigoryan, T., et al., *Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice*. *Genes Dev*, 2008. **22**(17): p. 2308-41.
379. de la Iglesia, N., S.V. Puram, and A. Bonni, *STAT3 regulation of glioblastoma pathogenesis*. *Curr Mol Med*, 2009. **9**(5): p. 580-90.
380. Korur, S., et al., *GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7443.

381. Ikushima, H., et al., *Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(5): p. 504-14.
382. Yoshida, Y., et al., *Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(3): p. 237-41.
383. Ligon, K.L., et al., *Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma*. *Neuron*, 2007. **53**(4): p. 503-17.
384. Piccirillo, S.G., et al., *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 761-5.
385. Hide, T., et al., *Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation*. *Cancer Res*, 2009. **69**(20): p. 7953-9.
386. Conti, A., et al., *miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors*. *J Neurooncol*, 2009. **93**(3): p. 325-32.
387. Gal, H., et al., *MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **376**(1): p. 86-90.
388. Silber, J., et al., *miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells*. *BMC Med*, 2008. **6**: p. 14.
389. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. *Nature*, 1993. **362**(6422): p. 709-15.
390. Lodish H, B.A., Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. , *Molecular Biologie of thé Cell*. 5th de. ed. 2004, New York: WH Freina.
391. Loeb, L.A., *Apurinic sites as mutagenic intermediates*. *Cell*, 1985. **40**(3): p. 483-4.
392. Schaaper, R.M., T.A. Kunkel, and L.A. Loeb, *Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(2): p. 487-91.
393. Sobol, R.W., et al., *Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 39951-9.
394. Izumi, T., et al., *Two essential but distinct functions of the mammalian abasic endonuclease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(16): p. 5739-43.

395. Duncan, B.K. and J.H. Miller, *Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA*. Nature, 1980. **287**(5782): p. 560-1.
396. Yonekura, S., et al., *Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA*. J Radiat Res (Tokyo), 2009. **50**(1): p. 19-26.
397. Krokan, H.E., F. Drablos, and G. Slupphaug, *Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair*. Oncogene, 2002. **21**(58): p. 8935-48.
398. Kvam, E. and R.M. Tyrrell, *Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation*. Carcinogenesis, 1997. **18**(12): p. 2379-84.
399. Douki, T., et al., *Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation*. Biochemistry, 2003. **42**(30): p. 9221-6.
400. Cadet, J., et al., *Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation*. Photochem Photobiol Sci, 2009. **8**(7): p. 903-11.
401. Hsu, G.W., et al., *Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase*. Nature, 2004. **431**(7005): p. 217-21.
402. Lutz, W.K., *Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis*. Mutat Res, 1990. **238**(3): p. 287-95.
403. O'Brien, P.J. and T. Ellenberger, *The Escherichia coli 3-methyladenine DNA glycosylase AlkA has a remarkably versatile active site*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 26876-84.
404. O'Brien, P.J. and T. Ellenberger, *Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9750-7.
405. Douki, T. and J. Cadet, *Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions*. Biochemistry, 2001. **40**(8): p. 2495-501.
406. Cadet, J., E. Sage, and T. Douki, *Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA*. Mutat Res, 2005. **571**(1-2): p. 3-17.
407. Brash, D.E., et al., *A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10124-8.
408. You, Y.H., et al., *Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44688-94.

409. Matsumura, Y. and H.N. Ananthaswamy, *Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **195**(3): p. 298-308.
410. Mitchell, D.L. and R.S. Nairn, *The biology of the (6-4) photoproduct*. Photochem Photobiol, 1989. **49**(6): p. 805-19.
411. O'Driscoll, M. and P.A. Jeggo, *The role of double-strand break repair - insights from human genetics*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(1): p. 45-54.
412. Petersen, S., et al., *AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching*. Nature, 2001. **414**(6864): p. 660-5.
413. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
414. Jackson, S.P., *Sensing and repairing DNA double-strand breaks*. Carcinogenesis, 2002. **23**(5): p. 687-96.
415. Leuther, K.K., et al., *Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA*. EMBO J, 1999. **18**(5): p. 1114-23.
416. Hammarsten, O. and G. Chu, *DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 525-30.
417. Hammarsten, O., L.G. DeFazio, and G. Chu, *Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends*. J Biol Chem, 2000. **275**(3): p. 1541-50.
418. Hartley, K.O., et al., *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product*. Cell, 1995. **82**(5): p. 849-56.
419. Petrini, J.H. and T.H. Stracker, *The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(9): p. 458-62.
420. Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson, *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 605-11.
421. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
422. Lou, Z., et al., *MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals*. Mol Cell, 2006. **21**(2): p. 187-200.

423. Kolas, N.K., et al., *Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase*. Science, 2007. **318**(5856): p. 1637-40.
424. Schultz, L.B., et al., *p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks*. J Cell Biol, 2000. **151**(7): p. 1381-90.
425. Lukas, J., C. Lukas, and J. Bartek, *Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 997-1007.
426. Riballo, E., et al., *A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci*. Mol Cell, 2004. **16**(5): p. 715-24.
427. Berkovich, E., R.J. Monnat, Jr., and M.B. Kastan, *Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 683-90.
428. Sun, Y., et al., *A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13182-7.
429. Uziel, T., et al., *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage*. EMBO J, 2003. **22**(20): p. 5612-21.
430. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-68.
431. Cortez, D., et al., *ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1713-6.
432. Brown, E.J. and D. Baltimore, *ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 397-402.
433. Hekmat-Nejad, M., et al., *Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint*. Curr Biol, 2000. **10**(24): p. 1565-73.
434. Petermann, E. and K.W. Caldecott, *Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase*. Cell Cycle, 2006. **5**(19): p. 2203-9.
435. Petermann, E., et al., *Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(8): p. 3319-26.

436. Petermann, E., M. Woodcock, and T. Helleday, *Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2010. **107**(37): p. 16090-5.
437. Dart, D.A., et al., *Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16433-40.
438. Niida, H., et al., *Depletion of Chk1 leads to premature activation of Cdc2-cyclin B and mitotic catastrophe*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39246-52.
439. Casper, A.M., et al., *ATR regulates fragile site stability*. Cell, 2002. **111**(6): p. 779-89.
440. Syljuasen, R.G., et al., *Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(9): p. 3553-62.
441. Nyberg, K.A., et al., *Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints*. Annu Rev Genet, 2002. **36**: p. 617-56.
442. Shechter, D., V. Costanzo, and J. Gautier, *Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 901-8.
443. Fanning, E., V. Klimovich, and A.R. Nager, *A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(15): p. 4126-37.
444. Lee, J., A. Kumagai, and W.G. Dunphy, *The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28036-44.
445. Delacroix, S., et al., *The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1*. Genes Dev, 2007. **21**(12): p. 1472-7.
446. Kumagai, A., et al., *TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex*. Cell, 2006. **124**(5): p. 943-55.
447. Sanchez, Y., et al., *Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1497-501.
448. Smits, V.A., P.M. Reaper, and S.P. Jackson, *Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response*. Curr Biol, 2006. **16**(2): p. 150-9.

449. Pichierri, P., F. Rosselli, and A. Franchitto, *Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle*. *Oncogene*, 2003. **22**(10): p. 1491-500.
450. Davies, S.L., et al., *Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(3): p. 1279-91.
451. Wu, X., et al., *ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation*. *Oncogene*, 2007. **26**(5): p. 757-64.
452. Jazayeri, A., et al., *ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(1): p. 37-45.
453. Yoo, H.Y., et al., *Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(24): p. 17501-6.
454. Tibbetts, R.S., et al., *Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress*. *Genes Dev*, 2000. **14**(23): p. 2989-3002.
455. Siliciano, J.D., et al., *DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53*. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3471-81.
456. Cortez, D., et al., *Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks*. *Science*, 1999. **286**(5442): p. 1162-6.
457. Tibbetts, R.S., et al., *A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53*. *Genes Dev*, 1999. **13**(2): p. 152-7.
458. O'Driscoll, M., et al., *A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome*. *Nat Genet*, 2003. **33**(4): p. 497-501.
459. Stivers, J.T. and Y.L. Jiang, *A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases*. *Chem Rev*, 2003. **103**(7): p. 2729-59.
460. Berti, P.J. and J.A. McCann, *Toward a detailed understanding of base excision repair enzymes: transition state and mechanistic analyses of N-glycoside hydrolysis and N-glycoside transfer*. *Chem Rev*, 2006. **106**(2): p. 506-55.
461. Liu, D., et al., *Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under ischemic conditions*. *J Cereb Blood Flow Metab*.

462. Radicella, J.P., et al., *Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8010-5.
463. Dizdaroglu, M., et al., *Excision of products of oxidative DNA base damage by human NTH1 protein*. Biochemistry, 1999. **38**(1): p. 243-6.
464. Svejstrup, J.Q., *Rescue of arrested RNA polymerase II complexes*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 3): p. 447-51.
465. Batty, D.P. and R.D. Wood, *Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA*. Gene, 2000. **241**(2): p. 193-204.
466. Hsieh, P. and K. Yamane, *DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(7-8): p. 391-407.
467. Dalhus, B., et al., *DNA base repair--recognition and initiation of catalysis*. FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(6): p. 1044-78.
468. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 39-85.
469. Cleaver, J.E., *Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(7): p. 564-73.
470. Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, *DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 1039-56.
471. Hartlerode, A.J. and R. Scully, *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. Biochem J, 2009. **423**(2): p. 157-68.
472. West, S.C., *Molecular views of recombination proteins and their control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 435-45.
473. Lieber, M.R., *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 181-211.
474. Lieber, M.R., *The mechanism of human nonhomologous DNA end joining*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 1-5.
475. Ma, Y., et al., *Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination*. Cell, 2002. **108**(6): p. 781-94.

476. Ma, Y., K. Schwarz, and M.R. Lieber, *The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps*. DNA Repair (Amst), 2005. **4**(7): p. 845-51.
477. Yannone, S.M., et al., *Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double-strand break ends by Artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(10): p. 3354-65.
478. Meek, K., V. Dang, and S.P. Lees-Miller, *DNA-PK: the means to justify the ends?* Adv Immunol, 2008. **99**: p. 33-58.
479. Mahaney, B.L., K. Meek, and S.P. Lees-Miller, *Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining*. Biochem J, 2009. **417**(3): p. 639-50.
480. Goodarzi, A.A., et al., *DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity*. EMBO J, 2006. **25**(16): p. 3880-9.
481. Lobrich, M. and P.A. Jeggo, *Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow*. DNA Repair (Amst), 2005. **4**(7): p. 749-59.
482. Huertas, P., *DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 11-6.
483. Caldecott, K.W., *Single-strand break repair and genetic disease*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(8): p. 619-31.
484. Walker, M.D., T.A. Strike, and G.E. Sheline, *An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1979. **5**(10): p. 1725-31.
485. Lomonaco, S.L., et al., *The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells*. Int J Cancer, 2009. **125**(3): p. 717-22.
486. Saunders, L.R. and E. Verdin, *Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5489-504.
487. Potente, M., et al., *SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2644-58.
488. Wang, C., et al., *Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 1025-31.
489. Sun, Y., et al., *Downregulation of Sirt1 by antisense oligonucleotides induces apoptosis and enhances radiation sensitization in A549 lung cancer cells*. Lung Cancer, 2007. **58**(1): p. 21-9.

490. Chang, C.J., et al., *Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **380**(2): p. 236-42.
491. 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.
492. Singh, S.K., et al., *Cancer stem cells in nervous system tumors*. *Oncogene*, 2004. **23**(43): p. 7267-73.
493. Shakhova, O., C. Leung, and S. Marino, *Bmi1 in development and tumorigenesis of the central nervous system*. *J Mol Med*, 2005. **83**(8): p. 596-600.
494. Li, A., et al., *Genomic changes and gene expression profiles reveal that established glioma cell lines are poorly representative of primary human gliomas*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(1): p. 21-30.
495. Reynolds, B.A. and A.L. Vescovi, *Brain cancer stem cells: Think twice before going flat*. *Cell Stem Cell*, 2009. **5**(5): p. 466-7; author reply 468-9.
496. Hori, J., et al., *Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts*. *Stem Cells*, 2003. **21**(4): p. 405-16.
497. Mammolenti, M., et al., *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 Cells*, 2004. **22**(6): p. 1101-10.
498. Ubiali, F., et al., *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*, 2007. **19**(9): p. 1063-74.
499. Facchetti, A., et al., *Human leukocyte antigen and antigen processing machinery component defects in astrocytic tumors*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(23): p. 8304-11.
500. Zagzag, D., et al., *Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain*. *Lab Invest*, 2005. **85**(3): p. 328-41.
501. Fasano, C.A., et al., *Bmi-1 cooperates with Foxg1 to maintain neural stem cell self-renewal in the forebrain*. *Genes Dev*, 2009. **23**(5): p. 561-74.

502. Fasano, C.A., et al., *shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**: p. 87-99.
503. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 805-16.
504. Kippin, T.E., D.J. Martens, and D. van der Kooy, *p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity*. *Genes Dev*, 2005. **19**(6): p. 756-67.
505. Saramaki, A., et al., *Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(2): p. 543-54.
506. Subkhankulova, T., et al., *Bmi1 directly represses p21(Waf1/Cip1) in Shh-induced proliferation of cerebellar granule cell progenitors*. *Mol Cell Neurosci*, 2010 (epub)
507. Ramsey, M.R., et al., *Expression of p16Ink4a compensates for p18Ink4c loss in cyclin-dependent kinase 4/6-dependent tumors and tissues*. *Cancer Res*, 2007. **67**(10): p. 4732-41.
508. Wiedemeyer, R., et al., *Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development*. *Cancer Cell*, 2008. **13**(4): p. 355-64.
509. Greer, E.L. and A. Brunet, *FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7410-25.
510. Bruggeman, S.W., D. Hulsman, and M. van Lohuizen, *Bmi1 deficient neural stem cells have increased integrin dependent adhesion to self-secreted matrix*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(5): p. 351-60.
511. Bhoopathi, P., et al., *Blockade of tumor growth due to matrix metalloproteinase-9 inhibition is mediated by sequential activation of beta1-integrin, ERK, and NF-kappaB*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(3): p. 1545-52.
512. Huen, M.S., et al., *RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 901-14.
513. Stewart, G.S., et al., *The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage*. *Cell*, 2009. **136**(3): p. 420-34.
514. Karmakar, P., et al., *BLM is an early responder to DNA double-strand breaks*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **348**(1): p. 62-9.

515. Mortusewicz, O., et al., *Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(25): p. 8905-9.
516. Negishi, M., et al., *Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process*. Genes Cells, 2009. **14**(11): p. 1347-57.
517. Haince, J.F., et al., *PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1197-208.
518. Mortusewicz, O., et al., *Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(22): p. 7665-75.
519. Ayoub, N., et al., *HPI-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 682-6.
520. Ringrose, L., H. Ehret, and R. Paro, *Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes*. Mol Cell, 2004. **16**(4): p. 641-53.
521. Goodarzi, A.A., et al., *ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin*. Mol Cell, 2008. **31**(2): p. 167-77.
522. Ismail, I.H., et al., *BMII-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair*. J Cell Biol, 2010. **191**(1): p. 45-60.
523. Alchanati, I., et al., *The E3 ubiquitin-ligase Bmi1/Ring1A controls the proteasomal degradation of Top2alpha cleavage complex - a potentially new drug target*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8104.

